

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JOSÉ PEDRO ZANETTI PRADO

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

Poços de Caldas/MG

2021

JOSÉ PEDRO ZANETTI PRADO

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE
Aspergillus oryzae IPT-301 EM SÍLICA GEL PURA E FUNCIONALIZADA PARA
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: Dr. Alfredo Eduardo Maiorano

Poços de Caldas/MG

2021

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

Prado, José Pedro Zanetti.
P896i Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de
Aspergillus oryzae IPT-301 em sílica gel pura e funcionalizada para
produção de frutooligossacarídeos / José Pedro Zanetti Prado. –
Poços de Caldas/MG, 2021.

104 f. –

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade
Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2021.
Bibliografia.

1. *Aspergillus oryzae*. 2. Sílica gel. 3. Glutaral. I. Perna, Rafael
Firmani. II. Título.

CDD – 660

JOSÉ PEDRO ZANETTI PRADO

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE
ASPERGILLUS ORYZAE IPT-301 EM SÍLICA GEL PURA E FUNCIONALIZADA
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: 07 de outubro de 2021

Prof. Dr. Rafael Firmani Perna
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Cleide Mara Faria Soares
Instituição: Universidade Tiradentes

Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales
Instituição: Universidade Federal do Tocantins



Documento assinado eletronicamente por **Cleide Mara Faria Soares, Usuário Externo**, em 08/10/2021, às 08:10, 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 **Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior**, em 08/10/2021, às 08:17, 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 **Sergio Andres Villalba Morales, Usuário Externo**, em 08/10/2021, às 08:31, 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 **0610413** e o código CRC **9B10538E**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos, que de forma direta ou indireta, possibilitaram a realização deste trabalho.

Agradeço meu orientador, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, pela parceria e confiança dedicada a mim para realização desta pesquisa, junto ao IPT pelo fornecimento de materiais indispensáveis ao trabalho.

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

Aos meus parceiros de pesquisas pela parceria, conversas e ajudas.

Aos mestres Larissa Lemos Faria, Josivan de Sousa Cunha e Rogério Lopes Garcia por todo ensinamento que me passaram.

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

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

Aos técnicos e funcionários da UNIFAL-MG, Campus Poços de Caldas, que sempre estiveram dispostos a colaborar para o andamento da pesquisa.

A Giovana Pazotti Nogueira que foi minha parceira e confidente de todas as horas, e sempre me forneceu apoio para que conseguisse dar andamento a pesquisa em momentos difíceis como a pandemia do novo coronavírus.

Aos meus familiares pelo total apoio destinado a mim.

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

“O conhecimento científico é, às vezes, desagradável; amiúde contradiz os clássicos (sobretudo se é novo); ocasionalmente, tortura o senso comum e humilha a intuição. Por último, pode ser conveniente para alguns e não para outros. ”

(Mario Bunge)

RESUMO

Frutooligossacarídeos (FOS) são açúcares prebióticos de baixa caloria, não cariogênicos, podendo ser consumidos por diabéticos e, por não serem hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais, promovem a seletividade das bactérias probióticas na microbiota intestinal, auxiliando na eliminação de microrganismos patogênicos e na prevenção do câncer de cólon. São comercialmente produzidos por enzimas microbianas como a frutossiltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) utilizando a sacarose como substrato. A imobilização destas enzimas em suportes porosos, permite aumentar a estabilidade enzimática, reutilizar o biocatalisador e proteger a enzima de condições adversas do meio reacional. Diante disso, este trabalho teve como objetivo imobilizar, por adsorção física e ligação covalente, a FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel, pura (sem tratamento) e funcionalizada com glutaraldeído, visando obter um biocatalisador heterogêneo ativo e estável para a produção de FOS. Avaliou-se as estabilidades térmica, frente ao pH de incubação, operacional e de armazenamento da enzima imobilizada, bem como os perfis cinéticos do biocatalisador. As melhores condições obtidas para a imobilização de FTase em sílica gel pura (35 °C, pH 5,5 e 175 rpm) e em sílica gel funcionalizada com glutaraldeído foram empregadas para se determinar o rendimento de imobilização (RI) e a atividade recuperada (AR). Para a FTase imobilizada em sílica gel pura, alcançou-se valores de RI e AR iguais a 13 % e 10 %, respectivamente, ao passo que, para a enzima imobilizada no suporte funcionalizado, foram obtidos RI de 38 % e AR de 7,5 %.

A enzima imobilizada em ambos os suportes apresentou comportamento cinético descrito pelo modelo cooperativo de Hill, cujos maiores valores de atividade foram obtidos para uma faixa de concentração de substrato compreendida entre 400 g L⁻¹ e 600 g L⁻¹. A FTase imobilizada em sílica gel funcionalizada mostrou maior capacidade de reutilização ao longo de 8 ciclos reacionais consecutivos, além de exibir maiores estabilidades térmica, de armazenamento e frente ao pH em relação ao biocatalisador adsorvido no suporte puro. Os resultados obtidos sugerem um alto potencial de aplicação da sílica gel funcionalizada como suporte de imobilização de FTase para a produção de FOS.

Palavras-chave: *Aspergillus*; frutossiltransferase; imobilização; sílica-gel; glutaraldeído; frutooligossacarídeos.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are low-calorie, non-cariogenic prebiotic sugars that can be consumed by diabetics and, as they are not hydrolyzed by gastrointestinal enzymes, they promote the selectivity of probiotic bacteria in the intestinal microbiota, helping to eliminate pathogenic microorganisms and prevent cancer of colon. They are commercially produced by microbial enzymes such as fructosyltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) using sucrose as substrate. The immobilization of these enzymes on porous supports, allows to increase the enzymatic stability, to reuse the biocatalyst and to protect the enzyme from adverse conditions of the reaction medium. Therefore, this work aimed to immobilize, by physical adsorption and covalent bonding, the extracellular FTase of *Aspergillus oryzae* IPT-301 on silica gel, pure (untreated) and functionalized with glutaraldehyde, in order to obtain an active and stable heterogeneous biocatalyst for FOS production. The thermal stability, against the incubation, operational and storage pH of the immobilized enzyme, as well as the kinetic profiles of the biocatalyst, were evaluated. The best conditions obtained for the immobilization of FTase on pure silica gel (35 °C, pH 5.5 and 175 rpm) and on silica gel functionalized with glutaraldehyde were used to determine the immobilization yield (RI) and the recovered activity (AR). For the FTase immobilized on pure silica gel, RI and AR values equal to 13% and 10%, respectively, were reached, while for the enzyme immobilized on the functionalized support, an RI of 38% and an AR of 7, were obtained. 5%. The enzyme immobilized on both supports showed kinetic behavior described by the Hill corporate model, whose highest activity values were obtained for a substrate concentration range between 400 g L⁻¹ and 600 g L⁻¹. FTase immobilized on functionalized silica gel showed greater reuse capacity over 8 consecutive reaction cycles, in addition to exhibiting greater thermal, storage and pH stability compared to the biocatalyst adsorbed on the pure support. The results obtained suggest a high potential for the application of functionalized silica gel as an FTase immobilization support for the production of FOS.

Keywords: *Aspergillus*; fructosyltransferase; immobilization; sílice; glutaraldehído; fructooligosaccharides.

Figura 1 — Moléculas de (A) Sacarose;(B) Kestose;(C) Nistose; (D) Frutofuranosil nistose	22
Figura 2 — Reação de transfrutosilação	28
Figura 3 — Micrografias eletrônicas de amostras de partículas de sílica gel	58
Figura 4 — Espectro de infravermelho por transformada de Fourier das amostras A (sílica gel na ausência da enzima), B (sílica gel pura contendo a enzima imobilizada) e C (sílica gel funcionalizada contendo a enzima imobilizada)	60
Figura 5 — Diagrama de Pareto obtido para a variável resposta Rendimento de Imobilização (RI). X1 - temperatura (em °C), X2 – pH de imobilização e X3 - velocidade de agitação (em rpm)	64
Figura 6 — Diagrama de Pareto obtido para a variável resposta Atividade Recuperada (AR). X1 - temperatura (em °C), X2 – pH de imobilização e X3 - velocidade de agitação(em rpm).....	64
Figura 7 — Influência da concentração de substrato na atividade de transfrutosilação para a FTase extracelular imobilizada nos suportes sílica gel pura e funcionalizada. A atividade máxima foi definida como 100 % de atividade relativa	70
Figura 8 — Ajuste dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e de Hill aos dados experimentais de atividade de transfrutosilação da enzima FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em sílica gel pura.....	72
Figura 9 — Ajuste dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e de Hill aos dados experimentais de atividade de transfrutosilação da enzima FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em sílica gel funcionalizada.....	72
Figura 10 — Estabilidade térmica da FTase de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em sílica-gel pura ao decorrer de 16 h de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). Condições reacionais: solução de sacarose 47 % (m v ⁻¹) em tampão tris-acetat.....	75
Figura 11 — Estabilidade térmica da FTase de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em sílica-gel funcionalizada ao decorrer de 16 h de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). Condições reacionais: solução de sacarose 47 % (m v ⁻¹) em tampão t.....	76
Figura 12 — Determinação da energia de ativação para a denaturação térmica	

(E _D). A equação de Arrhenius de ln (k _D) versus (T ⁻¹) foi utilizada para estimar E _D da Ftase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 immobilizada em sílica-gel funcionalizada com glutaraldeído.....	77
Figura 13 — Determinação da energia de ativação para a denaturação térmica (E _D). A equação de Arrhenius de ln (k _D) versus (T ⁻¹) foi utilizada para estimar E _D da FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 immobilizada em sílica-gel pura	77
Figura 14 — Estabilidade da enzima FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 immobilizada em sílica-gel pura e funcionalizada após 24 h de incubação a 4 °C para diferentes valores de pH. Condições reacionais: solução de sacarose 47 % (m v ⁻¹), 190 rpm, tampão tris-acetato.....	81
Figura 15 — Estabilidade operacional da enzima FTase de <i>A. oryzae</i> IPT-301 immobilizada em sílica-gel pura e funcionalizada avaliada durante ciclos reacionais consecutivos em batelada. A atividade máxima (3,95 ± 0,23 U g ⁻¹) foi definida como 100 % de atividade relativa	81
Figura 16 — Estabilidade frente ao armazenamento da FTase de <i>A. oryzae</i> IPT-301 immobilizada em sílica gel pura e funcionalizada. A atividade máxima (6,89 ± 0,75 U g ⁻¹) foi definida como 100 % de atividade relativa	85
Figura 17 — Curva analítica obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação da concentração de açúcares redutores (AR)	104
Figura 18 — Curva analítica obtida pelo método GOD-PAP para a determinação das concentrações de glicose (G)	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Teor de FOS em algumas plantas e vegetais	24
Tabela 2 — Classificação das enzimas	26
Tabela 3 — Matriz de planejamento experimental tipo DCC	50
Tabela 4 — Caracterização de partículas de sílica gel pura e funcionalizada, obtida pelos métodos BET e BJH	59
Tabela 5 — Matriz do Delineamento do tipo composto central de 11 ensaios para as respostas rendimento de imobilização e atividade recuperada com valores dos fatores reais e codificados	62
Tabela 6 — Coeficientes de regressão para a variável resposta Y1 (rendimento de imobilização).....	65
Tabela 7 — Coeficientes de regressão para a variável resposta Y2 (atividade recuperada)	65
Tabela 8 — Dados de ANOVA para a variável resposta RI (Y1).....	66
Tabela 9 — Dados de ANOVA para a variável resposta AR (Y2).....	67
Tabela 10 — Parâmetros de imobilização calculados para a FTase extracelular adsorvida nos suportes sílica-gel pura e funcionalizada.....	68
Tabela 11 — Parâmetros cinéticos obtidos para a FTase de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em sílica-gel pura (P) e funcionalizada (F).....	73
Tabela 12 — Parâmetros termodinâmicos para a FTase imobilizada em sílica gel pura e funcionalizada para diferentes temperaturas de incubação.....	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Frutooligossacarídeos	21
3.1.1 Estrutura química e classificação	21
3.1.2 Benefícios do FOS	23
3.1.3 Síntese	23
3.2 Frutossiltransferase	25
3.2.1 Atividade de transfrutossilatação	27
3.3 Imobilização de Enzimas	28
3.3.1 Métodos de Imobilização	28
3.3.1.1 Método de ligação iônica	29
3.3.1.2 Método de ligação covalente	29
3.3.1.3 Método de encapsulação	30
3.3.1.4 Método de adsorção	31
3.3.2 Tipos de Suporte	31
3.3.3 Sílica-Gel	33
3.3.4 Glutaraldeído	34
3.4 Imobilização da FTase extracelular	36
3.5 Parâmetros de imobilização	37
3.5.1 Seleção e otimização dos parâmetros de imobilização	38
3.6 Estabilidade Térmica	39
3.7 Estabilidade frente ao pH	41
3.8 Influência da concentração de substrato	42
3.8.1. Modelo de Michaelis-Menten	42
3.8.2. Modelo de Hill	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45

4.1 Pré-tratamento e funcionalização do suporte	45
4.2 Produção da enzima extracelular microbiana	45
4.2.1 Micro-organismos e condições de cultivo	45
4.2.2 Cultivo celular submerso	46
4.3 Ensaio de imobilização enzimática	46
4.3.1 Parâmetros de imobilização	47
4.3.2 Planejamento experimental.....	47
4.4 Caracterização física e química do biocatalisador.	48
4.5 Caracterização bioquímica da enzima imobilizada	49
4.5.1 Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e determinação dos parâmetros cinéticos	50
4.5.2 Ensaio de estabilidade térmica e determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	51
4.5.3 Ensaio de estabilidade frente ao pH de incubação	53
4.5.4 Ensaio de estabilidade operacional	53
4.5.5 Ensaio de estabilidade de armazenamento	53
4.6 Métodos Analíticos	54
4.6.1 Determinação das atividades enzimáticas.....	54
4.6.2 Quantificação dos açúcares	54
4.6.2.1 <i>Determinação da concentração de açúcares redutores</i>	54
4.6.2.2 <i>Determinação da concentração de glicose</i>	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Caracterização físico-química do biocatalisador imobilizado	57
5.2 Otimização dos parâmetros de imobilização	61
5.3 Parâmetros de imobilização da Ftase imobilizada em sílica gel e em sílica gel funcionalizada com glutaraldeído	68
5.4 Influência da concentração de sacarose na atividade enzimática e parâmetros cinéticos	70
5.5 Estabilidade térmica da enzima imobilizada em sílica-gel e imobilizada em sílica gel funcionalizada	74
5.6 Efeito do pH na estabilidade da enzima imobilizada	80
5.7 Estabilidade operacional da enzima imobilizada	84
5.8 Estabilidade frente ao armazenamento da enzima imobilizada	85

6 CONCLUSÃO	87
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	88
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICE A — DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES E GLICOSE	104

1 INTRODUÇÃO

A mudança de hábitos alimentares tem despertado, na indústria de alimentos, o interesse pela pesquisa, desenvolvimento e produção de edulcorantes funcionais, das quais constituem, atualmente, a composição nutricional de diversos produtos introduzidos no mercado. Os frutooligossacarídeos (FOS), desde então, tem melhor representado essa classe de açúcares “não convencionais” e, portanto, mostrado maior relevância industrial para a saúde e nutrição humana (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020).

Os FOS são oligômeros de frutose constituídos, principalmente, por kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose. Esses açúcares, de baixa caloria, são classificados como prebióticos, não são cariogênicos, podem ser consumidos seguramente por diabéticos, aumentam a absorção de cálcio e magnésio pelo organismo humano e, por não serem hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais, promovem a seletividade bacteriana na microbiota intestinal, auxiliando na eliminação de microrganismos patogênicos e na prevenção do câncer de cólon (JITONNOM *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2017). Os FOS, ainda, auxiliam na redução dos níveis séricos totais de colesterol e no tratamento de doenças como a anemia, hipertensão arterial e insuficiência renal (JITONNOM *et al.*, 2018; PASSOS *et al.*, 2003).

De acordo com Wang (2015), os processos enzimáticos são preferidos para a produção dos oligossacarídeos, podendo ser produzidos mediante reação de transfrutossilacção de moléculas de sacarose, catalisadas por enzimas de origem microbiana como as frutossiltransferases (FTase, E.C.2.4.1.9) as quais apresentam elevada atividade de transfrutossilacção (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; FLORES-MALTOS *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; PERNA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021). As FTases são sintetizadas, majoritariamente, por fungos dos gêneros *Aureobasidium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (ANTOSOVÁ *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2017). Especificamente, o *Aspergillus oryzae* IPT-301 tem sido reportado como fonte potencialmente produtora de FTase extracelular (enzima excretada para o meio

de cultura) com elevada atividade de transfrutossilagem dentre as dezessete linhagens de fungos filamentosos avaliadas (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007).

A abundância de matéria-prima (sacarose), o alto valor agregado ao produto de interesse (FOS) e, principalmente, o potencial de mercado mundial de FOS, estimado em U\$\$ 344 milhões com perspectiva de crescimento de 13,1 % entre os anos de 2018 a 2022, tornam a produção industrial atrativa para esse açúcar (MORDOR INTELLIGENCE, 2017). No entanto, o Brasil ainda não oferece tecnologia eficaz para a sua produção em larga escala que corresponda à demanda existente, suprida por importações. Os custos relacionados à produção enzimática e ao rendimento reacional continuam desafiadores frente ao escalonamento do processo. O uso de enzimas requer a recuperação e a reutilização destas para tornar o processo economicamente viável (SOUZA *et al.* 2017).

A produção de FOS com FTase solúvel pode gerar altos custos de síntese e purificação da enzima, instabilidade da sua estrutura tridimensional e possível perda de atividade devido às condições do processo ou inibição pelo substrato ou produto. Portanto, a imobilização enzimática é feita a fim de que a atividade catalítica da enzima não seja afetada negativamente, deixando-a mais protegida contra mudanças drásticas de temperatura e pH, bem como permitindo o seu reuso em processos contínuos e/ou bateladas, reduzindo a contaminação e o custo de operação.

Portanto, a aplicação de FTases imobilizadas pode se tornar uma alternativa promissora frente às problemáticas levantadas. A imobilização consiste em confinar, física ou quimicamente, a enzima a um suporte sólido insolúvel em meio aquoso ou solvente orgânico, obtendo-se um biocatalisador heterogêneo (derivado) com elevada atividade, especificidade, seletividade e estabilidade (DWEVEDI, 2016). Desta forma, a imobilização tem sido considerada a técnica mais promissora para tornar competitiva a aplicação de enzimas no setor industrial (SOUZA *et al.*, 2017).

A aplicação de enzimas imobilizadas permite a obtenção de biocatalisadores heterogêneos mais robustos e resistentes às mudanças do ambiente reacional (aumento da estabilidade enzimática), sua reutilização e facilidade de separação do produto, além da possibilidade de implementar e

conduzir processos contínuos (SHELDON, 2007; SOUZA *et al.*, 2017). Deve-se escolher o suporte observando a maior retenção de atividade enzimática. É preferível que o material do suporte seja facilmente encontrado e que não libere substâncias tóxicas no meio reacional, bem como apresente durabilidade, densidade, porosidade, além de facilidade para limpeza e esterilização (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

Entre os numerosos suportes relatados para imobilização de enzimas por adsorção, a sílica gel tem sido identificada como um suporte promissor nos processos de imobilização, pois além de ser encontrada em abundância na natureza e se apresentar como um material de baixo custo, engloba todas as características de um suporte inorgânico, destacando-se pela sua alta resistência mecânica, estabilidade térmica e química e, principalmente, elevada área superficial específica (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

Existem poucos estudos sobre a imobilização da FTase extracelular em suportes orgânicos e inorgânicos. Yun *et al.* (1996) imobilizaram a FTase de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10542 em uma resina altamente porosa Diaion HPA 25®. A enzima imobilizada apresentou maior resistência às variações de pH do que a enzima solúvel e apresentou alta atividade enzimática por 30 dias a 50 °C. Além disso, a temperatura ideal (55 °C) e o pH (5,5) para a produção de FOS não foram modificados pelo processo de imobilização Ghazi *et al.* (2006) relataram alta atividade operacional de enzimas comerciais com atividade de transfrutoseilação (Pectinex UltraSP-L e Rapidase TF) imobilizadas em suportes à base de polimetacrilato. Platková *et al.* (2006) relataram a imobilização de FTases de *Aureobasidium pullulans* em vários materiais comerciais. As FTases imobilizadas no Dowex Marathon MSA (estireno-DVB macro poroso) e Amberlite IRA 900® (estireno-DVB) apresentaram as maiores atividades específicas (1268 U g⁻¹ e 1169 U g⁻¹, respectivamente). Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) imobilizaram FTase extracelular de *Rhodotorula sp.*, por adsorção, em minério de nióbio. Segundo os autores, a enzima imobilizada apresentou alta atividade de transfrutoseilação e estabilidades térmica e frente ao pH satisfatórias, com conversão de 58 % de sacarose em FOS.

A superfície do suporte pode, ainda, ser funcionalizada com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima, conferindo maior resistência e rigidez à estrutura do biocatalisador heterogêneo

perante agentes denaturantes (calor, solventes orgânicos e pH extremos), além de minimizar o fenômeno de dessorção da enzima no suporte e possibilitar o seu uso em diferentes configurações de reatores (MENDES *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2017). O glutaraldeído é um dos reagentes mais utilizados na funcionalização de suportes e/ou como braço espaçador devido à simplicidade dos métodos de ativação empregados e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis (BARBOSA *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2013; PAULA *et al.*, 2008). A molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima, sendo essa imobilizada com ligações covalentes no suporte através de reação com seus grupos aminos que se ligam, por sua vez, aos grupos aldeídos do suporte funcionalizado (SOUZA *et al.*, 2017).

Neste contexto, o presente trabalho propôs imobilizar a enzima FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 em suporte sílica gel, pura e funcionalizada com glutaraldeído, visando obter um biocatalizador heterogêneo robusto que apresente expressiva atividade enzimática, seletividade e especificidade, além de elevada estabilidade, especialmente térmica e operacional, de modo a ser empregado em diferentes configurações de reatores para a síntese de FOS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Imobilizar a enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-

301 em sílica gel, pura e funcionalizada com glutaraldeído, visando obter um biocatalisador heterogêneo ativo e estável para a produção de frutooligossacarídeos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar o material de suporte, sílica gel, para a imobilização de FTase extracelular por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), área superficial específica (BET) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR);
- b) Funcionalizar o suporte sílica gel com glutaraldeído por meio da inserção de grupos funcionais na superfície do material visando aumentar a imobilização da enzima;
- c) Imobilizar a enzima FTase extracelular produzida por cultivo celular submerso, em sílica gel pura e funcionalizada;
- d) Selecionar as melhores condições do processo de imobilização por meio da análise das variáveis temperatura, pH e velocidade de agitação, aplicando-se técnica de planejamento experimental;
- e) Imobilizar, por adsorção física e covalente, a enzima FTase extracelular em sílica gel pura e em sílica funcionalizada, visando obter um biocatalisador heterogêneo com elevada atividade de transfrutossililação;
- f) Determinar os parâmetros de imobilização: rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR);
- g) Avaliar os efeitos da concentração de substrato (sacarose) do meio reacional na atividade de transfrutossililação e obter os parâmetros cinéticos da enzima imobilizada;
- h) Avaliar as estabilidades térmica, de armazenamento e frente ao pH de

incubação da enzima FTase imobilizada em sílica gel, pura e funcionalizada, e obter seus parâmetros cinéticos e termodinâmicos;

- i) Monitorar o desempenho do biocatalisador imobilizado em ciclos bateladas consecutivas para avaliação da sua estabilidade operacional.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos, ou FOS, são oligômeros de frutose, formados por unidades frutossil, encontrados em pequenas quantidades em alguns vegetais e frutas. Pode ser obtido, também, por meio de rota enzimática (ASQUIERI, 2020).

Apresentam diversos benefícios à saúde e são amplamente utilizados na alimentação humana, introduzidos em bebidas lácteas e leites fermentados (AZHARI, 2021). Pode ser utilizado como substituto do açúcar comum, podendo ser seguramente consumido por diabéticos. É utilizado, também, na dieta de animais, como aditivos alimentares para suínos e aves domésticas (PASSOS *et al.*, 2003) e em rações de cães (SWANSON *et al.*, 2002).

Em geral, apresentam elevada solubilidade, não cristalizam, nem precipitam, bem como possuem um terço do poder adoçante da sacarose (MUTANDA, 2014). Há relatos na literatura que a viscosidade dos FOS, quando em solução, e sua estabilidade térmica são superiores ao da sacarose, para a mesma proporção, além de serem estáveis em faixa de pH 4-7 (URETA *et al.*, 2019).

Fortes (2006) reporta que os FOS possuem ausência de cor e odor, ausência de precipitação e sensação de secura na boca, além da capacidade de melhorar o flavour nos alimentos e aprimorar suas características físico-química.

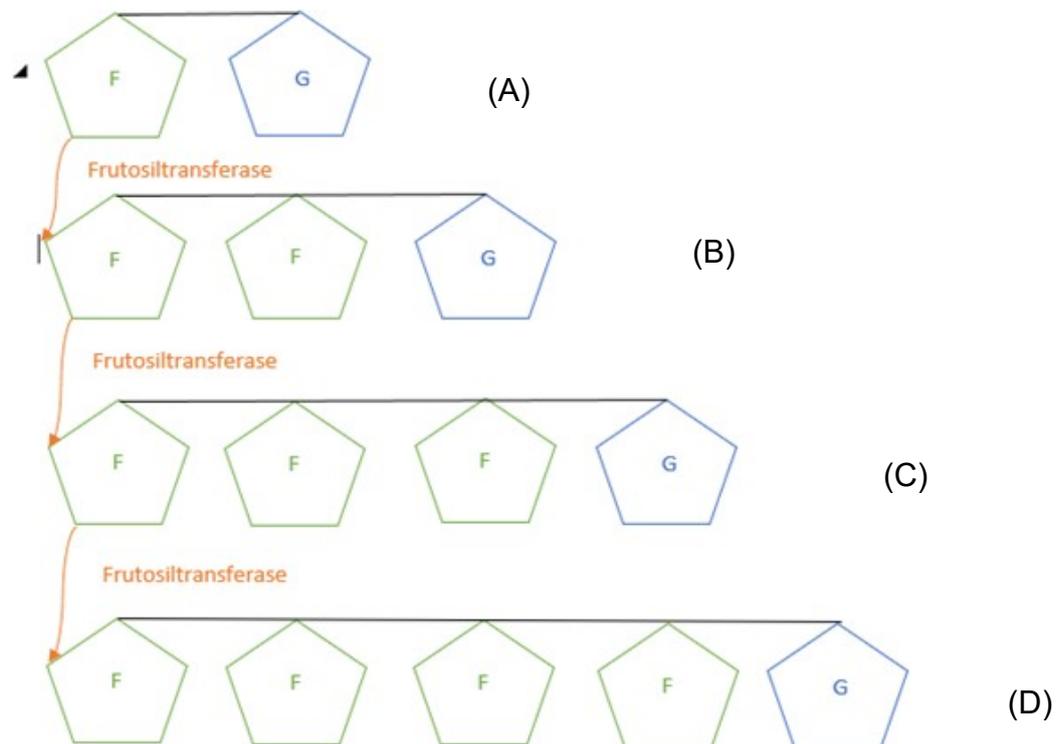
3.1.1 Estrutura química e classificação

Os FOS são constituídos por dois a dez monômeros de sacarídeos, pertencentes ao grupo frutanos, os quais podem ser encontrados na natureza. O termo FOS é utilizado para frutanos do tipo inulina que apresentam ou não um grupoterminal de glicose. Na composição dos FOS, duas a nove unidades de frutossil estão ligadas através de ligações glicosídicas β (2 \rightarrow 1) e a ligação com a glicose é do tipo α (1 \rightarrow 2), como ocorre na sacarose (NASCIMENTO; A., *et al.*

2019).

São oligômeros de frutose, compostos por 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4), onde as unidades de frutose (F) são ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) da sacarose, diferenciando-o assim de outros oligômeros (YUN, 1996), tais oligômeros estão esquematizados pela Figura 1. Devido a esta ligação β (2-1), apresentam resistência a digestão (URETA *et al.*, 2019).

Figura 1 — Moléculas de (A) Sacarose;(B) Kestose;(C) Nistose; (D) Frutofuranosil nistose



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Os frutanos são classificados de acordo com sua ligação glicosídica predominante com os resíduos de frutose, sendo ligados na posição β (2-1) ou na β (2-6), sendo que ambas ligações podem ser encontradas na mesma molécula (EGGLESTON; CÔTÉ, 2003).

Estudos reportados por Mutanda *et al.* (2014) indicaram que os FOS podem ser produzidos por enzimas a partir do alongamento da molécula de sacarose mediante ação de enzimas com atividade de transferência dos grupos frutose ou via hidrólise enzimática da inulina por exoinulinases e endoinulinases atuando sozinhas ou

sinergicamente. Em ambos os casos, quantidades de frutose e glicose são formados como subprodutos (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

3.1.2 Benefícios do FOS

Devido a ligação β (2-1) frutossil-frutose presente nos frutooligossacarídeos, a digestão deste açúcar pelo corpo humano é mais complexa, não sofrendo hidrólise pelas enzimas do trato digestivo, chegando intacto ao intestino grosso. Posteriormente são fermentados, levando a produção de ácidos lácticos e ácidos graxos de cadeias curtas, diminuindo o pH da região e ajudando na proliferação da flora intestinal (MACEDO, 2020). Sendo assim, o FOS pode ser considerado um açúcar prebióticos. Lobo *et al.* (2006) conduziram experimentos em ratos, no qual eram ministrados FOS 5% em suas dietas. Com isso, analisaram que houve um aumento da absorção de cálcio e magnésio, evidenciando um importante benefício do oligômero na manutenção da saúde dos ossos.

De acordo com Roberfroid *et al.* (1998) e Tuohy *et al.* (2003), efeitos positivos de ingestão de FOS são alcançados com doses entre 4 e 20 gramas/dia. Acima desse valor, efeitos indesejáveis são relatados quanto ao funcionamento do trato gastrointestinal. Para Coussement (1999), níveis de ingestão diários entre 20 e 30 gramas ocasionam o início de desconforto no indivíduo, de modo que seria recomendada dose diária de 10 gramas.

Além das propriedades promotoras de saúde, estes carboidratos também podem ser usados para melhorar aspectos sensoriais em produtos de panificação de baixo valor calórico (MILNER, 1999). Inulina e oligofrutoses são incorporadas em diversos produtos alimentícios, principalmente em produtos de padaria e confeitaria, devido as suas características reológicas: produtos leves e facilmente mastigáveis; e que apresentam textura porosa que facilita a digestão (LEITÃO *et al.*, 1984).

3.1.3 Síntese

O FOS pode ser encontrado naturalmente, em quantidade de traços, em

diversos vegetais, frutas e legumes, nas quais se destacam a alcachofra Jerusalém, alho, aspargos, banana, beterraba, cebola, chicória, tomate, trigo e yacon (MAIORANO *et al.*, 2008; SPIEGEL *et al.*, 1994; YUN, 1996). Também podem ser encontrados no mel, açúcar mascavo e em tubérculos (MACEDO, 2020). Na tabela 1, Macedo (2020) demonstra a quantidade que cada alimento possui do açúcar:

Tabela 1 — Teor de FOS em algumas plantas e vegetais

Alimentos	FOS (%)
Alcachofra Jerusalém	<1
Alho	3,6-6,4
Banana	0,3-0,7
Cebola	1,1-7,5
Centeio	0,5-1
Chicória	5-10
Yacon	3-19

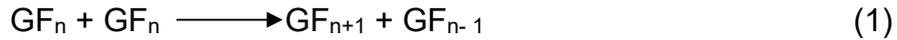
Fonte: adaptado de Macedo (2020).

O FOS pode ser obtido, também, por meio da atividade de transfrutoseilação em resíduos de sacarose, e consiste tanto em cadeias lineares como de cadeias ramificadas de oligossacarídeos, com grau de polimerização variando entre 1 e 5 unidades de frutose (HIDAKA *et al.*, 1986). As enzimas que realizam tal ação são as frutoseiltransferase ou β -frutofuranosidases (BLANCH *et al.*, 2011). Essas enzimas podem ser produzidas por fungos *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sydowi*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium rugulosum* e *Scopulariopsis brevicaulis*, por levedura *Saccharomyces cerevisiae* e por bactéria *Bacillus macerans* (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001).

Estudos relatam que dentre os possíveis microrganismos produtores de frutoseiltransferases, o fungo *A. oryzae* destaca-se como o mais promissor para a produção da enzima em escala industrial (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; MAIORANO *et al.*, 2008).

O mecanismo enzimático pode ser representado pela seguinte reação

química:



em que GF refere-se à sacarose; G e F referem-se às unidades de glicose e frutose, respectivamente; e n é o número de unidades frutossil.

Os processos para obtenção do FOS podem ser divididos em duas etapas: a primeira consiste na fermentação ou cultivo celular, à qual será obtida a enzima utilizada na segunda etapa. As enzimas produzidas (solúveis ou imobilizadas) serão expostas a altas concentrações de sacarose, sintetizando os frutooligossacarídeos, caracterizando a segunda etapa do processo. Observa-se que, tanto o processo em batelada como o contínuo pode ser aplicado para a produção de FOS, fazendo-se o uso de soluções de sacarose altamente concentradas (600-850 g/L) (YUN, 1996; CHIEN *et al.*, 2001). FOS produzidos através dessa rota enzimática são comercializados como Neosugar®, Meioligo®, Profeed® e Nutraflora® (FORTES, 2006).

Existem outros meios de se obter o frutooligossacarídeos, como por extração de plantas e leguminosas, mas estes processos não são economicamente inviáveis devido ao baixo rendimento e a produção fica dependente de sazonalidade de plantas e frutos (FORTES, 2010). Industrialmente, o meio mais utilizado para a produção de FOS, é através da rota enzimática, utilizando-se de enzimas que realizam a atividade transferase para a produção deste açúcar.

3.2 Frutossiltransferase

As enzimas são biocatalisadores formados por longas cadeias de aminoácidos. Então, pode-se considerar uma enzima como sendo uma proteína que realiza uma determinada atividade catalítica. Sua função é viabilizar a atividade das células, quebrando ou juntando moléculas, através dos seus sítios ativos (CHOUKADE, 2019). As enzimas possuem elevada seletividade ao substrato. Uma enzima, como exemplo, são específicas para um determinado tipo de ligação química, outras para um determinado tipo de isômeros de moléculas, etc.

A classificação das enzimas foi organizada pela comissão de enzima da

União Internacional de Bioquímica, que dividiu as enzimas em seis grandes grupos, de acordo com a função de cada uma. Essas classes são mostradas na tabela 2.

Tabela 2 — Classificação das enzimas

Número	Classe da enzima	Tipo de reação
1	Oxidoredutases	Reações de oxirredução ou troca de elétrons
2	Transferases	Transferem grupos funcionais entre moléculas
3	Hidrolases	Reações de hidrólises
4	Liasas	Catalisam as quebras de ligações covalentes e a remoção de molécula de água, amônia e gás carbônico
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômero
6	Ligases	Catalisam reações de formações de novas moléculas a partir de duas pré-existentes

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A frutossiltransferase (FTases, E.C. 2.4.1.9) são enzimas pertencentes à classe das transferases e são responsáveis pelas reações de transferência de grupos frutossil na molécula de sacarose, sintetizando frutooligossacarídeos (FOS) como principal produto (CHOUKADE, 2019).

Podem ser obtidas por plantas ou microrganismos. Dentre as FTases de origem microbiana, raras são as enzimas produzidas por bactérias, diferentemente de fungos que se destacam como produtores potenciais do

biocatalisador. As FTases são enzimas que apresentam alta atividade de transfrutoseilação e baixa atividade hidrolítica, cuja produção de FOS a partir da sacarose apresenta rendimentos satisfatórios, aproximadamente 55 %, para altas concentrações do substrato (L'HOCINE *et al.*, 2000).

O aumento da concentração de glicose ao decorrer da reação funciona como um inibidor para a atividade enzimática, de forma que para se atingir maiores rendimentos é necessário impedir a inibição causada pelo monossacarídeo (TANRISEVEN; GOKMEN, 1999).

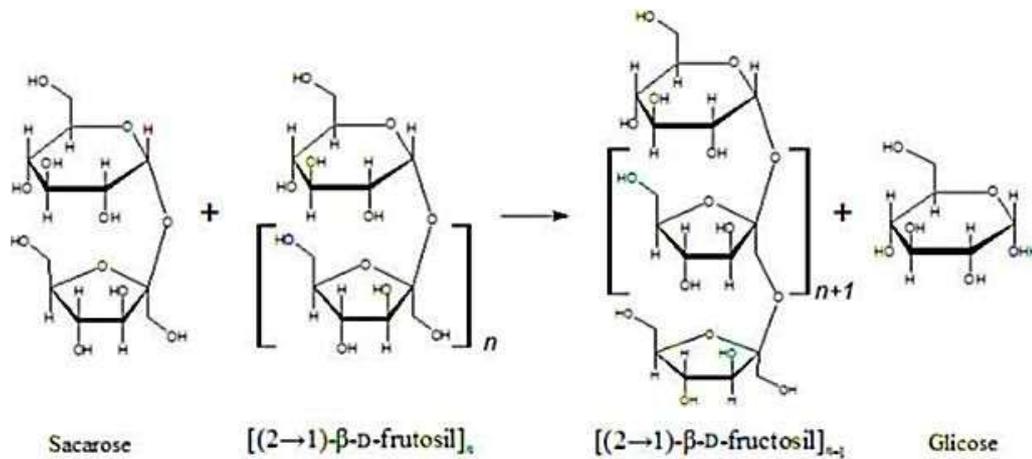
Os fungos utilizados para produção microbiana em larga escala das enzimas frutossiltransferases (FTases) são do gênero *Aspergillus sp.*; *Fusarium sp.*, *Aerobasidium sp.*, *Penicillium sp.* e *Arthrobacter sp.* (MUÑIZ MARQUÉZ *et al.*, 2016). Segundo Dominguez (*et al.* 2014) a fermentação submersa é a mais utilizada para a produção desta enzima. Esta fermentação consiste no crescimento do microrganismo de forma livre ou suspensa, em um meio de cultivo líquido, com todos os sais e nutrientes necessários para seu desenvolvimento. A fermentação submersa é considerada segura, de baixo custo, com elevada produção por volume de reator, possibilitando pleno controle sobre os parâmetros que influenciam na fermentação (DOMINGUEZ, 2014).

O fungo que se destaca na produção da FTase é o *Aspergillus oryzae*, possuindo o status de GRAS (Generally Recognize As Safe), devido a sua baixa toxicidade na produção de alimentos. Além disso, muitas pesquisas vêm demonstrando a grande capacidade de produção da FTase por este fungo devido à elevada atividade de transfrutoseilação exibida pela enzima microbiana (CUERVO-FERNANDEZ *et al.* 2007; CUNHA *et al.* 2019; FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; MAIORANO *et al.*, 2020; OTTONI *et al.* 2012; PERNA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021).

3.2.1 Atividade de transfrutoseilação

A enzima frutossiltransferase realiza a reação de transferência de grupos frutossil, mas excluindo transferências entre água, ou oxigênio, que caracterizaria uma hidrólise ou oxirredução. A figura 2, ilustra a reação de transfrutoseilação.

Figura 2 — Reação de transfrutossilação



Fonte: Adaptado de Cunha (2019; p. 2).

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

Segundo Ottoni *et al.* (2012) e Cuervo-Fernandez (2007), a atividade de transfrutossilação pode ser definido como sendo a quantidade de enzima que produz um micromol de FOS por minuto sob condições experimentais estabelecidas, considerando kestose, nistose e frutofuranosilnistose como parte integrante do FOS.

Existe outra definição também encontrada na literatura, na qual define a atividade de transfrutossilação como a quantidade de enzima necessária para transferir um micromol de frutose por minuto sob condições experimentais estabelecidas (CHEN e LIU, 1996; CUNHA *et al.* 2019; FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.* 2020).

3.3 Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas tem atraído grande interesse das indústrias, principalmente pela alimentícia, mostrando ser um processo econômico e

eficiente, mostrando em alguns casos que pode até ser reaproveitada, utilizando o complexo enzima-suporte por mais de um ciclo (FARIA,2021).

Existem diversos problemas em se utilizar enzimas livres em escalas industriais, como: elevação do custo de operação, fazendo-se necessário acrescentar uma nova etapa no processo, a de purificação do produto, bem como, o uso da enzima livre apresenta uma instabilidade enzimática, com um tempo de meia vida mais curto. A imobilização de enzimas facilita o *downstream* do processamento e a recuperação de produto melhorada.

A imobilização consiste no confinamento da proteína em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso e em solventes orgânicos. Segundo Barbosa (2014), a imobilização pode possibilitar uma melhor estabilidade operacional, uma maior facilidade em separação do produto com o meio reacional e melhora a eficiência catalítica da enzima.

Em comparação com as enzimas solúveis, as enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes a mudanças do ambiente reacional, incluindo influências de temperatura, pH e solventes orgânicos, além de possibilitar a utilização em reatores contínuos.

A imobilização de enzimas está sendo praticada usando uma variedade de materiais e diferentes métodos. Tais métodos estão descritos nos tópicos subsequentes.

A enzima pode ser ligada ao suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz e a classificação do método de imobilização pode ser considerada quanto ao tipo de interação responsável pela ligação da enzima no suporte, como meios químicos ou físicos, ou a natureza do suporte: poroso ou não-poroso (CARVALHO, 2015).

Segundo Sheldon *et al.* (2013), os métodos para a imobilização são divididos em categorias: adsorção num suporte, ligação covalente em um suporte, encapsulação e ligação cruzada. Estas são combinações de métodos químicos que envolvem a formação de, no mínimo, uma ligação covalente entre os resíduos terminais de uma enzima e um grupo funcional do suporte, ou entre duas ou mais moléculas de enzima; métodos físicos que envolvem as forças físicas como adsorção, interações eletrostáticas; métodos de encapsulação ou microencapsulação em matrizes poliméricas.

3.3.1 Métodos de Imobilização

Assim como o suporte, os métodos de imobilização dependem das peculiaridades do material biológico e das condições de aplicação do sistema imobilizado, portanto, não existe um método geral que pode ser usado para qualquer processo. Na literatura, muitos métodos são aplicados para contornar os possíveis problemas de instabilidade das enzimas frente a solventes orgânicos, métodos estes que podem ser dados a partir da imobilização por adsorção física, imobilização por ligação covalente, imobilização por ligação iônica, por ligação cruzada ou imobilização por encapsulação (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

3.3.1.1 Método de ligação iônica

O método de ligação iônica consiste basicamente em interações iônicas e eletrostáticas da proteína com cargas opostas presentes no suporte. Neste tipo de imobilização, a energia do complexo enzima-suporte é maior do que em outros métodos, como de adsorção, mas, mais fracas que as de ligações covalentes.

Lipases são capazes de serem adsorvidas espontaneamente em soluções aquosas com superfícies hidrofóbicas, devido a seu mecanismo de ativação interfacial, que é muito maior de que outras proteínas, possibilitando purificar e simultaneamente imobilizar lipases por esta técnica. (FERREIRA, 2021; BRABCOVÁ, 2013; MATEO, 2006).

3.3.1.2 Método de ligação covalente

O método de imobilização por ligações covalentes, se baseia na retenção de enzimas na superfície do suporte, via formação de uma ligação covalente. A imobilização covalente proporciona uma ligação mais duradoura e evita a perda por lixiviação quando entra em contato com o solvente, aumentando assim a estabilidade a longo prazo (PAGAN *et al.*, 2015).

É uma técnica de imobilização de enzimas que envolve a modificação na

superfície do suporte com agentes bifuncionais para imobilização eficiente e irreversível da enzima. Por envolver tratamento químico do suporte, pode ocorrer modificação no sítio ativo da enzima, fazendo com que esta tenha sua atividade alterada (reduzida ou aumentada) (CARVALHO, 2015; ZHOU, 2013).

Um tipo especial de Imobilização por ligação covalente é a imobilização por ligação cruzada. O método de ligação cruzada foi inicialmente descrito para promover cristais de proteínas a fim de se realizar estudos estruturais por raio-X. É um método de imobilização irreversível que não requer o uso de suporte. As enzimas são ligadas umas às outras, ou às proteínas inativas, formando uma estrutura tridimensional complexa (CARVALHO, 2015).

De acordo com Sheldon (2011), os biocatalisadores imobilizados por esta técnica apresentam geralmente uma melhor estabilidade de armazenamento e operacional, protegendo da denaturação pelo calor, por solventes orgânicos.

Smaali (2012) imobilizou b-FFase produzida por *A. awamori* NBRC 4033 em quitosana, utilizando o glutaraldeído para ativar o suporte, funcionando como agente bifuncional, e obteve uma conversão de sacarose para FOS de 53%.

Santos *et al.* (2012) produziram um suporte obtido pela técnica sol-gel utilizando os precursores tetraetoxissilano (TEOS) e álcool polivinílico (PVA) para imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* por ligação covalente utilizando o agente epicloridrina. Os resultados obtidos foram superiores aos comparados quando se ativa com glutaraldeído, devido a uma maior presença de pontos com ligações covalentes entre enzima e suporte.

3.3.1.3 Método de encapsulação

O método por encapsulação consiste em proteger as enzimas em um único compartimento de volume definido, tendo a possibilidade de manter a enzima com uma certa mobilidade. Os meios poliméricos reticulados devem ter poros pequenos o suficiente para não permitir a passagem das enzimas, mas oferecendo passagem livre aos substratos e produtos. Isso permite que as enzimas permaneçam na solução, mas que fiquem protegidas de efeitos externos. Apesar da vantagem de não ocorrência de alteração estrutural da

enzima, esse método pode não ser aplicável em alguns casos, por exemplo, se o substrato da enzima for grande e não passar pelos poros do suporte (CARVALHO, 2013).

A FTase micelial de *A. oryzae* IPT-301, reticulada com glutaraldeído, foi encapsulada em esferas de alginato de cálcio. A FTase imobilizada mostrou reciclabilidade até 3 ciclos com 92 % de atividade residual de 4 h cada. (GONÇALVES *et al.*, 2020).

3.3.1.4 Método de adsorção

O método de adsorção consiste na imobilização da enzima na superfície do suporte por ligações de *van der Waals*. Fatores como tamanho da enzima a ser adsorvida, área superficial do adsorvente, porosidade e tamanho do poro afetam diretamente a eficiência do método. A ligação física é fraca e pode ocasionar a lixiviação da enzima nos meios reacionais, por isso se faz necessário estudos quanto à influência da porosidade do suporte neste método. A facilidade de dessorção leva a uma fácil perda enzimática, mas isso pode ser também visto como uma vantagem, pois permite a recuperação do suporte após denaturação da enzima e nova imobilização.

Imobilização por adsorção apresenta operacionais vantagens, como custo relativamente baixo, simplicidade, aplicabilidade para uma ampla variedade de enzimas e portadores, causa mínimo ou nenhuma mudança conformacional na enzima, permitindo a retenção de alta atividade enzimática, e a possibilidade de reutilizar o suporte após a inativação da enzima (KALANTARI *et al.* 2017; KHARRAT *et al.* 2011).

Yun e Song (1996) imobilizaram FTase de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10542 em uma resina altamente porosa, Diaion HPA 25. A enzima imobilizada mostrou maior resistência a variações de pH do que a enzima solúvel e mostrou alta atividade enzimática para 30 dias a 50 °C. Além disso, a temperatura ideal (55 °C) e pH (5,5) para a produção de FOS não foram modificados pelo processo de imobilização.

Silva (2019) realizou experimento comparativo utilizando a adsorção, para avaliar a atividade de β -galactosidase em macro poros e mesoporos, preparado por um método sol-gel a partir de um precursor de sílica e uma

dispersão de nano partículas lipídicas sólidas em uma fase de micela, para aplicações como hidrólise delactose.

Faria (2021) realizou a adsorção da enzima frutossiltransferase em sílica gel, avaliando a estabilidade a temperatura, pH e ao reuso, conseguindo obter um rendimento de imobilização de 85%.

3.3.2 Tipos de Suporte

A maior contribuição para um bom processo de imobilização é dada pelo suporte. Um bom suporte deve ter: estabilidade frente aos parâmetros de processo; baixa denaturação; funcionalidade química; resistência mecânica; retenção da atividade enzimática inicial; durabilidade e capacidade de reutilização; compatibilidade aceitável com a enzima e substrato; custo e facilidade de manuseio (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). Além disto, o material deve ter elevada área superficial e ser poroso.

De acordo com Talbert e Goddard *et al.* (2012) o material utilizado como suporte para a imobilização de enzimas pode modificar a quantidade de água total na proximidade da enzima. Portanto a análise do suporte ser hidrofílico/hidrofóbico é fundamental, pois na etapa de preparação de suportes hidrofóbicos a água pode ficar retida nos interstícios porosos e, conseqüentemente, ao redor da enzima imobilizada. A presença da quantidade mínima de moléculas de água no microambiente é necessária para preservação da estrutura conformacional da enzima. Todavia, o uso de suportes hidrofílicos no processo de imobilização promove a competição da água entre o suporte e a enzima durante a reação, influenciando no equilíbrio termodinâmico do sistema.

A natureza física do suporte influencia diretamente no rendimento de imobilização e em efeitos difusionais causados pela transferência de massa entre o meio líquido e os biocatalisadores imobilizados. Essas limitações podem ser na transferência de massa externa, que envolve a transferência de reagentes/substratos do meio reacional até a superfície do suporte de imobilização, e na transferência de massa interna, que descreve a transferência de reagentes/substratos no suporte de imobilização até o sítio ativo da enzima. Qualquer etapa da difusão pode limitar a atividade global da enzima imobilizada.

Os suportes podem ser divididos quanto a sua morfologia como porosos e

não porosos e classificados de acordo com sua origem (orgânicos ou inorgânicos). Os suportes inorgânicos, naturais ou sintéticos, são mais apropriados para uso industrial por apresentarem elevada resistência mecânica, estabilidade em ampla faixa de pressões, temperaturas e valores de pH, rigidez, resistência a solventes orgânicos e ao ataque microbiano (ZHOU, 2013).

Os materiais porosos apresentam como vantagem uma maior área superficial interna disponível para que a enzima se adere. Mas estes poros devem ser suficientemente grandes para que as enzimas consigam passar por eles e ainda possibilitar o contato da enzima com o substrato. Nos últimos anos vários artigos indicam o progresso no uso de materiais mesoporosos e suas contribuições correspondentes ao processo de imobilização de enzima, bem como as aplicações na biocatálise: sílica amorfa, organosílica, carbono mesoporoso, zeólitas, dentre outros. Ghazi *et al.* (2005) estudaram a imobilização por ligações covalentes de frutotransferases comerciais em um polímero à base de polimetacrilato (Sepabeads® EC). Foi obtido um biocatalisador com alta estabilidade mecânica, relativa fácil produção com atividade de transfrutoseilação máxima de 25 U.g^{-1}

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) imobilizaram FTase extracelular de *Rhodotorula sp.*, por adsorção, em minério de nióbio. Segundo os autores, a enzima imobilizada apresentou alta atividade de transfrutoseilação e estabilidades térmica e frente ao pH satisfatórias, com conversão de 58 % de sacarose em FOS.

3.3.3 Sílica-gel

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

As características físico-químicas e morfológicas da sílica podem ser descritas como naturais ou sintéticas, cristalina ou amorfa, micro, macro ou

mesoporos.

Pode ser obtida comercialmente ou pode ser produzida, sendo o método sol-gel o mais utilizado para a imobilização de enzimas. O método consiste na hidrólise e poli condensação dos solventes, seguido pela secagem, conforme exemplificado por Dalla-Vecchia *et al.* (2004). Uma rede porosa de sílica é formada e denominada xerogel, caso a secagem seja à temperatura ambiente. Se a sílica for seca por meio pressurizado é denominada de aero gel (CARVALHO, 2015).

Na superfície da sílica gel observa-se a presença de grupos de -OH (hidroxilas), os quais atuam como pontos de ligação com a enzima a ser imobilizada e a sílica, agindo como centro de adsorção molecular formando ligações Si-O-X, capazes de formar uma ligação de hidrogênio com os grupos OH ou sofrer interações doador-receptor. (CARVALHO, 2015).

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

Autores como CANILHO *et al.* (2013) estudaram a imobilização de lipase de diferentes fontes em sílica mesoporosa, por adsorção física, o método de imobilização estudado neste trabalho. Carvalho (*et al.* 2015) analisaram o uso de sílicas modificadas para a imobilização de lipases, mostrando que a sílica gel é um potencial suporte para uso de imobilização de enzimas.

3.3.4 Glutaraldeído

Para aumentar a adsorção da enzima no suporte, podendo aumentar a estabilidade e até mesmo a atividade recuperada, se faz o tratamento do suporte, modificando-o superficialmente.

Essa modificação ocorre por meio de adições de grupos funcionais específicos na parede do suporte, que ou irão reagir com grupos reativos do tipo alcoxi presentes em alcoxissilanos mono, bi ou tri funcionais com os silanóis da matriz do suporte, ou irão apresentar uma forte ligação entre o suporte com

grupos funcionais presentes na enzima, acrescentando ligações mais fortes que as presentes no suporte. O glutaraldeído funcionaliza o suporte, adicionando-se ligações covalentes entre a enzima e o suporte (CARVALHO, 2015).

O glutaraldeído é amplamente utilizado para aumentar a hidrofobicidade do suporte, mas um dos grandes problemas de se ativar com tal produto, é que este poder ser considerado tóxico para algumas enzimas (PAULA; 2007).

O comportamento do glutaraldeído com a sílica foi observado por Paula *et al.* (2007) e MENDES *et al.* (2013) e explicado por Barbosa *et al.* (2012), que mostraram que a ativação ideal da enzima ocorre quando há duas moléculas de glutaraldeído por grupo amino no suporte, gerando uma estrutura reativa com os resíduos de aminoácidos da enzima.

Garcia *et al.* (2021) apresentaram resultados promissores ao se reticular com glutaraldeído a biomassa catalítica do *Aspergillus oryzae* IPT-301, para a produção de FOS. As células reticuladas mostraram uma razão entre as atividades superior a enzima livre em várias temperaturas, pH e concentração de substrato. Os dados cinéticos sugeriram que as células reticuladas apresentam maior afinidade substrato-enzima e taxa de transfrutoseilação do que as células livres. Além disso, após 12 ciclos de reação em batelada, a FTase presente na célula imobilizada manteve 88,9% de seu AT inicial, demonstrando uma estabilidade operacional consideravelmente maior do que a FTase presente na célula livre, que apresentou 50,3% de seu AT inicial.

Existem outros agentes funcionalizantes muito utilizados para melhorar as características do suporte, como por exemplo Nikolic *et al.* (2010) que estudaram a imobilização de Tripsina em algodão oxidado com peróxido de sódio, produzindo um suporte que melhorou a estabilidade de armazenamento e também sua atividade quando imobilizada.

Brígida *et al.* (2007) imobilizaram Lipase de *Candida antártica* em fibra de casca de coco verde, usando como agente funcionalizante o 3-glicidiloxipropilmetoxilano (GPTMS), posteriormente oxidando com periodato de sódio. A enzima imobilizada apresentou uma estabilidade 363 vezes mais estável que a enzima livre, e ainda apresentou uma maior estabilidade térmica.

Outro agente funcionalizante muito aplicado são os líquidos iônicos. Estes são divididos em duas classes: Os líquidos iônicos apróticos (LIA) que são aqueles considerados doadores de prótons, formando ligações de hidrogênio, e

os líquidos iônicos próticos (LIP) que possuem prótons de alta mobilidade e são resultantes da combinação de um ácido e uma base de *Bronsted* e possuem vantagens como baixo custo, simplicidade de síntese e baixa toxicidade (ALVAREZ, 2010).

Souza (2013) utilizou LIP para na encapsulação da lipase de *Burkholderia cepacia* pela técnica sol-gel. Neste estudo foram utilizados líquidos iônicos próticos baseados em monoetanolamina com diferentes comprimentos de cadeia alquílica e em diferentes concentrações (0,5 - 3,0% m/v). Os rendimentos de imobilização das lipases resultaram em valores elevados quando comparados ao sistema imobilizado na ausência de LI, com aumento da eficiência catalítica em 35 vezes. O efeito positivo observado foi atribuído ao revestimento que o LI proporcionou aos poros e à superfície do suporte selecionado (sílica), além da proteção da estrutura da lipase durante a obtenção do biocatalisador imobilizado, atuando como um agente estabilizador da enzima e protetor contra a inativação pelo álcool durante a encapsulação.

3.4 Imobilização de FTase extracelular

Poucos são os estudos reportados na literatura que abordam a imobilização de FTases em suportes orgânicos e inorgânicos visando a produção de FOS. Yun *et al.* (1996) imobilizaram a FTase de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10542 em uma resina altamente porosa Diaion HPA 25®. A enzima imobilizada apresentou maior resistência às variações de pH do que a enzima solúvel e apresentou alta atividade enzimática por 30 dias a 50 °C.

Ghazi *et al.* (2005) estudaram a imobilização por ligações covalentes de frutossiltransferases comerciais em um polímero à base de polimetacrilato (Sepabeads® EC). Foi obtido um biocatalisador com alta estabilidade mecânica, relativa fácil produção com atividade de transfrutossilção máxima de 25 U.g⁻¹. Platková *et al.* (2006) relataram a imobilização de FTases de *Aureobasidium pullulans* em vários materiais comerciais. As FTases imobilizadas no Dowex Marathon MSA (estireno- DVB macroporoso) e Amberlite IRA 900® (estireno- DVB) apresentaram as maiores atividades específicas 1268 U g⁻¹ e 1169 U g⁻¹, respectivamente.

Oliveira (2013) buscou imobilizar a FTase extracelular

produzida por *Rhodotorula sp.* Aplicada na produção do FOS. A imobilização se deu em suporte sólido ácido inorgânico composto por nióbio e grafite, com uma eficiência de aproximadamente 98%, e uma razão de 194 U/g suporte. Obteve-se altas atividades enzimáticas em pH 4,5 e 6, com temperatura ótima de 61 °C e 63°C, respectivamente.

Huallanco (2010) realizou o estudo da modelagem e simulação do processo para a Ftase extracelular livre e imobilizada para diferentes tipos de reatores. A enzima imobilizada utilizada, foi feita pelo mesmo método de Oliveira (2013). Os resultados mostraram que tanto a enzima livre, quanto a imobilizada, apresentaram inibição pelo substrato, em pH 4,5 e 50°C. Para reatores batelada, obteve-se um rendimento de FOS de 50% para 14 U/mL de enzima imobilizada e agitação de 45 rpm. Em reatores contínuos, obteve-se um rendimento de 32,1%, utilizando 15 U/mL de enzima imobilizada, e 45 rpm para agitação.

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) imobilizaram FTase extracelular de *Rhodotorula sp.*, por adsorção, em minério de nióbio. Segundo os autores, a enzima imobilizada apresentou alta atividade de transfrutoseilação e estabilidade térmica e frente ao pH satisfatórias, com conversão de 58 % de sacarose em FOS.

Garcia *et al.* (2021) apresentaram resultados promissores ao se reticular com glutaraldeído a biomassa catalítica do *Aspergillus oryzae* IPT-301, para a produção de FOS. As células reticuladas mostraram uma razão entre as atividades superior a enzima livre em várias temperaturas, pH e concentração de substrato. Os dados cinéticos sugeriram que as células reticuladas apresentam maior afinidade substrato-enzima e taxa de transfrutoseilação do que as células livres. Além disso, após 12 ciclos de reação em batelada, a FTase presente na célula imobilizada manteve 88,9% de seu AT inicial, demonstrando uma estabilidade operacional consideravelmente maior do que a FTase presente na célula livre, que apresentou 50,3% de seu AT inicial.

A imobilização da FTase extracelular, também produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, foi estudada por Faria (2021). O suporte utilizado para a produção de FOS foi a sílica-gel, obtendo-se o perfil de imobilização para diversas temperaturas, mantendo o pH 5,5 e a velocidade de agitação em 175 rpm. A atividade de transfrutoseilação (A_T) foi otimizada pelo projeto experimental em função do pH e temperaturas da reação. O A_T da enzima imobilizada

apresentou comportamento cinético descrito pelo modelo Hill. A FTase imobilizada mostrou capacidade de reutilização por seis reações consecutivas ciclos e maior pH e estabilidade térmica do que a enzima solúvel.

3.5 Parâmetros de imobilização

A seleção do método e do material utilizado para uma imobilização deve ser baseado em parâmetros, levando em conta a atividade do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custos que implicará no processo, toxicidade dos reagentes utilizados na imobilização e na estabilidade operacional dele (SOUZA, 2017).

Esses parâmetros podem ser analisados como o cálculo da atividade recuperada, sendo determinada pela relação entre a atividade aparente do derivado, o produto da atividade inicial oferecida e a concentração de enzima imobilizada, dada pela equação 2:

$$AR (\%) = \frac{U_{\text{imobilizado}}}{U_0 - U_f} * 100 \quad (2)$$

Em que AR é a atividade recuperada (%); $U_{\text{imobilizado}}$ é atividade aparente do derivado imobilizado ($U \cdot g^{-1}$ do suporte); U_0 é a atividade oferecida no início da imobilização ($U \cdot mg^{-1}$ da proteína); e U_f é a atividade no sobrenadante no final da imobilização ($U \cdot mg^{-1}$ da proteína);

Outro parâmetro de grande importância é a atividade desaparecida, que nos mostra o quanto da enzima pode estar sendo transferida para o suporte, e é dado pela equação 3:

$$AD = U_0 - U_f \quad (3)$$

O rendimento de imobilização (RI), é a relação entre a atividade enzimática imobilizada pela atividade inicialmente oferecida ao suporte, demonstrado pela equação 4:

$$RI = \frac{U_f - U_0}{U_0} * 100 \quad (4)$$

3.5.1 Seleção e otimização dos parâmetros de imobilização

Buscando a otimização dos processos de adsorção, vários autores vêm utilizando o planejamento experimental como ferramenta (KAVAK, 2009; RICOU- HOEFFER *ET AL.*, 2001; SILVA, 2007, SOARES, 2019). Com base na estatística, essa ferramenta visa maximizar a qualidade das informações obtidas acerca das interações e efeitos dos fatores (como pH, temperatura e agitação) na propriedade de interesse (como a recuperação de atividade ou rendimento de imobilização) com a menor quantidade de ensaios (RICOU-HOEFFER *ET AL.*, 2001).

O planejamento fatorial possibilita maior eficiência e economia, uma vez que a determinação do efeito das variáveis mais significativas em um processo pode promover redução no custo operacional, melhoria na produtividade, redução do tempo de análise e melhor concordância entre os valores obtidos e os esperados.

Para o processo de imobilização de FTases, Faria (2021) mostrou a influenciada temperatura no processo de imobilização. Já Cunha (2019), avaliou a influência do pH sobre a enzima, podendo modificá-la de acordo com a acidificação do meio. Parâmetros como agitação, influenciam o contato físico da enzima com o suporte, podendo ajudar ou não no processo de imobilização.

Estes parâmetros que influenciam no processo, precisam ser estudados e otimizados, para se obter sempre os melhores resultados de imobilização, padronizando todo o processo.

3.6 Estabilidade Térmica

Segundo Gomes (2007), entre os fatores que afetam a estabilidade e a cinética das proteínas, o calor é o que mais exige modificações, dentro do contexto biológico. Estas adaptações vêm sendo amplamente estudadas para maior compreensão dos mecanismos envolvidos.

A termo estabilidade de uma enzima refere-se tanto à termo estabilidade dinâmico e quanto à estabilidade cinética. Segundo Faria *et al.* (2021), ao aumentar a temperatura, bem como a energia cinética das enzimas, a taxa

reacional também aumenta até certo ponto. Em baixas temperaturas, as enzimas movimentam-se lentamente em direção ao substrato, o que compromete a catálise. Já o aumento gradativo da temperatura, favorece as colisões entre os sítios ativos das enzimas e o substrato, de forma a aumentar taxa de reação (SHULER; KARGI, 2002).

O uso de uma elevada temperatura pode ocasionar no rompimento das ligações não-covalentes presente na proteína, ocasionando o desdobramento dela. Algumas enzimas, após o resfriamento, conseguem retomar estas ligações, mas algumas não, sendo assim inativadas (MIRANDA *et al.*, 2014). Quando ocorre a denaturação térmica da enzima, há uma transição de um estado de menor energia para um estado de maior energia. Para ocorrer essa transição, de forma irreversível, é preciso fornecer uma quantidade mínima de energia, em forma de calor, para a enzima, denominada energia de denaturação (ED).

Os parâmetros de inativação térmica foram estimados através do modelo de Sadana e Henley (ano 1987), para os dados de atividade relativa vs tempo.

$$A/A_0 = (1 - \alpha) * \exp^{-k_1 * t} + \alpha \quad (5)$$

Sendo A/A_0 a atividade relativa, α é um parâmetro do modelo, e k_1 é a constante de desativação térmica de primeira ordem.

Para o estudo desta faixa de temperatura em que a enzima não tem suas ligações rompidas, se faz necessário entender a equação de Arrhenius, a qual estão descritas a desativação na equação 6.

$$k_d = A_d \cdot e^{\frac{-E_d}{RT}} \quad (6)$$

Em que k_d é a constante de desativação térmica, A_d é a constante de Arrhenius, e E_d a energia necessária para promover a desativação térmica, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta (MIRANDA *et al.*, 2014).

A energia de desativação (E_d) é a energia necessária para se desativar uma enzima, então, quanto maior ela for, mais estável seria a enzima. Uma variável que se pode estudar com a desativação da enzima é o tempo de meia vida, exemplificado pela equação 7.

$$t_{1/2} = -\frac{1}{k_1} \ln\left(\frac{2^{1-\alpha}}{1-\alpha}\right) \quad (7)$$

O tempo de meia vida, é o tempo necessário para que a enzima reduza sua atividade pela metade do valor inicial (GONÇALVES *et al.* 2020; SAQIB *et al.* 2010; SIDDIQUI *et al.* 1997; SOUZA *et al.* 2015;). É possível encontrar a energia necessária para começar a denaturar a enzima, esse parâmetro é denominado de entalpia de ativação da denaturação (ΔH_d), sendo que quanto maior for este valor, mais estável a enzima é. A equação 8 descreve esta energia.

$$\Delta H_d = E_d - RT \quad (8)$$

A energia de Gibbs de ativação da denaturação (ΔG_D), representada pela equação 9 é considerada a forma mais confiável para quantificar a estabilidade enzimática, pelo fato de considerar entalpia e entropia para determinar a espontaneidade da perda de estabilidade da enzima. Valores menores e mais negativos de energia livre de Gibbs, significam uma maior tendência a denaturação, sendo desejado valores altos da energia de Gibbs (KUMAR *et al.*, 2013).

$$\Delta G_d = -RT \cdot \ln\left(\frac{k_d h}{k_b T}\right) \quad (9)$$

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

A entropia de denaturação térmica da enzima (ΔS_D) pode ser quantificada por meio da Equação 10. Esse fator está relacionado com a aleatoriedade do processo de denaturação da enzima, de forma que, quanto maior a aleatoriedade, maior e positivo será o valor da entropia de denaturação térmica da enzima (KUMAR *et al.*, 2013).

$$\Delta S_d = \frac{\Delta H_d - \Delta G_d}{T} \quad (10)$$

3.7 Estabilidade frente ao pH

As enzimas são proteínas anfóteras, com grandes números de grupos ácidos e básicos em sua superfície que são facilmente modificáveis pela ionização e pH do meio, afetando, assim, sua estrutura terciária, bem como a reatividade dos grupos catalíticos e seus sítios ativos. (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER, 2002).

Geralmente, as enzimas possuem grupos iônicos em seus sítios ativos, que necessitam de condições ótimas e específicas de pH para atuarem de forma satisfatória. O pH do meio influencia diretamente na reação, modificando a distribuição de cargas da molécula enzimática, do substrato, das coenzimas e dos produtos (VERMA *et al.* 2019).

O pH ótimo ocorre quando a velocidade de reação catalítica é máxima, sendo que este ponto se difere para cada enzima em uma determinada reação, devido a características do sítio ativo da enzima. Tal ponto apenas pode ser encontrado de forma empírica (SHULER; KARGI, 2002).

Cunha *et al.* 2019 estudaram o efeito do pH para a enzima frutossiltransferase extracelular, no qual em meios mais ácidos a atividade relativa foi inferior aos obtidos em pH de 5,5, 6 e 6,5, com uma queda acentuada em pH mais básicos.

Faria *et al.* 2021 mostraram que o ponto ótimo de atividade da enzima frutossiltransferase imobilizada em sílica gel pura foi de 5,5, com a diminuição em pH mais ácidos e básicos que estes.

3.8 Influência da concentração de substrato na enzima Ftase imobilizada

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

Com o aumento do substrato espera-se um aumento na velocidade de reação, mas, em muitos casos, existe a possibilidade de inibição pelo substrato, fazendo-se com que a velocidade de reação da enzima estabilize-se com o tempo, podendo fazer com que caia com o aumento da concentração. (FONTES, 1999).

A obtenção dos parâmetros cinéticos baseia-se na análise das curvas de

progresso da reação, obtidas por meio de ajustes de dados experimentais. Os gráficos da velocidade inicial em função da concentração de substrato geralmente são os mais utilizados para se estudar o comportamento da enzima em relação ao aumento do substrato. O comportamento hiperbólico deste gráfico é bem descrito pela cinética de Michaelis-Menten. Alternativamente, um perfil sigmoide também pode ser observado em casos de conexão cooperativa entre substrato e sítio ativo. A cinética cooperativa é bem descrita pelo modelo de Hill ou modelos mais complexos como o de Koshland (FONTES, 1999).

3.8.1. Modelo de Michaelis-Menten

A modelagem hiperbólica apresentada pelo comportamento das enzimas em relação ao aumento da concentração do substrato, foi descrita por Michaelis-Menten (1913), ao estudarem a ação das invertases na decomposição da sacarose. O trabalho original de Michaelis-Menten (1913) foi baseado em uma enzima específica que converte um único substrato em um único produto, assumindo uma etapa totalmente irreversível. Seu objetivo era determinar a taxa de produção de molécula de produto (Faria, 2021).

Uma das suposições iniciais do modelo é que existe um equilíbrio químico na reação de formação do complexo enzima-substrato. Essa proposição impõe que as taxas de desenvolvimento da reação, direta e inversa, entre enzima e substrato para formação do complexo transitório devem ser iguais, como esquematizado na equação 11.



Essa proposição impõe que para que haja validade da equação, as taxas de desenvolvimento da reação, direta e inversa, entre enzima e substrato para formação do complexo transitório devem ser iguais ($k_1 = k_2 = K$). Tal exigência é conhecida como hipótese do equilíbrio, e insere uma grande restrição à aplicação do modelo (ENGEL, 1981). Em 1925, Briggs e Haldane desenvolveram uma expressão formalmente igual à estabelecida por Michaelis-Menten, suprimindo a hipótese do equilíbrio e inserindo uma nova suposição mais flexível, denominada hipótese do estado estacionário.

Este estado estacionário propõe que uma reação enzimática pode ser

subdividida em duas etapas. A primeira, denominada pré-estacionária, abrange o período de tempo imediatamente seguinte ao início da reação, e é caracterizada pelo aumento da concentração do complexo intermediário. A etapa subsequente é designada etapa estacionária, a qual pressupõe que a concentração do complexo enzima substrato está quase em equilíbrio, como demonstrado no esquema a seguir.



Sabendo-se que a relação entre as constantes de equilíbrio é denominada K_m (constante de Michaelis-Menten para hipótese de estado estacionário), obtém-se a equação 13, conhecida como equação cinética de Michaelis-Menten.

$$V_o = V_{m\acute{a}x} * \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (13)$$

Sendo V_o a velocidade inicial, $V_{m\acute{a}x}$ a velocidade máxima de reação, $[S]$ a concentração de substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten ou constante dosubstrato. A constante K_m pode ser interpretada como uma medida da afinidade da enzima pelo substrato quando verificada a condição de equilíbrio.

3.8.2. Modelo de Hill

O perfil sigmoide da velocidade inicial em função da concentração de substrato é observado em reações onde ocorre a ligação cooperativa da enzima ao substrato. Esse comportamento é exclusivamente observado quando uma enzima é capaz de estabelecer ligações simultâneas com várias moléculas de substrato (RODWELL et. al. 2015).

Hill propôs uma modelagem adequada a uma curva de perfil sigmoide, apresentada pela equação 14:

$$V_o = V_{m\acute{a}x} * \frac{[S]^n}{[k_{0,5}] + [S]^n} \quad (14)$$

Sendo $[k_{0,5}]$ a concentração de substrato a qual a enzima encontra-se

hemisaturada, ou seja, com velocidade de reação igual a metade da velocidade máxima. O coeficiente n é o coeficiente de Hill, e uma medida do grau de cooperatividade da enzima, o qual depende do tipo e da força das interações entre os múltiplos sítios ativos e as moléculas de substrato.

O coeficiente de Hill é um parâmetro empírico cujo valor depende do número, do tipo e da força das interações entre os múltiplos sítios ativos e as moléculas de substrato. Para n igual a 1, a equação de Hill é reduzida ao comportamento cinético apontado por Michaelis-Menten, indicando que há ausência de cooperatividade entre enzima e substrato, com todos os sítios ativos comportando-se independentemente. Se n é maior que 1, a enzima apresenta cooperatividade positiva, sugerindo que a ligação de um substrato a um sítio ativo aumenta a afinidade dos sítios restantes. Quanto maior o valor do coeficiente maior o grau de cooperatividade e mais acentuado o caráter sigmoide do diagrama da velocidade inicial em função do tempo. Valores de n inferiores a 1 indicam cooperatividade negativa do ligante com o sítio ativo enzimático (RODWELL et. al. 2016; WEISS, 1997).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Pré-tratamento e funcionalização do suporte de imobilização

A sílica gel pura (Sigma-Aldrich®) foi preparada de acordo com o método adaptado de MENDES (2011). Partículas do suporte (63 – 200 μm) foram lavadas com etanol P.A 95 % ($v v^{-1}$) na proporção de 1:5 (massa de suporte: volume de solvente) sob agitação magnética branda por 6 horas à temperatura ambiente. Uma fração de partículas de sílica-gel lavada foi funcionalizada com solução de glutaraldeído 25 % (vv^{-1}) e tampão tris-acetato 0,2 mol L^{-1} , pH 5,5. A ativação do suporte ocorreu na proporção de 1:28 (massa de suporte: volume de solução) sob agitação magnética branda por 18 horas a 25 °C. Partículas de sílica pura e funcionalizada foram filtradas à vácuo, secas em estufa à 60 °C por 24 horas e usadas para ensaios de imobilização da enzima por adsorção física e ligação covalente, respectivamente.

4.2 Produção da enzima extracelular microbiana

4.2.1 Micro-organismo e condições de cultivo

Para a produção da enzima FTase extracelular, foi utilizada a cepa de *A. oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP). O pellet contendo esporos do micro-organismo foi ressuspendido em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 70 μL foram inoculadas em meio sólido 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 com auxílio 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 (Isofar®) 20 % ($m v^{-1}$) e ajustada a quantidade de

esporos com auxílio de Câmara de Neubauer (Newoptics®) para aproximadamente 1×10^7 esporos. mL⁻¹, seguido de armazenamento sob refrigeração a - 6 °C.

4.2.2 Cultivo celular submerso

A enzima frutossiltransferase extracelular foi produzida, por cultivo celular submerso, a partir do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 utilizando meio de cultura sintético, pH 5,5, constituído por: sacarose comercial (150 g L⁻¹), extrato de levedura (5,0 g L⁻¹), NaNO₃ (5,0 g L⁻¹), KH₂PO₄ (2,0 g L⁻¹), Mg₂SO₄.7H₂O (0,5 g L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (0,3 g L⁻¹) e FeSO₄.7H₂O (0,01 g L⁻¹). Um volume de 50 mL do meio de cultura foi adicionado em frascos erlenmeyers, vedados com algodão e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 120 °C e 2,022 atm. Após a esterilização, os frascos foram incubados em agitador orbital do tipo *shaker* (Tecnal®, modelo TE-4200), inoculando-se 500 µL de suspensão de esporos do fungo na concentração de 1×10^7 esporos mL⁻¹, dando-se início ao cultivo celular conduzido por 64 horas a 30 °C e 200 rpm (CUNHA *et al.* 2019; GONÇALVES *et al.* 2020; FARIA *et al.* 2021; SILVA *et al.*, 2021). Ao término do cultivo, o meio de cultura foi filtrado à vácuo e o permeado (caldo filtrado), contendo FTase extracelular, foi utilizado para estudos posteriores de imobilização e caracterização bioquímica das propriedades da enzima.

4.3 Ensaio de imobilização enzimática

Os ensaios de imobilização da FTase extracelular foram realizados de acordo com o método descrito por Faria *et al.* (2021). Um volume de 10 mL de caldo (contendo a enzima FTase extracelular), previamente filtrado à vácuo, foi adicionado em frasco Erlenmeyer contendo 1 g do suporte sílica gel puro. A imobilização foi conduzida em Banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) por 6 horas, mediante condições experimentais (temperatura, pH e velocidade de agitação) definidas pela matriz de planejamento (Tabela 3). Ao término da imobilização, coletou-se 0,1 mL do sobrenadante para monitoramento da atividade de transfrutossilidação do caldo. Posteriormente, as amostras foram filtradas à vácuo e a torta retida (derivado enzima-suporte) foi submetida a

ensaios de atividade enzimática padrão (item 4.6.1) para o cálculo dos parâmetros de imobilização ou armazenada para estudos subsequentes de caracterização bioquímica da enzima imobilizada. Após os ensaios de atividade com a enzima imobilizada, o derivado foi filtrado à vácuo, lavado abundantemente com água destilada e levado à estufa para secagem à 100 °C por 24 h para determinação da sua massa seca.

Os ensaios de imobilização, envolvendo o suporte funcionalizado, foram realizados mediante condições experimentais (temperatura, pH e velocidade de agitação).

4.3.1 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram obtidos conforme descrito por MENDES *et al.* (2012) e Ferreira *et al.* (2019). O rendimento de imobilização (RI) foi calculado pela Equação (4) (tópico 3.4) medindo-se o número de unidades de atividade de transfrutossilacção no sobrenadante antes e após os ensaios de imobilização. A percentagem de atividade recuperada (AR) foi calculada pela Equação (2) (tópico 3.4) por meio da determinação da atividade da enzima imobilizada (atividade de transfrutossilacção aparente) em relação ao número de unidades de enzima que desapareceram do sobrenadante (teoricamente imobilizado).

4.3.2 Planejamento experimental

A matriz de planejamento experimental (Tabela 3) foi obtida por meio do software Protimiza Experimental Design®. Um planejamento do tipo Delineamento Composto Central (DCC), constituído por 11 ensaios com triplicata no ponto central (Tabela 3) foi utilizado para o estudo de três variáveis (fatores) de imobilização, sendo elas: temperatura, pH e velocidade de agitação. Para cada fator, foram atribuídos três níveis, escolhidos após uma série de ensaios preliminares. Como variáveis respostas, foram definidos os parâmetros (em %): (i) rendimento de imobilização (RI) e (ii) atividade recuperada (AR), calculados conforme item 4.5.

O modelo para a superfície de resposta foi ajustado para ambas as

variáveis respostas (Y). As funções de resposta de segunda ordem para os fatores foram expressas pela Equação 15 e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p \leq 0,10$.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 * X_1 + \beta_2 * X_2 + \beta_3 * X_3 + \beta_{12} * X_1 * X_2 + \beta_{13} * X_1 * X_3 + \beta_{23} * X_2 * X_3 \quad (15)$$

em que X_1 , X_2 e X_3 representam os níveis dos fatores temperatura (em °C), pH e velocidade de agitação (em rpm), respectivamente, enquanto β_0 , β_1 , β_2 , β_3 , β_{12} , β_{13} e β_{23} representam os valores dos coeficientes estimados pelo modelo estatístico.

Tabela 3 — Matriz de planejamento experimental

ENSAIO	TEMPERATURA (°C) - X1	PH -X2	VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (RPM) – X3
1	25 (-1)	4,5 (-1)	100 (-1)
2	45 (1)	4,5 (-1)	100 (-1)
3	25 (-1)	6,5 (1)	100 (-1)
4	45 (1)	6,5 (1)	100 (-1)
5	25 (-1)	4,5 (-1)	250 (1)
6	45 (1)	4,5 (-1)	250 (1)
7	25 (-1)	6,5 (1)	250 (1)
8	45 (1)	6,5 (1)	250 (1)
9	35 (0)	5,5 (0)	175 (0)
10	35 (0)	5,5 (0)	175 (0)
11	35 (0)	5,5 (0)	175 (0)

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.4 Caracterização física e química do biocatalisador

A morfologia das partículas de sílica gel foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando microscópio eletrônico (Zeiss EVO MA-10, Alemanha), com tensão de aceleração de 20 kV e distância de 10 mm. As amostras foram previamente preparadas em *Vap Prep* 61, Sample Degas System, secas por 2 h a 60 °C e suas áreas superficiais específicas foram determinadas por fisissorção de nitrogênio a 77 K em analisador Micromeritics Gemini VII, usando o método de Brunauer-Emmett-Telle (BET). A caracterização das ligações químicas e estrutura do complexo enzima-suporte (biocatalisador heterogêneo), na presença e ausência da enzima imobilizada, foi determinada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) usando Espectrômetro (Agilent Cary 630, Estados Unidos) operado para uma faixa de 650 a 4000 cm^{-1} .

4.5 Caracterização bioquímica da enzima imobilizada

4.5.1 Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e determinação dos parâmetros cinéticos

As atividades de transfrutoseilação da enzima imobilizada em sílica gel pura e funcionalizada foram determinadas a 50 °C em meio reacional constituído por 1,2 mL de tampão tris acetato 0,2 mol. L^{-1} , pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose comercial (substrato) nas concentrações de 200 g.L^{-1} , 300 g.L^{-1} , 400 g.L^{-1} , 470 g.L^{-1} , 500 g.L^{-1} e 600 g.L^{-1} . Ao meio reacional, foi adicionado 1,0 g de suporte, contendo a enzima imobilizada, e as atividades foram determinadas conforme método descrito no item

4.8.1. Os parâmetros cinéticos ($V_{máximo}$, K_M , $K_{0,5}$ e n) foram estimados a partir de análises de regressão não linear mediante ajuste dos modelos de Michaelis-Menten (Equação 13) e Hill (Equação 14) aos dados experimentais de atividade enzimática. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.2 Ensaios de estabilidade térmica e determinação dos parâmetros termodinâmicos

As enzimas imobilizadas em sílica gel pura e funcionalizada foram

incubadas em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5, na ausência de substrato, para uma ampla faixa de temperatura (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). As amostras foram retiradas em intervalos de tempo distintos (1 h, 2 h, 4 h e 16 h), imediatamente resfriadas em banho de água e gelo por 5 min e as atividades enzimáticas residuais foram determinadas sob condições padrão (item 4.8). Os experimentos foram realizados em triplicata. A constante de desativação térmica de primeira ordem (k_d , em min⁻¹) foi estimada por meio do ajuste do modelo de Sadana e Henley (1987) (Equação 5) aos dados experimentais de atividade residual versus tempo de incubação (PERNA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2021). A energia de ativação (ED, em kJ mol⁻¹) para a denaturação térmica da enzima imobilizada foi determinada pela linearização da Equação de Arrhenius (Equação 6). O tempo de meia vida ($t_{1/2}$, em min) e as variações de entalpia (ΔH_D , in kJ mol⁻¹), energia de Gibbs (ΔG_D , in kJ mol⁻¹) e entropia (ΔS_D , in kJ mol⁻¹ K⁻¹) de ativação para a denaturação térmica enzimática foram determinadas pelas Equações (7), (8), (9) e (10), respectivamente (FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; SAQIB *et al.* 2010; SILVA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2015) conforme descrito no item 3.5.

4.5.3 Ensaio de estabilidade frente ao pH de incubação

A enzima imobilizada em sílica gel pura e funcionalizada foi incubada, na ausência de substrato, em tampão tris acetato 0,2 mol L⁻¹ em diferentes pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5), durante 24 horas a 4 °C. Ao término da incubação, as atividades de transfrutossilagem foram determinadas sob condições padrão (item 4.8.1). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.4 Ensaio de estabilidade operacional

As enzimas imobilizadas em sílica gel pura e funcionalizada foram inseridas em meio reacional contendo 3,7 mL de solução de sacarose comercial 63,6 % (m v⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5. As reações enzimáticas foram determinadas sob condições padrão (item 4.8.1). Ao término de cada ciclo batelada, correspondente a 1 h de reação, o derivado enzima-suporte foi removido do meio reacional por filtração à vácuo e lavado

abundantemente com água destilada para a remoção das moléculas de reagentes e/ou produtos do seu microambiente. Posteriormente, o derivado imobilizado foi reintroduzido em um novo e similar meio reacional. As atividades de transfrutossilação foram avaliadas considerando a quantidade de ciclos reacionais enzimáticos e os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.5 Ensaio de estabilidade de armazenamento

Os ensaios de estabilidade de armazenamento foram realizados com as enzimas imobilizadas em sílica gel pura e funcionalizada ao decorrer de 4 dias. O derivado imobilizado foi mantido em solução tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5, na ausência de substrato, sob refrigeração a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e suas atividades de transfrutossilação foram monitoradas diariamente sob condições experimentais padrão (item 4.6). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Determinação das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas de transfrutossilação (A_T) foram determinadas conforme procedimento descrito por Cunha *et al.* (2019), Gonçalves *et al.* (2020), Faria *et al.* (2021) e Garcia *et al.* (2021). Para isso, 1,0 g do derivado (enzima imobilizada) ou 0,1 mL da enzima solúvel (presente no caldo) foi incubado com 3,7 mL de solução de sacarose 63,6 % (m v^{-1}) e 1,2 mL de tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5. A reação foi conduzida em banho Dubnoff a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 190 rpm por 1 h e interrompida pela imersão do meio reacional em água em ebulição por 10 min, seguido por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min para inativação enzimática. Posteriormente, o meio reacional foi filtrado à vácuo e a concentração de açúcares redutores e glicose foram quantificadas (item 4.8.2). As atividades de transfrutossilação (A_T) das enzimas solúvel ($A_T^{\text{solúvel}}$) e imobilizada ($A_T^{\text{imobilizada}}$) foram calculadas pelas equações 16 e 17, respectivamente.

$$A_T^{solúvel} = \frac{[F_T]V_R}{V_E t_R} \quad (16)$$

$$A_T^{imobilizada} = \frac{[F_T]V_R}{m t_R} \quad (17)$$

em que $[F_T]$ é a concentração molar de frutose transfrutossilada (em $\mu\text{mol L}^{-1}$), V_R é o volume do meio reacional (em L), V_E é o volume de solução enzimática (caldo) (em mL), m é massa do derivado (em g) e t_R é o tempo de reação (em min).

Por definição, uma unidade (1U) de atividade de transfrutossilação refere-se à quantidade de enzima que transfere um micromol (1 μmol) de frutose (F_T) por minuto, sob condições experimentais estabelecidas (CUNHA *et al.*, 2019, FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021).

4.6.2 Quantificação dos açúcares

As concentrações de glicose (G) e açúcares redutores (AR) foram quantificados pelos métodos colorimétricos GOD/PAP® (kit enzimático glicose-oxidase) e DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico), respectivamente. As concentrações de frutose liberada (F) e frutose transfrutossilada (transferida) (F_T) no meio reacional foram determinadas pelas Equações (18) e (19) (CHEN *et al.*, 1996, CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.* 2021; GARCIA *et al.* 2021; GONÇALVES *et al.* 2020,; SILVA *et al.* 2021).

$$[F] = [AR] - [G] \quad (18)$$

$$[F_T] = [G] - [F] = 2 * [G] - [AR] \quad (19)$$

4.6.2.1 Determinação da concentração de açúcares redutores

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

(2013).

A solução DNS (Reagente A) foi preparada pela dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$) (Dinâmica®) em 200,0 mL de solução 2 mols L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®). Paralelamente, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (Reagente B) constituída por 600 g L^{-1} de tartarato duplo de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) (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 de AR foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 1,0 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 1,0 mL da solução preparada. A reação foi conduzida em banho termostatizado a 100 °C por 10 min e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 8,0 mL de água destilada. Posteriormente, triplicatas de alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) a 540 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações de AR mediante auxílio da curva analítica obtida para o método DNS (Figura 17, Apêndice A). O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco, porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática de transfrutoseilação, por água destilada.

4.6.2.2 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose presente no meio reacional foi determinada pelo método GOD-PAP, que 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, que é oxidado por meio da peroxidase, que em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato produzem coloração rosácea ou vermelha (BOBBIO; BOBBIO, 2005; FARIA, 2021; WONG; WONG; CHEN, 2008). O kit enzimático utilizado foi da marca LaborLab®.

A quantificação da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em um tubo de ensaio, de 35 μL de amostra, obtida da reação enzimática, em 3,5 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (marca Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min. Posteriormente,

triplicatas de alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Edutec ®, modelo EEQ901A-B) a 505 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações do açúcar mediante auxílio da curva analítica obtida para o método GOD-PAP® (Figura 18, Apêndice A). Procedimento analítico similar foi realizado para a obtenção do branco, porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática, por água destilada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados de acordo com a caracterização dos materiais sílica gel pura (sem tratamento) e a sílica gel funcionalizada com glutaraldeído, através do método de BET, BJH e MEV.

Posteriormente, os parâmetros de imobilização para a sílica gel foram analisados de acordo com a temperatura, pH e agitação, a fim de se otimizar a imobilização da Ftase extracelular.

A análise dos parâmetros de imobilização: rendimento de imobilização e atividade recuperada, foram analisados para a enzima Ftase imobilizada em sílica gel funcionalizada com glutaraldeído, comparando-se os resultados com a Ftase imobilizada em sílica gel.

A fim de se avaliar a influência do substrato e obter-se os parâmetros cinéticos da enzima imobilizada em sílica gel e sílica gel funcionalizada, avaliou-se, para diferentes concentrações de substrato, ambas imobilizações, através dos modelos de Michaelis-Menten e o modelo de Hill.

Foram analisados, por fim, os ensaios de estabilidade térmica, frente ao pH, aóreo e aos ensaios de armazenamento as enzimas imobilizadas em sílica gel, e sílica gel funcionalizada com glutaraldeído.

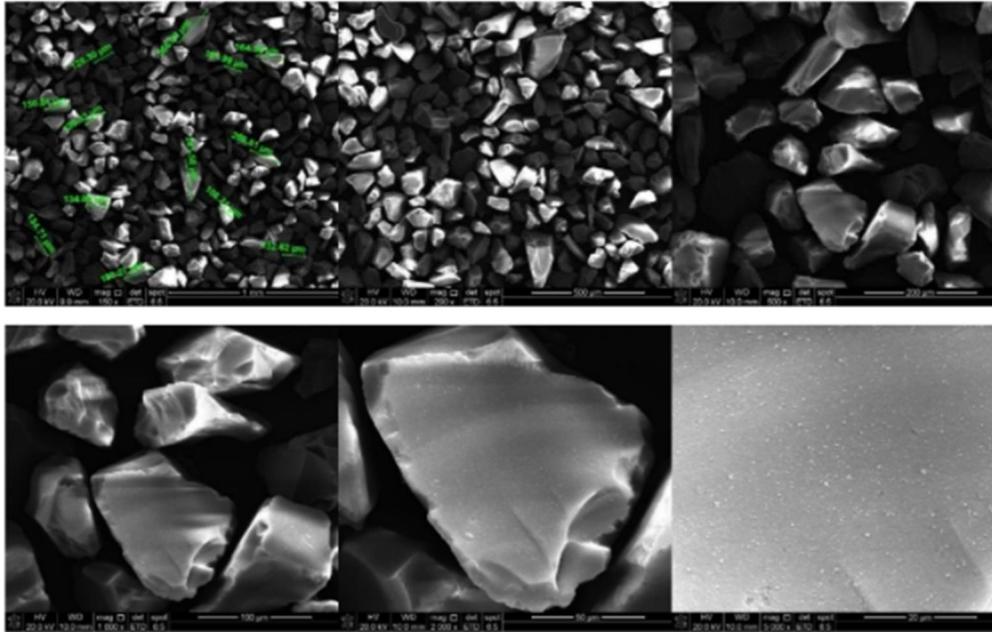
5.1 Caracterização físico-química do biocatalisador imobilizado

Neste item, serão analisadas as características físico-químicas do biocatalisador antes do processo de imobilização, para as análises de MEV, BET e BJH, e de IF-TR para os suportes após a imobilização com a enzima Ftase.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) referentes à morfologia de amostras de partículas de sílica gel pura, antes da imobilização enzimática, são mostradas na Figura 3. Observou-se que as partículas do suporte apresentaram uma faixa de tamanho compreendida entre 102 μm a 256 μm (Figura 4a). Verificou-se, ainda, partículas, na sua maioria, uniformes (Figuras 3b-c). Com o aumento da micrografia (1000 x - Figura 3d; 2000 x - Figura 3e; 5000 x - Figura 3f), foi possível observar a presença de uma superfície

uniforme. Uma maior rugosidade na superfície do material suporte favorece a adsorção, pois aumenta a área superficial disponível para interações inclusive, não específicas, da enzima (BLANCO *et al.*,2008).

Figura 3 — Micrografias eletrônicas de amostras de partículas de sílica gel



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Na Tabela 4 são apresentados os resultados referentes às áreas superficiais específicas, assim como o tamanho e volume de poros para as partículas de sílica gel pura e funcionalizada. Pelo método BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938), observou-se uma redução de área superficial específica do suporte de aproximadamente 1,6 vezes quando partículas de sílica gel foram submetidas à funcionalização e adição dos grupos funcionais específicos na parede do suporte, que reagiram com grupos reativos do tipo alcoxi presentes em alcoxissilanos mono, bi ou tri funcionais e os silanóis da matriz do suporte, ou irão apresentar uma forte ligação entre o suporte e os grupos funcionais presentes na enzima, que é o caso do Glutaraldeído, que atua através de ligações covalente segundo CARVALHO (2015).

Pelo método BJH (BARRET; JOYNER; HALLEND, 1951), foram obtidos tamanho de poro aproximadamente iguais para as partículas de sílica gel pura (56,92 Å) e funcionalizada (59,04 Å) (Tabela 4). Materiais que apresentam partículas com tamanho de poro na faixa de 20 Å a 500 Å são classificados como mesoporosos (JUSZCZAK *et al.*, 2002). Sílica gel mesoporosa, por apresentar grande área de superfície, elevada porosidade, tamanho de poros

definidos e grande volume de poros, proporciona versatilidade em adsorver compostos específicos (GOMES; FURTADO; SOUZA, 2018). Os resultados de caracterização física mostraram que o processo de funcionalização não afetou significativamente as propriedades texturais do suporte, uma vez que a sílica gel apresenta elevada resistência mecânica e, principalmente, estabilidades térmica e química (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

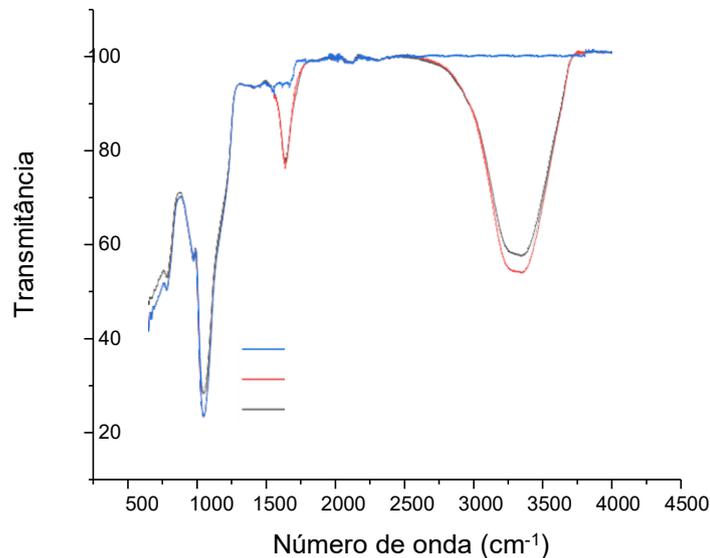
Tabela 4 — Caracterização de partículas de sílica gel pura e funcionalizada, obtida pelos métodos BET e BJH

Suporte	Área superficial específica (m²/g)	Tamanho de poro (Å)	Volume do poro (cm³/g)
Sílica gel pura	319,6 9	56,92	7,50 x 10⁻²
Sílica gel funcionalizada	198,9 3	59,04	3,59 x 10⁻²

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Os espectros do FT-IR para o suporte sílica gel (amostra A), e para a Ftase imobilizada em sílica gel (amostra B) e Ftase imobilizada em sílica gel funcionalizada com glutaraldeído (amostra C), contendo a Ftase microbiana imobilizada, estão dispostos na Figura 4.

Figura 4 — Espectro de infravermelho por transformada de Fourier das amostras **A** (sílica gel na ausência da enzima), **B** (Ftase imobilizada em sílica gel) e **C** (Ftase imobilizada em sílica gel funcionalizada)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda : Amostra A — ; Amostra B — ; Amostra C — .

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

A sílica gel pura e funcionalizada, ambos os suportes contendo a Ftase imobilizada, apresentaram duas regiões ativas no infravermelho, a de 3300 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} . A banda na região de 3300 cm^{-1} pode corresponder ao estiramento de grupos N-H (aminas) da enzima, enquanto a banda na região de aproximadamente 1630 cm^{-1} pode estar ligada a um conjunto de vibrações de grupamento amida (estiramento C-O, estiramento C-N e dobramento de N-H). Porém, a banda na região de 3300 cm^{-1} alarga-se desde 3700 cm^{-1} a aproximadamente 3000 cm^{-1} , cuja intensidade normalizada é superior à da banda de 1630 cm^{-1} . Segundo SOCRATES (2001), a banda correspondente ao grupamento amida deveria ser mais intensa, o que não é observado na Figura 4. A intensificação da banda correspondente ao estiramento N-H (aminas) pode estar associada à uma sobreposição de bandas, incluindo estiramento O-H em aproximadamente 3270 cm^{-1} . Os resultados obtidos confirmam a presença de

grupos orgânicos da enzima na superfície dos suportes sílica gel pura e funcionalizada após a imobilização da biocatalisador por adsorção física e por ligação covalente, respectivamente.

A sílica apresenta-se em unidades tetraédricas SiO_4 distribuídas aleatoriamente e unidas por pontes de siloxanos, Si-O-Si, em seu interior e contém grupos silanóis vicinais, Si-OH, e geminais, HO-Si-OH, dispersos na superfície, os quais são sensíveis às reações que possibilitam as modificações químicas desta matriz. O glutaraldeído constrói ligações com estes grupos siloxanos, e liga-se com os grupos aminos da enzima, adicionando uma ligação covalente entre a enzima e o suporte (CARVALHO, 2015).

5.2 Otimização dos parâmetros de imobilização

A fim de se estudar a influencia dos parâmetros de imobilização e otimiza-los, realizou-se um planejamento experimental, composto por 11 experimentos no qual o ponto central utilizado possuía a temperatura em 35 °C, pH em 5,5 e agitação de 175rpm, conforme utilizado por Faria (2021).

Os parâmetros de imobilização foram analisados de acordo com a matriz de experimentos (Tabela 3), e os resultados do planejamento experimental estão dispostos na Tabela 5. Observou-se que os maiores valores de atividade recuperada (AR) ($9,67 \pm 0,57$ %) foram obtidos ao se imobilizar a enzima sob condições definidas pelo ponto central (35 °C, pH 5,5 e 175 rpm), mesmo alcançando-se valores relativamente baixos de rendimento de imobilização ($12,33 \pm 1,15$ %). Para as melhores condições experimentais obtidas, verificou-se que os valores dos parâmetros de imobilização alcançados apresentaram baixa variação, indicando, portanto, uma boa reprodutibilidade do processo. De acordo com Rodrigues e lemma(2014), pontos centrais que apresentam altas variações não estão devidamente controlados, o que influencia diretamente na qualidade dos resultados obtidos com o planejamento experimental. Faria (2021) obteve valores de AR igual a $10 \pm 1,06$ % para RI e de 85 ± 6 % para RI ao se imobilizar FTase extracelular de *A. oryzae* IPT- 301 em sílica gel, utilizando-se de 35 °C, pH de 5,5 e uma velocidade de agitação de 175 rpm. Já Araujo *et al.* (2021) obteve AR igual a $14 \pm 0,5$ % e RI igual a $41 \pm 0,9$ % para a mesma enzima, nas mesmas condições experimentais de Faria (2021).

Tabela 5 — Matriz do Delineamento do tipo composto central de 11 ensaios para as respostas rendimento de imobilização e atividade recuperada com valores dos fatores reais e codificados

	Temperatura (°C)	pH	Velocida de Agitação (rpm)	Rendimento de imobilização (A_t) (%)	Atividade Recuperada (A_t) (%)
1	25 (-1)	4,5 (-1)	100(-1)	32,87	5,52
2	45 (1)	4,5 (-1)	100(-1)	33,92	4,52
3	25 (-1)	6,5 (1)	100(-1)	15,36	1,57
4	45 (1)	6,5 (1)	100(-1)	21,02	2,50
5	25 (-1)	4,5 (-1)	250(1)	30,32	7,01
6	45 (1)	4,5 (-1)	250(1)	29,67	4,59
7	25 (-1)	6,5 (1)	250(1)	21,33	6,92
8	45 (1)	6,5 (1)	250(1)	21,92	6,32
9	35(0)	5,5 (0)	175(0)	13,07	10,12
10	35(0)	5,5 (0)	175(0)	13,22	10,05
11	35(0)	5,5 (0)	175(0)	11,05	9,76

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Nota-se que os maiores valores de rendimento de imobilização (RI) foram maiores para o pH de 4,5. Verifica-se ainda que, ao se imobilizar a enzima em pH 4,5, a recuperação de atividade apresenta valores abaixo ao de pH 5,5. Já em pH mais básicos nota-se uma queda no RI, mas ainda apresenta uma maior atividade recuperada do que para pH de 4,5.

De acordo com Oliveira (2007), em pH mais ácidos, a atividade de transfrutoseilação é prejudicada pela hidrólise ácida da sacarose, fazendo-se com que a enzima não consiga realizar a atividade de maneira satisfatória,

apresentando valores baixos de atividade recuperada para tais pH.

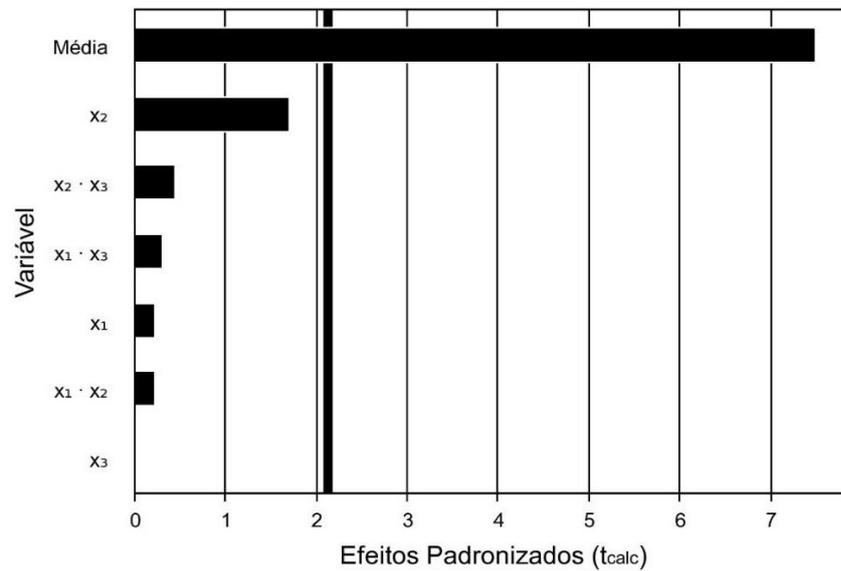
Isto mostra que um alto rendimento de imobilização não implica em uma alta atividade recuperada, já que na análise do rendimento não leva em conta que toda a enzima se aderiu na superfície do suporte, visto que, em seu cálculo, a enzima estudada está presente no caldo sobrenadante, não no suporte, podendo esta, ter se degradado devido ao pH mais ácido, os sítios ativos da enzima podem não estar expostos ao substrato, ou podem ter sofrido alterações em seus grupos iônicos (SHULER; KARGI, 2002).

Esse fato ainda pode estar relacionado com a porosidade do suporte e a possibilidade de o substrato não atingir os sítios ativos, considerando que a solução de sacarose é viscosa, e que, para suportes hidrofílicos como a sílica-gel, pode haver formação de agregados e de estruturas tridimensionais entre as partículas do suporte, podendo causar uma limitação difusional do substrato ao sítio catalítico da enzima imobilizada, conforme reportado por Ferreira (2017), que ao imobilizar a lipase em sílica aerosil® obteve rendimento de imobilização de 100% e atividade recuperada de 3,8%. Entretanto, a baixa recuperação de atividade pode ser compensada pela possibilidade de reuso da enzima imobilizada.

Ao se aplicar o planejamento experimental do tipo DCC (Tabela 5), buscou-se obter as variáveis (temperatura, pH e velocidade de agitação) significativas para o processo de imobilização da FTase extracelular em sílica gel pura. Foram considerados estatisticamente significativos os fatores ao nível de significância de 10 % ($p\text{-valor} \leq 0,10$). Bioprocessos que envolvem enzimas e microrganismos apresentam grande variabilidade e, portanto, recomenda-se aplicar níveis de significância mais elevados (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

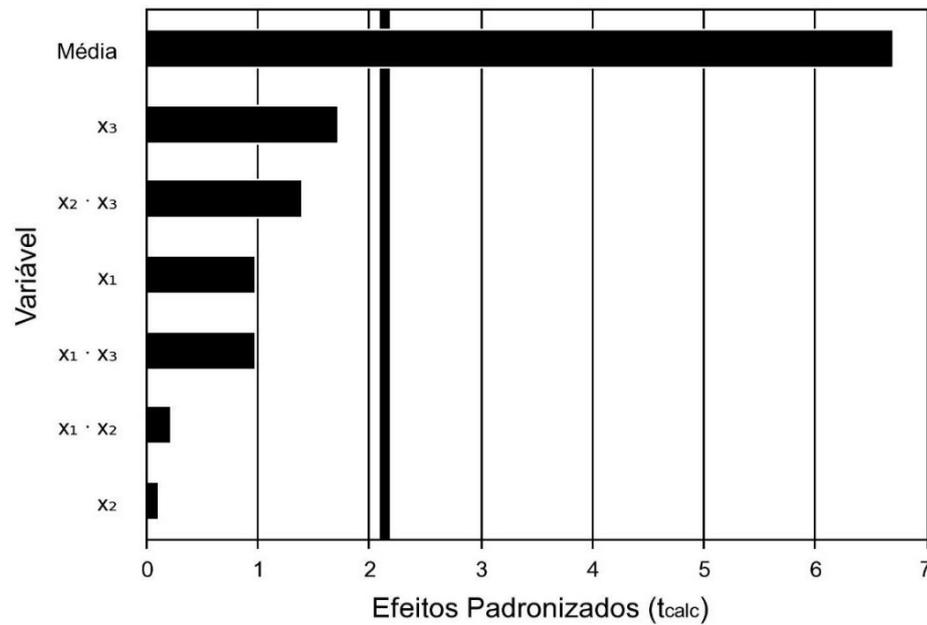
Os efeitos do Diagrama de Pareto são reflexos dos impactos das variáveis de imobilização nos parâmetros RI (Figura 5) e AR (Figura 6) ao se considerar alta significância e uma distribuição normal dos dados obtidos. Observou-se que os fatores temperatura, pH e velocidade de agitação não foram estatisticamente significativas para a faixa escolhida no estudo da imobilização da FTase em sílica gel pura e, portanto, não apresentaram influência significativa nas variáveis respostas RI (Y_1) e AR (Y_2) ao nível de significância de 10 % ($\alpha = 0,10$).

Figura 5 — Diagrama de Pareto obtido para a variável resposta Rendimento de Imobilização (RI).
X1 -temperatura (em °C), X2 – pH de imobilização e X3 - velocidade de agitação (em rpm)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 6 — Diagrama de Pareto obtido para a variável resposta Atividade Recuperada (AR).
X1 -temperatura (em °C), X2 – pH de imobilização e X3 - velocidade de agitação (em rpm)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Por meio dos resultados obtidos (Tabela 4), foram calculados os coeficientes de regressão para as variáveis respostas *RI* e *AR* apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 6 — Coeficientes de regressão para a variável resposta Y1 (rendimento de imobilização)

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	t Calculado	p - valor
Média	21,73	2,89	7,51	0,0017
X1^(a)	0,75	3,39	0,22	0,8359
X2^(b)	-5,75	3,39	-1,61	0,1655
X3^(c)	0,00	3,39	0,00	1,0000
X1. X2	0,75	3,39	0,22	0,8359
X1. X3	-1,00	3,39	-0,29	0,7829
X2. X3	1,50	3,39	0,44	0,6814

^(a)X1 - temperatura (em °C), ^(b)X2 - pH de imobilização, e ^(c)X3 - velocidade de agitação (em rpm).

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 7 — Coeficientes de regressão para a variável resposta Y2 (atividade recuperada)

FATORES	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	ERRO PADRÃO	T CALCULADO	P- VALOR
MÉDIA	13,27	1,98	6,71	0,0026
X1(A)	-2,25	2,32	-0,97	0,3870
X2(B)	0,25	2,32	0,11	0,9194
X3(C)	4,00	2,32	1,72	0,1597
X1. X2	-0,50	2,32	-0,22	0,8399
X1. X3	-2,25	2,32	-0,97	0,3870
X2. X3	3,25	2,32	1,40	0,2338

^(a)X1 - temperatura (em °C), ^(b)X2 - pH de imobilização, e ^(c)X3 - velocidade de agitação (em rpm).

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Com as respostas obtidas e, por meio da regressão, foi descrito os parâmetros RI (Y_1) (Equação 20) e AR (Y_2) (Equação 21) previstos pelos modelos em função das variáveis de imobilização codificadas.

$$Y_1 = 21,73 + 0,75 X_1 - 5,75 X_2 + 0,75 X_1 X_2 - X_1 X_3 + 1,5 X_2 X_3 \quad (20)$$

$$Y_2 = 13,27 - 2,25 X_1 + 0,25 X_2 + 4 X_3 - 0,5 X_1 X_2 - 2,25 X_1 X_3 + 3,25 X_2 X_3 \quad (21)$$

Por meio da análise de variância (ANOVA), foram verificados a validade estatística dos modelos gerados. Na Tabela 8 estão dispostos os dados de ANOVA para a variável resposta RI (Y_1), cuja percentagem de variação explicada (R^2) foi de 44,82 %. O valor do F_{calc} (0,5) foi inferior ao valor do $F_{tabelado}$ (6;16; 0,10) (2,94) invalidando o modelo e impossibilitando a geração da superfície de resposta e da curva de contorno.

Tabela 8 — Dados de ANOVA para a variável resposta RI (Y_1)

FONTE DE VARIACÃO	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	F_{CALC}	P-VALOR
REGRESSÃO	299,5	6	49,9	0,5	0,76088
RESÍDUOS	368,7	4	92,2		
FALTA DE AJUSTE	366	2	183	137,3	0,007
ERRO PURO	2,7	2	1,3		
TOTAL	668	10			
$R^2 = 44,82\%$					

$F_{tabelado}$ (6;16; 0,10) = **2,94**

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Na Tabela 9 estão dispostos os dados de ANOVA para a variável resposta AR (Y_2). Foi obtido uma percentagem de variação explicada (R^2) de 63,22 % para o modelo e, assim como para a resposta Y_1 , o valor de F_{calc} (1,1) foi menor que o valor de F_{tabelado} (2,94), tonando o modelo estatístico inválido e, portanto, sem possibilidade de geração da superfície de resposta e da curva de contorno.

Tabela 9 — Dados de ANOVA para a variável resposta AR (Y_2)

FONTE DE VARIACÃO	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	F_{calc}	p-valor
Regressão	296	6	49,3	1,1	0,468
Resíduos	172	4	43		
Falta de ajuste	169,5	2	84,8	63,6	0,015
Erro puro	2,7	2	1,3		
Total	468,2	10			

$F_{\text{tabelado}}(6;16; 0,10) = 2,94$

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Diante dos resultados apresentados para o planejamento experimental do tipo DCC, pode-se concluir que não foi possível otimizar a imobilização da enzima FTase extracelular em sílica-gel, para os parâmetros de temperatura, pH e de velocidade de agitação, mesmo apresentando uma influência do pH no parâmetro de rendimento de imobilização. Através dos diagramas de pareto e das análises das tabelas ANOVA, os parâmetros individualmente não influenciaram o processo de imobilização. Isto provavelmente se deve a uma ação destas variáveis na transferência de massa e nas propriedades de difusão, sendo dependentes de todos os parâmetros em conjunto.

Apesar das variáveis de imobilização não serem estatisticamente significativas e, portanto, os modelos estatísticos não serem validados pelas análises de variância, os estudos subsequentes de imobilização da FTase em sílica gel funcionalizada e de caracterização das propriedades bioquímicas do biocatalisador imobilizado foram realizados nas condições experimentais do

ponto central do planejamento de experimentos (35 °C, pH 5,5 e 175 rpm). Ressalta-se que, para essas condições, foram obtidos os maiores valores para o parâmetro AR.

De acordo com Ferreira (2017) e Faria (2021), o parâmetro de atividade recuperada é de extrema importância ao se estudar imobilização de enzimas, pois ela indica o quanto da atividade inicial oferecida foi realmente aproveitada pelo suporte. Além disso, o rendimento de imobilização calcula o quanto de enzima que foi retirada da atividade oferecida, mas não se calcula apenas as enzimas ativas, como as inativas também.

Por envolver tratamento químico do suporte, a enzima pode sofrer uma modificação no sítio ativo, fazendo com que esta tenha sua atividade recuperada alterada (reduzida ou aumentada) (CARVALHO, 2015; ZHOU, 2013).

A atividade recuperada apresenta a atividade das enzimas imobilizadas no suporte e uma carga máxima de enzima é muito desejável e atraente do ponto de vista industrial, pois permite alta atividade catalítica por volume do reator e, conseqüentemente, uma atividade mais rápida (BLANCH, 1997).

5.3 Parâmetros de imobilização da Ftase imobilizada em sílica gel e em sílica gel funcionalizada com glutaraldeído

Os parâmetros de imobilização (Tabela 10) foram obtidos para a Ftase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada nos suportes sílica-gel pura e funcionalizada com glutaraldeído, conforme condições experimentais definidas pelos ensaios de planejamento experimental (item 5.2).

Tabela 10 — Parâmetros de imobilização calculados para a Ftase extracelular adsorvida nos suportes sílica-gel pura e funcionalizada

Suporte	Parâmetro de imobilização (em %)	
	Rendimento (RI)	Atividade Recuperada (RA)
Sílica-gel pura ⁽¹⁾	12,33 ± 1,15	9,67 ± 0,57
Sílica-gel funcionalizada ⁽¹⁾	39,25 ± 1,72	6,76 ± 0,65

⁽¹⁾ os ensaios de imobilização foram realizados a 35 °C, pH 5,5 e 175 rpm, na proporção 1:10 (massa de suporte: volume de caldo de cultura).

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Analisando a Tabela 10, verificou-se um aumento expressivo do rendimento de imobilização, cerca de 3,5 vezes, ao se funcionalizar o suporte inorgânico com glutaraldeído. O aumento no valor desse parâmetro pode estar associado, principalmente, com a inserção de grupos reativos e/ou braço espaçador do aldeído na superfície das partículas da sílica-gel, favorecendo a imobilização, por ligação covalente, da enzima no suporte (MATEO *et al.*, 2007; CHAUBEY *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2017). A molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima e esta, por sua vez, é imobilizada covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminos, que se ligam aos grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff (BARBOSA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2017). Paula *et al.* (2008) reportaram que a ativação ideal do suporte ocorre quando há duas moléculas de glutaraldeído por grupo amino no suporte, gerando uma estrutura reativa com os resíduos de aminoácidos da enzima, protegendo a proteína do ambiente e podendo fazer com que a biomolécula se ligue mais facilmente ao suporte.

Com relação aos valores calculados para a atividade recuperada da FTase microbiana (Tabela 9), observou-se uma redução do parâmetro, cerca de 30% menor, para a enzima imobilizada em sílica-gel funcionalizada. Apesar da reação entre os grupos bifuncionais do glutaraldeído e grupos silanóis do suporte, favorecendo a estabilização térmica e operacional das enzimas, o reagente também pode ocasionar parcial inativação e/ou redução da atividade catalítica devido à alteração da conformação nativa do biocatalisador impostas pelas ligações entre a enzima e os grupos reativos do suporte (ERDEMIR *et al.*, 2009).

Ressalta-se ainda que a imobilização por ligação covalente propicia o surgimento de ligações mais intensas entre a superfície do suporte e a enzima e, por envolver vários pontos de contato, podendo ocorrer um aumento da rigidez da estrutura da biomolécula, resultando na perda e/ou redução da atividade enzimática (SOUZA *et al.* 2017, CANILHA; CARVALHO, 2006). Deve-se destacar também outros fatores que levam à redução da recuperação de atividade durante o processo de imobilização, tais como o bloqueio dos sítios ativos e as limitações difusionais, visto que o diâmetro dos poros do suporte

pode afetar negativamente o fenômeno de transferência de massa, tanto do substrato quanto do produto (SOUZA *et al.*, 2017; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que Silva (2021) estudou a FTase obtida através do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 solúvel e obteve que este apresenta uma perda de atividade de 50% em 6 horas de armazenamento. Devido a isso, a atividade recuperada apresentou valores abaixo do esperado, pois muitas enzimas que se adsorveram aos suportes, já não estavam apresentando atividade.

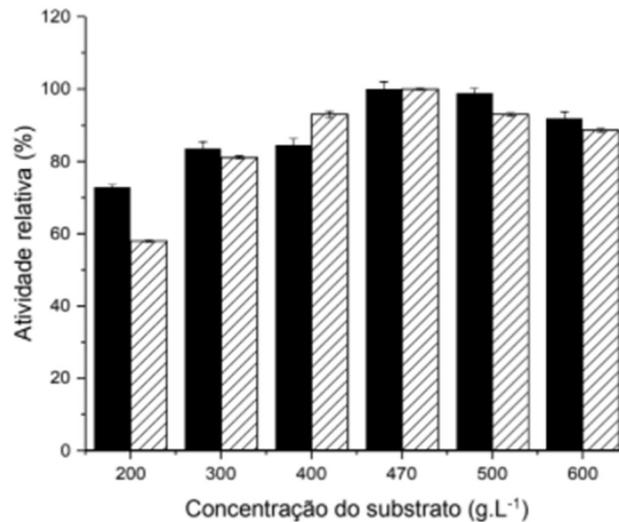
Como notado anteriormente, o suporte ativado com glutaraldeído foi maior do que a sílica pura quanto ao tamanho de poros, assim sugere-se que a carga proteica aceita por esse suporte também é maior. De acordo com a literatura o maior tamanho de poros possibilita um maior contato da enzima com o substrato e uma maior proteção que o suporte fornece a enzima aos meios reacionais com condições mais adversas (CARVALHO, 2015).

Consonante, os dados mostram que o rendimento de imobilização determina que FTase imobilizada em sílica gel funcionalizada com glutaraldeído foi maior do que a mesma imobilizada em sílica pura por adsorção física. Os parâmetros determinados sugerem que a proteína é mais estável quando imobilizada com a modificação do suporte, uma vez que o rendimento de imobilização é de 39,25%, enquanto o rendimento de imobilização para a enzima imobilizada em sílica gel é de 12,33%.

5.4 Influência da concentração de sacarose na atividade enzimática e parâmetros cinéticos

Os efeitos da concentração de sacarose na atividade de transfrutoseilação (A_T) da FTase imobilizada nos suportes sílica-gel pura e funcionalizada são mostrados na Figura 7.

Figura 7 — Influência da concentração de substrato na atividade de transfrutoseilação para a FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada nos suportes sílica gel pura e funcionalizada. A atividade máxima foi definida como 100 % de atividade relativa ($2,56 \pm 0,25$ U/g). Condições reacionais: solução de sacarose 20, 30, 40, 47, 50, 60% (m.v⁻¹) em tampão tris-acetato (pH 5,5)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: Sílica gel funcionalizada com glutaraldeído ; Sílica gel pura .

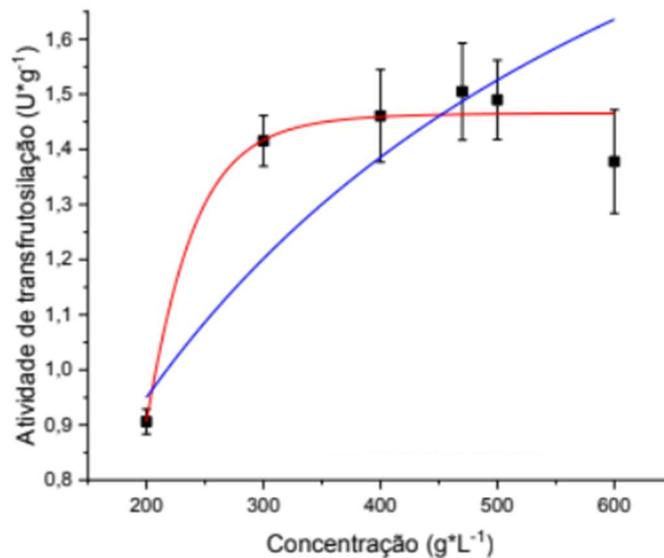
Os maiores valores de A_T foram obtidos para a concentração de sacarose acima de 400 g L⁻¹ e as atividades máximas ($1,50 \pm 0,09$ U g⁻¹ e $2,06 \pm 0,05$ g L⁻¹ para as enzimas imobilizadas em sílica gel pura e funcionalizada, respectivamente) ocorreram à 470 g L⁻¹ para a enzima imobilizada em ambos os suportes. Os menores valores de A_T foram alcançados para concentrações menores que 300 g L⁻¹ do substrato. Hidaka *et al.* (1988), Jung *et al.* (1989) reportaram diminuição de A_T de FTase *Aspergillus niger* para concentrações de sacarose abaixo de 50 % (m v⁻¹). Faria *et al.* (2021) também obtiveram baixos valores de A_T de FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel para uma faixa de concentração de sacarose compreendida entre 200 g L⁻¹ a 300 g L⁻¹. Os resultados apresentados (Figura 7) corroboraram com os estudos de Cunha *et al.* (2019) ao se avaliar os perfis de atividade da FTase solúvel de *A. oryzae* IPT-301, sugerindo que a imobilização dessa enzima microbiana nos suportes sílica-gel pura e funcionalizada não modificou a concentração de substrato para a obtenção do máximo valor de A_T .

Para concentrações de 600 g.L⁻¹ foi verificada uma pequena redução da atividade enzimática, possivelmente ocasionada pela inibição dos sítios ativos do biocatalisador pela sacarose. Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) reportaram inibição pelo substrato na atividade enzimática de FTase extracelular de *Rhodotorula* sp. imobilizada por adsorção em suporte constituído por nióbio-

grafite. Similarmente, Alvarado-Huallanco e Maugeri (2010) também reportaram efeitos de inibição pelo substrato para a FTase solúvel de *Rhodotorula* sp. para concentrações de sacarose acima de 70 % (m v⁻¹).

As Figuras 8 e 9 mostram os dados das atividades de transfrutoseilação e os ajustes dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e corporativo de Hill para a determinação dos parâmetros cinéticos do biocatalisador imobilizado em sílica-gel pura e funcionalizada, respectivamente.

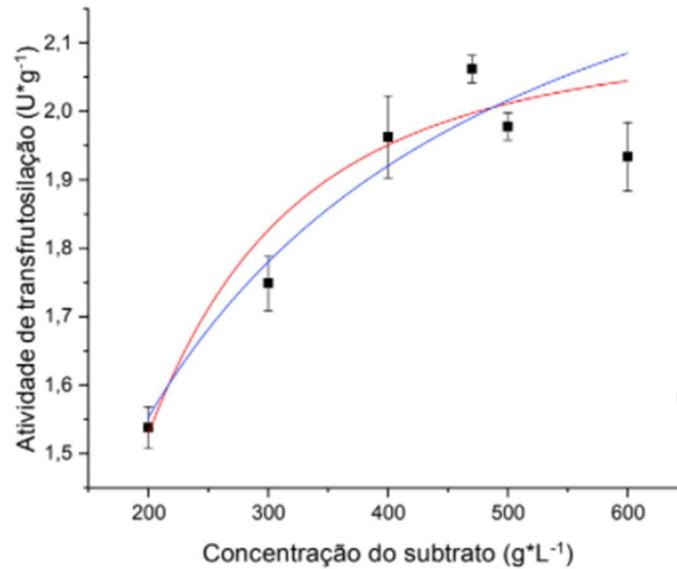
Figura 8 — Ajuste dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e de Hill aos dados experimentais de atividade de transfrutoseilação da enzima FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica gel pura



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: Atividade de transfrutoseilação ■; Modelo de Hill —; Modelo de Michaelis-Menten —.

Figura 9 — Ajuste dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e de Hill aos dados experimentais de atividade de transfrutoseilação da enzima FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica gel funcionalizada



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: Atividade de transfrutossilagem ■; Modelo de Hill —; Modelo de Michaelis-Menten —.

Os parâmetros cinéticos estimados para ambos os modelos, assim como seus respectivos coeficientes de determinação, estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11 — Parâmetros cinéticos obtidos para a FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel pura (P) e funcionalizada (F)

Parâmetro cinético		Modelo cinético	
		<i>Michaelis-Menten</i>	<i>Hill</i>
$V_{\text{máx}}$ (U g^{-1})	P	$2,56 \pm 0,65$	$1,46 \pm 0,03$
	F	$2,52 \pm 0,16$	$2,12 \pm 0,25$
K_m (g L^{-1})	P	$339 \pm 160,7$	$186 \pm 3,24$
	F	$124 \pm 33,78$	$129 \pm 34,55$
n	P	-	$7,11 \pm 2,14$
	F	-	$2,18 \pm 1,51$
R^2	P	0,83	0,99
	F	0,88	0,90

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A partir da comparação dos modelos e de seus coeficientes de determinação, foi possível constatar que o modelo que melhor explica a atividade enzimática da sílica-gel pura e funcionalizada é o modelo de Hill (R^2 de 0,99 e

0,9 respectivamente). Segundo Ghazi *et al.* (2007), enzimas com atividade de transferência de grupos frutossil, em geral, são bem descritas pela cinética de Hill, indicando a presença de fenômenos de cooperatividade entre enzima e substrato.

Para ambos os suportes, nota-se um n maior que 1 no modelo de Hill, que representa uma cooperatividade positiva, indicando que a afinidade dos demais sítios ativos da enzima com o substrato aumenta após a reação da primeira molécula de substrato com o sítio ativo. Segundo Weiss (1997), isso ocorre em enzimas com mais de um sítio catalítico e várias subunidades.

O baixo $V_{m\acute{a}x}$ pode ser atribuído ao baixo transporte de massa ou aprisionamento de moléculas de sacarose dentro dos poros da sílica, o que limita a ação do sítio ativo em moléculas de substrato (CHIANG *et al.* 1997).

Sabe-se que K_m representa a concentração de sacarose a qual a velocidade de reação é a metade da velocidade máxima. Os valores para o modelo de Hill e Michaelis-Menten estão equivalentes aos obtidos por Faria (2021) ao estudar a imobilização da FTase em sílica pura ($204,2 \pm 4,0 \text{ g. L}^{-1}$). Faria (2021) ainda obteve um $V_{m\acute{a}x}$ de $1,45 \pm 0,03$, muito próximo ao $1,46 \pm 0,03$ e $2,12 \pm 0,25$ (Sílica pura e funcionalizada, respectivamente) obtidos neste trabalho.

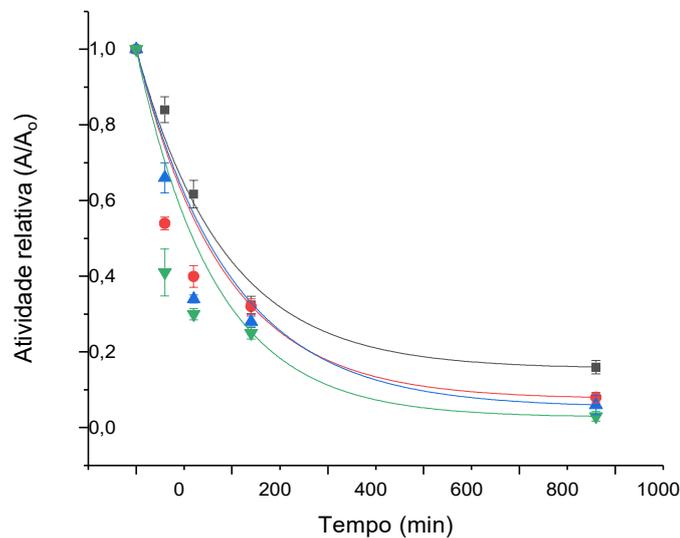
Nota-se, ainda, um K_m inferior para a enzima Ftase imobilizada em sílica gel funcionalizada com glutaraldeído, indicando uma maior afinidade entre a enzima e o substrato, pois leva-se menos tempo para atingir-se a concentração máxima.

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) ao imobilizar a frutossiltransferase de *Rhodotorula sp.* em minério de nióbio, obtiveram uma cinética correspondente a inibição por substrato, tal comportamento é comum em enzimas imobilizadas, devido a limitações difusionais e efeitos de partição de prótons (CHIANG *et al.*, 1997). Cunha (2019) estudou a cinética enzimática da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT- 301 livre, e constatou que a enzima segue o modelo hiperbólico de Michaelis-Menten.

5.5 Estabilidade térmica da enzima imobilizada em sílica-gel e imobilizada em sílica gel funcionalizada

A estabilidade térmica da enzima FTase imobilizada em sílica-gel pura e funcionalizada foi determinada para uma faixa de temperatura compreendida entre 30 °C e 60 °C ao decorrer de 16 h de incubação do biocatalisador na ausência de substrato. As Figuras 10 e 11 mostram a atividade de transfrutoseilação remanescente após o tratamento térmico da enzima imobilizada nos suportes sílica-gel pura e funcionalizada, respectivamente.

Figura 10 — Estabilidade térmica da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel pura ao decorrer de 16 h de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). Condições reacionais: solução de sacarose 47 % (m v-1) em tampão tris-acetato (pH 5,5)

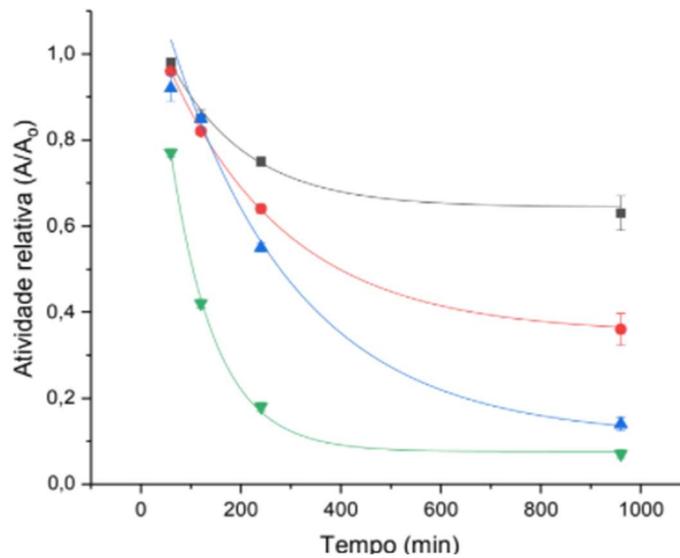


Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: 30 °C ■ ; 40 °C ● ; 50 °C ▲ ; 60 °C ▼.

Modelo de Sadana e Henley (1987) para: 30 °C — ; 40 °C — ; 50 °C — ; 60 °C —.

Figura 11 — Estabilidade térmica da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel funcionalizada ao decorrer de 16 h de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). Condições reacionais: solução de sacarose 47 % (m v-1) em tampão tris acetato (pH 5,5)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: 30 °C ■ ; 40 °C ● ; 50 °C ▲ ; 60 °C ▼.

Modelo de Sadana e Henley (1987) para: 30 °C — ; 40 °C — ; 50 °C — ; 60 °C —.

A FTase imobilizada em sílica-gel funcionalizada mostrou maior retenção de atividade de transfrutoseilação que a enzima adsorvida em sílica-gel pura para as temperaturas de incubação avaliadas. A maior retenção de A_T foi observada para a FTase incubada a 30 °C. Para essa temperatura, a FTase imobilizada em sílica-gel funcionalizada apresentou atividade residual acima de 70 % após 16 h de incubação, ao passo que o biocatalisador imobilizado em sílica-gel pura mostrou atividade residual de 20 % para o mesmo tempo de incubação. Observou-se ainda que, após 4h de incubação, para as temperaturas de 40 °C e 50 °C, a FTase imobilizada em sílica-gel funcionalizada apresentou A_T maior que 50 %, enquanto a enzima imobilizada no suporte puro reteve apenas 30 % de atividade. Para temperatura de 60 °C, foram observadas as maiores reduções de atividade enzimática nos tempos de incubação avaliados, mostrando que a FTase imobilizada por adsorção física e ligação covalente, sofreu denaturação térmica com retenção de atividade de aproximadamente 10 % após 16 h de incubação.

Soares *et al.* (1999) caracterizaram a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente, e, para uma faixa de temperatura de 40°C a 60°C, concluíram que a imobilização aumentou a estabilidade térmica da enzima. Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010)

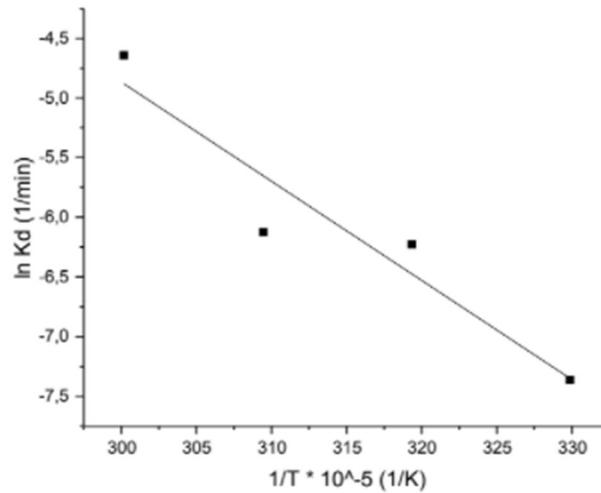
imobilizaram a FTase extracelular, de *Rhodotorula sp.*, em minério de nióbio e conseguiram aumentar o tempo de meia vida da enzima em até 2,3 vezes.

Ferreira (2018) estudou a estabilidade térmica para a lipase imobilizada vinda do *Geotrichum candidum* para a faixa de temperatura de 35 a 50°C, e obteve que a imobilização da lipase no suporte MANAE-agarose aumentou o tempo de meia vida em relação a enzima solução para todas as temperaturas estudadas. Já Oliveira (2020) estudou a estabilidade térmica da FTase imobilizada em nano partículas magnéticas de Fe₃O₄-quitosana, obtida através do fungo *Aspergillus aculeatus* na faixa de temperatura de 20 a 80°C. Os resultados indicaram alta termo estabilidade em temperaturas comumente usadas para a produção de frutooligossacarídeos.

Silva (2021) avaliou a estabilidade térmica da enzima FTase solúvel obtida através de um meio de cultivo submerso com o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 para a faixa de 30 a 60°C por 8 horas, e obteve uma atividade residual de até 80% para a temperatura de 30°C. Faria (2021) estudou a estabilidade térmica para a mesma enzima, mas imobilizada em sílica gel pura nas faixas de temperatura de 30 a 60°C durante 17 horas e obteve uma estabilidade superior a enzima solúvel.

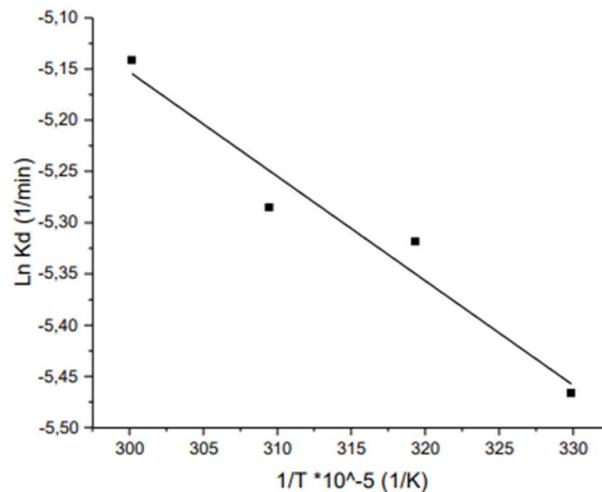
As constantes de desativação térmica de primeira ordem (k_d , em min^{-1}) para as diferentes temperaturas de incubação foram obtidas por regressão não-linear a partir do modelo de Sadana e Henley (1987), ao passo que a energia de ativação para a denaturação térmica (E_D , em kJ mol^{-1}) foi determinada pela linearização da Equação de Arrhenius (Figuras 12 e 13).

Figura 12 — Determinação da energia de ativação para a denaturação térmica (E_D). A equação de Arrhenius de $\ln(k_d)$ versus (T^{-1}) foi utilizada para estimar E_D da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel funcionalizada com glutaraldeído



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 13 — Determinação da energia de ativação para a denatuação térmica (ED). A equação de Arrhenius de $\ln(k_d)$ versus (T^{-1}) foi utilizada para estimar ED da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel pura



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Os parâmetros termodinâmicos da FTase imobilizada em sílica-gel pura e funcionalizada foram calculados a partir das curvas de inativação térmica e estão dispostos na Tabela 12.

Tabela 12 — Parâmetros termodinâmicos para a FTase imobilizada em sílica gel pura e funcionalizada para diferentes temperaturas de incubação

Parametros	FTase	Temperatura °C			
		30	40	50	60
R ²	P	0,77	0,82	0,77	0,86
	F	0,98	0,99	0,98	0,99
K _d (min ⁻¹)	P	0,0042	0,0049	0,0050	0,0058
	F	0,0006	0,0019	0,0021	0,0096
t _{1/2} (min)	P	164,00	141,44	136,79	118,45
	F	1089,77	351,51	316,88	71,85
E _d (kJ/mol)	P	8,47			
	F	69,15			
ΔH _d [*] (kJ/mol)	P	5,95	5,86	5,78	5,70
	F	66,6	66,5	66,46	66,38
ΔG _d [*] (kJ/mol)	P	98,38	101,33	104,56	107,48
	F	103,16	103,70	106,81	106,09
ΔS _d [*] (kJ/mol.K)	P	-0,30	-0,30	-0,30	-0,30
	F	-0,12	-0,11	-0,12	-0,11

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) é o tempo necessário para que a atividade da enzima caia para 50% da atividade original na temperatura dada (SAQIB *et al.* 2010). Um valor elevado do tempo de meia-vida é uma indicação de que o biocatalisador pode aguentar essa temperatura por mais tempo (GRIFFIN *et al.* 1984; SAQIB *et al.* 2010). Portanto, é um parâmetro econômico importante na aplicação industrial, porque quanto maior o valor de $t_{1/2}$, maior será o termo estabilidade da enzima (MARANGONI, 2003; SOUZA *et al.* 2015).

Da tabela 9, consegue-se analisar que para todas as temperaturas, menos 60°C, o tempo de meia vida foi superior quando se imobiliza em sílica gel funcionalizada. Este fato indica uma maior estabilidade da FTase quando imobilizada nesta condição. O maior tempo de meia vida, quando se imobiliza com a sílica ativada, deve-se ao fato de o glutaraldeído realizar ligações covalentes com a enzima, sendo esta ligação mais forte que a formada quando a enzima se liga a sílica pura (ligação por adsorção) (FERREIRA, 2018).

Desta forma, pode-se dizer que a enzima quando imobilizada em sílica funcionalizada, apresentou estabilidade de 6,65, 2,48, 2,32 e 0,61 vezes nas temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, respectivamente, em relação a FTase

imobilizada na sílica pura. Nota-se, também, que o tempo de meia vida cai com o aumento da temperatura, indicando que a enzima sofre denaturação mais rapidamente com o aumento da temperatura.

Maugieri (2011) estudou a estabilidade térmica da FTase extracelular, obtida através de *Rhodotorula sp.*, imobilizada em nióbio. A imobilização apresentou maior estabilidade térmica comparada com a enzima livre, na temperatura de 47 a 51°C, em um pH de 6,0. O tempo de meia vida aumentou 4 vezes quando se comparada a enzima livre.

Como se sabe, a energia de desativação térmica (E_d) e a quantidade mínima de energia necessária para que a enzima se denature. Portanto, altos valores deste parâmetro indica uma maior estabilidade térmica (Saqib *et al.* 2010; Ferreira *et al.* 2018). Através da tabela 9, observamos que a FTase imobilizada em sílica gel funcionalizada (69,15 kJ/mol) apresentou uma energia de desativação térmica 8 vezes maior que quando imobilizada em sílica pura (8,47 kJ/mol), indicando, então, uma maior estabilidade térmica.

A energia de desativação está diretamente relacionada a entalpia de denaturação (ΔH_d^*) que é um parâmetro termodinâmico muito importante para avaliar o total de energia necessário para denaturar a enzima, como pode ser observado na equação (9) (MARANGONI, 2003). Valores altos e positivos de E_d e ΔH_d^* indica alta estabilidade térmica da enzima (SOUZA *et al.* 2015; FERREIRA *et al.* 2018). Para todas as temperaturas, notou-se um maior ΔH_d^* para a FTase imobilizada em sílica gel funcionalizada (11 vezes maior), indicando uma maior estabilidade térmica da enzima aderida ao suporte através da ligação covalente.

A denaturação térmica de uma enzima também depende da entropia do sistema (ΔS_d^*), o qual expressa a quantidade de energia pela temperatura necessária para transitar de um estado ativo para um estado de denaturação da enzima (MARANGONI, 2003; SOUZA *et al.* 2015). Sabe-se que a abertura da estrutura da enzima é acompanhada de um aumento da entropia do sistema. Porém, os valores negativos obtidos, tanto para a sílica pura quanto para a funcionalizada, indicam um estado mais ordenado da enzima (GARCIA, 2018), indicando que o processo de denaturação térmica não é um processo natural, sendo necessário uma demanda de energia (E_d) para que a enzima atinja o

estado de denaturação (SAQIB *et al.*, 2010).

Além disso, o aumento da temperatura pode enfraquecer as ligações polares entre a enzima e o suporte, mas fortalecem as interações hidrofóbicas. Isso também pode explicar os valores negativos para ΔS_d^* obtidos, sendo que a uma maior tendência da enzima se contrair devido as interações hidrofóbicas do que ela se denaturar devido as fracas interações polares em altas temperaturas (Siddiqui *et al.* 1997).

A energia livre de Gibbs (ΔG_d^*) é o parâmetro mais confiável para avaliar a estabilidade térmica de um biocatalisador, pois considera as contribuições da entalpia e da entropia (SAQIB *et al.* 2010; SOUZA *et al.* 2015). Valores elevados deste parâmetro indicam elevada termo estabilidade, que significa um aumento na resistência a denaturação da enzima pela temperatura. Isto pode ser observado quando se imobiliza em sílica funcionalizada, já que apresenta valores maiores do que quando imobilizada em sílica pura. Vale ressaltar que todos os valores de ΔG_d^* obtidos são positivos, indicando que a transição da enzima do seu estado natural para o estado de denaturação não é um processo natural (GONÇALVES, 2020).

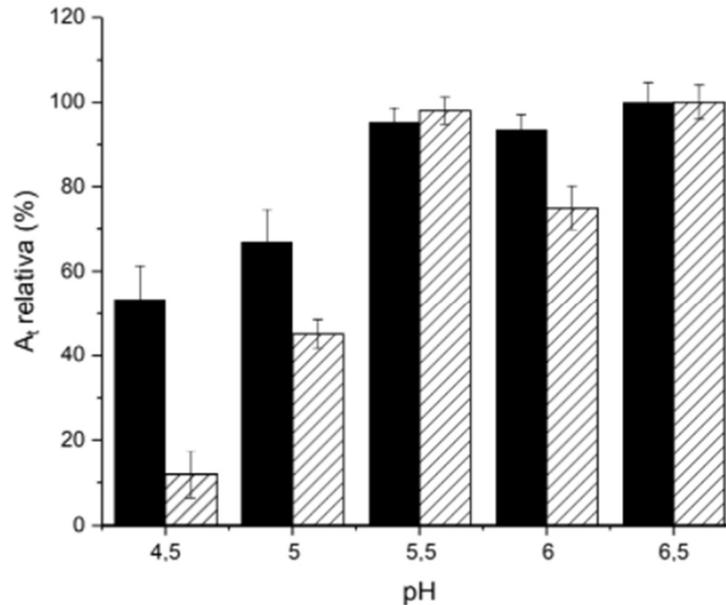
Faria (2021) estudou a estabilidade térmica da FTase imobilizada em sílica gel pura, comparando com a enzima livre, e obteve que o processo de imobilização aumentou a estabilidade da enzima, apresentando maiores valores de meia vida, de energia de denaturação térmica (E_d) e de energia de Gibbs (ΔG_d^*).

Os valores obtidos na tabela 9 indicam que a imobilização da FTase em sílica gel funcionalizada com glutaraldeído aumenta a estabilidade térmica e o tempo de meia vida quando comparada com a imobilização em sílica gel pura. A presença do glutaraldeído cria ligações covalentes, mais fortes que as ligações físicas apresentadas pela enzima na sílica pura, podendo, assim, “proteger” mais a enzima dos efeitos da temperatura (CARVALHO, 2015).

5.6 Efeito do pH na estabilidade da enzima imobilizada

O FTase imobilizado em sílica gel apresentou maior estabilidade a variações de pH do que a FTase solúvel em a maioria dos valores de pH testados. Os resultados obtidos se encontram na figura 14.

Figura 14 — Estabilidade da enzima FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel pura e funcionalizada após 24 h de incubação a 4 °C para diferentes valores de pH. Condições reacionais: solução de sacarose 47 % (m v-1), 190 rpm, tampão tris-acetato.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: Sílica gel funcionalizada com glutaraldeído ; Sílica gel pura .

A partir da figura 14, foi possível observar uma maior estabilidade da enzima imobilizada em pH de 5,5 a 6,5, obtendo-se A_T relativa acima de 80%. Nota-se, também, que para pH mais ácidos, como o de 4,5 e 5, houve uma queda mais brusca na A_T, sendo esta queda mais acentuada para a enzima imobilizada em sílica gel pura, mostrando que a funcionalização do suporte com glutaraldeído confere maior estabilidade à enzima, devido as ligações covalentes (Carvalho, 2015).

Geralmente, as enzimas possuem grupos iônicos em seus sítios ativos, que necessitam de condições ótimas e específicas de pH para atuarem de forma satisfatória. O pH do meio influencia diretamente na reação, modificando a distribuição de cargas da molécula enzimática, do substrato, das coenzimas e dos produtos (VERMA *et al.* 2019). O método de imobilização por ligações covalentes, se baseia na retenção de enzimas na superfície do suporte, formando ligações fortes, podendo modificar as conformações da enzima, deixando-a mais protegida a pH mais inóspitos (CARVALHO, 2015; ZHOU, 2013).

Tal resultado se mostra atrativo industrialmente, uma vez que enzimas

estável uma ampla faixa de pH têm como vantagens a redução de custo com estocagem e são viáveis para aplicação industrial (XU *et al.*, 2015). Oliveira (2007) obteve picos máximos de atividade em pH 4,5 e 6, para a enzima FTase imobilizada em minério de nióbio. A explicação para tal variação se deu ao comportamento da carga negativa do suporte.

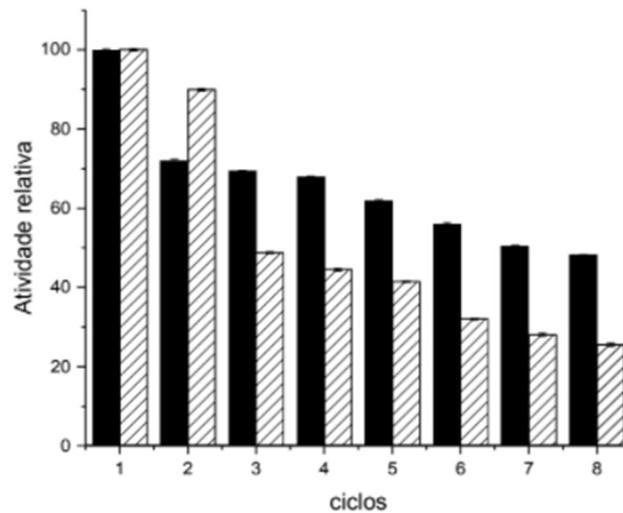
Cunha (2019) avaliou a influência do pH na atividade de transfrutoseilação da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 e apresentou uma melhor estabilidade a pH 6,0. Já Faria (2021) estudou a FTase imobilizada em sílica pura e obteve uma faixa ótima de pH entre 5,0 e 6,0.

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) estudaram a imobilização de FTase de *Rhodotorula sp.* por adsorção em minério de nióbio. A enzima imobilizada mostrou alta atividade e boa estabilidade em valores de pH de 4,5 e 6,0. Onderkova' *et al.* (2007) relatou a estabilidade da FTase imobilizada de *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-94 em um acrílico. Após uma incubação de 1 hora, a enzima mostrou atividade em pH de 3 a 6 com valor relativo de A_T 85%.

5.7 Estabilidade operacional da enzima imobilizada

A estabilidade operacional durante o ciclo da FTase imobilizada em partículas de sílica gel pura e funcionalizada é mostrada na figura 15.

Figura 15 — Estabilidade operacional da enzima FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel pura e funcionalizada avaliada durante ciclos reacionais consecutivos em batelada. A atividade máxima ($3,95 \pm 0,23 \text{ U g}^{-1}$) foi definida como 100 % de atividade relativa.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: Silica gel funcionalizada com glutaraldeído ; Silica gel pura .

Através da figura 15, nota-se uma queda na A_T relativa, para a enzima imobilizada no suporte funcionalizado, do primeiro para o segundo ciclo, obtendo uma atividade de 70%. Mas após este ciclo, a A_T se mantém em uma constante até o quinto ciclo, apresentando uma queda de 5% após ele. No final do oitavo ciclo, a enzima imobilizada em sílica gel funcionalizada apresentou uma atividade relativamente alta, com cerca de 50 % da atividade inicial, ao ser comparada com a FTase imobilizada em sílica gel, que após os 8 ciclos apresentou atividade relativa de aproximadamente 25%.

Para a FTase imobilizada em sílica gel pura, nota-se uma estabilidade no primeiro para o segundo ciclo, acompanhado de uma queda de 40% no terceiro ciclo, estabilizando-se até o quinto ciclo e caindo novamente no sexto. Ao término do oitavo ciclo, a FTase imobilizada em sílica gel pura apresentou uma A_T relativa um pouco acima de 20%.

Com isso, é possível determinar que a funcionalização do suporte com o glutaraldeído aumenta a estabilidade enzimática ao reuso, possibilitando de se reutilizar o biocatalisador por até 8 ciclos sem perdas expressivas de atividade (FARIA, 2021). Vale ressaltar que os resultados de estabilidade operacional corroboram com os resultados de meia-vida obtidos, visto que a enzima imobilizada no suporte funcionalizado apresentou uma menor queda na atividade.

Arrasto de enzima é uma das principais limitações da imobilização

enzimática por adsorção devido a fraca interação (van der Waals, hidrogênio e hidrofóbico forças)

entre a enzima e o suporte. Por esta razão, a funcionalização do suporte sílica gel com glutaraldeído se faz de extrema importância, acrescentando uma ligação mais forte (covalente) ao biocatalisador.

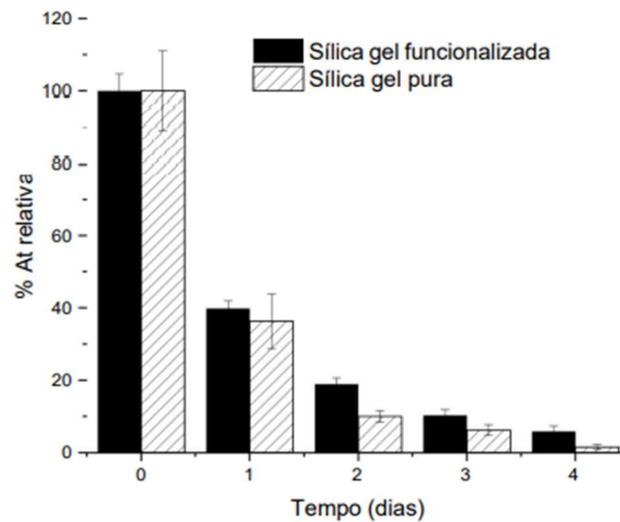
Sugahara e Varea (2014) relataram a reutilização da lipase extracelular de *Beauveria bassiana*, imobilizada por adsorção em sílica, por quatro ciclos de reação com 80,8% da atividade restante. Faria (2021) imobilizou FTase extracelular em sílica gel pura e obteve uma estabilidade de até 2 ciclos sem perdas expressivas.

Soares et al (1999) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa*, por ligação covalente, em sílica de porosidade controlada, obtendo resultados atrativos paraprocessos contínuos, visto que o biocatalisador foi reutilizado em vinte ciclos, apresentando queda no quarto ciclo, mas com atividade expressiva até o vigésimo ciclo. Yun e Song (1996) estudaram a produção contínua de FOS através da FTase imobilizada em uma resina porosa, e obtiveram uma queda de 8% em 30 dias de uso. Por fim, neste estudo pode-se verificar que a modificação que o glutaraldeído apresentou na sílica gel ocorreu por meio de adição dos grupos funcionais específicos na parede do suporte, que reagiram com grupos reativos do tipo alcoxi presentes em alcóxissilanos mono, bi ou tri funcionais e os silanóis da matriz do suporte, apresentando uma forte ligação entre o suporte e os grupos funcionais presentes na enzima (CARVALHO, 2015).

5.8 Estabilidade frente ao armazenamento da enzima imobilizada

Os resultados de estabilidade frente ao armazenamento da FTase imobilizada em sílica gel pura e funcionalizada são mostrados na Figura 16.

Figura 16 — Estabilidade frente ao armazenamento da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica gel pura e funcionalizada. A atividade máxima ($6,89 \pm 0,75 \text{ U g}^{-1}$) foi definida como 100 % de atividade relativa



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: Sílica gel funcionalizada com glutaraldeído ; Sílica gel pura .

Observou-se uma queda brusca na A_T relativa após o primeiro dia de armazenamento da enzima imobilizada em ambos os suportes, obtendo uma atividade de transfrutoseilação de aproximadamente 40% da atividade inicial. A partir do segundo dia a queda da atividade mostrou-se mais acentuada para a FTase imobilizada em sílica gel pura.

Ao término do quarto dia, ambos suportes apresentam baixas atividades relativas, sendo a A_T relativa da enzima no suporte funcionalizado de 6 % e na sílica gel pura de 1,5 %. Mesmo com a elevada queda, a enzima imobilizada em sílica gel funcionalizada apresentou uma maior estabilidade frente ao armazenamento, visto que a imobilização covalente, que a sílica gel funcionalizada com glutaraldeído apresenta, proporciona uma ligação mais duradoura e evita a perda por lixiviação quando entra em contato com o solvente, aumentando assim a estabilidade a longo prazo (PAGAN *et al.*, 2015).

Silva *et al.* (2021) estudaram o armazenamento da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301, e mostrou que a A_T da enzima solúvel reduziu em até 45 % da atividade inicial ao se armazenar o biocatalisador por 9 horas sob refrigeração, ressaltando a importância de se imobilizar a enzima para obter maiores estabilidades. Li (2009) estudou a imobilização de b-glucuronidase em micropartículas de CaCO_3 encapsuladas em alginato e apresentou atividade de 67% da atividade inicial após 27 dias, sendo que o biocatalisador foi armazenado em uma solução de 0,9 M de

bicalina dissolvida em tris-HCl (30 M e pH 7,0) na temperatura de 37°C.

JANG (2021) pesquisou a estabilidade ao armazenamento da enzima β -1,3-1,4- glucanase com ácido poli- γ -glutâmico produzido por *Bacillus* sp. SJ-10 em diferentes temperaturas (4°C, 25°C e 50°C). Os resultados mostram que a enzima imobilizada com poli- γ -glutâmico aumentou a estabilidade quando comparada com a enzima solúvel.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a enzima FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 foi satisfatoriamente imobilizada nos suportes sílica-gel pura, por adsorção física e sílica-gel funcionalizada, por ligação covalente. Resultados do FTI-R mostraram que a enzima FTase extracelular foi imobilizada nos suportes sílica gel pura e funcionalizada com glutaraldeído. Já os resultados do MEV apresentaram que as partículas do suporte possuem na faixa de tamanho compreendida entre 102 μm a 256 μm . Verificou-se, ainda, a presença de um sólido inorgânico amorfo e partículas com uma superfície uniforme e rugosa.

Pelo método BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938), observou-se uma redução de área superficial específica do suporte de aproximadamente 1,6 vezes quando partículas de sílica gel foram submetidas à funcionalização. Já pelo método BJH (BARRET; JOYNER; HALLEND, 1951), foram obtidos tamanho de poro aproximadamente iguais para as partículas de sílica gel pura (56,92 Å) e funcionalizada (59,04 Å).

Estudos de planejamento de experimentos do tipo DCC mostraram que as variáveis (temperatura, pH e velocidade de reação) não foram estatisticamente significativas para o processo de imobilização da FTase em sílica gel pura. No entanto, definiu-se o ponto central (35°C, pH 5,5 e 175 rpm) do planejamento como condição experimental por fornecer os maiores valores de atividade recuperada da enzima.

Realizou-se, também, o estudo de rendimento de imobilização e atividade recuperada para a sílica gel funcionalizada em glutaraldeído, em comparação com a FTase imobilizada em sílica gel pura. A enzima imobilizada no suporte funcionalizado apresentou um rendimento de imobilização maior que a enzima imobilizada em sílica gel pura, mas, em compensação, o suporte em sua forma pura apresentou uma maior atividade recuperada. O glutaraldeído, apesar de ligar-se a enzima com uma ligação mais forte (covalente), pode ocasionar uma modificação conformacional alterando a estrutura tridimensional do sítio ativo da enzima, tornando partes da molécula enzimática inacessíveis.

Foi realizado um estudo sobre a concentração de substrato ideal para as reações com a enzima imobilizada, que deve estar entre os valores de 400 a

600 g.L⁻¹. Em relação a cinética da FTase immobilizada em sílica-gel pura e funcionalizada, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo de Hill para a sílica pura e a sílica gel funcionalizada.

Os ensaios de estabilidade térmica foram ajustados de acordo com o modelo de Sadana-Hanley, e os parâmetros termodinâmicos foram obtidos para a FTase immobilizada em sílica gel pura e funcionalizada, sendo que a enzima immobilizada no suporte funcionalizado apresentou uma maior estabilidade a variação de temperatura, um maior tempo de meia vida e uma energia de desativação oito vezes maior que a enzima immobilizada em sílica gel pura.

Realizou-se os ensaios de estabilidade ao pH, e a enzima immobilizada em sílica gel funcionalizada com glutaraldeído apresentou uma maior estabilidade, principalmente em pH mais ácidos, quando comparada com a FTase immobilizada em sílica gel pura.

Com os ensaios de estabilidade operacional foi possível observar que a enzima immobilizada em sílica gel funcionalizada com glutaraldeído apresentou atividade de transfrutoseilação relativa de até 50% com oito ciclos de reação, enquanto a enzima immobilizada em sílica gel pura apresentou atividade recuperada de 25% da atividade inicial. Tal resultado é atrativo para processos industriais, uma vez que com a imobilização é possível reutilizar a FTase extracelular com uma menor perda de atividade.

A FTase immobilizada em sílica gel funcionalizada apresentou uma atividade recuperada de aproximadamente 5% após 4 dias de imobilização, sendo este número superior ao da enzima immobilizada em sílica gel pura.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a estabilidade de armazenamento da FTase imobilizada em sílica gel pura e funcionalizada em relação a diferentes temperaturas utilizando diversos agentes estabilizantes;
- Estudar a aplicação da FTase imobilizada em sílica gel pura e funcionalizada em reatores de leito fixo para a produção contínua de FOS;
- Estudar processos de separação e purificação da enzima FTase extracelular para aumento da carga enzimática durante o processo de imobilização;
- Estudar os efeitos da carga iônica no processo de imobilização da FTase extracelular.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Characterization of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 3, p. 1–21, 2010. <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1894>.
- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Effects of the addition of substrate and salts in both the fructosyltransferase immobilization and its catalytic properties. **Journal Of Food Biochemistry**, Campinas, n. 37, p. 520-527, set. 2012.
- ALVAREZ, V. H.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTOR, M.; AZNAR, M.; IGLESIAS, M. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. **Fluid Phase Equilibria**, n. 299, p. 42-50, 2010.
- AN, D. *et al.* A green route to preparation of silica powders with rice husk and waste gas. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 509-514, 2010.
- ANTOSOVÁ, M.; POLAKOVIC, M. Fructosyltransferase: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, p.351-353, 2001.
- ANTOSOVÁ, M. *et al.* Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, p. 58-63, 2008.
- ASQUIERI, E.R.; NISHI, A.C.F.; BATISTA, R. D. Yacon extract drying (*Smallanthus sonchifolius*) by Spray Dryer: effect of the different carrier agents and evaluation of the levels of fructooligosaccharides and phenolic compounds. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-26, e591974521, 2020.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p.1220–1227, 2012.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. 2nd ed. New York: CRC Press, 1997.
- BLANCO, E. M.; HORTON, M. A.; MESQUIDA, P. Simultaneous investigation of the influence of topography and charge on protein adsorption using artificial nanopatterns. **Langmuir**, v. 24, n. 6, p. 2284–2287, 2008.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.
- BORNET, F. R. Undigestible sugars in food products. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 59, n. 3, p. 763S-769S, mar. 1994.

BRABCOVÁ, J.; DEMIANOVÁ, Z.; VONDRÁŠEK, J.; JÁGR, M.; ZAREVÚCKA, M.; PALOMO, J. M. Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications, **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, n. 98, p. 62–72, 2013.

BRÍGIDA, A. I. S. ; PINHEIRO, A. D. T. ; FERREIRA, A. L. O. ; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 173–187, 2007.

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

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

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

CASTRO, C. C. *et al.* Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 82-90, 2017.

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

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. *Arthrobacter* sp. Lipase immobilization on magnetic sol–gel composite supports for enantioselectivity improvement. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 154-60, 2009.

CHEN, Q.; KENASIS, G. L.; HELLER, A. Stability of Oxidases Immobilized in Silica Gels. **Journal American Chemical Society**, v. 120, p. 4582-4585, 1998.

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

CHOUKADE, Ritumbhara; KANGO, Naveen. Characterization of a mycelial fructosyltransferase from *Aspergillus tamarii* NKRC 1229 for efficient synthesis of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, [S. l.], p. 434-440, 14 set. 2021.

COUSSEMENT, P. A. A. . Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, Suppl., p. 1402S-1406S, 1999. PMID:10447430.

CUERVO, R. F.; OTTONI, C. A.; SILVA, E. S.; MATSUBARA, R. S.; CARTER, J. M.; MAGOSSI, L. R.; WADA, M. A. A; RODRIGUES, M. F. A.; GUILARTE, B. M.; MAIORANO, A. E. Screening of β -fructofuranosidase producing microorganisms and effects of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 87-93, 2007.

CUNHA, J. S.; OTONI, C. A.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. 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.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.623-630, 2004.

DO NASCIMENTO, A. K. C. Síntese de fructooligosacarídeos a partir da β -fructofuranosidase obtida de *Penicillium citreonigrum* URM 4459. *In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE O ENSINO DE ENGENHARIA QUÍMICA*, 2019, Fortaleza.

DOMINGUES, A. L. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. **Food Bioprocess and Technology**, v. 7, n. 324, 2014.

DWEVEDI, A. **Enzyme Immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment**. Switzerland: Springer, 2016. 132 p.

EGGLESTON, G.; CÔTÉ, G.L. Oligosaccharides in food and agriculture. *In: EGGLESTON, G.; CÔTÉ, G. L. (Eds). ACS Symposium Series*. Washington, D. C.: American Chemical Society, 2003. chapter 1:1–14.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A.T.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 525-528, 2001.

ERDEMIR, S.; YILMAZ, M. Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1-4, p. 29-35, 2009.

FAGUNDES, R. L. M.; COSTA, Y. R. Uso de alimentos funcionais na alimentação. **Higiene alimentar**, v. 17, n. 47, p. 42-48, 2003.

FARIA, L. L. ; MORALES, S. A. V. ; PRADO, J. P. Z. ; DIAS, G. S. ; ALMEIDA, A. F. ; XAVIER, M. C. A. ; SILVA, E. S. ; MAIORANO, A. E. ; PERNA, R. F. . Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters (online)**, v. 43, p. 43-59, 2021.

FERREIRA, Matheus M.; SANTIAGO, Fernanda L. B.; DA SILVA, Nádía A. G.; LUIZ, Jaine H. H.; LAFUENTE, Roberto Fernández-; MENDES, Adriano A.; HIRATA, Daniela B. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, [S. l.], p. 55-63, 14 set. 2021.

FLORES-MALTOS, D. A. *et al.* Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 259-267, 2014.

FONTES, R. **Conceitos de cinética enzimática e modelos clássicos de inibição enzimática**. 1999. Disponível em <https://users.med.up.pt/~ruifonte/PDFs/PDFs_arquivados_anos_anteriores/2011_2012/cinetica_enzimica_2011_vs02.pdf>. Acesso em: 23 out. 2019.

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

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

GARCIA, ROGÉRIO LOPES. **Imobilização da biomassa catalítica de aspergillus oryzae ipt-301, caracterização e aplicação na produção de fructooligosacarídeos**. 2018. 88 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) — Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas-MG, 2018.

GARCIA-GALAN C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, [S.L.], v. 353, p. 2885-2904, 2011.

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, 2005.

GLOBAL NUTRACEUTICALS MARKET: growth, trends and forecasts (2018-2022). **Mordor Intelligence**, Abril de abr. 2017. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com>>. Acesso em: 20 mai. 2020.

GOMES, E. *et al.* Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

GOMES, L. S.; FURTADO, A. C. R.; SOUZA, M. C. A Sílica e suas Particularidades, **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 4, p. 1018-1038, 2018.

GONÇALVES, M. C. P.; MORALES, S. A. V. ; SILVA, E. S. ; MAIORANO, A. E ; PERNA, R.F. ; KIECKBUSCH, T. G. .. Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, p. 1-10, 2020.

GONÇALVES, Maria Carolina Pereira. **Imobilização de frutossiltransferase microbiana em gel de alginato e sua caracterização para a produção de frutooligosacarídeos**. 2019. 143 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) — Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas-MG, 2019.

HEBETTE, C.L.M.; DELCOUR, J. A.; KOCH, M. H. J.. Complex melting of semicrystalline chicory (*Cichorium intybus* L.) root inulin. **Carbohydrate Research**, v.310, n. 1-2, p. 65–75, 1998.

HIDAKA, H.; EIDA, T.; TAKIZAWA, T.; TOKUNAGA, T.; TASHIRO, Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacterium Microflora**, v. 5, n. 1, p. 37-50, 1986.

HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A Fructo-oligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, p. 1181-1187, 1988.

ALVARADO-HUELLANCO, M.B. and Maugeri-Filho, F. (2010), Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 85: 1654-1662. <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/jctb.2477>

JANG, LI; JANG, Z.; WU, Hong; LONG, L.; JANG, Yanjun; ZANG, Lei. Improving the recycling and storage stability of enzyme by encapsulation in mesoporous CaCO₃– alginate composite gel. **Composites Science and Technology**, [S. I.], p. 539-544, 19set. 2021.

JANG, Wong Je. Improving enzyme activity, thermostability and storage stability of β -1,3-1,4-glucanase with poly- γ -glutamic acid produced by *Bacillus* sp. SJ-10. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. I.], v. 143, p. 100-113, 19 set. 2021.

JITONNOM, J.; KETUDAT-CAIRNS, J. R.; HANNONGBUA, S. QM/MM modeling of the hydrolysis and transfructosylation reactions of fructosyltransferase from *Aspergillus japonicus*, an enzyme that produces prebiotic fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 79, p. 175-184, 2018.

JUNG, K. H.; YUN, J. W.; KANG, K. R.; LIM, J. Y.; LEE, J. H. Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p.491-494, 1989.

JUSZCZAK, L.; FORTUNA, T.; WODNICKA, K. Characteristics of cereal starch granules surface using nitrogen adsorption. **Journal of Food Engineering**, v.

54, p. 103-110, 2002.

KALANTARI, M.; YU, M.; YANG, Y.; STROUNINA, E.; GU, Z.; HUANG, X.; ZHANG, J. SONG H.; YU, C. Tailoring mesoporous-silicananoparticles for robust immobilization of lipase and biocatalysis. **Nano Research**, v. 10, n. 2, p. 605–617, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1320-63>.

KAVAK, D. Removal of boron from aqueous solutions by batch adsorption on calcined alunite using experimental design. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 1, p. 308-314, 2009.

KHARRAT, N.; BEN ALI, Y.; MARZOUK, S. GARGOURI, Y. T.; KARRA-CHA[^]ABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1083–1089, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.029>.

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

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

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

L'HOCINE, L., WANG, Z., JIANG, S. X. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *A. niger* AS0023. **Journal of Biotechnology**, v. 81, p.73-84, 2000.

LIM, J.S.; LEE, J.H.; KANG, S.W.; PARK, S.W.; KIM, S.W. Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase. **European Food Research Technology**, v. 225, n. 3-4, p.457-462, 2006.

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

LOBO, A. R.; COLLI, C.; FILISETTI, T. M. C. C.. Fructooligosaccharides improve bonemass and biomechanical properties in rats. **Nutrition Research**, v. 26, n. 8, p. 413- 420, 2006.

LORENZONI, A. S. G.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P.F. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -

fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p.193-197, 2014.

MACEDO, L. L.; VIMERCATI, W. C.; ARAÚJO, C. S. (). Fructooligosaccharides: nutritional, technological and sensory aspects. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, e2019080, 2020. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08019>.

MAIORANO, A.E.; PICCOLI, R.M.; SILVA, E.S.; RODRIGUES, M.F.A. Microbial production of fructosyltransferase for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**,v.30, n.11, p.1867-1877, 2008.

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. New Jersey: Wiley, 2003.

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

MATEO, C.; PALOMO, M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; PESSELA, B. C. C., HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins, **Enzyme Microbial Technology**,. v. 39, p. 274–280, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microbial Technology**,v. 40, n. 6, p. 1451-63,2007.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; de L. C. GIORDANO, R. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, p. 245–251, 2013.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; HEIZIR, F. C.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p.831-840, 2011.

MENDES AA, de Castro HF, Rodrigues DS, *et al*. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333–369, 1913.

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

MIRANDA, J. S.; SILVA, N. C. A.; BASSI, J.; CORRADINI, M. C. C.

Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous polyhydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis : isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 392– 403, 2014.

MUÑIZ-MÁRQUEZ, D. B.; CONTRERAS, J. C.; RODRÍGUEZ, R.; MUSSATTO, S. I.; TEIXEIRA, J. A.; AGUILAR, C. N.. Enhancement of fructosyltransferase fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in Solid-State Fermentation using aguamiel as culture medium. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 276-282, 2016.

MUTANDA, T.; MOKOENA, M. P.; OLANIRAN, A. O.; WILHELMI, B.. 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.

NIKOLIC, T.; KOSTIC, M.; PRASKALO, J.; PEJIC, B.; PETRONIJEVIC, Z.; SKUNDRIC, B. Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 976–981, 2010

OLIVEIRA, E. and Maugeri, F. (2013), Effect of Sucrose and Salts on FOS Synthesis. **Journal of Food Biochemistry**, 37: 520-527. <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jfbc.12002>

ONDERKOVÁ, Z.; BRYJAK, J.; POLAKOVIC, M. Properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* immobilized on an acrylic carrier. **Chemical Papers**, v.61, n. 5, p. 359-363, 2007.

OTTONI, C.A.; CUERVO, R.F; PICCOLI, R.M.; MOREIRA, R; GUILARTE, B.M; SILVA, E.S.; RODRIGUES, M.F.A; MAIORANO, A.E. Media optimization for β - fructofuranosidase production by *aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, São Paulo, p. 49-59. mar. 2012. Disponível em <<https://www.scielo.br/j/bjce/a/y4HXkFKZ5g8FgDzJrMRwQzn/?lang=en>>. Acesso em: 25 mai. 2020.

PAGAN, M.; SUAZO, D.; DEL TORO, N.; GRIEBENOW, K. A Comparative study of different protein immobilization methods for the construction of efficient nano- structured lactate oxidase-SWCNT-biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64,p. 138-146, 2015.

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

PAULA, A.; URIOSTE, D.; SANTOS, J.; DE CASTRO, H. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, p. 281–288, 2007.

- PEREIRA, A. C.; KUBOTA, L. T. Otimização da preparação de eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico. **Química Nova**, v. 27, 2004.
- PERNA, R. F.; CUNHA, J. S.; GONÇALVES, M. C. P.; BASSO, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.. Microbial fructosyltransferase: production by submerged fermentation and evaluation of pH and temperature effects on transfructosylation and hydrolytic enzymatic activities. **International Journal of Engineering Research and Science**, v.4, p. 43-50, 2018
- PLATKOVÁ, Z.; POLAKOVIČ, M.; ŠTEFUCA, V.; VANDÁLKOVÁ, M.; ANTOŠOVÁ, M.. Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, v. 60, n. 6, p. 469–472, 2006.
- PLOU, F. J.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; SANTOS-MORIANO, P.; BALLESTEROS, A. O. Application of immobilized enzymes for the synthesis of bioactive fructooligosaccharides. *In*: MORENO, F. J.; SANZ, M. L. (editors). **Food oligosaccharides**. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Ltd.; 2014. p. 200–216.
- POOL-SOBEL, B.L.; SAUER, J. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. S2580-S2584, 2007.
- PORTES, Maria Angela M. Carvalho, Spatial distribution of fructans and fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) in different developmental phases, **Plant Science**, Volume 170, Issue 3, 2006, Pages 624-633, ISSN 0168-9452, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.10.017>.
- PRADO, J. P. Z.; CUNHA, J. S.; BASSO, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R.F. Obtenção da curva de crescimento do *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a produção de frutossiltransferase e monitoramento do pH do caldo de fermentação. *In*: BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOOD AND BEVERAGES, 11.; SIMPÓSIO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 5., 2016, São José do Rio Preto - SP. **Anais** [...]. São José do Rio Preto-SP, 2016.p.1010-1016.
- RICOU-HOEFFER, P.; LECUYER, I.; LE CLOIREC, P. Experimental design methodology applied to adsorption of metallic ions onto fly ash. **Water Research**, v.34, n. 4, p. 965-976, 2001.
- ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J. A. E.; GIBSON, G. R.. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 1, p. 11-19, 1998. PMID:9430596.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.
- RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P.

A. **Harper's illustrated biochemistry**. Nova Iorque: McGrawHill Education / Medical, 2015.

SADANA, A.; Henley, J.P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnol. Bioeng.**, 1987, 30(6), 717-723. [<http://dx.doi.org/10.1002/bit.260300604>] [PMID: 18581490]

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M. N.; SIDDALINGAIYA, P. Fructooligosaccharide production using fructosyltransferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v. 40, p.1085–1088, 2005.

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

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, p. 641-646, 2010.

SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

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

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

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

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

SILVA, E. M.; POMPEU, D. R.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 53, n. 3, p. 274-280, 2007.

SILVA, M. B. P. O.; ABDAL, D.; PRADO, J. P. Z.; DIAS, G. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A.; ALEMIDA, A. F.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, e2020283, 2021.

SILVA, Raquel de Oliveira. **Análise comparativa de suportes e estratégias para a imobilização de β -Galactosidase visando aplicação industrial.** 2019. 40 p. Trabalho De Conclusão De Curso (Bacharelado em Engenharia Química) — Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2019.

SIQUEIRA, C. R.; KOVALTCHUK, E.; SILVEIRA, F. J. Fructooligosacarídeos: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeitos na saúde humana e importância na indústria de alimentos. *In: SEMANA DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS*, 6., 2008, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba: Universidade Tecnológica do Paraná – UFTPR, v. 2, n. 4, 2008.

SMAALI, I.; JAZZAR, S.; SOUSSI, A. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from date by-products using an immobilized crude enzyme preparation of b-D- fructofuranosidase from *Aspergillus awamori* NBRC 4033. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 2, p. 385–392, 2012.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 745-759, 1999.

SOARES, Larissa Azevedo *et al.* Optimization of the adsorption of Erionyl Yellow A-R on activated charcoal from sugarcane bagasse using design of experiments. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 5, n. 12, p. 28781-28797, 5 dez. 2019.

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

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A; PESSELA, J. B. C.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *In: Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria.* São Paulo: Blücher Editora, 2017. v. 4, capítulo 15, p. 529-568.

SOUZA, P. M.; ALIAKBARIAN, B.; FERREIRA FILHO, E. X.; MAGALHÃES, P. O.; PESSOA JUNIOR, A.; CONVERTI, A.; PEREGO, P. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17–21, 2015.

SUGAHARA, V. H.; VARÉA, G. S. Immobilization of *Beauveria bassiana* Lipase on sílica gel by physical adsorption. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, n. 6, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201401358>.

SWANSON, K. S.; GRIESHO, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; CHOW, J.; WOLF, B. W.; GARLEB, K. A.; FAHEY, G. C Jr. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p. 3721-3731, 2002.

- TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids SurfB: Biointerfaces**, v. 93, p. 8-19, 2012.
- TANRISEVEN, A.; GOKMEN, F. Novel method for the production of a mixture containing fructooligosaccharides and isomaltooligosaccharides. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.207-210, 1999.
- TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 15, p. 692-700,2003. PMID:12927512.
- URETA, MARIA; *et al.* Synthesis of fructo-oligosaccharides using grape must and sucrose as raw materials, **Food Research International**, Volume 123, 2019, Pages 166-171, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.044>
- VASCONCELOS, N. M. de; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. de S. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico**: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. (Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa, p. 1–59).
- VIEILLE, C.; BURDETTE, D. S.; ZEIKUS, J. G.; Thermozyms. **Biotechnology Annual Review**, v. 2, p. 1-83, 1996.
- VOLPATO, I.M.P. Calderon, S. Sinzato, K.E. Campos, M.V.C. Rudge, D.C. Damasceno, Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal–fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats, **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 138, Issue 3, 2011, Pages 691-696, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.044>.
- WANG, T. Synthesis of Neofructooligosaccharides. **Organic Chemistry Insights**, v. 5, p. 1–6, 2015.
- 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. doi: 10.1007/s00253-008-1407-4.
- XU, Q.; ZHENG, X.; HUANG, M.; WU, M.; YAN, Y.; PAN, J.; YANG, Q.; DUAN, C. J.; LIU, J. L.; FENG, J. X. Purification and biochemical characterization of a novel fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1237–1246. 2015.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation and application.

Enzyme and Microbial Technology, v.19, p.107-117, 1996.

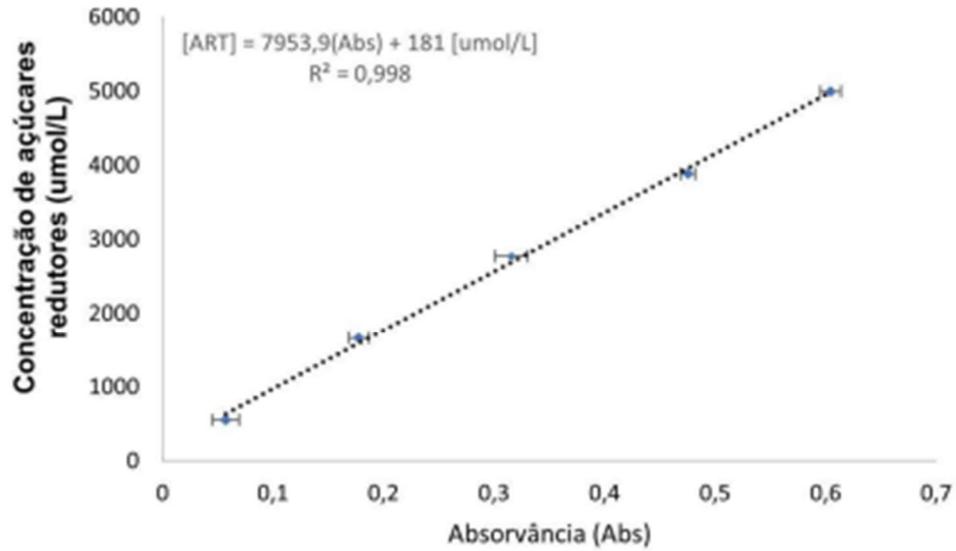
YUN, J. W.; SONG, S. K. Continuous Production of Fructooligosaccharides Using fructofuranosidase Immobilized on Ion Exchange Resin. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 1, p.18–21, 1996.

ZHANG, J.; LIU, C.; XIE, Y.; LI, N.; NING, Z.; DU, N.; HUANG, X.; ZHONG, Y.. Enhancing fructooligosaccharides production by genetic improvement of the industrial fungus *Aspergillus niger* ATCC 2061. **Journal of Biotechnology**, v. 249, p. 25-33, 2017.

ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n.9, p. 3894, 2013.

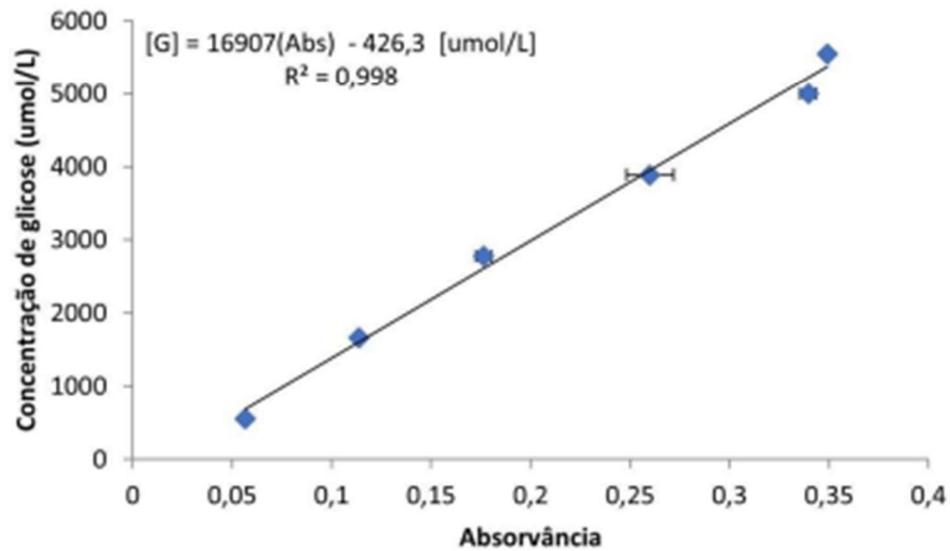
APÊNDICE A - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES E GLICOSE

Figura 16 — Curva analítica obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação da concentração de açúcares redutores (AR)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 17 — Curva analítica obtida pelo método GOD-PAP para a determinação das concentrações de glicose (G)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).