

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

BEATRIZ MENOSSI RIBEIRO

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301
VISANDO ESTUDOS BIOCATALÍTICOS EM REATOR DE LEITO FIXO PARA A
PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

POÇOS DE CALDAS/MG

2022

BEATRIZ MENOSSI RIBEIRO

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301
VISANDO ESTUDOS BIOCATALÍTICOS EM REATOR DE LEITO FIXO PARA A
PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.
Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna
Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Andres Villalba Morales

POÇOS DE CALDAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Biblioteca Campus Poços de Caldas

Ribeiro, Beatriz Menossi.

Imobilização de células íntegras de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 visando estudos biocatalíticos em reator de leito fixo para a produção de frutooligossacarídeos /

Beatriz Menossi Ribeiro. - Poços de Caldas, MG, 2022.

88 f. : il. -

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Frutooligossacarídeos. 2. Frutossiltransferase. 3. Células íntegras. 4. *Aspergillus oryzae*. 5. Imobilização. I. Perna, Rafael Firmani, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

BEATRIZ MENOSSI RIBEIRO

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 VISANDO ESTUDOS
BIOCATALÍTICOS EM REATOR DE LEITO FIXO PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

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

Aprovada em: 14 de fevereiro de 2022

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

Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano
Instituição: Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo – IPT/SP

Profa. Dra. Caroline Casagrande Sipoli
Instituição: Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior**, em 14/02/2022, às 18:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alfredo Eduardo Maiorano, Usuário Externo**, em 15/02/2022, às 09:52, 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 **Caroline Casagrande Sipoli, Usuário Externo**, em 15/02/2022, às 14:14, 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 **0669068** e o código CRC **BOF89357**.

AGRADECIMENTOS

A trajetória foi longa, diante de tempos difíceis e delicado com o cenário pandêmico originado pelo COVID-19, mas recompensador.

Agradeço a Deus pelo cuidado, providência, saúde e força que me foi dado todos os dias. Me trazendo paz e amor para suportar todas as dificuldades durante minha caminhada na realização deste sonho.

Aos meus pais e irmão, que me apoiaram e sonharam comigo, fazendo de tudo por mim, sou grata pelo amor e compreensão incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Firmani Perna pela sabedoria, incentivo, dedicação, ensinamentos, compreensão, amizade, paciência e profissionalismo, atos que levarei sempre comigo.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales que sempre esteve presente, se dedicando com muita sabedoria, sempre disposto a transmitir seus conhecimentos para aprimorar este trabalho.

Ao Leandro, meu aluno de IC, que me acompanhou e auxiliou no desenvolvimento da pesquisa com tanto empenho, dedicação e amor.

Aos meus amigos de grupo de pesquisa, em especial Isabella, Richard e Jardel, que sempre estiveram dispostos, me apoiando, auxiliando e dando força quando necessário, dentro e fora do laboratório.

Aos colaboradores da UNIFAL, em especial, Ju, Talita e Ícaro, que estavam sempre disponíveis para ajudar, disponibilizando todos os recursos necessários.

Ao mestre Giancarlo de Souza Dias, pela disposição e ensinamentos.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP) pelo apoio prestado na realização de análises laboratoriais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro integral para a execução desse projeto de pesquisa (Processo 421540/2018-4).

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

Obrigado por acreditarem e confiar em mim!

RESUMO

Frutooligossacarídeos (FOS) são açúcares prebióticos de baixa caloria que apresentam diversos benefícios à saúde e nutrição humana. São disponibilizados comercialmente mediante produção sintética, por reação de transfrutossilacção, utilizando enzimas microbianas como a frutossiltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) e sacarose como substrato. Dentre os microrganismos potencialmente produtores destas enzimas, destaca-se o *Aspergillus oryzae* IPT-301, sintetizando FTase micelial (enzima aderida às células microbianas) com elevada atividade de transfrutossilacção (A_T). Atualmente, a produção de FOS é conduzida em biorreatores batelada, um processo lento e oneroso. Portanto, torna-se necessário a implementação de sistemas de reação contínuos, em reatores de leito fixo (PBR), que aumentem o volume de produção de FOS e diminuam seus custos de produção. Logo, o uso de biocatalisadores na forma de células íntegras para a produção do açúcar torna-se vantajoso por exibirem suporte natural para a própria enzima. Diante disso, este trabalho teve como objetivo imobilizar, por reticulação com glutaraldeído, células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 e avaliar seus efeitos biocatalíticos quando empacotadas em reator de leito fixo (PBR), visando obter elevada atividade enzimática para a produção de FOS. Inicialmente, buscou-se desenvolver o biocatalisador por meio da produção e imobilização das células íntegras microbianas e, posteriormente, implementar o processo contínuo de produção do açúcar em reator PBR, para avaliação dos efeitos biocatalíticos da biomassa imobilizada. Para o desenvolvimento do biocatalisador, investigou-se a influência das variáveis de imobilização (pH, temperatura, concentração de glutaraldeído e velocidade de agitação) na atividade A_T por diferentes técnicas de planejamento experimental. A partir das melhores condições de imobilização alcançadas (pH 7,9; 25 °C, 200 rpm e 2,1 % v v⁻¹ de glutaraldeído), foram investigados diferentes tempos de reação (30, 45, 60, 75 e 90 min) para o processo, obtendo-se os maiores valores de A_T ao se reticular a biomassa microbiana por 45 min. Os resultados obtidos mostram o desenvolvimento promissor de um biocatalisador com elevada atividade enzimática. Para a implementação das células íntegras reticuladas em reator PBR, avaliou-se a influência da altura do leito catalítico (20, 15 e 10 cm), da temperatura do meio reacional (30, 40,

50 e 60 °C), da concentração de substrato (200, 300, 400, 473, 500 e 600 g L⁻¹) e da vazão volumétrica (1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 mL min⁻¹) nos perfis de A_T. Também foram obtidos os parâmetros cinéticos mediante ajustes do modelo cinéticos aos dados experimentais e, por fim, realizados estudos de transferência de massa externa (TME) e ensaios de estabilidade operacional, na ausência e presença de corrente de reciclo, no reator PBR. Foram alcançados os melhores perfis de atividade enzimática para o reator recheado com 20 cm de leito catalítico, contendo células íntegras reticuladas com diâmetro equivalente de 2,58 ± 0,3 mm, operado a 50 °C e alimentado com solução de sacarose de 473 g L⁻¹, pH 5,5, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. A cinética enzimática foi melhor ajustada ao modelo de Michaelis-Menten. Observou-se ainda que a reação foi limitada pelos efeitos de TME. Os ensaios de estabilidade operacional mostraram que, ao se implementar a corrente de reciclo no reator, obteve-se um aumento de 60 % na A_T relativa, cuja atividade enzimática máxima foi mantida a partir de 540 min de reação. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que a implementação do processo contínuo, visando a produção de FOS, mostrou-se promissora ao se alcançar perfis elevados de atividade enzimática em reator PBR recheado com células íntegras reticuladas.

Palavras-chaves: frutooligossacarídeos; frutossiltransferase; células íntegras; *Aspergillus oryzae*; imobilização; reator de leito fixo.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are low-calorie prebiotic sugars that have several benefits to human health and nutrition. They are commercially available through synthetic production, by transfructosylation reaction, using microbial enzymes such as fructosyltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) and sucrose as a substrate. In the group of the microorganisms potentially producing these enzymes, *Aspergillus oryzae* IPT-301 stands out synthesizing mycelial FTase (enzyme attached to microbial cells) with high transfructosylation (AT) activity. Presently, the production of FOS is carried out in batch bioreactors, a slow and costly process. Therefore, it is necessary to implement continuous reaction systems, in fixed bed reactors (PBR) that increase the production volume of FOS and reduce its production costs. Consequently, the use of biocatalysts in the form of intact cells to produce sugar becomes advantageous because they exhibit natural support for the enzyme itself. For that reason, this work aimed to immobilize intact *A. oryzae* IPT-301 cells by crosslinking with glutaraldehyde and to evaluate their biocatalytic effects when packed in a fixed bed reactor (PBR), point to obtain high enzymatic activity to produce FOS. Firstly, we sought to develop the biocatalyst through the production and immobilization of intact microbial cells and, afterwards, implement the continuous process of sugar production in a PBR reactor, to evaluate the biocatalytic effects of the immobilized biomass. For the development of the biocatalyst, the influence of immobilization variables (pH, temperature, glutaraldehyde concentration and stirring speed) on AT activity was investigated by different experimental design techniques. From the best immobilization conditions achieved (pH 7.9; 25 °C, 200 rpm and 2.1 % v.v⁻¹ of glutaraldehyde), different reaction times (30, 45, 60, 75 and 90 min) were investigated, for the process, obtaining the highest values of AT when crosslinking the microbial biomass for 45 minutes. The results obtained show the promising development of a biocatalyst with high enzymatic activity. For the implementation of cross-linked intact cells in a PBR reactor, the influence of the height of the catalytic bed (20, 15 and 10 cm), the temperature of the reaction medium (30, 40, 50 and 60 °C), the concentration of substrate (200, 300, 400, 473, 500 and 600 g L⁻¹) and the volumetric flow rate (1.0, 2.0, 3.0, 4.0- and 5.0-mL min⁻¹) in the AT profiles. The kinetic parameters were also obtained by adjusting the kinetic model to the experimental data and, finally, external mass transfer (TME) studies and

operational stability tests were carried out, in the absence and presence of recycle current, in the PBR reactor. The best enzyme activity profiles were achieved for the reactor filled with 20 cm of catalytic bed, containing crosslinked intact cells with an equivalent diameter of 2.58 ± 0.3 mm, operated at 50 °C and fed with sucrose solution of 473 g L^{-1} , pH 5.5, at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Enzyme kinetics was better adjusted to the Michaelis-Menten model. It was also noted that the reaction was limited by the effects of TME. The operational stability tests showed that, by implementing the recycle current in the reactor, an increase of 60% in the relative AT was obtained, whose maximum enzymatic activity was maintained after 540 minutes of reaction. In view of the results obtained, it was concluded that the implementation of the continuous process, aiming at the production of FOS, proved to be promising in achieving high profiles of enzymatic activity in a PBR reactor filled with cross-linked intact cells.

Keywords: fructooligosaccharides; fructosyltransferase; whole cells; *Aspergillus oryzae*; packed bed reactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos- 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C).	20
Figura 2 – Esquema de reação da formação de FOS por reação catalisada enzimática de dissacarídeo (sacarose) com frutossiltransferase (FTase) e enzima frutofuranosidase (FFase).....	22
Figura 3 – Método de imobilização de enzimas	25
Figura 4 – Regiões de limitação pela transferência de massa e pela própria reação	31
Figura 5 – Células Íntegras de <i>A. oryzae</i> IPT-301.....	40
Figura 6 – Aparato experimental	43
Figura 7 – Diagrama de Pareto obtido para a variável resposta atividade de transfrutosilação.	51
Figura 8 – Diagrama de Pareto obtido para a variável resposta atividade de transfrutosilação	54
Figura 9 – Gráfico de correlação entre os valores preditos e experimentais para a variável resposta (Y1), atividade de transfrutosilação (AT), de células íntegras reticuladas	54
Figura 10 – Diagrama de Pareto obtido para a variável resposta atividade de transfrutosilação	58
Figura 11 – Gráfico de correlação entre os valores preditos e experimentais para a variável resposta (Y1), atividade de transfrutosilação (AT), de células íntegras reticuladas	58
Figura 12 – Avaliação dos efeitos da velocidade de agitação na atividade enzimática de células íntegras de <i>A. oryzae</i> IPT-301 durante o processo de imobilização. A atividade máxima de transfrutosilação ($707,88 \pm 50,43$ U.g-1) foi definida como 100 % da atividade relativa.....	60
Figura 13 – Avaliação dos efeitos do tempo de reticulação na atividade enzimática de células íntegras de <i>A. oryzae</i> IPT-301 durante o processo de imobilização. A atividade máxima de transfrutosilação ($979,03 \pm 64,93$ U.g-1) foi definida como 100 % da atividade relativa.....	62
Figura 14 – Micrografias eletrônicas obtidas para amostra de células íntegras microbianas in natura de <i>A. oryzae</i> IPT-301	63

Figura 15 – Micrografias eletrônicas obtidas para amostras de células íntegras microbianas reticuladas de <i>A. oryzae</i>	64
Figura 16 – Influência da altura do leito na atividade relativa em porcentagem, variando-se o empacotamento em 50%, 75% e 100% durante 180 minutos de reação.	67
Figura 17 – Avaliação do efeito da temperatura do meio reacional, variando entre 30°C, 40°C, 50°C e 60°C durante 150 minutos de reação	68
Figura 18 – Avaliação das diferentes concentrações de substrato na atividade de transfrutossilção, variando as concentrações de 200 g. L-1 até 600 g. L-1 durante 150 minutos de reação.....	69
Figura 19 – Modelo de Michaelis-Menten para obtenção dos parâmetros cinéticos .	71
Figura 20 – Avaliação das diferentes vazões volumétricas na atividade de transfrutossilção, variando as vazões de 1 mL.min ⁻¹ até 5 mL.min ⁻¹ durante 150 minutos de reação.....	72
Figura 21 – Região de limitação pela TME e pela velocidade da reação	76
Figura 22 - Influência do reciclo na atividade de transfrutossilção	77
Figura 23 – Curva analítica desenvolvida pelo método DNS para quantificação da concentração de açúcares redutores (AR).	87
Figura 24 – Curva analítica desenvolvida pelo método GOD-PAP® para a quantificação da concentração de glicose (G).....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais para as variáveis de imobilização. Planejamento experimental do tipo Delineamento Plackett & Burman.....	36
Tabela 2 – Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais para as variáveis de imobilização. Planejamento experimental do tipo Delineamento de Face Centrada (DFC).....	37
Tabela 3 – Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais para as variáveis de imobilização. Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	39
Tabela 4 – Matriz do Delineamento de Plackett & Burman (valores reais e codificados).....	49
Tabela 5 – Matriz do Delineamento de Face Centrada - DFC (valores reais e codificados).....	52
Tabela 6 – Resultado da análise de variância (ANOVA) para a regressão quadrática com interação para avaliação dos efeitos de concentração de glutaraldeído e velocidade de agitação na variável resposta atividade de transfrutossilagem de células íntegras reticuladas.....	53
Tabela 7 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR (valores reais e codificados).....	56
Tabela 8 – Resultado da análise de variância (ANOVA) para a regressão quadrática com interação para avaliação dos efeitos de concentração de glutaraldeído e velocidade de agitação na variável resposta atividade de transfrutossilagem de células íntegras reticuladas.....	57
Tabela 9 – Caracterização de células íntegras de <i>A. oryzae</i> IPT-301, in natura e reticuladas, obtida pelos métodos BET e BJH.....	65
Tabela 10 – Parâmetros cinéticos e R^2 para as células íntegras imobilizadas de <i>A. oryzae</i> IPT-301.....	71
Tabela 11 – Propriedades físicas dos reagentes presentes na solução à 50 °C.....	73
Tabela 12 – Números adimensionais de Rep , Sc , Sh e DAB	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS.....	20
3.2	ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASES (FTASES).....	21
3.3	ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO (AT)	23
3.4	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	24
3.5	MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA	25
3.5.1	Reticulação	25
3.5.2	Reticulação com glutaraldeído	26
3.6	EFEITOS DA CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	26
3.6.1	Modelo de Michaelis-Menten	27
3.6.2	Efeitos da temperatura na cinética enzimática	28
3.6.3	Efeitos da influência da concentração de substrato	29
3.7	TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA.....	29
3.8	REATORES DE LEITO FIXO (PBR)	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	DESENVOLVIMENTO DO BIOCATALISADOR.....	34
4.1.1	Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo	34
4.1.2	Produção de células íntegras microbianas	34
4.2	SELEÇÃO E OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS MICROBIANAS.....	35
4.2.1	Planejamento experimental do tipo Delineamento Plackett & Burman	35
4.2.2	Planejamento experimental do tipo Delineamento de Face Centrada (DFC)	37
4.2.3	Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	38

4.3	ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS COM GLUTARALDEÍDO	39
4.4	AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE IMOBILIZAÇÃO NO PROCESSO DE RETICULAÇÃO.....	41
4.4.1	Ensaio para avaliação da velocidade de agitação.....	41
4.4.2	Ensaio para avaliação do tempo reacional.....	41
4.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS.....	41
4.6	IMPLEMENTAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS RETICULADAS EM REATOR DE LEITO FIXO (PBR)	42
4.6.1	Especificação do reator PBR e montagem do aparato experimental....	42
4.6.2	Influência dos parâmetros operacionais na atividade enzimática de transfrutossilagem.....	43
4.6.2.1	Altura do leito catalítico.....	43
4.6.2.2	Temperatura do meio reacional.....	43
4.6.2.3	Concentração de substrato e obtenção dos parâmetros cinéticos.....	44
4.6.2.4	Vazão volumétrica.....	44
4.6.3	Ensaio de estabilidade operacional.....	44
4.6.4	Obtenção dos parâmetros de transferência de massa externa.....	45
4.7	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	45
4.7.1	Determinação da atividade enzimática de transfrutossilagem.....	45
4.7.2	Determinação de massa seca das células íntegras microbianas.....	46
4.7.3	Quantificação dos açúcares.....	47
4.7.4	Determinação da concentração de açúcares redutores (AR).....	47
4.7.5	Determinação da concentração de glicose (G).....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	49
5.1.1	Delineamento de Plackett & Burman.....	49
5.1.2	Delineamento de Face Centrada (DFC).....	52
5.1.3	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	55
5.2	INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DURANTE A IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS MICROBIANAS.....	59

5.3	INFLUÊNCIA DO TEMPO DE RETICULAÇÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DURANTE O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS MICROBIANAS	61
5.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS MICROBIANAS RETICULADAS	63
5.5	PERFIS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO REATOR PBR.....	66
5.5.1	Influência da Altura do Leito Catalítico na Atividade de Transfrutosilação.....	66
5.5.2	Influência da temperatura do meio reacional na atividade de transfrutosilação.....	67
5.5.3	Influência da concentração de substrato na atividade de transfrutosilação e obtenção de seus parâmetros cinéticos	69
5.5.4	Influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutosilação.....	72
5.6	OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA.....	73
5.6.1	Coeficiente de transferência de massa externa.....	74
5.7	ENSAIOS DE ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	77
6	CONCLUSÕES.....	79
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	80
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICE A	87

1 INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são edulcorantes cujo consumo é altamente benéfico para a saúde e nutrição humana já que apresentam baixo nível calórico, são prebióticos, não são cariogênicos, ajudam na redução do colesterol total e podem ser consumidos de forma segura por diabéticos (JITONNOM *et al.*, 2018; MAIORANO *et al.*, 2020). Estas características, somadas à crescente tendência por uma alimentação mais saudável, têm incentivado o consumo de FOS pelo mercado de alimentos nutracêuticos.

Os FOS são produzidos mediante a reação de transfrutossilacção da sacarose, catalisada por enzimas de origem microbiana como a frutossiltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) (FLORES-MALTOS *et al.*, 2014). Além disso, a produção do biocatalisador para a fabricação de FOS por meio de enzimas microbianas, apresentam um menor ciclo de vida, independe de sazonalidade, reduzindo os custos no processo, características que se destacam na indústria açucareira (HERNALSTEENS, 2006).

Neste contexto, torna-se necessária a implementação de sistemas de reação contínuos que aumentem o volume de produção de FOS e diminuam seus custos de produção. Para isso, faz-se necessário a utilização de biocatalisadores que apresentem estabilidades térmica e operacional com atividade de transfrutossilacção expressiva e que as condições reacionais empregadas sejam favoráveis à maximização da produção do FOS (CASTRO *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2019; FOGLER, 2012; JUNG *et al.*, 2011; PERNA *et al.*, 2018).

Os biocatalisadores têm sido amplamente estudados em biorreatores bateladas, mediante ensaios de atividade enzimática de FTases microbianas solúveis, imobilizadas ou na forma de células íntegras (FTase micelial), em função de condições de reação como temperatura, pH e concentração de substrato (CASTRO *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; MAIORANO *et al.*, 2020; PERNA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021).

Especificamente, as FTases miceliais de *Aspergillus oryzae* IPT-301 têm apresentado as maiores atividades de transfrutossilacção, em comparação com outras dezessete linhagens avaliadas (CUERVO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

As células íntegras imobilizadas permitem obter biocatalisadores mais robustos e resistentes às mudanças do ambiente reacional (aumento da estabilidade enzimática), reutilizáveis e fáceis de serem separados do produto, além da possibilidade de implementar e conduzir processos contínuo e batelada (SHELDON, 2007; SOUZA *et al.*, 2017). Destaca-se ainda que a imobilização de células íntegras é considerada mais vantajosa que a de enzimas, pois não requer processos de extração ou purificação prévia da proteína, uma vez que utiliza a própria estrutura celular como suporte natural da enzima. Inclusive, a imobilização de células por encapsulação e reticulação têm possibilitado a preparação de biocatalisadores mais estáveis e, inclusive, com aplicações potenciais em biorreatores de leitos fixo e fluidizado para a produção de FOS (GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; LORENZONI *et al.*, 2015; ZAMBELLI *et al.*, 2016).

Especificamente, a reticulação de células íntegras microbianas possibilita obter biocatalisadores robustos e de maior resistência perante a agentes desnaturantes (calor, solventes orgânicos e pH extremos), além de minimizar o fenômeno de dessorção da enzima micelial (SOUZA *et al.*, 2017). Como reagente mais utilizado nos processos de reticulação, tem-se o glutaraldeído que proporciona a obtenção de biocatalisadores ativos e estáveis (BARBOSA *et al.*, 2012; MATEO *et al.*, 2007). Garcia *et al.* (2021) ao estudarem a reticulação com glutaraldeído das células íntegras de *A. oryzae* IPT-301, reportaram alta estabilidade operacional e a preservação da atividade de transfrutossilação em até 12 ciclos batelada de reação. Nota-se, portanto, que as células íntegras do microorganismo, reticuladas com o reagente, são biocatalisadores potenciais para a implementação de um sistema de produção contínuo de FOS, principalmente em biorreatores de leito fixo (PBR), os quais proporcionam maior contato efetivo entre o substrato e o biocatalisador, assim como um sistema de escoamento mais facilmente controlável, em comparação a biorreatores de leito fluidizado (FBR) (FOGLER, 2012).

Entretanto, o biorreator PBR deve ser projetado e operado de forma a diminuir as limitações de transferência de massa e a presença de caminhos preferenciais ou volumes mortos, para assim maximizar a produção dos FOS. Cabe destacar que, em comparação as demais técnicas de imobilização, a reticulação aproveita a própria estrutura celular como suporte, evitando o uso de materiais externos que podem oferecer restrições difusionais (KRASŇAN *et al.*, 2016).

Estes fenômenos, associados ao perfil de escoamento e às características do leito catalítico, afetam a conversão do substrato, produzindo desvios consideráveis da conversão e rendimento esperados no processo (FOGLER, 2012). Ao reduzir as limitações difusionais no leito catalítico garante-se que o acesso das moléculas de sacarose até as FTases miceliais seja rápido e eficiente, maximizando a atividade enzimática. Também, ao eliminar caminhos preferenciais ou volumes mortos, evitam-se desperdícios do volume útil do PBR causados pelo escoamento não ideal, no qual os volumes de fluido alimentados permaneçam durante tempos de residência diferentes no biorreator (DORAN, 1995; FOGLER, 2012). Assim, para maximizar a produção de FOS no biorreator PBR, faz-se necessário determinar o perfil de concentração da sacarose e do fluxo de material ao longo do leito catalítico em função de parâmetros operacionais e de propriedades do leito catalítico. Estes perfis podem ser obtidos por meio de estudos cinéticos, de transferência de massa externa e interna e da distribuição de tempo de residência (FOGLER, 2012).

Atualmente, há poucos estudos relacionados à produção contínua dos FOS, cujas vazões volumétricas empregadas são consideravelmente baixas, da ordem de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$, e os tempos de residência são comparáveis a processos em batelada, possivelmente devido à baixa atividade dos biocatalisadores utilizados (HOMAEI *et al.*, 2013). No entanto, as células íntegras contendo FTase micelial, imobilizadas por reticulação, apresentam um alto potencial para a produção contínua dos FOS em menores tempos de residência, o qual ainda não foi explorado (GARCIA *et al.*, 2021).

Nesse contexto, tendo como principal justificativa a necessidade de desenvolver a produção contínua destes açúcares, visando atender ao crescimento da sua demanda comercial, este trabalho de pesquisa propõe a implementação de um sistema de reação contínuo em biorreator de leito fixo (PBR) que maximize a produção de FOS, utilizando como biocatalisadores as células íntegras com atividade de transfrutoseilação (A_T), obtidas pelo principal microorganismo produtor de FTase micelial, o *A. oryzae* IPT-301, e imobilizadas por reticulação com glutaraldeído, técnica esta que oferece a maior estabilidade operacional da célula íntegra sem queda de atividade enzimática e sem o uso de suportes externos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Imobilizar, por reticulação com glutaraldeído, células íntegras de *Aspergillus oryzae* IPT-301 e avaliar seus efeitos biocatalíticos quando empacotadas em reator de leito fixo (PBR) visando obter elevada atividade de transfrutoseilação para a produção de frutooligossacarídeos (FOS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos apresentados a seguir foram traçados para realizar o objetivo geral:

- Quanto ao desenvolvimento do biocatalisador:

- a) Produzir células íntegras de *A. oryzae* IPT-301, com atividade de transfrutoseilação, por cultivo celular submerso em meio de cultura sintético;
- b) Selecionar e otimizar as variáveis de imobilização de células íntegras (pH, temperatura, velocidade de agitação e concentração de glutaraldeído), que afetam a atividade enzimática, mediante aplicação de diferentes técnicas de planejamento experimental;
- c) Avaliar a influência das variáveis de imobilização (tempo reacional e velocidade de agitação), na atividade de transfrutoseilação, no processo de reticulação de células íntegras microbianas;
- d) Realizar a caracterização física das células íntegras, *in natura* e imobilizada, por microscopia eletrônica de varredura e análises de áreas específicas obtidas pelo método de adsorção de BET.

- Quanto a implementação de células íntegras reticuladas em biorreator PBR

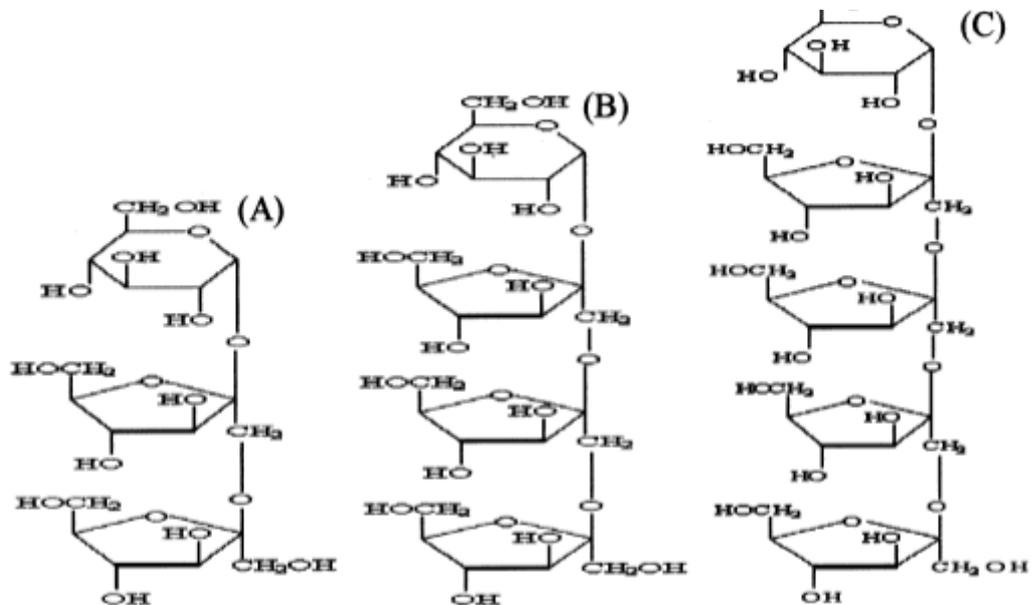
- e) Avaliar a influência dos parâmetros operacionais do reator PBR (altura do leito catalítico, temperatura do meio reacional, concentração de substrato e vazão volumétrica) nos perfis de atividade de transfrutossilação das células íntegras imobilizadas;
- f) Estimar os parâmetros cinéticos por meio de ajustes de modelos cinéticos enzimáticos aos dados experimentais de atividade de transfrutossilação obtidos em estado estacionário;
- g) Obter os parâmetros de transferência de massa externa do sistema reacional contínuo;
- h) Avaliar a estabilidade operacional do sistema reacional contínuo, na ausência e presença de corrente de reciclo, por meio do monitoramento da atividade de transfrutossilação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Para os frutooligossacarídeos aceita-se que é um nome comum apenas para frutose oligômeros ligados na posição β -2,1 de sacarose, distinguindo-se das outras espécies do mesmo, composto principalmente pela kestose, nistose e 1-frutofuranosilnistose, de grau de polimerização entre 2 e 20 de cadeia curta, como apresentado na Figura 1. Importantes principalmente por causa de suas propriedades funcionais (YUN, 1996).

Figura 1 – Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos



Fonte: PASSOS (2003, p.386).

Legenda: a) 1-kestose

b) nistose

c) frutofuranosil nistose

Os FOS podem ser encontrados a partir de duas diretrizes, de forma natural, encontrado em vários vegetais, algumas frutas e alimentos com alta reserva de carboidratos, como beterraba, chicória, alho, cebola, trigo, banana e tomate; ou de outra forma, produzidos comercialmente, através da síntese enzimática que possuem

atividade de transfrutilação ou frutiltransferase (EC 2.4.1.9). (GANAIE,2014; MUSSATO; MANCILHA, 2007; SANGEETHA *et al.*, 2005; YUN, 1996).

O rendimento da produção de FOS proveniente do uso de enzimas originárias de plantas é baixo, limitada pelas condições sazonais; (YUN, 1996). Para a produção industrial de frutooligossacarídeos deve-se obter a triagem de microrganismos que produzem alta atividade enzimática (HAYASHI, 1992).

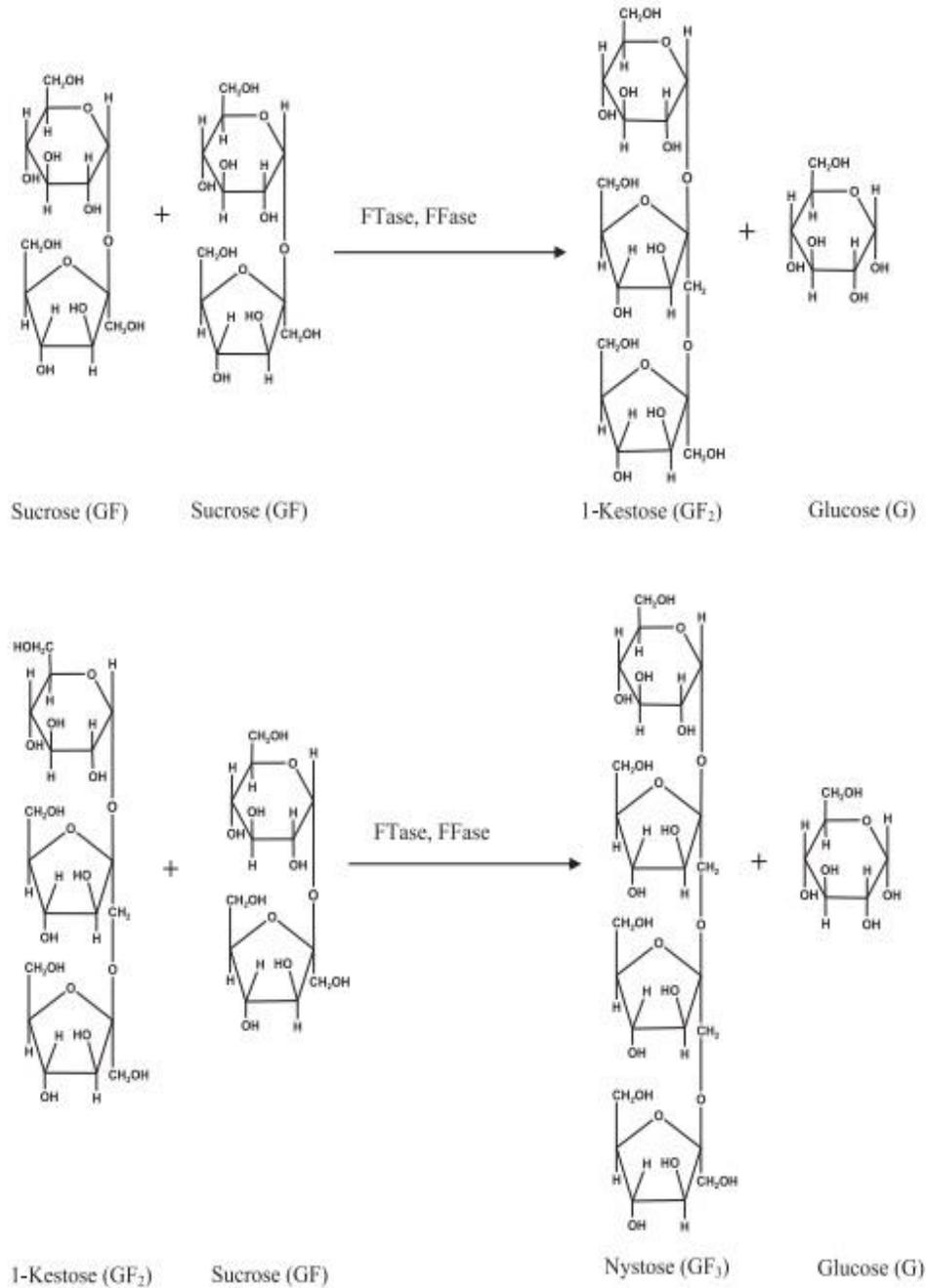
O FOS pode ter sua produção industrial por dois processos distintos: (i) processo fermentativo formado de duas etapas: a primeira, consiste em produzir enzimas por fermentação, aplicadas futuramente de forma solúvel ou imobilizada na fase reacional; (ii) formado por uma etapa, são utilizadas células completas derivada de um determinado micro-organismo, estando este suspenso ou imobilizado, produzindo FOS simultaneamente por processo fermentativo (WANG, 2015).

3.2 ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASES (FTASES)

Frutosiltransferases (FTase, EC 2.4.1.9) são enzimas que catalisam reações de transfrutosilação em moléculas de sacarose para a produção de oligômeros de frutose, denominados frutooligossacarídeos (FOS) (ANTOŠOVÁ; POKOVIC, 2001; ANTOŠOVÁ *et al.* 2008; GANAIE *et al.*, 2014). As FTases atuam na ligação β (2 \rightarrow 1) das moléculas do substrato formando, principalmente, 1-kestose (GF2), 1-nistose (GF3) e 1- β -frutofuranosil nistose (GF4), representado pela estrutura genérica apresentada na Equação (1), composta por GF_n, (G -molécula de glicose e F molécula de frutose e n - número de unidades do grupo frutosil) os distinguindo de outros oligômeros, como observado na Figura 2 (FLORES-MALTOS *et al.*, 2014; OTONI apud SANGEETHA *et al.*, 2012; YUN 1990, 1996;).



Figura 2 – Esquema de reação da formação de FOS por reação catalisada enzimática de dissacarídeo (sacarose) com frutossiltransferase (FTase) e enzima frutofuranosidase (FFase)



Fonte: Adaptado de Ganaie (2013).

Apenas a cultura do cultivo de cana de açúcar possui altos níveis de micélio e atividades extracelulares da FTase, indicando que a sacarose é o melhor indutor para β -frutofuranosidase biossíntese (CUERVO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

Em 2007, Cuervo-Fernández *et al.* afirmou em seus estudos, antes de otimizar suas condições de cultura (otimizadas posteriormente por CUNHA, (2017)), que o *Aspergillus oryzae* IPT-301 é potencialmente bom para produção de frutossiltransferase. Os FOS adquiridos pela ação de enzimas de microorganismos unem a frutose apenas aos resíduos de frutose (MURAMATSU *et al.*, 1994).

3.3 ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO (A_T)

Na Ftase, a atividade de transfrutosilação (A_T) é uma quantificação importante, visto que é determinada através da quantidade de enzima que produz um micromol de FOS por minuto (uma unidade (1U) de atividade de transfrutosilação) (CUERVO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2007; OTTONI *et al.*, 2012) ou pelo número de enzima necessária para transferir um micromol de frutose por minuto, definido perante condições impostas pelo teste a ser executado (CHEN; LIU, 1996; CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.* 2021; HAYASHI *et al.*, 1990; KURAKAKE *et al.*, 1996; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011).

Garcia (2018), otimizou os parâmetros de A_T do micélio, proveniente do *Aspergillus oryzae* IPT-301, apresentando o valor para A_T de 956,06 U. g⁻¹ ao imobilizar o substrato, constatando o que Cuervo-Fernández (2004) vinha estudando. As células íntegras microbianas, contendo FTase, possuem atividade de transfrutosilação (NOBRE *et al.* 2018; SHEU *et al.* 2013). Estudos realizados por Cuervo-Fernández *et al.* (2007) mostraram que a FTase presente nas células microbianas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresentou maior atividade de transfrutosilação e, portanto, um maior potencial para a produção de FOS, entre as dezessete cepas de fungos filamentosos investigadas.

3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

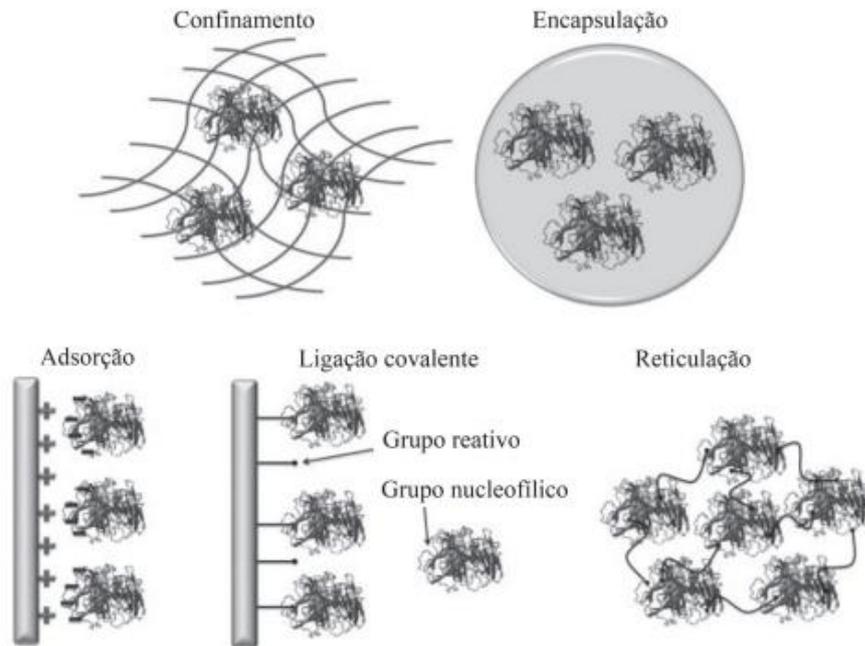
Apesar da alta atividade de transfrutoseilação, o uso de células íntegras *in natura* com atividade de FTase apresenta algumas desvantagens no que diz respeito a suas estabilidades (GANAIE *et al.*, 2014). No entanto, estudos envolvendo a imobilização dessas células microbianas, por reticulação, têm permitido um aumento expressivo em suas estabilidades térmica e operacional (GANAIE *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2016), tornando-se uma importante ferramenta no processo biocatalítico envolvendo a transfrutoseilação da sacarose (GARCIA *et al.*, 2018).

A imobilização é considerada uma das técnicas mais promissoras para alterar a especificidade, seletividade, atividade e estabilidade enzimática e, geralmente, pode ser aplicada para viabilizar a reutilização do biocatalisador por vários ciclos reacionais (GUISAN, 2013). Considerando, além disso que a imobilização é capaz de tornar o procedimento completo e economicamente viável, cabível a todos os tipos de reatores, e simplifica o controle do procedimento (DATTA *et. al*, 2013; GRAY *et. al*, 2013).

Para selecionar o método de imobilização eficiente à reação, é significativo basear-se na eficiência da biocatálise imobilizada, atividade enzimática total, desativação e regeneração do biocatalisador, o custo do método de imobilização e toxicidade dos reagentes (CABRAL, 2017).

Dentre as diferentes técnicas de imobilização reportadas na literatura, representada pela Figura 3, a reticulação tem a vantagem de utilizar a própria estrutura celular como suporte, eliminando a etapa de extração da enzima e evitando o uso de materiais externos que podem ocasionar restrições difusionais (KRASŇAN *et al.*, 2016).

Figura 3 – Método de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado de Souza (2017).

3.5 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA

3.5.1 Reticulação

A reticulação de células íntegras consiste na formação de um aglomerado celular, de forma natural ou induzida por agentes químicos que promovam ligações cruzadas entre as células, conhecidos como agentes de reticulação ou cross-linking.

Entre os agentes químicos, o glutaraldeído se destaca por ser bifuncional e apresentar baixo custo (MENDES *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2017).

Especificamente, a reticulação permite obter células microbianas catalíticas mais resistentes e estáveis perante agentes desnaturantes (calor, solventes orgânicos e pH extremos), além de minimizar o fenômeno de dessorção da enzima aderida à célula e possibilitar o seu uso em diferentes configurações de reatores (SOUZA *et al.*, 2017).

3.5.2 Reticulação com glutaraldeído

A imobilização utilizando glutaraldeído pode ser aplicada para diversas enzimas, em uma larga faixa de condições de processo (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005). Garcia (2018) ao estudar a reticulação com glutaraldeído de células íntegras de *A. oryzae* IPT-301, obteve tanto o aumento das estabilidades térmica e operacional quanto a preservação da atividade de transfrutoseilação por até 12 ciclos consecutivos de reação, reportando o uso potencial do biocatalisador produzido para a obtenção de FOS para processos em diferentes configurações de reatores enzimáticos.

Diversos fatores devem ser investigados para garantir que a reticulação seja bem-sucedida, tais como as concentrações de células íntegras catalíticas e de glutaraldeído, além do pH, temperatura e a velocidade de agitação envolvidos no processo de imobilização (GARCIA *et al.*, 2021). Portanto, um dos métodos mais indicados para se investigar, de maneira sinérgica e simultânea, a influência das variáveis envolvidas em um determinado processo refere-se a estudos de planejamento experimental (MONTGOMERY *et al.*, 2013; (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

A estabilidade operacional proporcionada pela imobilização de células íntegras tem possibilitado a futura produção de FOS de forma contínua em biorreatores de leito fixo (PBR). Apesar disso, atualmente há poucos trabalhos reportados sobre uso de PBRs para produção de FOS.

3.6 EFEITOS DA CINÉTICA ENZIMÁTICA

Segundo Cooney (2011, p.218) a cinética enzimática é vista como a ciência que usufrui de dados da atividade enzimática para modelar ou prever o comportamento enzimático, necessitando que se tenha primeiramente conhecimento de sua atividade. A cinética enzimática é o estudo das reações químicas que são catalisadas por enzimas, com foco em suas taxas de reação. O estudo da cinética de uma enzima considera os vários estágios de atividade, revela o mecanismo lítico da enzima, correlaciona seu valor às condições do ensaio.

A análise cinética é capaz de gerar um modelo para a reação enzimática e, reciprocamente, os princípios da cinética enzimática podem ser usados para escrever a equação da velocidade para o modelo proposto (MARQUEZ, 2007).

A escolha da técnica mais adequada também depende da natureza da enzima (bioquímica e propriedades cinéticas) e o suporte (características químicas, propriedades mecânicas). Ainda segundo Brena (2013), a interação entre a enzima e o suporte fornece uma enzima imobilizada com substâncias bioquímicas e propriedades físico-químicas que determinam sua aplicabilidade a processos específicos.

Embora as aplicações de enzimas estejam sendo desenvolvidas cada vez mais, são necessárias descobertas para superar suas fraquezas na manutenção das atividades durante os processos catalíticos (LI, 2012). Portanto, o objetivo é trabalhar com o ponto ótimo de cada variável que influencia no sistema do micélio, para se ter uma reação com reprodutibilidade e segura.

3.6.1 Modelo de Michaelis-Menten

O modelo de Michaelis-Menten é desenvolvido inicialmente pela reação enzimática enzima-substrato, definido pelos parâmetros cinéticos das células íntegras, dispõe de uma alta taxa relativa de desenvolvimento, ao ser relacionada com a etapa de separação do complexo em enzima livre e produto. (MICHAELIS; MENTEN, 1913; PRATA, 2020).

A constante é conhecida por classificar a etapa de formação de produtos como irreversível, apresentado na etapa inicial da reação, contendo pouco ou nenhum produto formado ainda (DIAS, 2020).

O modelo sem inibição de Michaelis-Menten reproduz a cinética de diversas enzimas, proposto pelo complexo enzima-substrato ($[ES]$), que é fundamental para a cinética enzimática, capaz de compreender o mecanismo da catálise enzimática. Assim sendo, o modelo de Michaelis-Menten assume um $[ES]$ baixo, mas constante, dado no estado estacionário, o qual, não pode ser apresentado por enzimas alostéricas (regulares), o que leva assumir que sua a velocidade de formação e

dissociação do complexo ([ES]) são equivalentes (CHOI; REMPALA; KIM, 2017; MICHAELIS; MENTEN, 1913; OLIVEIRA, 2007).

Michaelis-Menten define a velocidade da reação enzimática (V_{el}) a partir da adição do substrato, dado como função da concentração de substrato (C_A) reproduzido pela Equação (2) (CHOI; REMPALA; KIM, 2017).

$$V_{el} = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot C_A}{k_m + C_A} \quad (2)$$

Sendo $V_{m\acute{a}x}$ a velocidade máxima de reação ($U \cdot g^{-1}$) dado pela saturação do substrato, C_A a concentração de substrato ($g \cdot m^{-3}$) e K_m constante de Michaelis-Menten ($g \cdot L^{-1}$) parâmetro medido pela afinidade do complexo ([ES]) (CHOI; REMPALA; KIM, 2017; MICHAELIS; MENTEN, 1913).

As enzimas alostéricas, conhecidas por possuir uma curva de velocidade do tipo sigmoide compostas por múltiplas subunidades e múltiplos sítios ativos, não se ajustam ao modelo de Michaelis-Menten, e são representadas por uma curva de velocidade do tipo sigmoide, dessa forma, quando presentes é necessário que ocorra o ajuste do modelo para que diminua os desvios (PUNEKAR, 2018; WEISS, 1997).

3.6.2 Efeitos da temperatura na cinética enzimática

A influência da temperatura sobre a atividade da enzima é geralmente, representada em termos de atividade ou velocidade de reação em função da temperatura, ou seja, a maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. (DAL MASO, 2019)

Em estudos apontados por Cuervo-Fernández *et al.* (2007), Cunha (2017), Garcia (2018) e Gonçalves (2019) para a atividade de transfrutossilacção do micélio livre de *Aspergillus oryzae* IPT-301, tem-se que os melhores resultados estão entre as temperaturas compreendidas entre 45 e 55 °C. Entretanto segundo Gonçalves (2019), ao se trabalhar com a temperatura de 50 °C obtém-se a atividade máxima de transfrutossilacção para o micélio livre. Gonçalves (2019), também estudou os efeitos da temperatura para o micélio reticulado e aprisionado de *Aspergillus oryzae* IPT-301,

mantendo o ponto ótimo de temperatura do micélio livre para as novas condições quando se refere a atividade de transfrutossilação.

3.6.3 Efeitos da influência da concentração de substrato

Faria (2018), sugere que ao implementar estudos da influência da concentração do substrato, recomenda-se definir inicialmente as condições do meio e explorar apenas a variação da concentração.

Segundo Dias (2020), a teoria da saturação é capaz de explicar os efeitos da influência da concentração sob o substrato, definindo que uma porção de enzimas só poderá atuar sobre uma quantia específica de substrato. Cujo a atividade enzimática aumenta com a maior concentração de substrato, entretanto, ao alcançar a quantia específica do substrato poderá ocorrer a partir daí qualquer acréscimo dele que não surtirá efeito na atividade enzimática, havendo um limite para o aumento da velocidade de reação de modo linear com a concentração de substrato (FONTES, 2005).

Desta forma, para a reação em um meio que apresente a concentração da enzima constante, verifica-se que concentrações de substrato baixas, terá com igualdade baixa velocidade de reação (FONTES, 2005).

3.7 TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA

A transferência de massa externa (TME) é dada pela concentração do escoamento da partícula do catalisador, considerando-a isolada, ocorrendo de forma externa, sem levar em consideração o fluido que contorna a partícula. Modelada ao considerar que o transporte difusivo ocorre formando um filme estagnado de espessura constante ao redor da partícula de biocatalisador. As reações com catalise enzimática ocorre em reações heterogêneas quando sujeitas ao escoamento de um fluido de alimentação reagente até o biocatalisador, transportando o substrato para o sítio ativo (FOGLER, 2012).

É possível obter o fluxo de substrato através do filme estagnado, ele é calculado para soluções diluídas conforme mostra a Equação (3) (FOGLER, 2012).

$$W_A = k_c \cdot [C_{AB} \cdot C_{AS}] \quad (3)$$

Dado que, W_A é o fluxo unidirecional do substrato ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); k_c é o coeficiente de transferência de massa externa ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) e C_{Ab} , C_{As} , são as concentração de substrato na superfície da partícula e no interior do fluido ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$).

O coeficiente de transferência de massa (k_c) Equação (4) é capaz de ser obtido através da correlação dos números adimensionais, encontrados a partir das Equações (5), (6) e (7) conhecidas como equações de Sherwood (Sh), Reynolds de partícula (Re_p) e Schmidt (Sc) (FOGLER, 2012).

$$k_c = \frac{Sh \cdot D_{AB}}{d_p} \quad (4)$$

Sh é dado pela razão da transferência de massa convectiva e difusiva:

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

Re_p e Sc são equações retratadas pela razão de difusividade de momento e difusividade mássica:

$$Re_p = \frac{U \cdot d_p}{\nu} \quad (6)$$

$$Sc = \frac{\nu}{D_{AB}} \quad (7)$$

D_{AB} (coeficiente de difusão), Equação (8), declara a diluição infinita do substrato no fluido (CREMASCO, 2012). Dado pela Correlação de Darken:

$$D_{AB} = X_A \cdot D_{0AB} + X_B D_{0AB} \quad (8)$$

Sendo, p o diâmetro da partícula de biocatalisador (m), ν a viscosidade cinemática ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), U a velocidade de escoamento do fluido reagente ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), D_{AB} ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) é o coeficiente de difusão do substrato (A) no fluido (B), X_A e X_B as frações

molares dos solutos e do solvente e D_{0BA} e D_{0AB} são os coeficientes de difusão para diluição infinita do solvente no soluto e do soluto no solvente.

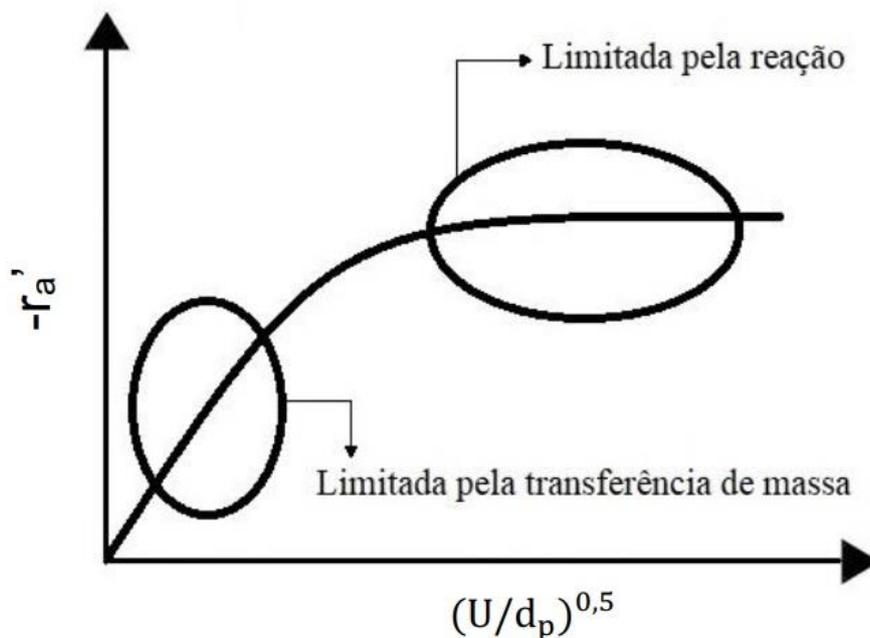
Cremasco (2012), avalia os coeficientes de difusão D_{0BA} e D_{0AB} a partir da correlação em de Geankoplis, dado pela Equação (9), sendo indicado quando o soluto apresentado são açúcares e proteínas,

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

Sendo T a temperatura (K), μ a viscosidade dinâmica da solução (cP) e MM a massa molar. Observa-se que para obter D_{0BA} , basta alterar os índices A e B da Equação (9).

Para determinar se ocorre limitações pela transferência da massa externa ou pela própria reação durante seu desempenho, a Figura 4 apresenta a relação da velocidade de reação ($-ra'$) pela raiz da razão da velocidade superficial (escoamento) e diâmetro de partícula ($U \cdot dp^{-1}$).

Figura 4 – Regiões de limitação pela transferência de massa e pela própria reação



Fonte: Adaptado de Fogler (2012).

A Figura 4 apresenta as regiões que podem ocorrer as limitações, de acordo com os alguns fatores da reação. A limitação pela transferência de massa, é predominada por uma região de baixa velocidade de escoamento quando em pequenos valores de coeficiente $(U.dp^{-1})^{0,5}$, capaz de torna reações heterogêneas dependentes ou não a transferência de massa. É possível diminuir as limitações e contribuir para a transferência de massa com o aumento da velocidade de escoamento ou diminuindo o diâmetro de partícula (DORAN, 1995; FOGLER, 2012).

3.8 REATORES DE LEITO FIXO (PBR)

O reator de leito fixo é constituído por uma pilha compacta e imóvel de biocatalisador, este empacotamento age como meio poroso no interior de uma coluna normalmente disposta na vertical, qual o fluido escoar, reagindo com a superfície interna e externa do biocatalisador. Apresentando facilidade operacional devido a tecnologia simples do sistema (JAKOBSEN, 2014).

Com uma grande sucessão de características atraentes, os reatores PBR apresentam uma fácil operação e implementação, provocando então baixos custos de manutenção e construção, permitindo que seja possível grandes e longas escalas de operação contínua. Com tudo a imobilização do catalisador é capaz de eliminar a necessidade de separação a vazão do processo, contatando grande flexibilidade operacional, mantendo operacionalidade em extensas faixas de temperatura, pressão e vazão (FOGLER, 2012; HILL, 1977; MORAIS, 2007).

Segundo Santana *et al.* (2018), o uso do reator contínuo de leito fixo (PBR) proporciona outras vantagens em relação à batelada: facilidade de separação entre o biocatalisador e o substrato, possibilidade de operar em longos períodos e bom controle dos parâmetros de reação e seu uso é considerado preferível quando comparado a outros reatores catalíticos heterogêneos. Em 2016 Zambelli *et al.*, foi capaz de comparar a produção contínua de FOS utilizando o reator PBR em contrapartida a produção em batelada, demonstrando sob as mesmas condições que o volume de produção FOS no PBR foi 1,7 vezes maior que em batelada.

Dias (2020) e Prata (2020) estudaram o desempenho da enzima proveniente do *Aspergillus oryzae* IPT-301, em reação contínua no reator PBR, constatando obter

maiores atividades que em reações convencionais, alcançando indícios de que de grande aplicação do processo contínuo, em reator PBR, para a produção de FOS em processos de implementação indústria, tanto para as células encapsuladas ou em seu estado livre. Os resultados obtidos são baseados nas mesmas condições de temperatura e concentração de substrato do processo em batelada, acarretando uma constante estabilidade operacional, processo para implementação industrial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DO BIOCATALISADOR

4.1.1 Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo

Para a produção de células íntegras (biomassa catalítica), foi utilizada a cepa de *Aspergillus 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 microrganismo, 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 sua concentração foi ajustada em câmara de Neubauer (Newoptics®) para aproximadamente 1×10^7 esporos. mL^{-1} , seguido de armazenamento, sob refrigeração, a -12 °C (CUNHA *et al.*, 2019).

4.1.2 Produção de células íntegras microbianas

As células íntegras (biomassa catalítica) de *A. oryzae* IPT-301, contendo FTase, foram produzidas por cultivo celular submerso utilizando meio de cultura sintético, pH 5,5, constituído por: sacarose (150 g L^{-1}), extrato de levedura ($5,0 \text{ g L}^{-1}$), NaNO_3 ($5,0 \text{ g L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,01 \text{ g L}^{-1}$). 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 conduzido por 64 horas a $30\text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm (CUNHA *et al.* 2019; FARIA *et al.* 2021; GONÇALVES *et al.* 2020). Ao término do processo, o meio de cultura foi filtrado à vácuo e a biomassa retida no papel de filtro (torta), foi armazenada sob refrigeração em placas de Petri para estudos posteriores de reticulação. Visando reduzir a perda de atividade da enzima FTase, buscou-se realizar as etapas de imobilização e reação enzimática imediatamente após a coleta da biomassa (CUNHA, 2017; GARCIA, 2018).

4.2 SELEÇÃO E OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS MICROBIANAS

As células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 produzidas por cultivo celular submerso (Tópico 4.1) foram submetidas a ensaios de imobilização, por reticulação, visando primeiramente selecionar as variáveis significativas do processo por meio da aplicação do planejamento experimental do tipo PLACKETT & BURMAN. Posteriormente, foram aplicados planejamentos experimentais do tipo Delineamento de Face Centrada (DFC) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização das variáveis selecionadas e estatisticamente significativas.

4.2.1 Planejamento experimental do tipo Delineamento Plackett & Burman

Um planejamento experimental do tipo Delineamento Plackett & Burman foi aplicado para a seleção das variáveis significativas de imobilização, cuja matriz de experimentos foi elaborada pelo software Protimiza Experimental Design® (TABELA 1).

Foram realizados 16 ensaios com quadruplicata no ponto central para o estudo de quatro fatores (pH, temperatura, velocidade de agitação e concentração de glutaraldeído), cada um composto por três níveis. Os dados para os fatores foram escolhidos previamente de acordo com resultados publicados pelo grupo de pesquisa (CUNHA *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020). Como variável resposta, avaliou-se as atividades de transfrutossilização das células íntegras (biomassa

catalítica) reticuladas (em U.g⁻¹). Os ensaios de atividade enzimática foram realizados conforme descrito no Tópico 4.7.1. As análises estatísticas foram efetuadas pela Análise de Variância (ANOVA).

Tabela 1 – Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais para as variáveis de imobilização. Planejamento experimental do tipo Delineamento Plackett & Burman

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Velocidade de agitação (rpm)	Concentração de glutaraldeído (v/v)
	(X1)	(X2)	(X3)	(X4)
1	8,5 (1)	15 (-1)	250 (1)	1,6 (-1)
2	8,5 (1)	35 (1)	150 (-1)	2,6 (1)
3	6,5 (-1)	35 (1)	250 (1)	1,6 (-1)
4	8,5 (1)	15 (-1)	250 (1)	2,6 (1)
5	8,5 (1)	35 (1)	150 (-1)	2,6 (1)
6	8,5 (1)	35 (1)	250 (1)	1,6 (-1)
7	6,5 (-1)	35 (1)	250 (1)	2,6 (1)
8	6,5 (-1)	15 (-1)	250 (1)	2,6 (1)
9	6,5 (-1)	15 (-1)	150 (-1)	2,6 (1)
10	8,5 (1)	15 (-1)	150 (-1)	1,6 (-1)
11	6,5 (-1)	35 (1)	150 (-1)	1,6 (-1)
12	6,5 (-1)	15 (-1)	150 (-1)	1,6 (-1)
13	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)
14	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)
15	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)
16	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)

Fonte: Elaborada pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

Nota: X1: pH; X2: velocidade de agitação; X3: temperatura; X4: concentração de glutaraldeído.

4.2.2 Planejamento experimental do tipo Delineamento de Face Centrada (DFC)

Um planejamento experimental do tipo Delineamento de Face Centrada (DFC) foi aplicado para a otimização das variáveis significativas de imobilização resultantes do experimento apresentado no Tópico 4.2.1. A matriz de experimentos foi elaborada pelo *software* Protimiza Experimental Design® (TABELA 2).

Foram realizados 11 ensaios, com triplicata no ponto central, para o estudo de dois fatores (velocidade de agitação e concentração de glutaraldeído), cada um constituído por três níveis. Os fatores para estudo foram selecionados de acordo com o Tópico 4.2.1. Como variável resposta, avaliou-se as atividades de transfrutossilção das células íntegras (biomassa catalítica) reticuladas (em U.g⁻¹). Os ensaios de atividade enzimática foram realizados conforme descrito no tópico 4.7.1.

Tabela 2 – Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais para as variáveis de imobilização. Planejamento experimental do tipo Delineamento de Face Centrada (DFC)

Ensaio	Concentração de glutaraldeído	Velocidade de agitação
	(v/v)	(rpm)
	(X1)	(X2)
1	1,6 (-1)	150 (-1)
2	2,6 (1)	150 (-1)
3	1,6 (-1)	250 (1)
4	2,6 (1)	250 (1)
5	1,6 (-1)	200 (0)
6	2,6 (1)	200 (0)
7	2,1 (0)	150 (-1)
8	2,1 (0)	250 (1)
9	2,1 (0)	200 (0)
10	2,1 (0)	200 (0)
11	2,1 (0)	200 (0)

Fonte: Elaborada pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

Nota: X1: concentração de glutaraldeído; X2: velocidade de agitação.

As análises estatísticas foram realizadas mediante Análise de Variância (ANOVA). A função de resposta, de segunda ordem, para os dois fatores investigados foi dada pela Equação (10) e as diferenças foram consideradas significativas em valores de $p \leq 0,10$.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (10)$$

Em que X_1 e X_2 representam os níveis dos fatores concentração de glutaraldeído (em %, v.v⁻¹) e velocidade de agitação (em rpm), respectivamente, enquanto β_0 , β_1 , β_2 , β_{12} , β_{11} e β_{22} representam os valores dos coeficientes estimados pelo modelo estatístico.

4.2.3 Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi aplicado para complementar os estudos de otimização das variáveis significativas de imobilização, cuja matriz de experimentos foi elaborada pelo software Protimiza Experimental Design® (TABELA 3). Foram realizados 11 ensaios com triplicata no ponto central para o estudo de dois fatores (velocidade de agitação e concentração de glutaraldeído), cada um composto por três níveis. Os fatores investigados foram para mesmas variáveis exploradas no Tópico 4.2.2, porém, com a inserção dos pontos axiais no planejamento experimental. O modelo estatístico para a superfície de resposta foi ajustado para a variável resposta (Y), isto é, a atividade de transfrutossilção das células íntegras (biomassa catalítica) reticuladas (em U.g⁻¹). Os ensaios de atividade enzimática foram realizados conforme descrito no Tópico 4.7.1.

Tabela 3 – Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais para as variáveis de imobilização. Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Ensaio	Concentração de glutaraldeído	Velocidade de agitação
	(v/v)	(rpm)
	(X1)	(X2)
1	1,6 (-1)	150 (-1)
2	2,6 (1)	150 (-1)
3	1,6 (-1)	250 (1)
4	2,6 (1)	250 (1)
5	1,39 (-1,41)	200 (0)
6	2,81 (1,41)	200 (0)
7	2,1 (0)	129,29 (-1,41)
8	2,1 (0)	270,71 (1,41)
9	2,1 (0)	200 (0)
10	2,1 (0)	200 (0)
11	2,1 (0)	200 (0)

Fonte: Elaborada pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

Nota: X1: concentração de glutaraldeído; X2: velocidade de agitação.

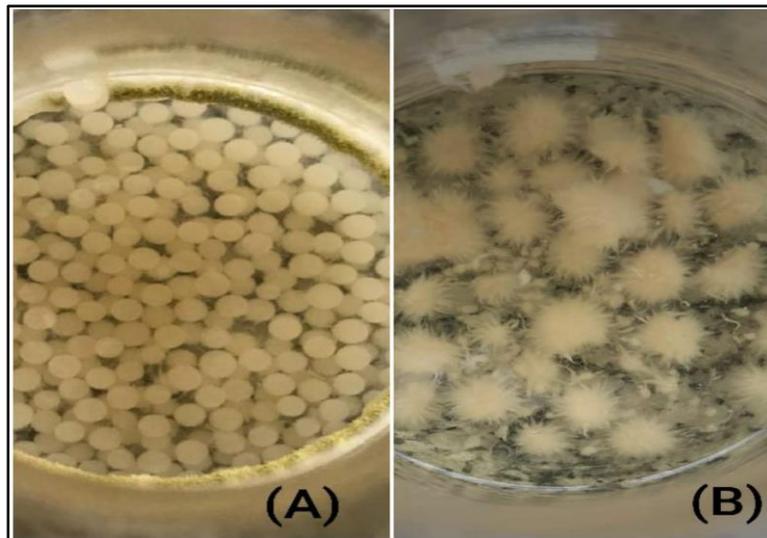
4.3 ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS COM GLUTARALDEÍDO

Os ensaios de imobilização das células íntegras (biomassa catalítica) foram realizados de acordo com a adaptação dos métodos de reticulação descritos por Garcia (2018), Garcia *et al.* (2021) e Gonçalves *et al.* (2020). Em frasco erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 1,5 g de biomassa úmida, oriunda do cultivo celular submerso após filtração à vácuo (Tópico 4.1.2). Posteriormente, adicionou-se solução aquosa de glutaraldeído 25 % (v.v⁻¹) (Dinâmica®), previamente dissolvido em solução tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, totalizando um volume reacional de 150 mL. A reação de imobilização foi conduzida por 60 minutos em agitador orbital do tipo shaker (Tecnal®, modelo TE-4200) e finalizada, por mais 30 minutos, pela adição de 1,5 mL de borohidreto de sódio (NaBH₄) (Neon®) 100 g L⁻¹, previamente dissolvido em

solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®). As variáveis de imobilização envolvidas na reação (pH, temperatura, velocidade de agitação e concentração de glutaraldeído), foram definidas de acordo com as matrizes geradas a partir dos diferentes tipos de planejamentos experimentais propostos para estudo (Tópico 4.2).

Ao término da reação de imobilização, a suspensão resultante foi cuidadosamente filtrada à vácuo utilizando papel de filtro do tipo Whatman nº1 com diâmetro de 90 mm. As células íntegras reticuladas (FIGURA 5) foram lavadas abundantemente com água destilada e preservadas sob refrigeração a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em solução tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,5) para a realização dos ensaios de atividade enzimática (Tópico 4.7.1).

Figura 5 – Células íntegras de *A. oryzae* IPT-3013



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Legenda: a) Células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 não reticuladas
b) Células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 reticuladas com solução de glutaraldeído (25 %, v.v⁻¹)

4.4 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE IMOBILIZAÇÃO NO PROCESSO DE RETICULAÇÃO

4.4.1 Ensaios para avaliação da velocidade de agitação

Foram avaliados a influência de diferentes velocidades de agitação (150, 175, 200, 225 e 250 rpm) no processo de imobilização das células íntegras microbianas. Os ensaios de reticulação foram realizados conforme método descrito no Tópico 4.3, cuja reação ocorreu a 25 °C, pH 7,9 e 2,1 % (v.v⁻¹) de solução de glutaraldeído 25 % (v.v⁻¹).

4.4.2 Ensaios para avaliação do tempo reacional

Foram avaliados a influência de diferentes tempos de reação (30, 45, 60, 75 e 90 min) no processo de reticulação das células íntegras microbianas. Os ensaios de imobilização foram realizados conforme método descrito no Tópico 4.3, cuja reação ocorreu a 25 °C, pH 7,9, 200 rpm e 2,1 % (v v⁻¹) de solução de glutaraldeído 25 % (v v⁻¹). Ressalta-se que o tempo necessário para desativar a reação (30 minutos), com borohidreto de sódio, foi mantido constante durante os ensaios.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS

A estrutura morfológica e as propriedades texturais das células íntegras de *A. oryzae* IPT-301, *in natura* e reticulada com glutaraldeído, foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando microscópio eletrônico (Zeis EVO MA-10, Alemanha), com tensão de aceleração de 20 kV e distâncias de 9,9 e 10,1 mm, respectivamente. As imagens foram ampliadas em 500x, 150x, 500x, 2000x e 5000x. As amostras do material de suporte foram depositadas sobre uma fita de carbono em um porta-amostras (stub) e foram recobertas por uma fina película de liga de ouro-paládio por meio do processo de *sputtering*, com o uso de um mini Sputter Coater modelo POLARON EMITECH SC7620. O processo de recobrimento teve duração de 3 minutos.

As amostras de células íntegras, *in natura* e reticulada com glutaraldeído, foram previamente preparadas em Vap Prep 61 (Sample Degas System), secas à vácuo por 2 h a 60 °C e suas áreas específicas foram determinadas por fisissorção de nitrogênio a 77 K em analisador Micromeritics Gemini VII Surface Area and Porosity, usando o método BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). Para a obtenção do volume e distribuição de poros das células íntegras *in natura* e reticulada, foi utilizado o método BJH (BARRET; JOYNER; HALLEND, 1951).

4.6 IMPLEMENTAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS RETICULADAS EM REATOR DE LEITO FIXO (PBR)

4.6.1 Especificação do reator PBR e montagem do aparato experimental

Para a obtenção dos perfis de atividade enzimática, montou-se o aparato experimental apresentado na Figura 6A. Uma bomba peristáltica (LAP-101-3 / Tecnopon®), com controle de vazão volumétrica, foi utilizada para alimentar a solução reagente (sacarose), em fluxo ascendente, por meio de uma tubulação de silicone (0,5 cm de diâmetro) até a entrada do reator PBR. A solução reagente foi mantida em Banho Maria com circulação interna de água (TE-054 / Tecnal®) na temperatura de reação. O reator foi construído em vidro de borossilicato com diâmetro e comprimento nominais de 1,0 e 20 cm, respectivamente, cujas células íntegras reticuladas de *A. oryzae* IPT-301, com diâmetro equivalente igual a $2,58 \pm 0,3$ mm, constituíram o seu leito catalítico (FIGURA 6B). A temperatura de reação foi controlada no reator por uma jaqueta térmica mediante circulação de água oriunda de um banho termostatizado (Marca TE-2005/ Modelo Tecnal®). As extremidades (entrada e saída) do reator foram equipadas por bandejas de distribuição usinadas em material Teflon® visando homogeneizar a dispersão radial de substrato (solução reagente) através do leito catalítico.

Figura 6 – Aparato experimental



Fonte: Arquivo pessoal da Autora.

Legenda: a) Processo contínuo constituído por reator PBR, banho termostatizado, bomba peristáltica, banho-maria e tubulação de silicone;

b) Reator PBR com 50 % e 100 % de leito catalítico recheado com células íntegras reticuladas de *A. oryzae*.

4.6.2 Influência dos parâmetros operacionais na atividade enzimática de transfrutossilação

4.6.2.1 Altura do leito catalítico

Para se avaliar a influência da altura do leito catalítico nos perfis de atividade enzimática do processo contínuo, o reator PBR foi recheado com células íntegras reticuladas de *A. oryzae* IPT-301 (diâmetro equivalente de $2,58 \pm 0,3$ mm) para alturas de leito iguais a 10 cm, 15 cm e 20 cm, correspondendo a 50 %, 75 % e 100 % do comprimento do reator, respectivamente. A reação foi conduzida a 50 °C por 150 min, alimentando-se o reator com solução de sacarose comercial 473 g L^{-1} e pH 5,5, a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.2.2 Temperatura do meio reacional

Para se avaliar a influência da temperatura do meio reacional nos perfis de atividade enzimática do processo contínuo, uma solução de sacarose comercial

473 g L⁻¹ e pH 5,5 foi alimentada a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ em reator PBR com altura de leito catalítico de 20 cm. A reação foi conduzida à 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C por 150 min e os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.2.3 Concentração de substrato e obtenção dos parâmetros cinéticos

Para se avaliar a influência da concentração de substrato nos perfis de atividade enzimática do processo contínuo, foram preparadas soluções de sacarose comercial, pH 5,5, nas concentrações de 200 g L⁻¹, 300 g L⁻¹, 400 g L⁻¹, 473 g L⁻¹, 500 g L⁻¹ e 600g L⁻¹. A reação foi conduzida à 50 °C por 150 min em reator PBR com vazão de alimentação de 1,0 mL min⁻¹ e altura de leito catalítico de 20 cm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após a obtenção das atividades de transfrutoseilação, os parâmetros cinéticos foram estimados, em regime estacionário, mediante ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten (Equação 02) aos dados experimentais, por meio de software gráfico.

4.6.2.4 Vazão volumétrica

Para se avaliar a influência da vazão volumétrica nos perfis de atividade enzimática, o reator PBR foi alimentado à 1 mL min⁻¹, 2 mL min⁻¹, 3 mL min⁻¹, 4 mL min⁻¹ e 5 mL min⁻¹ com solução de sacarose comercial 473 g L⁻¹, pH 5,5. A reação foi conduzida à 50 °C por 150 min em reator PBR com altura de leito catalítico de 20 cm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.3 Ensaios de estabilidade operacional

Os estudos de estabilidade operacional foram realizados em sistema reacional contínuo na ausência e presença de corrente de reciclo. Para isso, o reator PBR foi recheado com células íntegras reticuladas de *A. oryzae* IPT-301 (diâmetro equivalente de 2,58 ± 0,3 mm) com altura de leito catalítico igual a 20 cm. A reação foi conduzida a 50 °C por 12 horas, alimentando-se o reator com solução de sacarose comercial 473 g L⁻¹ e pH 5,5, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para a realização dos ensaios com reciclo, a montagem do aparato experimental foi configurada de modo que toda a corrente do efluente fosse reintroduzida como corrente de alimentação no reator.

4.6.4 Obtenção dos parâmetros de transferência de massa externa

O coeficiente de transferência de massa externa foi obtido por meio da Equação (4). Para isso, determinaram-se os valores dos números adimensionais de Sherwood, Reynolds de partícula e Schmidt utilizando as Equações (5), (6) e (7), respectivamente. A velocidade de escoamento do fluido foi obtida considerando a vazão que resultou na maior atividade enzimática de transfrutoseilação e as dimensões do reator PBR. Para o cálculo do coeficiente de difusão mássica (D_{AB}), as correlações de Darken (Equação 8) e Geankoplis (Equação 9) foram utilizadas.

A viscosidade dinâmica, aplicada para os cálculos dos números adimensionais de Schmidt e Reynolds de partícula, foi obtido conforme procedimento experimental reportado por Dias (2020), cujos valores foram determinados para diferentes concentrações de sacarose comercial em diversas temperaturas mediante utilização de viscosímetro Brookfield, modelo DV-I Prime com spindle 61 e agitação de 100 rpm.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinação da atividade enzimática de transfrutoseilação

A A_T de células íntegras reticuladas de *A. oryzae* IPT-301, referente aos tópicos 4.2, 4.3 e 4.4, foram determinadas conforme procedimento experimental descrito por Cunha *et al.* (2019), Gonçalves *et al.* (2020) e Garcia *et al.* (2021). Para isso, 0,05 g de célula íntegra imobilizada foi incubada com 3,7 mL de solução de sacarose 63,6 % ($m \cdot v^{-1}$) e 1,2 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol L^{-1} , pH 5,5. A reação foi conduzida em banho Dubnoff a 50 °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. A atividade enzimática das células íntegras reticuladas (em $U \cdot g^{-1}$) foi calculada pela Equação (11).

$$A_T = \frac{[FT] V_R}{m_s t_R} \quad (11)$$

Em que [FT] é a concentração molar de frutose transfrutosilada (em $\mu\text{mol L}^{-1}$), V_R é o volume do meio reacional (em L), m_s é a massa celular seca (em g) e t_R é o tempo de reação (em min).

Para a determinação de A_T (em U.g^{-1}) de processos contínuos em reator PBR, referente ao tópico 4.6, aplicou-se o procedimento experimental reportado por Dias (2020) e Prata (2020). As amostras, coletadas na saída do reator em intervalos de tempo predefinidos, foram imersas em banho de água fervente durante 10 minutos, seguido por banho de água e gelo por 5 minutos para interrupção da reação enzimática. Para este caso, a atividade enzimática das células íntegras reticuladas (em U.g^{-1}) foi calculada pela Equação (12).

$$A_T = \frac{[FT] Q}{m_s} \quad (12)$$

Em que Q representa a vazão volumétrica (em L min^{-1}) de reagente (substrato) alimentado no reator PBR.

Por definição, uma unidade (1U) de atividade de transfrutosilação se refere à quantidade de enzima que transfere um micromol ($1 \mu\text{mol}$) de frutose (FT) por minuto, sob condições experimentais estabelecidas (CUNHA *et al.*, 2019; DIAS, 2020; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; PRATA, 2020).

A concentração de FT (Equações 10 e 11), foi calculada a partir das concentrações de açúcares redutores (AR) e glicose (G), conforme especificado no Tópico 4.7.3.

4.7.2 Determinação de massa seca das células íntegras microbianas

Ao término dos ensaios de atividade enzimática, as células íntegras reticuladas úmidas foram lavadas abundantemente com água destilada a fim de remover todo resíduo de sacarose aderido a elas e, imediatamente, filtradas à vácuo em papel do tipo Whatman n^o1 com diâmetro de 90 mm. As células microbianas retidas no papel (torta) foram acondicionada em estufa de secagem à 60 °C até a obtenção de massa

seca constante. O valor da massa seca (m_s), obtido para cada reação, foi aplicado nas Equações (10) e (11) para a determinação das atividades enzimáticas de transfrutossilação.

4.7.3 Quantificação dos açúcares

As concentrações de glicose (G) e açúcares redutores (AR) foram quantificadas pelos métodos colorimétricos GOD-PAP® (kit enzimático glicose-oxidase) e DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (Miller, 1959), respectivamente. As concentrações de frutose liberada (F) e frutose transfrutossilada (transferida) (FT) no meio reacional foram determinadas pelas Equações (13) e (14) (CHEN *et al.*, 1996, CUNHA *et al.*, 2019; GARCIA *et al.* 2021; GONÇALVES *et al.* 2020).

$$[F] = [AR] - [G] \quad (13)$$

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

4.7.4 Determinação da concentração de açúcares redutores (AR)

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 (C₇H₄N₂O₇) (Dinâmica®) em 200,0 mL de solução 2 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®). Paralelamente, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (Reagente B) constituída por 600 g L⁻¹ de tartarato duplo de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) (Dinâmica®). Após a dissolução, ambos os reagentes (A e B) foram misturados e o volume final da mistura aferido para 1,0 L em balão volumétrico. A quantificação dos AR foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 1,0 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 1,0 mL da solução previamente 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 (Eduotec®, modelo EEQ901A-B) a 540 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos AR mediante auxílio da curva de calibração obtida para o método DNS (FIGURA 23, Apêndice A). O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco, porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática de transfrutossilação, por água destilada.

4.7.5 Determinação da concentração de glicose (G)

A concentração de glicose (G) 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, 2019; 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 (Eduotec®, modelo EEQ901A-B) a 505 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações do açúcar mediante auxílio da curva de calibração obtida para o método GOD-PAP® (FIGURA 24, 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

5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

5.1.1 Delineamento de Plackett & Burman

O delineamento de Plackett & Burman provou pelo diagrama de Pareto (FIGURA 6) a possibilidade de se obter por meio da leitura da matriz com A_T , como variável resposta do planejamento (TABELA 4), resultados válidos. Foram considerados estatisticamente significativos os fatores ao nível de significância de 10 % (p -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).

Tabela 4 – Matriz do Delineamento de Plackett & Burman (valores reais e codificados)

(continua)

Ensaio	X1	X2 (°C)	X3 (rpm)	X4 (% v v ⁻¹)	Y1 (U g ⁻¹)
1	8,5 (1)	15 (-1)	250 (1)	1,6 (-1)	287,06
2	8,5 (1)	35 (1)	150 (-1)	2,6 (1)	217,78
3	6,5 (-1)	35 (1)	250 (1)	1,6 (-1)	179,46
4	8,5 (1)	15 (-1)	250 (1)	2,6 (1)	18,45
5	8,5 (1)	35 (1)	150 (-1)	2,6 (1)	89,45
6	8,5 (1)	35 (1)	250 (1)	1,6 (-1)	58,64
7	6,5 (-1)	35 (1)	250 (1)	2,6 (1)	214,99
8	6,5 (-1)	15 (-1)	250 (1)	2,6 (1)	123,64
9	6,5 (-1)	15 (-1)	150 (-1)	2,6 (1)	110,67
10	8,5 (1)	15 (-1)	150 (-1)	1,6 (-1)	305,27
11	6,5 (-1)	35 (1)	150 (-1)	1,6 (-1)	259,59
12	6,5 (-1)	15 (-1)	150 (-1)	1,6 (-1)	447,09
13	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)	255,22
14	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)	239,53

Tabela 4 – Matriz do Delineamento de Plackett & Burman (valores reais e codificados)

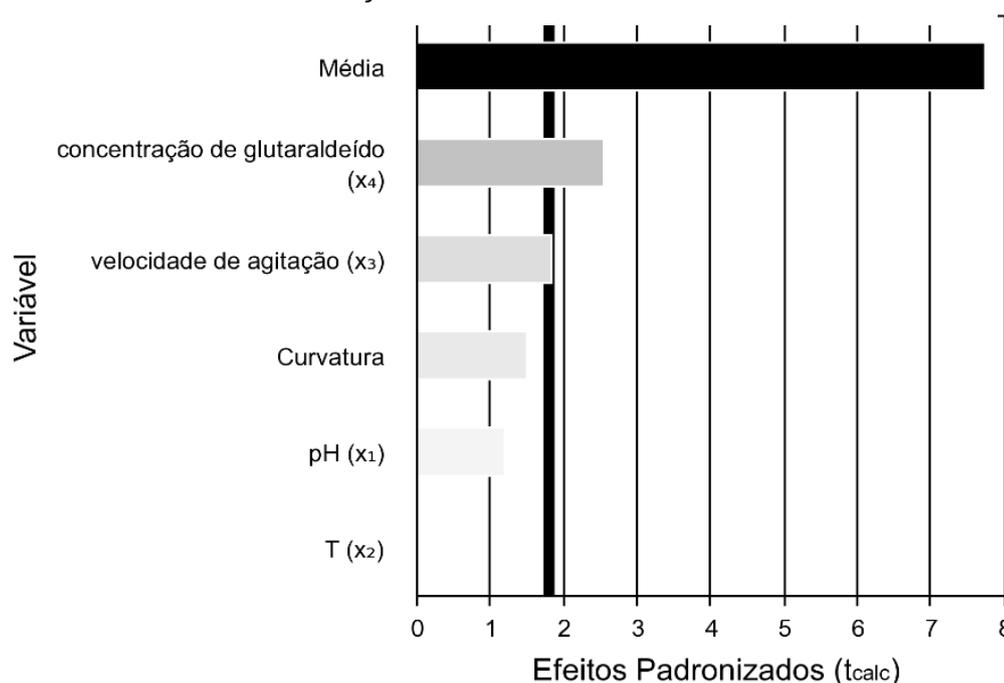
Ensaio	X1	X2 (°C)	X3 (rpm)	X4 (% v v ⁻¹)	(conclusão)
					Y1 (U g ⁻¹)
15	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)	301,29
16	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)	272,17

Fonte: Elaborada pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

Nota: X1: pH; X2: temperatura (em °C); X3: velocidade de agitação (em rpm); X4: concentração de glutaraldeído (em %, v v⁻¹); Y1: atividade de transfrutoseilação (em U g⁻¹).

O conhecimento dos dados para a resposta de Y1 (atividade de transfrutoseilação), demonstra que os pontos centrais exibem uma variação aceitável para a avaliação do erro puro da matriz; entretanto, as atividades durante todo o processo variaram de 18,45 U g⁻¹ a 447,09 U g⁻¹, justificando quais foram as variáveis capazes de influenciar no sistema, de forma significativa, perante os graus impostos a cada ensaio. Assim sendo, o diagrama de Pareto (FIGURA 7) comprova as informações de Y1, identificando duas variáveis de imobilização a serem otimizadas para o processo de reticulação: a velocidade de agitação (X3) e a concentração de glutaraldeído (X4).

Figura 7 – Diagrama de Pareto obtido para a variável resposta atividade de transfrutossilação



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

Nota: Fatores do planejamento experimental: X1 – pH de reticulação; X2 – temperatura; X3 – velocidade de agitação; X4 – concentração de glutaraldeído.

O diagrama de Pareto (FIGURA 7) exhibe os reflexos dos impactos de A_T , apresentado por p -valor $< \alpha$ (nível de significância, $\alpha = 0,10$), aproximado para zero pelo software, considerando alta significância e uma distribuição normal dos dados e amostras. Ao aplicar o teste de conformidade (teste de Shapiro Wilk) rejeitou-se H_0 (hipótese nula) e o modelo não gerou ANOVA.

Os resultados obtidos neste tópico são respostas importantes para os estudos de imobilização, expondo os fatores que devem ser otimizados e propondo a execução de um delineamento para as variáveis velocidade de agitação e concentração de glutaraldeído para a reticulação das células íntegras microbianas. Para as variáveis que não influenciaram o processo de imobilização (pH e temperatura), foram utilizados os valores obtidos por Gonçalves *et al.* (2020) e Garcia *et al.* (2021), cujas células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 foram reticuladas em pH 7,9 a 25 °C.

5.1.2 Delineamento de Face Centrada (DFC)

Com o intuito de apurar os efeitos da concentração de glutaraldeído (agente reticulante) e a velocidade de agitação na reação de imobilização a partir das análises das atividades de transfrutossilacção das células íntegras reticuladas (variável resposta, Y1), realizou-se um conjunto de ensaios, cujos resultados estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Matriz do Delineamento de Face Centrada - DFC (valores reais e codificados)

Ensaio	X1 (v/v)	X2 (rpm)	Y1 (U g ⁻¹)
1	1,6 (-1)	150 (-1)	540,45
2	2,6 (1)	150 (-1)	464,57
3	1,6 (-1)	250 (1)	264,57
4	2,6 (1)	250 (1)	607,24
5	1,6 (-1)	200 (0)	562,94
6	2,6 (1)	200 (0)	557,78
7	2,1 (0)	150 (-1)	371,01
8	2,1 (0)	250 (1)	1439,49
9	2,1 (0)	200 (0)	724,63
10	2,1 (0)	200 (0)	728,73
11	2,1 (0)	200 (0)	716,83

Fonte: Elaborada pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

Nota: X1: concentração de glutaraldeído (em %, v v⁻¹); X2: velocidade de agitação (em rpm); Y1: atividade de transfrutossilacção (em U g⁻¹).

Decorrente da variação da atividade de transfrutossilacção, foram obtidas respostas para a variável Y1 entre 264,57 U g⁻¹ a 1439,49 U. g⁻¹, apontando três pontos centrais para a avaliação do erro puro, o qual expôs baixa variação ao exibir suas atividades enzimáticas, acarretando reprodutibilidade satisfatória do modelo.

Entretanto, ao se avaliar os resultados para o modelo estatístico (Equação 15) e a Tabela 6, gerada pela ANOVA, observou-se que os mesmos não definiram

possibilidades válidas para as variáveis em estudo, mesmo ao se excluir os pontos quadráticos que são coeficientes estatisticamente não significativos, ao reparametrizar o modelo para um nível de confiabilidade de 90 % ($\alpha = 0,10$), conforme indicado pela Equação (15), diagrama de Pareto (FIGURA 8) e o gráfico de correlação (FIGURA 9).

Tabela 6 – Resultado da análise de variância (ANOVA) para a regressão quadrática com interação para avaliação dos efeitos de concentração de glutaraldeído e velocidade de agitação na variável resposta atividade de transfrutossilagem de células íntegras reticuladas

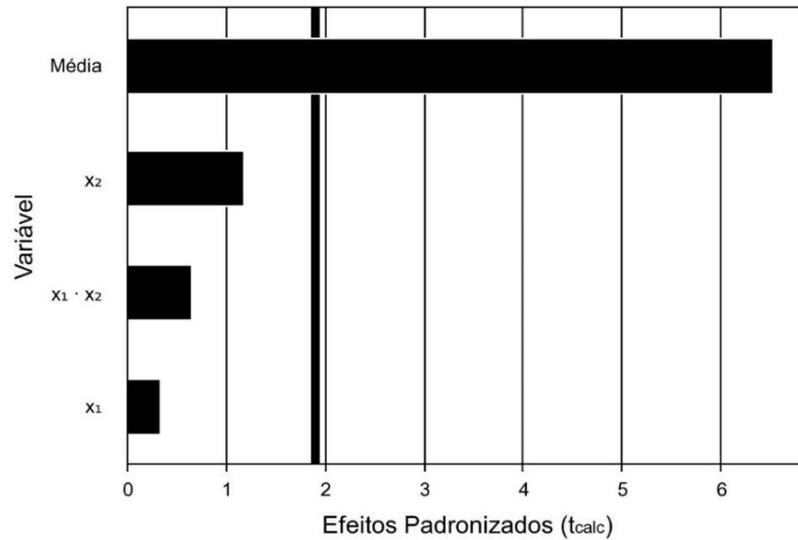
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	FCALC	p-valor
Regressão	200993,5	3	66997,8	0,6	0,61004
Resíduos	726541,3	7	103791,6		
Falta de Ajuste	726468,2	5	145293,6	3976,5	0,00025
Erro Puro	73,1	2	36,5		
Total	927534,8	10			

% variação explicada (R^2) = 21,67 %
 $F_{\text{tabelado}}(3, 7, 0,10) = 3,074$

Fonte: Elaborado pela autora a partir dos dados concedido pela ANOVA utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

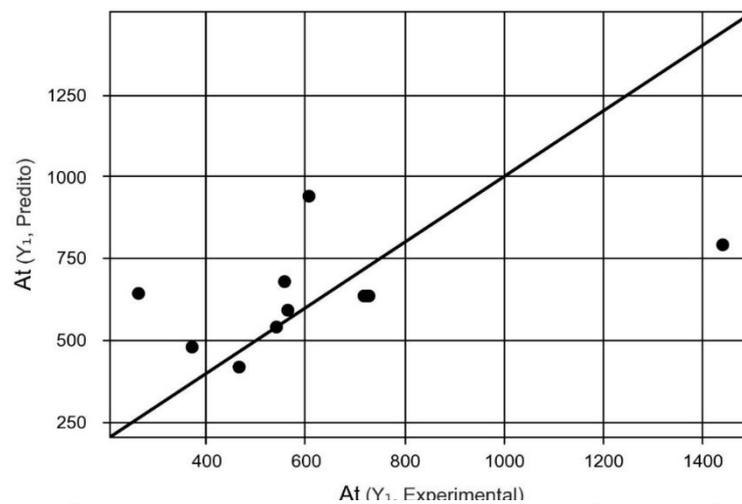
$$Y_1 = 634,38 + 43,60 X_1 + 155,88 X_2 + 104,64 X_1 X_2 \quad (15)$$

Figura 8 – Diagrama de Pareto obtido para a variável resposta atividade de transfrutossilção



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.
 Nota: Fatores do planejamento experimental: X₁ – concentração de glutaraldeído; X₂ – velocidade de agitação.

Figura 9 – Gráfico de correlação entre os valores preditos e experimentais para a variável resposta (Y₁), atividade de transfrutossilção (AT), de células íntegras reticuladas



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

Ao se obter p-valor (0,61) > α (0,10) e a percentagem de variação explicada (R²) igual a 21,67 % (TABELA 6), admitindo-se hipótese nula, foi observado que a diferença entre as médias não foi significativa. Os resultados indicaram que as

variáveis de imobilização investigadas não foram estatisticamente significativas (FIGURA 8) e os dados preditos e experimentais apresentaram dispersão (FIGURA 9) o que comprova, portanto, a não correlação estatística entre eles.

A interpretação dos dados apresentados para o modelo estatístico é insatisfatória para ocorrer a otimização das variáveis propostas, visto que o valor de $F_{\text{calculado}}$ (0,6) foi menor que o valor de F_{tabelado} (3,074), o que torna o modelo estatístico inválido e, portanto, sem possibilidade de geração de superfície de resposta e da curva de contorno. Diante disso, os resultados sugeriram a inserção de pontos axiais no modelo mediante a proposição de um delineamento compatível ao mesmo.

5.1.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Devido aos pontos axiais existentes na matriz, aplicou-se o DCCR para as variáveis de imobilização, ainda em estudo para otimização, sendo elas a concentração de glutaraldeído (X1) e a velocidade de agitação (X2), o qual manteve-se os mesmos níveis trabalhado anteriormente no delineamento DFC (Tópico 5.1.2).

Ao executar os ensaios da Tabela 7, era esperado encontrar superfícies de respostas elaboradas a partir das variáveis e seus pontos otimizados adentro de uma faixa de significância satisfatória.

Tabela 7 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR (valores reais e codificados)

Ensaio	X1 (v/v)	X2 (rpm)	Y1 (U g ⁻¹)
1	1,6 (-1)	150 (-1)	562,00
2	2,6 (1)	150 (-1)	464,57
3	1,6 (-1)	250 (1)	294,68
4	2,6 (1)	250 (1)	607,24
5	1,39 (-1,41)	200 (0)	586,57
6	2,81 (1,41)	200 (0)	645,66
7	2,1 (0)	129,29 (-1,41)	868,15
8	2,1 (0)	270,71 (1,41)	724,95
9	2,1 (0)	200 (0)	724,63
10	2,1 (0)	200 (0)	728,73
11	2,1 (0)	200 (0)	716,83

Fonte: Elaborada pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.
 Nota: X1 - concentração de glutaraldeído (em %, v v⁻¹); X2 - velocidade de agitação (em rpm); Y1 - atividade de transfrutoseilação (em U g⁻¹).

Os resultados para as atividades de transfrutoseilação (Y1), nas condições propostas, decorreram da variação de 294,68 U g⁻¹ a 868,15 U. g⁻¹, apontando três pontos centrais para a avaliação do erro puro, o qual expôs baixa variação ao apresentar suas atividades enzimáticas, indicando boa reprodutibilidade da matriz. Para o teste de Shapiro-Wilk foi aceito H0 (hipótese nula) e erro com distribuição normal no modelo estatístico.

Com as respostas obtidas (TABELA 7), a atividade de transfrutoseilação (Y1) foi descrita pelo modelo estatístico em função das variáveis de imobilização codificadas (Equação 16).

$$Y1 = 723,40 + 37,34 X1 - 109,69 (X1)^2 - 40,89 X2 - 19,48 (X2)^2 + 102,50 X1 X2 \quad (16)$$

Por meio da análise de variância (ANOVA), verificou-se a validade estatística do modelo gerado. Na Tabela 8 estão dispostos os dados de ANOVA para a variável

resposta AT (Y1), cuja percentagem de variação explicada (R2) foi de 56,69 %. O valor do $F_{\text{calculado}}$ (1,3) foi inferior ao valor do F_{tabelado} (3,45) invalidando o modelo e impossibilitando a geração da superfície de resposta e da curva de contorno.

Tabela 8 – Resultado da análise de variância (ANOVA) para a regressão quadrática com interação para avaliação dos efeitos de concentração de glutaraldeído e velocidade de agitação na variável resposta atividade de transfrutossilagem de células íntegras reticuladas

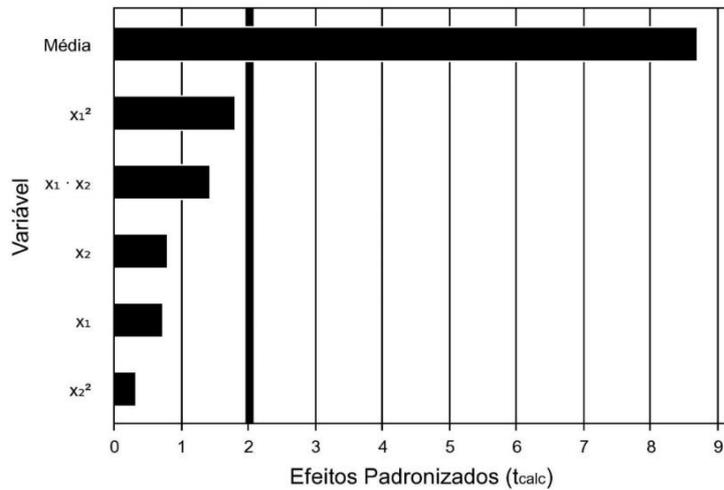
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	FCALC	p-valor
Regressão	135511,7	5	27102,3	1,3	0,38747
Resíduos	103534,6	5	20706,9		
Falta de Ajuste	103461,5	3	34487,2	943,9	0,00106
Erro Puro	73,1	2	36,5		
Total	239046,3	10			

% variação explicada (R2) = 56,69 %
 $F_{\text{tabelado}}(5, 5, 0,10) = 3,45$

Fonte: Elaborado pela autora a partir dos dados concedido pela ANOVA utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

Os efeitos do Diagrama de Pareto (FIGURA 10) são reflexos dos impactos das variáveis de imobilização na atividade enzimática ao se considerar alta significância e uma distribuição normal dos dados obtidos. Observou-se que os fatores concentração de glutaraldeído e velocidade de agitação não foram estatisticamente significativos para a faixa escolhida no estudo da imobilização de células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 e, portanto, não apresentaram influência significativa na variável resposta (Y1) ao nível de significância de 10 % ($\alpha = 0,10$). Além disso, observou-se também que os dados preditos e experimentais apresentaram dispersão (FIGURA 11) o que comprova, portanto, a não correlação estatística entre eles.

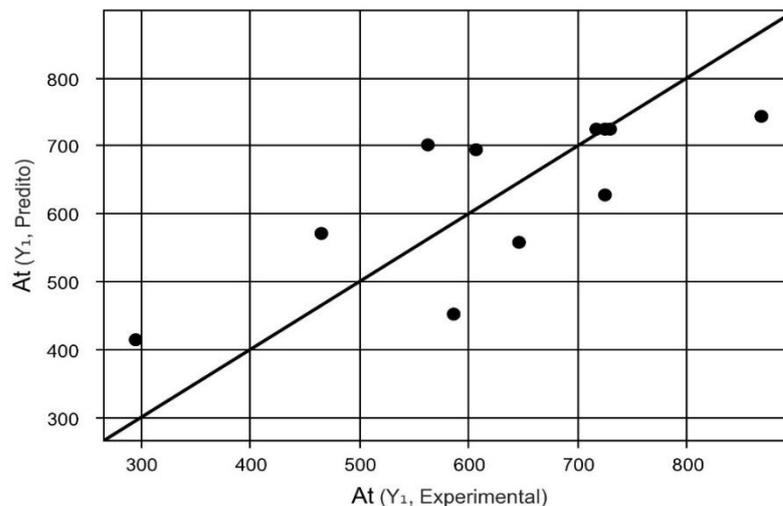
Figura 10 – Diagrama de Pareto obtido para a variável resposta atividade de transfrutossilção



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

Nota: Fatores do planejamento experimental: X_1 – concentração de glutaraldeído; X_2 – velocidade de agitação.

Figura 11 – Gráfico de correlação entre os valores preditos e experimentais para a variável resposta (Y_1), atividade de transfrutossilção (AT), de células íntegras reticuladas



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design®.

A interpretação dos dados retratados à matriz é insatisfatória para ocorrer a otimização das variáveis proposta, não sendo amplo o suficiente. O modelo de regressão não apresentou uma superfície de resposta considerável ao interpretar os dados, não sendo aceito o gráfico gerado pela ANOVA. A amostra provém de uma distribuição que tende a curva gaussiana, contudo a leitura de cada resultado

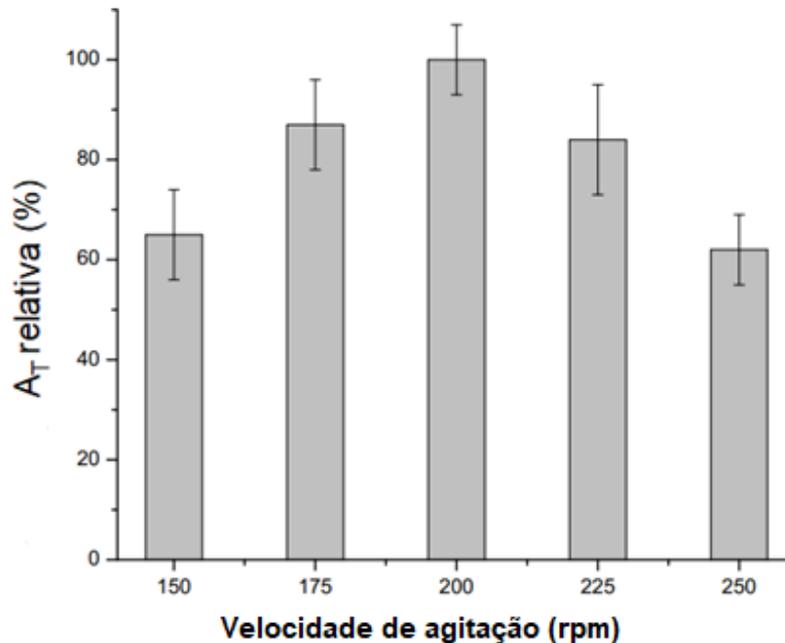
estatístico do delineamento, levando em consideração que a reação é um processo enzimático e o mesmo exige um coeficiente de regressão alto para ser aceito e provar se ocorreu melhoria ou não dos fatores (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Pode-se afirmar, portanto, que os resultados obtidos para as variáveis avaliadas (concentração de glutaraldeído e velocidade de agitação) não se mostraram satisfatórios. O processo de imobilização deve adotar uma nova estratégia para otimização das mesmas, sendo possível quando essas variáveis são estudadas de modo isolado, ou seja, excluindo sua relação com os outros fatores por não apresentar correlação entre si, conhecidas como variáveis independentes. No entanto, ressalta-se que, ao aplicar este estudo, não é possível julgar o erro padrão, pois qualquer condição experimental não se repete (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

5.2 INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DURANTE A IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS MICROBIANAS

De acordo com os estudos anteriores, a velocidade de agitação pode ser tomada como uma variável independente e, portanto, a sua otimização ocorreu de forma individual. Pela Figura 12, observou-se que valores de A_T relativas maiores que 85 % foram obtidos para uma faixa de velocidade de agitação compreendida entre 175 e 225 rpm, com atividades enzimáticas iguais a $615,93 \text{ U g}^{-1}$ e $593,03 \text{ U g}^{-1}$, respectivamente. No entanto, o maior valor de A_T ($707,88 \pm 50,43 \text{ U g}^{-1}$), correspondente a 100 % de atividade relativa (AR), foi alcançado para uma velocidade de agitação de 200 rpm. Os resultados obtidos se mostraram similares aos estudos de imobilização reportados por Garcia *et al.* (2021), cuja atividade enzimática de células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 teve um ganho de 14 % durante o processo de reticulação ocorrido a 200 rpm, sob as mesmas condições experimentais.

Figura 12 – Avaliação dos efeitos da velocidade de agitação na atividade enzimática de células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 durante o processo de imobilização. A atividade máxima de transfrutossilação ($707,88 \pm 50,43$ U.g⁻¹) foi definida como 100% da atividade relativa



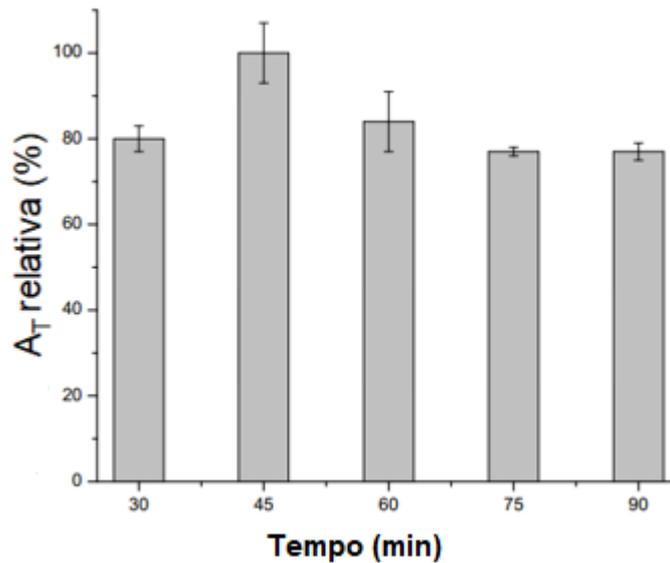
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Os menores valores de A_T relativa (FIGURA 12), de aproximadamente 65 %, foram obtidos para velocidades de agitação de 150 rpm ($462,54 \pm 43,10$ U.g⁻¹) e 250 rpm ($441,07 \pm 29,14$ U.g⁻¹). A baixa velocidade de agitação reduz a taxa de transferência de massa do glutaraldeído, presente no seio da solução, para a superfície das células microbianas e, portanto, tem-se um menor contato entre o reagente e o biocatalisador, reduzindo a eficiência do processo de reticulação. Por outro lado, para maiores velocidades de agitação, apesar do aumento da taxa de transferência de massa convectiva, houve a formação de vórtices no processo de reticulação induzida pela baixa viscosidade do fluido e pela agitação magnética central. A formação de vórtices acarreta a redução do nível de mistura do glutaraldeído na solução e, portanto, a obtenção de uma mistura uniforme é dificultada, influenciando negativamente o processo de reticulação das células microbianas. Ressalta-se também que a velocidade de agitação elevada pode ter ocasionado a danificação ou ruptura das células de *A. oryzae* IPT-301 devido ao aumento da tensão de cisalhamento (atrito), impactando nos menores valores de atividade enzimática.

5.3 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE RETICULAÇÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DURANTE O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS MICROBIANAS

De acordo com os estudos anteriores, o tempo de reação também pode ser tomado como uma variável independente e, portanto, a sua otimização ocorreu de forma individual. Pela Figura 13, observou-se que o maior valor de A_T ($979,03 \pm 64,93 \text{ U.g}^{-1}$), o que corresponde a 100 % da atividade relativa, foi obtido para um tempo de reticulação de 45 minutos, ao se imobilizar células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 em solução de glutaraldeído 25 % (v.v⁻¹), pH 7,9, 200 rpm à 25 °C. Gonçalves *et al.* (2020) e Garcia *et al.* (2021), sob condições experimentais similares, obtiveram células íntegras do mesmo microrganismo com atividades de transfrutossilção iguais a $817,15 \text{ U.g}^{-1}$ e 986 U.g^{-1} , respectivamente, porém, para um tempo de reticulação de 60 minutos. Ressalta-se que os autores não avaliaram a influência deste parâmetro na atividade enzimática. Os resultados mostraram, portanto, que houve uma redução satisfatória do tempo de reticulação alcançada neste trabalho.

Figura 13 – Avaliação dos efeitos do tempo de reticulação na atividade enzimática de células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 durante o processo de imobilização. A atividade máxima de transfrutossilação ($979,03 \pm 64,93$ U.g-1) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Para se determinar a natureza da estrutura produzida, o tempo é um dos agentes importante, e segundo Torres *et. al*, 2006, com o passar do tempo de reação pode-se ocorrer a desativação enzimática, devido a reticulação com glutaraldeído, já que o glutaraldeído é altamente reativo. O que gera extensas reações com o aumento de tempo de reação e uso de grandes concentrações.

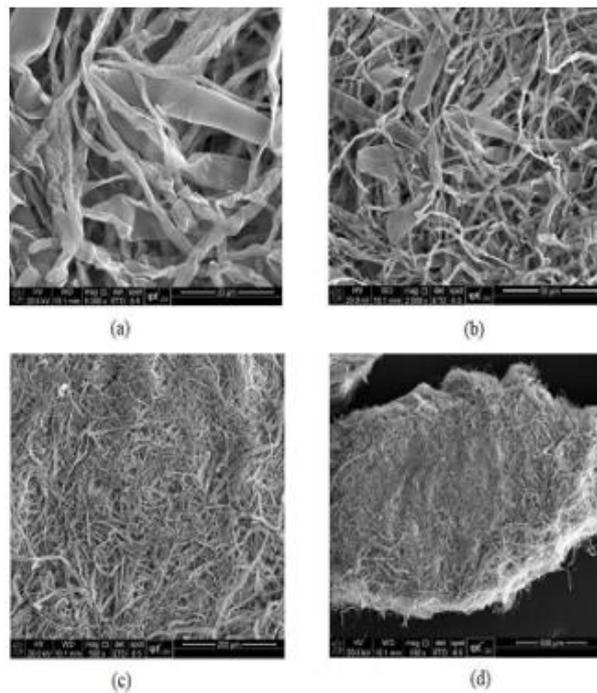
A alta reatividade contida no glutaraldeído com o passar do tempo de reação torna-se nocivo a enzima, levando a distorção da proteína. Segundo Furlani (2020), deve-se respeitar o tempo máximo proporcionado pela reação em estudo ao utilizar este agente reticulante, para que não ocorra a inibição do sítio ativo. Ou, então, deve-se proteger o sítio ativo da enzima adicionando um inibidor enzimático.

Por isso ao otimizar o tempo de reação, certifica-se que o sítio ativo da enzima não sofrerá inibição durante o processo de reticulação, deixando o biocatalisador estável, benéficamente proporcionando uma redução de custo para o processo.

5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS MICROBIANAS RETICULADAS

As imagens de MEV referentes à morfologia de amostras de células microbianas, *in natura* e reticuladas, com atividade enzimática são mostradas nas Figuras 14 e 15, respectivamente. As imagens foram obtidas para um aumento de 5000x, 2000x, 500x e 150x.

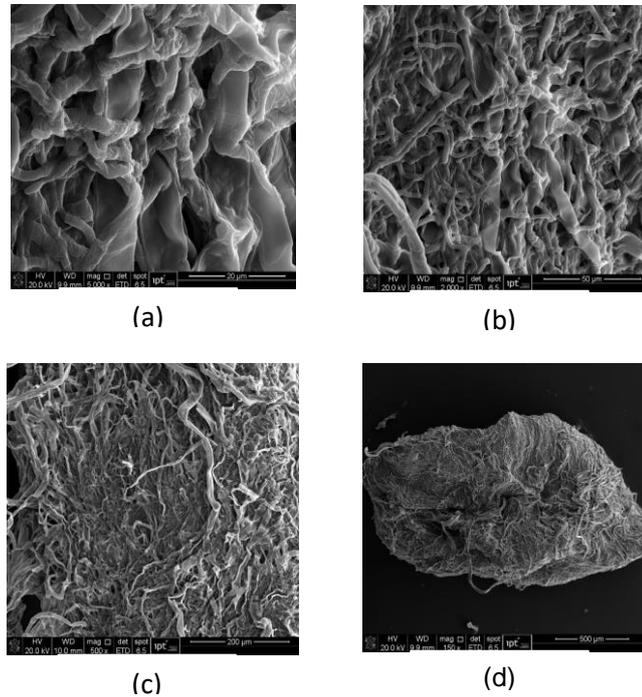
Figura 14 – Micrografias eletrônicas obtidas para amostra de células íntegras microbianas *in natura* de *A. oryzae* IPT-301



Fonte: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP).

Legenda: a) 5000x;
b) 2000x;
c) 500x;
d) 150x

Figura 15 – Micrografias eletrônicas obtidas para amostras de células íntegras microbianas reticuladas de *A. oryzae* IPT-301



Fonte: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP).
 Legenda: a) 5000x;
 b) 2000x;
 c) 500x;
 d) 150x.

De acordo com Nielsen (1992), as hifas devem estar presentes nos fungos filamentosos e seu desenvolvimento é sucedido por quatro principais estágios, sendo eles a germinação de esporos, crescimento de hifas, ramificação e diferenciação fúngica. As micrografias eletrônicas mostram o último estágio de formação do fungo, cuja estrutura morfológica das células íntegras, *in natura* e reticuladas, evidenciam a presença de hifas não septadas, sem presença de corpos de frutificação, de esporos e um micélio homogêneo, característico de crescimento micelial de um fungo filamentosos do gênero *Aspergillus sp.*

No entanto, as superfícies das células íntegras reticuladas exibem uma superfície de filamentos com aspectos mais homogêneos que as células *in natura*, devido ao aglomerado formado pelas hifas, diminuindo sua área superficial, apontando um espaçamento menor do que células *in natura*. Essas características, ocorrem devido as condições de crescimento que as células são submetidas, por

exemplo, o meio de cultura, tempo de crescimento, técnicas de imobilização celular, entre outros parâmetros inerentes ao processo utilizado (ELIZEI *et al.*, 2014; SOARES *et al.* 2010).

Furlani (2020), elucida que ao imobilizar o biocatalisador o efeito da transferência de massa interfere no tamanho e distribuição dos poros, influenciando diretamente no seu rendimento. Neste caso, ao imobilizar as células íntegras com glutaraldeído observou-se que ocorreu a diminuição dos poros, conseqüentemente a superfície tornou-se homogênea.

Os valores relacionados às áreas específicas, bem como o tamanho e volume de poros das células íntegras de *A. oryzae* IPT-301, *in natura* e reticuladas, estão dispostos na Tabela 9. Notou-se que a área específica das células microbianas, determinada pelo método de BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER; 1938), reduziu cerca de 24 % após o processo de reticulação. A redução da área específica, ao se reticular as células, pode estar associada a utilização do glutaraldeído como agente reticulante

O tamanho de poros, obtido pelo método de BJH (BARRET; JOYNER; HALLEND, 1951), apresentou valores de 8,8982 Å e 3,6982 Å para as células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 *in natura* e reticuladas, respectivamente (TABELA 9). Observou que o volume de poros reduziu aproximadamente 2,406 vezes para as células imobilizadas. O grau de reticulação é reportado como um dos fatores que causa a redução de porosidade em materiais, o que pode ocorrer também com as células microbianas (BERGER *et al.*, 2004; GONSALVES; ARAÚJO, 2011).

Tabela 9 – Caracterização de células íntegras de *A. oryzae* IPT-301, *in natura* e reticuladas, obtida pelos métodos BET e BJH

Células íntegras	Área específica (m²/g)	Tamanho de poro (Å)	de Volume de poro (cm³/g)
<i>In natura</i>	2,79 ± 0,04	8,8982	0,010250
Reticulada	2,12 ± 0,01	3,6982	0,003553

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

5.5 PERFIS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO REATOR PBR

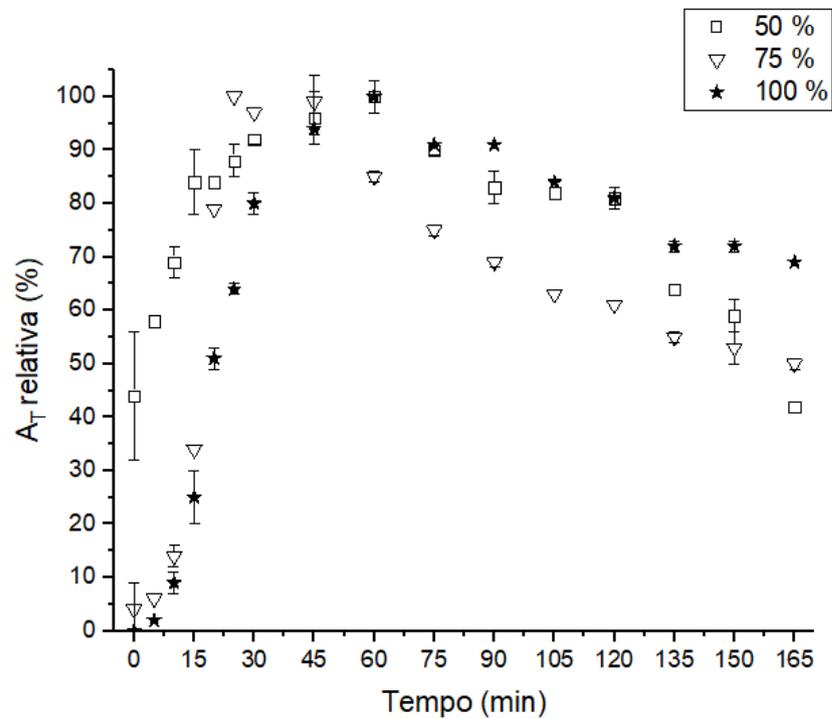
A seguir será apresentada a influência da altura do leito catalítico, temperatura do meio reacional, concentração do substrato e vazão volumétrica na atividade de transfrutossilção das células reticuladas, assim como os parâmetros cinéticos.

5.5.1 Influência da Altura do Leito Catalítico na Atividade de Transfrutossilção

A Figura 16 apresenta a atividade de transfrutossilção das células reticuladas no PBR em função da altura do leito catalítico (Tópico 4.6.2.1). Inicialmente, observou-se um rápido aumento da AR, até aproximadamente 100%, para todas as alturas de leito até 45 min de reação. Em seguida, a AR apresentou uma queda ao longo do tempo de reação. Esta queda foi menor para o PBR recheado com 100% da sua capacidade. Isso pode ser atribuído à maior massa de biocatalisador no PBR e, possivelmente, a uma menor formação de caminhos preferenciais ou volumes mortos nesta condição devido à maior ocupação do reator.

Também, após 135 minutos é possível observar a estabilização da A_T para o PBR recheado com 75% e 100% da sua capacidade, indicando que neste tempo passa a ocorrer a transição do regime transiente para o estacionário no PBR.

Figura 16 – Influência da altura do leito na atividade relativa em porcentagem, variando-se o empacotamento em 50%, 75% e 100% durante 180 minutos de reação

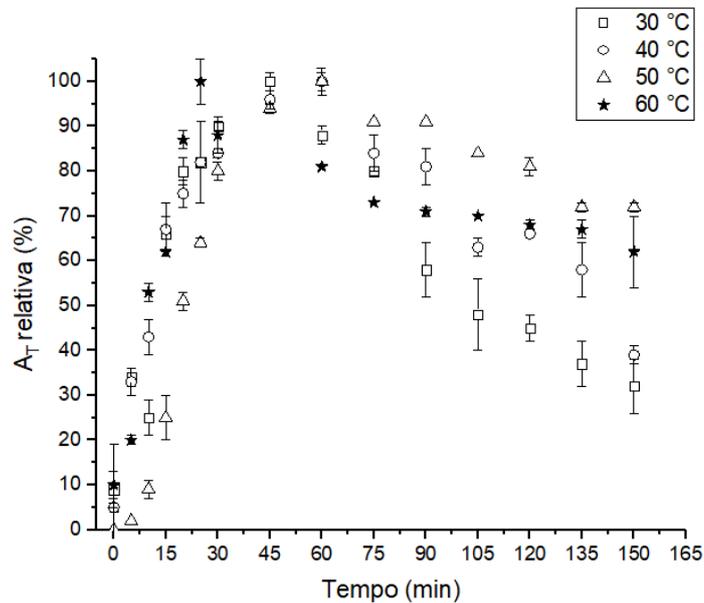


Fonte: Elaborada pela autora (2022)

5.5.2 Influência da temperatura do meio reacional na atividade de transfrutossilção

A seguir, a Figura 17 avalia a influência da A_T na temperatura ($^{\circ}\text{C}$) das células reticuladas no PBR, de acordo com o Tópico 4.6.2.2.

Figura 17 – Avaliação do efeito da temperatura do meio reacional, variando entre 30°C, 40°C, 50°C e 60°C durante 150 minutos de reação



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

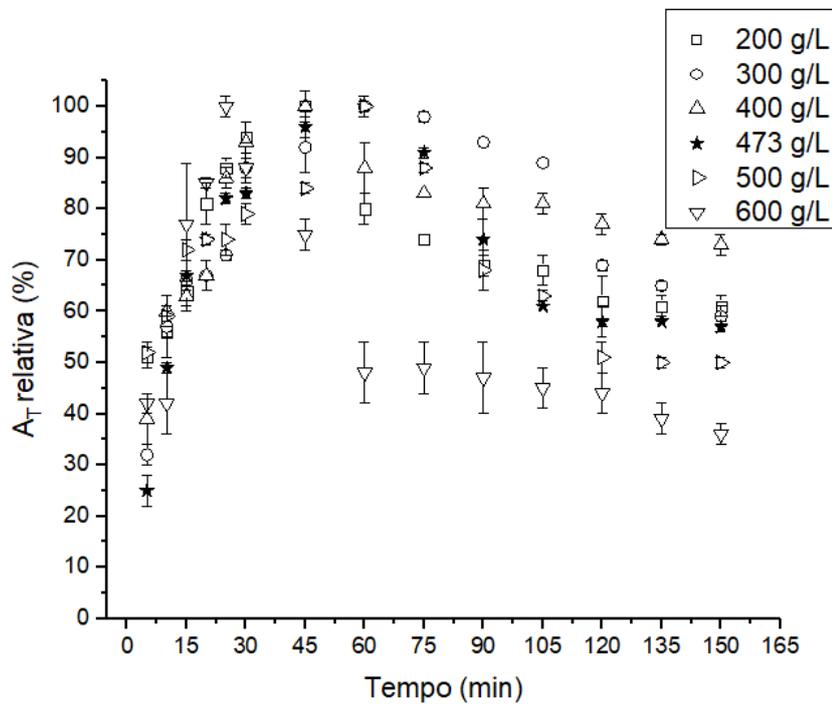
Analisando os perfis obtidos para 30 °C e 40 °C, observa-se que com o passar do tempo de reação a A_T , sofre um decréscimo da atividade de transfrutoseilação. A queda de A_T ocorre possivelmente à baixa estabilidade da enzima nestas temperaturas.

A temperatura de 50 °C aponta maior estabilidade de atividade de transfrutoseilação durante o processo, atingindo o estado estacionário aos 135 minutos de reação. Os resultados de Cunha *et al.* (2019) e Dias (2020) corroboram com o resultado obtido. Cunha *et al.* (2019) utilizou a enzima extracelular produzida pelo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator batelada e obteve a 50 °C a maior A_T , apresentando $19,53 \pm 0,056$ U.ml⁻¹. Dias (2020) utilizou a biomassa livre do mesmo microorganismo em reator PBR e obteve AR máxima de 79% a mesma temperatura de Cunha *et al.* (2019), atingindo o estado estacionário os 25 minutos de reação.

5.5.3 Influência da concentração de substrato na atividade de transfrutoseilação e obtenção de seus parâmetros cinéticos

A Figura 18 avalia a influência da A_T na concentração de sacarose (g.L^{-1}) das células reticuladas no PBR, de acordo com o Tópico 4.6.2.3.

Figura 18 – Avaliação das diferentes concentrações de substrato na atividade de transfrutoseilação, variando as concentrações de 200 g.L^{-1} até 600 g.L^{-1} durante 150 minutos de reação



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Observa-se que para todas as concentrações apresentadas a transição do regime transiente para estacionário ocorreu aproximadamente aos 120 minutos. Para as concentrações de 200 e 300 g.L^{-1} de sacarose constata-se uma grande queda da AR em um curto período de tempo, apresentando uma grande instabilidade durante a reação. É provável que este comportamento se deu pelo fato de ao trabalhar a baixas concentrações de sacarose, a reação continua possivelmente não apresentará A_T . Tal efeito pode ser observado também nos trabalhos de Gonçalves *et al* (2020) e Garcia

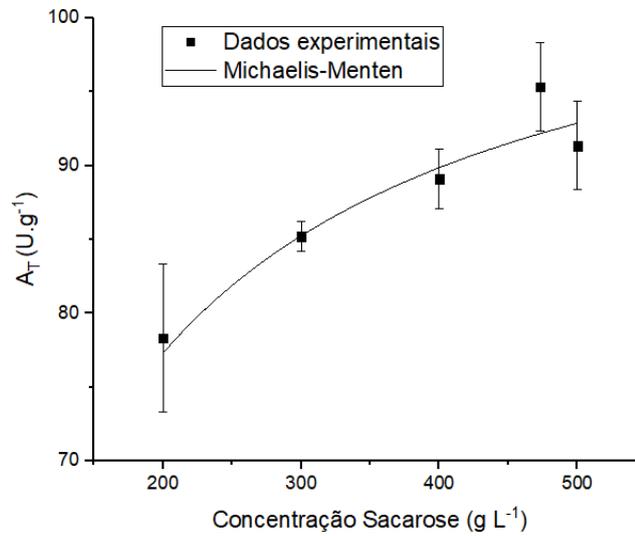
et al (2021), que em baixas concentrações de substratos tem-se uma queda na atividade de transfrutossilação.

Já ao observar a concentração de 600 g. L⁻¹ se vê uma crescente atividade no início da reação, dado sequencialmente pela sua queda brusca em um curto período de tempo (\pm 20 minutos). Dias, 2020 ao trabalhar com a célula íntegra livre, obteve um decréscimo de sua atividade a partir de 573 g. L⁻¹, ou seja, é possível afirmar que existe a formação de algum produto ou inibição pelo substrato durante a reação que provoque essa queda de atividade (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ,2001).

Para as concentrações de 400, 473 e 500 g. L⁻¹ obteve-se um desempenho semelhante da enzima, assim como Garcia *et al.* (2021) e Dias (2020) puderam observar em seus estudos com células íntegras reticuladas em reator batelada e células livres em reator PBR, ao analisar a atividade de transfrutossilação obtida em relação ao seu tempo de residência neste regime de concentrações para a mesma, tanto em reação batelada quanto em reação de processo contínuo, obtendo neste trabalho um resultado de 173,22 U.g⁻¹ ao trabalhar com a concentração de 473 g. L⁻¹. Baseado nos trabalhos anteriores realizados por este grupo de pesquisa, os maiores resultados de A_T veem sendo encontrados para a concentração de 473 g. L⁻¹, considerando-a se na faixa ótima de resultados, por isso, optou-se por trabalhar com esse valor.

Após, realizou-se o ajuste do modelo de Michaelis-Menten, por meio aos dados experimentais, mediante auxílio de software gráfico para obtenção dos parâmetros cinéticos aos dados da atividade de transfrutossilação da FTase das células íntegras imobilizadas em regime estacionário, apresentado pela Figura 19.

Figura 19 – Modelo de Michaelis-Menten para obtenção dos parâmetros cinéticos



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O ajuste do modelo cinético apresentou um coeficiente de determinação de $R^2 = 91\%$, seu valor retrata grande significância quanto a interpretação de A_T . A Tabela 10 apresenta os parâmetros da reação.

Tabela 10 – Parâmetros cinéticos e R^2 para as células íntegras imobilizadas de *A. oryzae* IPT-301

Parâmetro cinético	Modelo de Michaelis-Menten
$V_{m\acute{a}x}$ ($U \cdot g^{-1}$)	$101,91 \pm 3,50$
K_m	$61,35 \pm 13,71$
R^2	0,91

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Dias (2020), ao comparar seus estudos em processo contínuo ao processo batelada, afirma que para as células livre de *A. oryzae* IPT- 301 ocorre uma queda de afinidade entre enzima e o substrato.

Entretanto, podemos observar pela Tabela 10, que ao reticular as células íntegras existe um aumento significativo na afinidade da enzima e o substrato, assim como estudado por Garcia *et al.* (2021). Dentre os modelos testados, o modelo de

Michaelis-Menten foi o único e que se melhor se ajustou, resultando nos parâmetros de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 61,35 e 101,91 na devida ordem.

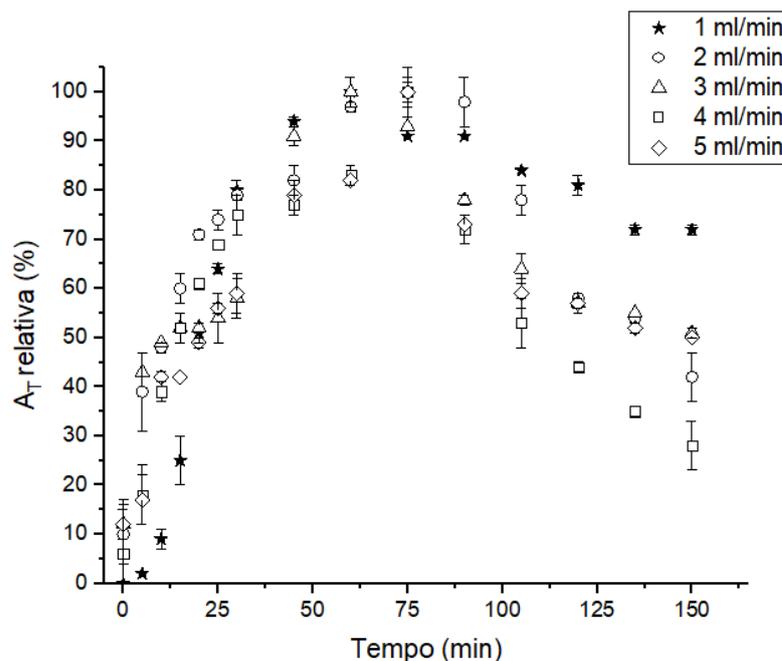
Garcia *et al.* (2021), em processo batelada ao reticular as células íntegras, também obteve seu melhor ajuste no modelo de Michaelis-Menten apresentando um R^2 de 95,4%, e parâmetros de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 98,5 $U\ g^{-1}$ e 956,06 $g\ L^{-1}$. Comparado com os resultados apresentados pelo processo contínuo, ao contrário de Dias (2020), é possível obter maior afinidade entre enzima substrato.

É notório que o valor de K_m (98,5) apresentado por Garcia (2018) é maior do que encontrado neste estudo, sendo K_m (61,35), indicando que existe maior afinidade da enzima e o substrato em processo contínuo após o processo de imobilização.

5.5.4 Influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutossilação

O efeito da vazão volumétrica na A_T foi investigado a partir da metodologia descrita no Tópico 4.6.2.4, variando de 1 a 5 $ml.min^{-1}$, apontado pela Figura 20, a seguir.

Figura 20 – Avaliação das diferentes vazões volumétricas na atividade de transfrutossilação, variando as vazões de 1 $mL.min^{-1}$ até 5 $mL.min^{-1}$ durante 150 minutos de reação



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Pode-se observar que para as vazões de 2, 3, 4 e 5 ml.min⁻¹ ocorre uma queda a partir de 90 minutos de reação, este fato pode estar relacionado ao tempo de contato entre o substrato e sítio ativo da enzima, levando a queda da atividade enzimática, favorecendo o arraste da enzima, ou seja, possivelmente temos um menor número de enzimas em contato, o que pode dificultar a ocorrência da reação de transfrutoseilação (DIAS, 2020).

Contudo, a vazão adequada para se trabalhar nestas condições se deu pela vazão de 1 ml.min⁻¹, o qual, tem-se um maior contato enzimático devido ao maior tempo de residência do substrato na reação, diminuindo a possibilidade de arraste do biocatalisador, o que, possibilita a realização da reação de transfrutoseilação.

5.6 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA

A realização da avaliação do coeficiente de transferência de massa externa (TME), depende da interpretação das propriedades físicas das substâncias presentes na reação (DIAS, 2020). A Tabela 11 apresenta os dados necessários para se obter o coeficiente de TME.

Tabela 11 – Propriedades físicas dos reagentes presentes na solução à 50 °C

Propriedades físicas materiais	Água líquida	Solução Aquosa de sacarose (50% m.m ⁻¹)
MM (g.mol ⁻¹)	18,01	342,3
ρ (kg.m ⁻³)	988,1	1214,5
μ (cP)	0,5494	6,18
ν (m ² .s ⁻¹)	5,6 x 10 ⁻⁷	5,1 x 10 ⁻⁶

Fonte: Adaptado de GEANKOPLIS (1993) e MATHLOUTH; REISER (1995).

O parâmetro da viscosidade foi obtido experimentalmente por Dias (2020), e utilizado neste trabalho, devido ao uso das mesmas condições durante a reação. Já Mathlouth e Reiser (1995, p. 200 - 217) reportou a massa específica da solução

aquosa de sacarose 50 % m m⁻¹ a 50 °C, com valor de sua viscosidade próxima da apresenta por Dias (2020) em laboratório.

5.6.1 Coeficiente de transferência de massa externa

A definição do coeficiente de transferência de massa é dada por (kc), determinado pelas equações Reynolds de partícula (Re_p), Schmidt (Sc) e Sherwood (Sh), que seguiu o tópico 4.6.4 para descrever seus números adimensionais, apresentados pela Tabela 12.

Tabela 12 – Números adimensionais de Re_p , Sc, Sh e DAB

Número adimensional	Valor
Reynolds de partícula – Re_p	1,058
Schmidt – Sc	6,64x10 ⁶
Sherwood – Sh	118,027
Difusividade – DAB	7,66x10 ⁻¹³

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Os valores adimensionais disposto na Tabela 12 apresentaram resultados que definem fluxo do escoamento, confronto entre as camadas limites e escoamento da reação, entre outros fatores, os quais quando não disposto como resultado final, são o caminho para a solução e confronto (FOGLER, 2012).

Para *Reynolds* encontrado, é possível afirmar que a reação ocorre em escoamento laminar. Dias (2020) obteve o valor de Re_p de 0,59 para as células íntegras livres no mesmo regime. Este resultado indica grande influência da força viscosa perante o escoamento.

O número de Schmidt expõe uma relação das espessuras relativas das camadas limite (hidrodinâmica e de transferência de massa) de forma a caracterizar os escoamentos, relacionando assim o movimento e a difusividade mássica (DIAS, 2020; FOGLER, 2012).

O valor de Sc (TABELA 12) encontrado é considerado um valor alto, deste modo, mostra que o processo é gerenciado pela reação, e indica uma espessura da

camada limite de transferência de massa pequena. Para Levenspiel (2011), os valores para líquidos de Sc são característicos de ordem 10^3 .

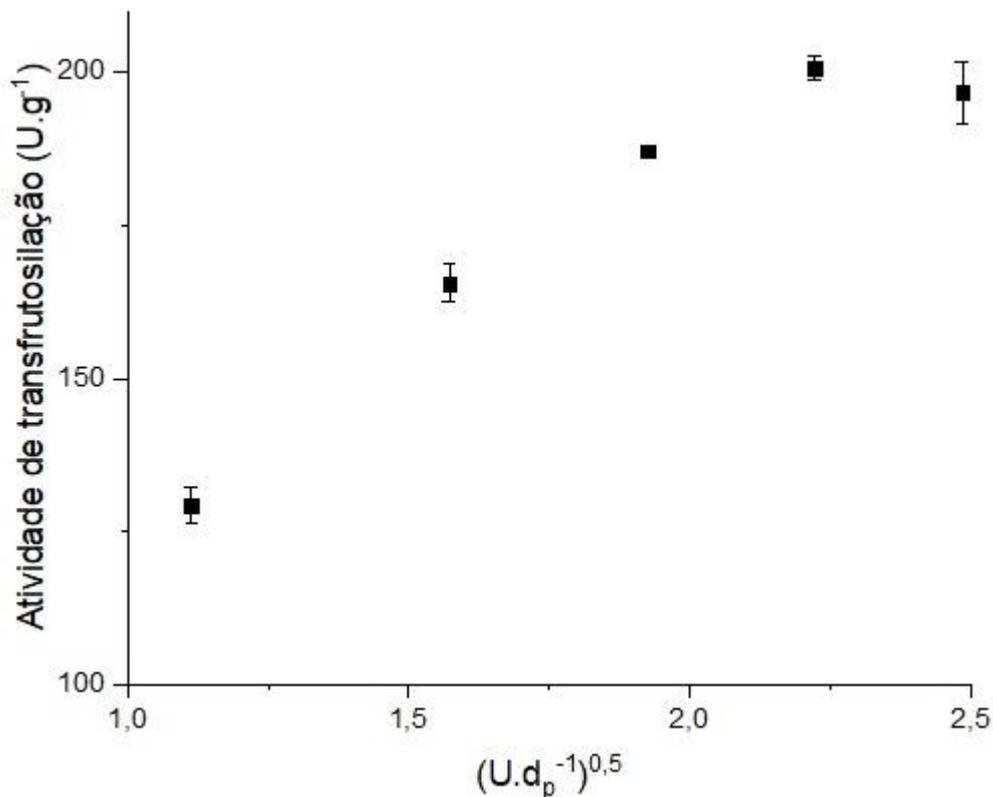
Para encontrar o número de Sherwood, foram definidos os valores dos coeficientes de difusão mássica, descrito pela transferência de massa por convecção e difusão (FOGLER, 2012). Assim, o valor apresentado da Tabela 12, descreve que a transferência de massa convectiva, sobressai sobre o difusivo.

É possível a partir dos dados experimentalmente encontrados estabelecer o valor do coeficiente de transferência de massa externa (kc), sendo este, $3,51 \times 10^{-8} \text{ m. s}^{-1}$. Entretanto, necessita-se de uma investigação para compreender se houve ou não limitação da transferência de massa externa, dado pela comparação entre transferência de massa externa (kc) e a constante cinética da reação (k) (FOGLER, 2012).

Fogler (2012) descreve sobre a avaliação do processo de limitação da reação pela TME, que pode ser descrito quando o valor encontrado para constante da reação (k) for desprezível em relação ao coeficiente de transferência de massa externo (kc), limitando a reação pela cinética.

No entanto não foi possível obter um valor para (k), visto o modelo cinético obtido de Michaelis-Menten não possibilitou a aproximação com modelos de primeira ou segunda ordem. Sendo assim, para analisar se a reação é favorecida pela TME ou pela reação química utilizou-se o método gráfico representado na Figura 4, relacionando a razão $U.dp^{-1}$ com a A_T na Figura 21 a seguir:

Figura 21 – Região de limitação pela TME e pela velocidade da reação



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

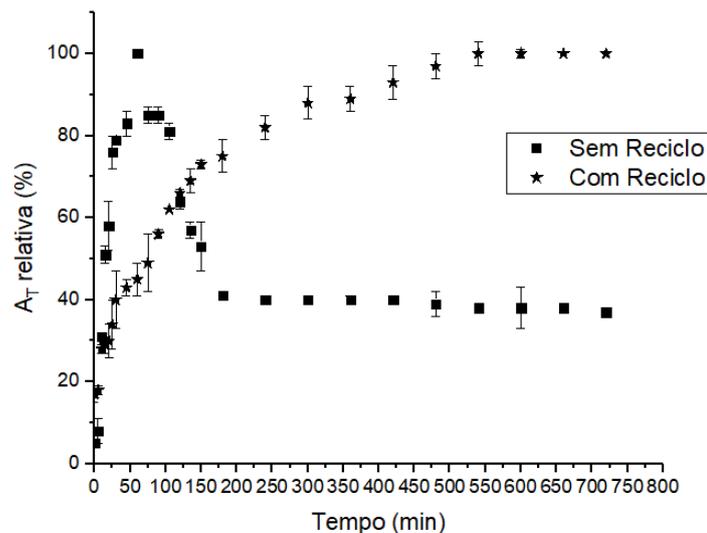
Observa-se que o comportamento do gráfico da Figura 21 é semelhante ao da Figura 4, mostrando que até vazão de 4 ml.min⁻¹ a reação é limitada pela TME, o que favorece a velocidade de reação em função dos regimes difusionais. A dificuldade encontrada pelo substrato para permear a camada limite acaba resultando em sítios ativos livres e diminuindo a A_T .

A partir da vazão 5 ml.min⁻¹ sugere-se que a A_T se estabiliza, e o regime de limitação que é dado pela velocidade da reação química, ocorrendo uma resistência da camada limite a passagem do substrato torna-se irrelevante, e os sítios ativos passam a ser preenchidos pelos substratos com mais frequência, favorecendo a reação. Nota-se também que para o período de tempo estudado, a partir da vazão 5 ml.min⁻¹ a atividade permaneceu constante, o que não justifica o aumento da vazão a partir deste ponto, evitando arraste enzimático e problemas operacionais.

5.7 ENSAIOS DE ESTABILIDADE OPERACIONAL

A investigação da estabilidade operacional ocorreu conforme procedimento experimental demonstrado no Tópico 4.6.3., demonstrado pela Figura 22, para reação com e sem reciclo.

Figura 22 – Influência do reciclo na atividade de transfrutossilação



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Ambas as reações apresentadas tendem se estabilizar com o passar das horas, entretanto a reação com reciclo apresenta um grande aumento de sua atividade relativa. Pode se afirmar que o reciclo, aumentou a atividade em 60%, devido ao retorno da atividade residual a reação após seu ciclo, ou seja, o círculo vicioso faz com que ela retorne à reação após sua saída do reator elevando a glicose transfrutossilada.

Observa-se que para a reação sem reciclo em 60 minutos o máximo de atividade relativa é atingida (100%), entretanto ocorre uma queda da atividade com o passar das horas e a reação se estabiliza com 180 minutos de reação com 40% de atividade, mantendo-se até atingir 12 horas de reação. Este aspecto como vimos anteriormente é normal, já que com o passar do tempo supostamente ocorra da perda da atividade enzimática da FTase, podendo ocorrer devido a remoção da atividade encontrada na enzima superficial da partícula das células íntegras reticuladas. Dias

(2020), para as células livres uma atividade máxima recuperada no tempo de 35 minutos de reação, atingindo 74%.

Já para a reação com reciclo observamos o contrário, é possível dizer que com o passar do tempo a atividade relativa foi aumentando gradativamente até atingir 100%, no tempo de 540 minutos e manteve-se constante até atingir as 12 horas, apontando que não ocorreu perda da atividade reacional. Este fato sugere que mesmo que ocorra a perda da atividade enzimática com o passar do tempo, assim como nos apresenta o estudo sem reciclo, tem-se na reação a atividade absorvida da célula nas primeiras horas, ocorrendo a atividade de transfrutossilagem durante a reação, mesmo que não mais aderida a célula e sim ao meio reacional, evitando a queda da atividade reacional.

De acordo com Dias (2020), a célula livre atinge 94% de atividade recuperada em 120 minutos de reação, e se mantém constante quando em reação com reciclo, alcançando o limite máximo da reação em menor tempo, devido ao contato direto da célula em seu estado livre com o substrato. Entretanto, a perda da estabilidade reacional é mais rápida e a reação não é capaz de preservar 100% de sua atividade, validando a importância da imobilização celular.

Além disso, Garcia (2018) apresentou que para reação batelada é possível alcançar 75% de sua atividade recuperada para a célula íntegra imobilizada em 12 horas de reação. Esses resultados indicam que as células reticuladas apresentam em reator PBR um ganho significativo para reação que quando em reator batelada. E o processo de reticulação das células íntegras nas condições otimizadas permite diminuir as adversidades encontradas na transferência de massa, apresentando melhores resultados e menor perda de sua massa com o passar das horas (FOGLER, 2012).

Assim sendo, cabe destacar que cada fator apresenta suas melhores condições, indispensáveis para a implementação em reator PBR, dado por pH 7,9, temperatura 25 °C, concentração de glutaraldeído 2,1 % v/v, velocidade de agitação 200 rpm e tempo de reticulação 45 minutos.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do biocatalisador ocorreu com a aplicação dos planejamentos experimentais e a avaliação da influência da velocidade de agitação e tempo, apontando os parâmetros que afetam a reação durante o processo, ao obter maior estabilidade do meio.

Com base nestes resultados obtidos, que permitem desenvolver as melhores condições do biocatalisador, foram realizados os experimentos para a avaliação dos efeitos biocatalíticos das células íntegras imobilizada, o qual possibilita que as células atuem em sua melhor estabilidade operacional, promovendo o máximo de constância durante o procedimento.

Já, ao avaliar os perfis de atividade enzimática no reator PBR, avaliou-se a influência na atividade de transfrutossilção das variáveis altura do leito catalítico, temperatura, concentração de substrato e vazão volumétrica da solução reagente (substrato). Apresentando resultados satisfatórios, este estudo apresenta que o leito deve estar 100 % recheado durante a reação, a uma temperatura de 50 °C, concentração de 473 g.L⁻¹ de substrato e vazão de substrato de 1 mL min⁻¹.

O modelo de Michaelis-Menten, apresentou a melhor cinética enzimática de reação, com $V_{m\acute{a}x}$ igual a 101,91 U.g⁻¹ e K_m igual a 61,35 g.L⁻¹, limitada pela TME até 4 ml.min⁻¹.

Por fim, ao utilizar uma reação contínua é possível obter um aproveitamento maior que 40%, e quando em conjunto as células íntegras imobilizadas encontra-se maior estabilidade operacional do meio. Este estudo reproduziu seu ponto ótimo nas mesmas condições que o grupo de pesquisa vem encontrando sua faixa ótima, mantendo uma melhor comparação ao discutir os resultados encontrados. Pode-se afirmar que ao se utilizar um reator PBR, nas mesmas proporções dos estudos com a célula livre observa-se resultados significativos para a atividade de transfrutossilção da enzima obtendo uma constante estabilidade operacional, possibilitando a produção contínua de frutooligossacarídeos (FOS).

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante das conclusões e continuação da temática abordada neste trabalho, propõe-se as seguintes sugestões:

- a-)** avaliar os parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividade) e o efeitos da inibição enzimática em processos contínuos durante a produção de FOS utilizando reatores de leito fixo recheados com células íntegras *in natura* e reticuladas;
- b-)** implementar sistema reacional contínuo em reator de leito fluidizado, constituído por células íntegras *in natura* e reticuladas, para a produção de FOS;
- c-)** estudar a modelagem matemática e simulação dos reatores de leito fixo e fluidizado quanto a predição da conversão teórica de substrato (sacarose) e a formação de produto desejado (FOS);
- d-)** implementar sistema reacional em reatores de escoamento contínuo, conectados em série e recheados com células íntegras *in natura* e reticuladas, e avaliar seus parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividade) para a produção de FOS.

REFERÊNCIAS

- ANTOŠOVÁ, M. *et al.* Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, Bratislava, v. 135, p. 58–63. 2008.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferase: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers—Chemicke Zvesti**, Bratislava, v. 55, p. 350–358, 2001.
- BRENA, B.; POMBO, P. G.; VIERA, F. B. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: GUISAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition**. Third ed. [S.I.] Springer Science+Business, 2013. v. 1051p. 1–375.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.
- CABRAL, B. V. **Hidrólise de Sacarose por Invertase Imobilizada em Duolite A-568 por Adsorção e Ligação Cruzada**. 2012. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal De Uberlândia, Uberlândia, 2012.
- CASTRO, C. C.; NOBRE, C.; DUPREZ, M.-E.; DE WEIRELD, G.; HANTSON, A.-L. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, [S.I.], v. 118, p. 82-90, 2017.
- CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, Taiwan, v. 18, p. 153-160, 1996.
- CREMASCO, M. A. **Fundamentos de transferência de massa**. Campinas: Editora da Unicamp, Brasil, 1998.
- COONEY, M. J. Kinetic Measurements for enzyme immobilization. In: MINTEER, S. D. (Ed.). **Enzyme Stabilization and Imobilization**. Humana Pre ed. St. louis, MO, USA: [s.n.]. v. 53p. 1689–1699.
- CUERVO-FERNÁNDEZ, R. *et al.* Screening of β -fructofuranosidase producing microorganisms and effects of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.I.], v.75, p.87-93, 2007.
- CUERVO, R. F *et al.* Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S.I.] v. 79, n. 3, p. 268–272, 2004.

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

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

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

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

FARIA, L. L.; MORALES, S. A. V.; PRADO, J. P. Z *et al.* Caracterização bioquímica da frutosiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizado em sílica gel para a produção de frutooligossacarídeos. **Biotechnol Lett**, v. 43, p. 43–59, 2021.

FURLANI, I.L *et al.* “Imobilização enzimática: Conceito e Efeitos na proteólise”. **Química Nova**, v.43, n.4, p463-473, 2020.

FLORES-MALTOS, D.A.; MUSSATTO, S.I.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C., RODRÍGUEZHERRERA, R., TEIXEIRA, J.A., AGUILAR, C.N. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S.l.], v.36, p.259-267, 2014.

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

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

GANAIE, M. A.; RAWAT, H. K.; WANI, O. A.; GUPTA, U. S. e KANGO, N. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**. Elsevier Ltd, [S.l.], 49(5), p. 840–844, 2014.

GARCIA, R. L. **Imobilização da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, caracterização e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. 2018. 86

f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2018.

GARCIA, R.L. *et al.* Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Braz. J. Chem. Eng.** 38, 273–285, 2021.

GONÇALVES, M. C. P. **Imobilização de Frutossiltransferase microbiana em gel de alginato e sua caracterização para a produção de frutooligosacarídeos.** 2019. 139 f. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal De Alfenas, Poços de Caldas, 2019.

GONÇALVES, M. C. P.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E.S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F.; KIECKBUSCH, T. G. Armadilha de células reticuladas com glutaraldeído de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em alginato de cálcio para alta atividade de transfructosilação. **J Chem Technol Biotechnol**, [S.l.], v.95, p. 2473-2482, 2020.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells.** [s.l: s.n.]. v. 1051, 2013.

HAYASHI, S. *et al.* Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Taiwan, v. 8, n. 2, p. 155–159, 1992.

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

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

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

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

KRASŇAN, V.; STLOUKAL, R.; ROSENBERG, M. e REBROŠ, M. 2016. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, n.6, p. 2535– 2553, 2016.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2011.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; ALONSO, N.; FERNANDEZLORENTE, G.; GUISAN, J. M. e FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on sepabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method. **Enzyme and Microbial Technology**, Madrid, v.37, n.7, p.750–756, 2005.

LORENZONI, A. S. G.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Porto Alegre, Brazil, v. 111, p. 51–55, 2015.

MAIORANO, A. E. *et al.* **Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor**. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 12, p. 2619-2629, 2020. Acesso em: 10 dez. 2021. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/205216>>.

MARQUEZ, L. D. S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas**. 2007. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia 2007.

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

MICHAELIS, L. e MENTEN, M. L. (1913) **Die Kinetik der Invertinwirkung**. *Biochem. Z.* 49, 333-369.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MONTGOMERY, D. C *et al.* **Design and analysis of experiments**. New York: John Wiley & Sons, 3° Ed, p.6, 2013.

MURAMATSU, M. *et al.* **Production method of branched fructooligosaccharides.** US Patent: 5,334,516. 2 aug. 1994

NOBRE, C.; ALVES FILHO, E.G.; FERNANDES, F.A.N. BRITO, E.S.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Production of fructo-oligosaccharides by *Aspergillus ibericus* and their chemical characterization. **Food Science and Technology**, [S.l.], v. 89, p. 58–64, 2018.

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

OTTONI, C. A. *et al.* Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. **AMB Express**, São Vicente, Brazil, v. 7, n. 1, 2017.

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

PERNA, R. F. *et al.* Produção e caracterização bioquímica de frutossiltransferase extracelular microbiana para a síntese de fructooligosacarídeos em escala laboratorial. In: SANTOS, A. S. (Ed.). **Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos**. Ponta Grossa: Atena, 2018. v. 53p. 195.

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 & Science**, [S.l.], v. 4, Issue-3, 2018.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de processos**. Campinas: Ed. Cárita, 3ª. Edição: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, Brasil, 2014.

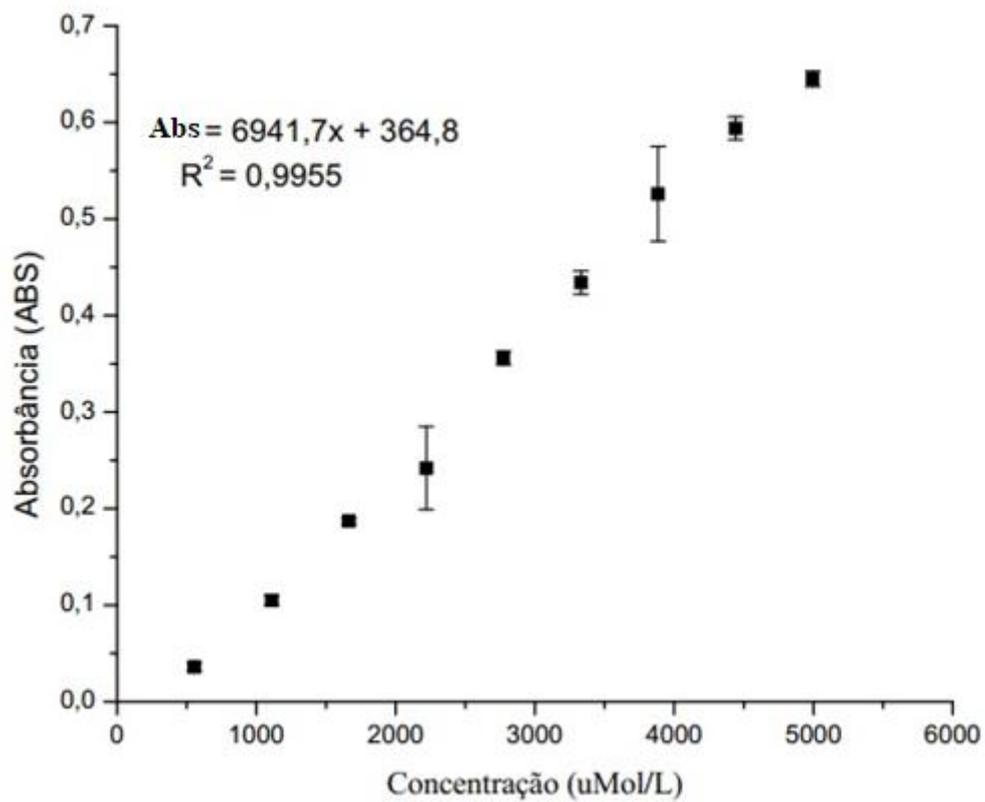
SANTANA, J. L. *et al.* Analysis of the performance of a packed bed reactor to production ethyl esters from crude vegetable oil using lipase immobilized in silica modified with protic ionic liquid. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, n. 8, p. 891-898, 2018.

SOUZA, L.T.A, *et al.* “Imobilização enzimática: princípios fundamentais”. **Biotecnologia Aplicada a Agro&Indústria**, [S.l.], v.4, p529-p569, 2017.

- SHEU, D. CHANG, J.; CHEN, Y.; LEE, C. Production of high-purity neofructooligosaccharides by culture of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 132, p.432–435, 2013.
- SOARES, I. A. *et al.* Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p.700-705, 2010.
- SILVA, M. B. P. O. *et al.* Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, 24, 2021.
- TORRES, A. A.; REGENHARDT, A. S.; MAMMARELA, J. E.; RUBIOLO, C.A. **Estudio del proceso conjunto de recuperación de proteínas e hidrólisis de lactosa presentes em el suero dulce de quesería em uma unidade de ultrafiltração com enzimas immobilizadas**. Universidad Nacional del Litoral – CONICET. IACCHIE – Interamerican Conferederation of Chemical Engineeerinf (CIIQ). 2006.
- 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. **Embrapa**, v. 88, n. ISSN, p. 1679–6543, 2013.
- WANG, T. Synthesis of Neofructooligosaccharides. **Organic Chemistry Insights**, v. 5, p. 1– 6, 2015.
- WONG, C.M.; WONG, K.H.; CHEN, X.D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 78, n. 6, p. 927-938, 2008. doi: 10.1007/s00253-008-1407-4.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 2, p. 107–117, 1996.
- ZAMBELLI, P. TAMBORINI, L. CAZZAMALLI, S.; PINTO, A.; ARIOLI, S.; BALZARETTI, S.; PLOU, F. J.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; MOLINARI, F.; CONTI, P. ROMANO, D. An efficient continuous flow process for the synthesis of a non-conventional mixture of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, p. 607–613, 2016.

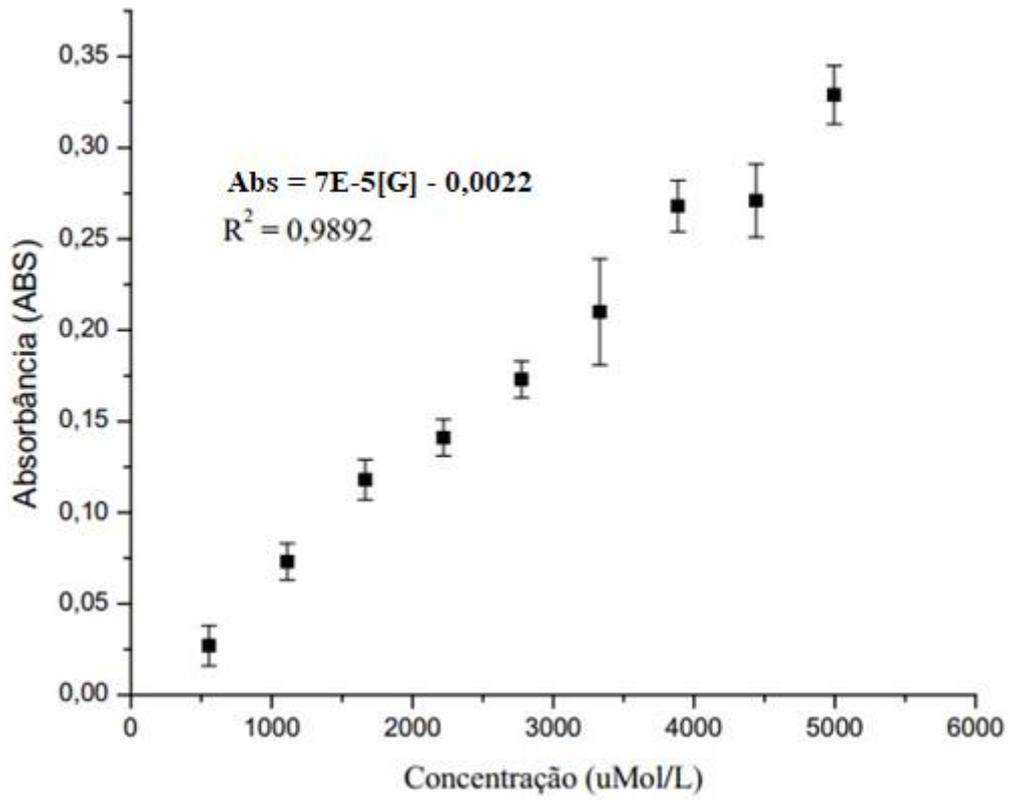
APÊNDICE A – Curva de calibração DNS GOD-PAP

Figura 23 – Curva analítica desenvolvida pelo método DNS para quantificação da concentração de açúcares redutores (AR)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Figura 24 – Curva analítica desenvolvida pelo método GOD-PAP® para a quantificação da concentração de glicose (G)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).