

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RICHARD SILVEIRA PEREIRA

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE
Aspergillus oryzae IPT-301 EM SABUGO DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

Poços de Caldas/MG

2021

RICHARD SILVEIRA PEREIRA

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE
Aspergillus oryzae IPT-301 EM SABUGO DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

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.

Orientadora: Profa. Dra. Melina Savioli Lopes.
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna.

Poços de Caldas/MG

2021

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

Pereira, Richard Silveira.
P436i Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de
Aspergillus oryzae IPT-301 em sabugo de milho para a produção de
fruto-oligossacarídeos / Richard Silveira Pereira. -- Poços de
Caldas/MG, 2021.
71 f. –

Orientador(a): Melina Savioli Lopes.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade
Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2021.
Bibliografia.

1. Sabugos. 2. Milho. 3. *Aspergillus oryzae*. 4. Enzimas imobilizadas.
5. Resíduos agrícolas. I. Lopes, Melina Savioli. II. Título.

CDD – 660.2

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE *ASPERGILLUS ORYZAE* IPT-301 EM SABUGO DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

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

Aprovada em: 16 de dezembro de 2021.

Profa. Dra. Melina Savioli Lopes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

rofa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni
Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Sérgio Andres Villalba Morales
Instituição: Universidade Federal de Tocantins



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Andres Villalba Morales, Usuário Externo**, em 16/12/2021, às 21:02, 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 **Melina Savioli Lopes, Professor do Magistério Superior**, em 17/12/2021, às 08:35, 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 **Cristiane Angélica Ottoni, Usuário Externo**, em 17/12/2021, às 10:50, 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 **0652111** e o código CRC **F3270BD4**.

*Acima de tudo, eu ofereço este trabalho a YHWH.
Dedico a meu pai, Anísio Pereira (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a D'US, por ter nos dado o dom da Ciência.

Aos meus pais, Anísio (*in memoriam*) e Cristiane, às minhas irmãs, Julia e Luísa, e à minha namorada Mariane, por sempre estarem ao meu lado, me dando apoio e suporte, essenciais.

À minha orientadora, Profa. Dra. Melina Savioli Lopes, por toda confiança depositada em mim desde o início, e pelos ensinamentos que me foram passados.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, pela oportunidade de integrar este (incrível) grupo de pesquisa e por toda a ajuda que me foi oferecida.

Aos meus amigos e colegas mestrandos, em especial Beatriz e Isabella, por todo o companheirismo e toda a amizade que há entre nós.

Ao Prof. Dr. Sérgio Andres Villalba Morales, integrante de nosso grupo de pesquisa e colaborador indispensável ao andamento deste trabalho.

À Profa. Dra. Michelle da Cunha Abreu Xavier e ao colega de iniciação científica Leandro, por comprovarem a aplicabilidade da funcionalização para esse tipo de suporte.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química os quais tive o privilégio de conhecer, pelos conhecimentos transmitidos.

À UNIFAL-MG, por me acolher desde a graduação, permitindo o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos alunos de iniciação científica de nosso grupo de pesquisa, funcionários e técnicos desta universidade, pela colaboração com o andamento desta pesquisa.

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

Obrigado a todos!

“Mas agora você sabe muito bem que começar é uma reivindicação demasiado grande para qualquer pessoa, e que só um pequeno papel é desempenhado por qualquer herói nos grandes feitos.”

(TOLKIEN, 2019, p. 385)

RESUMO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são alimentos benéficos ao organismo humano. Comercialmente, são produzidos através de uma reação de transfrutossilacção, a qual uma enzima transferase catalisa sacarose em FOS. Dentre os micro-organismos produtores destas enzimas, o *Aspergillus oryzae* IPT-301 se destaca por produzir frutossiltransferase (FTase) com elevada atividade de transfrutossilacção (A_t). A utilização da enzima livre em escala comercial é um processo difícil e custoso, já que ela se desnatura rapidamente. Assim sendo, observa-se a necessidade de pesquisas para a imobilização destas enzimas com o intuito de se aumentar seu tempo de meia-vida e sua estabilidade. Em vista disso, este trabalho objetivou avaliar o processo de imobilização da FTase extracelular (por adsorção física) em sabugo de milho, um resíduo agroindustrial natural. O suporte *in natura* foi apenas ralado. Funcionalizou-se o sabugo de milho por extração alcalina para maximizar sua capacidade de adsorção. Realizou-se ensaios para avaliar a cinética da FTase imobilizada em sabugo de milho para diferentes temperaturas. Fez-se um planejamento de experimentos com o objetivo de se avaliar as influências de temperatura e pH sobre A_t e se obter as condições ótimas. Avaliou-se as estabilidades térmica, operacional, de concentração de substrato, e frente ao pH. Os perfis cinéticos de imobilização apontaram que a A_t do caldo fermentado (em contato com o suporte) decaiu ao decorrer do ensaio, sendo o maior rendimento de imobilização (RI) obtido a 35 °C (74 % para o suporte *in natura* e 64 % para o funcionalizado). A atividade transfrutossilacção recuperada (A_{tr}) resultou em um valor cerca de quatro vezes superior para o sabugo de milho funcionalizado ($9,05 \pm 0,58$ %), indicando que a funcionalização do suporte aumentou sua capacidade de adsorção. O planejamento de experimentos apontou que as condições ótimas para A_t do biocatalisador heterogêneo foi de 55 °C e pH 5,5. O estudo dos efeitos de concentração mostrou que as maiores atividades foram atingidas para concentrações entre 400 g.L⁻¹ e 600 g.L⁻¹, sendo que a cinética enzimática melhor se ajustou ao modelo de Hill. Os ensaios de estabilidade frente ao pH indicaram que o biocatalisador heterogêneo foi estável frente à faixa de pH entre 5,5 e 6,0. O ensaio conseguinte indicou que não houve um aumento expressivo da estabilidade térmica do biocatalisador heterogêneo frente ao solúvel, com tempo de meia-vida (do biocatalisador heterogêneo) 1,13 vezes superior para 50 °C. O ensaio de estabilidade operacional permitiu constatar que a FTase imobilizada no suporte funcionalizado manteve a A_t relativa em até 13 % ao fim do quarto ciclo batelada, apontando a possibilidade de reuso. Por conseguinte, constatou-se que os ensaios de caracterização e de estabilidade permitiram concluir que a FTase foi imobilizada em sabugo de milho através de adsorção física. Destaca-se que esta pesquisa é inovadora ao imobilizar frutossiltransferase em um resíduo para a produção de fruto-oligossacarídeos.

Palavras-chave: sabugo de milho; frutossiltransferase; imobilização; caracterização enzimática; resíduo agroindustrial.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are beneficial foods to the human organism. Commercially, they are synthesized through a transfructosylation reaction, in which a transferase enzyme catalyses sucrose in FOS. Among the microorganisms that produce these enzymes, the *Aspergillus oryzae* IPT-301 stands out for producing fructosyltransferase (FTase) with high transfructosylation activity (A_t). The use of free enzymes on a commercial scale is a difficult and costly process, as it is easily denatured. Therefore, there is a need to research the immobilization of these enzymes intending to increase their half life time and their stability. Thereby, this work aimed to evaluate the immobilization process of the extracellular FTase (by physical adsorption) in corn cob, a natural agro-industrial waste. The support *in natura* was just grated. The corn cob was functionalized by alkali extraction to maximize its adsorption capacity. It was made assays to evaluate the kinetics of the FTase immobilized in corn cob for several temperatures. It was made a design of experiments intending to study the influences of temperature and pH over the A_t and their optimum conditions. It was evaluated the thermal, operational, substrate concentration, and pH stabilities. The kinetic models of immobilization pointed that the A_t of the fermented broth (in contact with the support) decreased along with the assay, wherein the best immobilization yield (RI) was for 35 °C (74 % for the support *in natura* and 64% for the functionalized one). The recovered transfructosylation activity (A_{tr}) resulted in a value around four times superior for the functionalized corn cob ($9,05 \pm 0,58$ %), indicating the support functionalization increased its adsorption capacity. The design of experiments showed that the optimum conditions for the heterogeneous biocatalyst were 55 °C and pH 5.5. The assays for the concentration effects showed that the highest activities were reached for concentrations between 400 g.L⁻¹ and 600 g.L⁻¹, and the enzymatic kinetic was best adjusted to the Hill model. The assays for the pH stability indicated that the heterogeneous biocatalyst was stable for the pH range between 5.5 and 6.0. The subsequent assay indicated that there was not an expressive increase of the thermal stability of the heterogeneous biocatalyst in face soluble one, with half life time (of the heterogeneous biocatalyst) 1.13 time superior for 50 °C. The operational stability assay allowed to verify that the FTase immobilized in functionalized corn cob kept its relative A_t up to 13 % at the end of the fourth batch cycle, pointing to its reuse possibility. Thus, it was concluded that the characterization and stability assays allowed it to observe that the FTase was immobilized in corn cob by physical adsorption. It is called attention to the fact that this research is innovative in immobilizing fructosyltransferase in waste for the production of fructooligosaccharides.

Keywords: corn cob; fructosyltransferase; immobilization; enzymatic characterization; agro-industrial waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas moleculares do FOS.....	17
Figura 2 - Representação da estrutura do sabugo de milho antes e após a funcionalização	25
Figura 3 - Frasco contendo o micro-organismo após o cultivo submerso.....	32
Figura 4 - Erlenmeyer contendo o suporte com o caldo enzimático	33
Figura 5 - Fluxograma do processo de imobilização enzimática	34
Figura 6 – Suporte com enzima após a secagem em estufa	37
Figura 7 - Amostras com DNS em banho-maria a 100 °C	38
Figura 8 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para o sabugo de milho funcionalizado sem e com a FTase adsorvida.....	40
Figura 9 - Perfis cinéticos de <i>At</i> da enzima FTase extracelular no sobrenadante do caldo enzimático em contato com o suporte in natura	42
Figura 10 - Diagrama de Pareto para as variáveis temperatura (T) e pH sobre a atividade de transfrutossilção do biocatalisador heterogêneo.....	46
Figura 11 - Curva de contorno da atividade de transfrutossilção do biocatalisador heterogêneo em função do pH e da temperatura	49
Figura 12 - Superfície de resposta da atividade de transfrutossilção do biocatalisador heterogêneo em função do pH e da temperatura.....	49
Figura 13 - Efeito da concentração de substrato na atividade relativa da FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado	50
Figura 14 - Modelos de Michalis-Menten e de Hill para o biocatalisador heterogêneo	51
Figura 15 - Estabilidade da FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado frente ao pH	53
Figura 16 - Curvas de desnaturação térmica para atividade de transfrutossilção relativa do biocatalisador solúvel com ajuste do Modelo de Sadana-Henley	54
Figura 17 - Curvas de desnaturação térmica para atividade de transfrutossilção relativa do biocatalisador heterogêneo com ajuste do Modelo de Sadana-Henley	54
Figura 18 - Ajuste linear da Equação de Arrhenius para a obtenção de <i>Ed</i> para o biocatalisador solúvel, com R ² de 92,80 %.....	55
Figura 19 - Ajuste linear da Equação de Arrhenius para a obtenção de <i>Ed</i> para o biocatalisador heterogêneo (sabugo de milho funcionalizado), com R ² de 95,59 %.....	56
Figura 20 - Estabilidade operacional da FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas transferases, de acordo com a ECN	19
Tabela 2 - Subdivisão das glicosiltransferases	19
Tabela 3 - Reagentes e suas devidas proporções para a inoculação dos esporos do fungo	31
Tabela 4 - Reagentes e suas devidas proporções para o preparo do meio de cultura para o cultivo submerso do micro-organismo.....	32
Tabela 5 - Matriz de planejamento para os ensaios do DCCR 2 ²	35
Tabela 6 - Rendimento de imobilização (<i>RI</i>) para cada temperatura (<i>T</i>) para o sabugo de milho in natura	43
Tabela 7 - Atividade recuperada (<i>Atr</i>) para 35 °C	44
Tabela 8 - Matriz do planejamento de experimento com as respostas	45
Tabela 9 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH sobre a atividade de transfrutossilação do biocatalisador heterogêneo	47
Tabela 10 - Análise de variância para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH sobre a atividade de transfrutossilação do biocatalisador heterogêneo	48
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos para o biocatalisador heterogêneo	52
Tabela 12 - Parâmetros termodinâmicos para o biocatalisador solúvel.....	56
Tabela 13 - Parâmetros termodinâmicos para o biocatalisador heterogêneo.....	57
Tabela 14 - Fator de estabilidade (<i>FE</i>) para o biocatalisador heterogêneo em razão do biocatalisador solúvel.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Açúcares redutores
BET	Análise de área pelo método de Brunauer, Emmett e Teller.
BJH	Análise de porosidade pelo método de Barrett, Joyner e Halenda.
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
DNS	Solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico
ECN	<i>Enzyme Commission Nomenclature</i>
FOS	Fruto-oligossacarídeos
FFase	Frutosilfuranosidase
FTase	Frutosiltransferase
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GF	Molécula de sacarose
GF _n	Molécula de fruto-oligossacarídeo com n frutoses ($1 < n \leq 4$)
GOD-PAP	Solução de glicose-oxidase-peroxidase
IPT-SP	Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
PPGEQ	Pesquisa e Pós-Graduação em Engenharia Química
SmC	Cultivo celular submerso
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	16
3.2	ENZIMAS.....	18
3.2.1	Frutosiltransferase.....	20
3.2.2	Atividade de transfrutossilação.....	20
3.3	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	21
3.3.1	Adsorção física.....	22
3.3.2	Outras técnicas de imobilização.....	22
3.3.3	Suportes para imobilização de enzimas.....	23
3.3.4	Sabugo de milho.....	24
3.3.5	Extração alcalina.....	24
3.3.6	Parâmetros de imobilização.....	25
3.4	CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	26
3.5	ESTABILIDADE ENZIMÁTICA.....	27
3.5.1	Efeitos da temperatura e estabilidade térmica.....	27
3.5.2	Efeitos do pH.....	29
3.5.3	Efeitos da concentração.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	PREPARO DO SUPORTE.....	30
4.2	PRODUÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE.....	30
4.2.1	Preparo do inóculo do micro-organismo.....	30
4.2.2	Cultivo celular submerso.....	31
4.3	IMOBILIZAÇÃO DA FTASE EM SABUGO DE MILHO.....	33
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA FTASE IMOBILIZADA EM SABUGO DE MILHO FUNCIONALIZADO.....	34
4.4.1	Planejamento de experimentos: efeitos de pH e temperatura na reação enzimática.....	34
4.4.2	Efeito da concentração de substrato.....	35

4.4.3	Estabilidade enzimática frente ao pH.....	36
4.4.4	Estabilidade térmica.....	36
4.4.5	Estabilidade operacional.....	36
4.5	ENSAIOS ANALÍTICOS.....	36
4.5.1	Atividade enzimática.....	36
4.5.2	Tratamento do biocatalisador heterogêneo após atividade enzimática	37
4.5.3	Quantificação da concentração dos açúcares.....	38
4.5.3.1	Açúcares redutores.....	38
4.5.3.2	Glicose.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO SUPORTE ENZIMÁTICO.....	40
5.2	PERFIS CINÉTICOS DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FTASE EM SABUGO DE MILHO.....	41
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	45
5.3.1	Planejamento de experimentos: efeitos de pH e temperatura na atividade de transfrutoseilação da FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado.....	45
5.3.2	Efeito da concentração de substrato e parâmetros cinéticos.....	50
5.3.3	Efeito do pH.....	52
5.3.4	Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos.....	53
5.3.5	Estabilidade operacional.....	59
6	CONCLUSÃO.....	61
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos os quais vem ganhando espaço nas indústrias farmacêutica e alimentícia, por se tratar de açúcares prebióticos que proporcionam inúmeros benefícios ao corpo humano, tais como aumento da flora bacteriana intestinal, redução do nível de colesterol e triglicérides, fortalecimento do sistema imunológico, redução de micro-organismos patogênicos, auxílio no aumento da absorção de minerais, além de possuírem baixo valor calórico e serem não-cariogênicos (BÚRIGO *et al.*, 2007; COSTA; GUIMARÃES; SAMPAIO, 2012; LEE; CHANG; TSAI, 1999; MARTINS *et al.*, 2016; MUSSATO; MANCILHA, 2007).

Os FOS são encontrados em baixas quantidades em alguns legumes e frutas como trigo, banana, tomate, cebola, entre outros. Todavia, para a utilização comercial, sua produção ocorre primordialmente através de reação enzimática, na qual as enzimas, provenientes de micro-organismos, catalisam a reação de transfrutossilacção da sacarose. Transfrutossilacção é a reação em que um grupo frutossil é transferido de uma molécula sacarose para outra sacarose, resultando em FOS e glicose (MAIORANO *et al.*, 2008; PASSOS; PARK, 2003; VAŇKOVÁ *et al.*, 2008).

Uma das enzimas responsáveis pela produção de FOS é a frutossiltransferase (FTase), proveniente de diversos fungos, entre eles, o *Aspergillus oryzae* IPT-301. A FTase rompe a ligação entre os grupos frutossil e glicosil presentes na molécula da sacarose através da posição $\beta(2\rightarrow1)$ do grupo frutossil. Como resultado, este grupo é transferido a uma outra molécula de sacarose ou de FOS, tendo como produtos FOS e glicose. As moléculas de FOS são compostas por um grupo glicosil e n grupos frutossil, com n podendo possuir valores entre 1 e 4 (FARIA, 2019; MAIORANO *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2016).

A produção de FOS através de reação enzimática é vantajosa pela facilidade em se controlar a quantidade de produto e reagente, já que há uma alta especificidade da enzima com o substrato, além de todos os benefícios dos fruto-oligossacarídeos. Contudo, a grande dificuldade em se trabalhar com enzimas é a sua grande instabilidade operacional, principalmente em estado solúvel. Enzimas são proteínas que podem ser facilmente desnaturadas, exigindo um alto controle de pH, temperatura e agitação, somado ao fato de não poderem ser reutilizadas, já que são rapidamente dissolvidas no meio reacional. Esses obstáculos dificultam sua utilização comercial em processos contínuos, resultando em um alto custo de produção (BOLIBOK *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2020; MAIORANO *et al.*, 2008; RISSO *et al.*, 2012).

A solução para a instabilidade operacional da FTase é a imobilização das enzimas em um material que seja insolúvel e permita sua separação do meio reacional e que mantenha as características catalíticas desta, possibilitando maior estabilidade enzimática para o reuso e aplicação em reatores de leito fixo, e conseqüentemente, reduzindo os custos operacionais na produção de FOS (BOLIBOK *et al.*, 2017; FARIA, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2019; LOZADA-RAMÍREZ; SÁNCHEZ-FERRER; GARCÍA-CARMONA, 2012; RISSO *et al.*, 2012).

Um possível material natural e abundante para utilizar como suporte para imobilização enzimática é o sabugo de milho. Por ser resíduo da agricultura, possui baixo (ou nenhum) valor comercial, e por ser facilmente encontradas plantações de milho em todo território brasileiro (e até por todo mundo), é possível encontrar sabugo de milho em grandes quantidades, reduzindo custos de transporte e acesso.

Com isso, a imobilização da enzima frutossiltransferase em sabugo de milho permitiria o aprimoramento da produção dos FOS em reatores de leito fixo, abrindo a possibilidade de produção comercial em grandes escalas com custos operacionais reduzidos, disponibilizando açúcar prebiótico a uma maior rede de indústrias alimentícias e farmacêuticas, com o grande potencial de substituição da sacarose comercial. Para tal, é necessária a avaliação da atividade enzimática e da estabilidade da FTase imobilizada em sabugo de milho, visando maior estabilidade, reuso e aplicação em reatores contínuos heterogêneos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o sabugo de milho como suporte para a imobilização de frutossiltransferase (FTase), gerada por *Aspergillus oryzae* IPT-301, para a produção de fruto-oligosacarídeos (FOS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

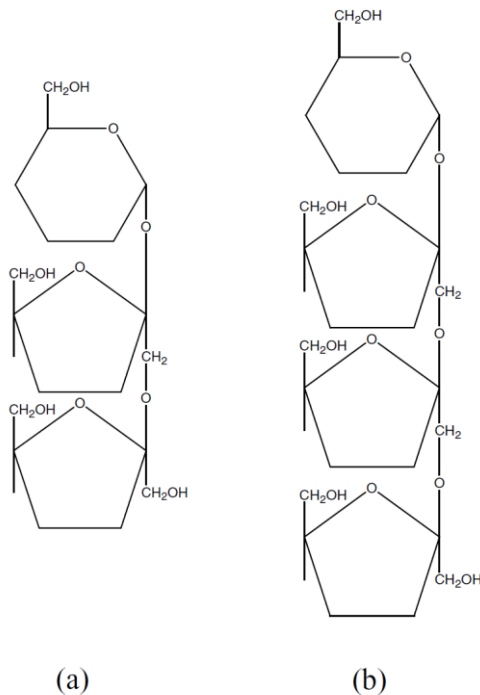
- a) Caracterizar fisicamente o sabugo de milho funcionalizado como suporte para a imobilização da FTase extracelular;
- b) determinar os parâmetros de imobilização da FTase em sabugo de milho *in natura* e funcionalizado;
- c) traçar os perfis cinéticos de imobilização para diferentes temperaturas;
- d) analisar a influência do pH e da temperatura na atividade de transfrutossililação da FTase imobilizada em sabugo de milho por planejamento de experimentos;
- e) avaliar o efeito da concentração de substrato (sacarose) do meio reacional na atividade de transfrutossililação e obter os parâmetros cinéticos;
- f) determinar as estabilidades térmica, operacional e frente ao pH do biocatalisador heterogêneo e obter os parâmetros termodinâmicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Alimentos prebióticos são carboidratos não digeridos pelo organismo humano, os quais apresentam estabilidade química em uma ampla faixa de temperatura e pH. Por não serem metabolizados pelas enzimas presentes na saliva e sistema digestivo superior, os prebióticos proporcionam crescimento da flora bacteriana intestinal, capaz de fermentá-los (BACIUN *et al.*, 2005; HERNALSTEENS; MAUGERI, 2008; PANESAR *et al.*, 2014; VEJA; ZÚÑIGA-HANSEN, 2011; SINGH *et al.*, 2017). Como consequência do aumento da flora intestinal, os benefícios proporcionados ao corpo humano pelos carboidratos prebióticos são: redução de micro-organismos patogênicos, fortalecimento do sistema imunológico, aumento da facilidade de absorção de minerais, redução no nível de colesterol e triglicérides, além de possuírem baixo valor calórico e serem não-cariogênicos. Alguns exemplos de prebióticos são: fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos e lactulose (MAIORANO *et al.*, 2008; MUTANDA *et al.*, 2014; OLARTE-AVALLENADA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016). Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos de cadeia curta, compostos por uma única molécula de glicose conectada a uma cadeia de moléculas de frutose. Genericamente, possuem estrutura molecular GF_n , sendo G referente a glicose e F a frutose (com n moléculas). Para a produção deste oligossacarídeo, a cadeia de frutose é ligada na posição $\beta(2\rightarrow1)$ da sacarose (GF), e tendo como principais classificações: 1-kestose (GF_2), nistose (GF_3) e frutofuranosilnistose (GF_4). A Figura 1 mostra a estrutura molecular dos FOS para GF_2 e GF_3 (ANTOŠOVÁ *et al.*, 2008; FARIA, 2019; FLORES-MALTOS *et al.*, 2019; GUAN *et al.*, 2017; KIM; CHOI; YUN, 1998; LIM *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2007; SÁNCHEZ *et al.*, 2010; TÁMBARA *et al.*, 1999).

Figura 1 - Estruturas moleculares do FOS



Fonte: Lim *et al.* (2007, p.458).

Legenda: (a) GF₂: 1-kestose.

(b) GF₃: nistose.

Naturalmente, pode-se encontrar traços de FOS em algumas plantas, frutas e vegetais, tais como banana, cebola, raízes de aspargo, alcachofra, tomate e trigo. Contudo, para uso comercial, eles são produzidos através de reação enzimática, na qual as enzimas com atividade de transfrutossilacção (proveniente de fungos e bactérias) catalisam a conversão de sacaroses em fruto-oligossacarídeos. As enzimas responsáveis pela produção de FOS são a frutossiltransferase (FTase) e a β -D-frutofuranosidase (FFase) (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014; L'HOCINE *et al.*, 2000; MAIORANO *et al.*, 2008; MUTANDA *et al.*, 2014; PANESAR *et al.*, 2014; VAŇKOVÁ *et al.*, 2008; YUN; SONG, 1996).

Por serem encontrados em pequenas quantidades na natureza, o seu processo de produção faz com que os FOS sejam alimentos prebióticos extremamente caros. Em 2008, o valor de mercado dos FOS foi estimado em cerca de 4 €.kg⁻¹. Já em 2019, este valor saltou para aproximadamente 150 €.kg⁻¹. Em 2019, a produção mundial de FOS foi em torno de 167 mil toneladas, com valor equivalente a 390 milhões de euros. (BEDZO; MANDEGARI; GÖRGENS, 2019). Devido aos seus benefícios ao corpo humano, este açúcar prebiótico é muito

utilizado em produtos farmacêuticos e em alimentos nutricionais (FLORES-MALTOS *et al.*, 2014; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005).

3.2 ENZIMAS

Enzimas são proteínas, de origem animal, vegetal ou microbiana, responsáveis pela catálise das funções metabólicas em todo sistema vivo. As enzimas de origem microbiana são as mais utilizadas comercialmente, devido a sua maior facilidade de manipulação em grande escala (FARIA, 2019; PUNEKAR, 2018; SHULER; KARGI, 2002).

Devido a sua alta especificidade em relação ao substrato e condições controladas de reação, as enzimas estabeleceram um nicho de mercado conhecido como “Indústria Global Enzimática”, com um valor de mercado projetado em US\$ 6,3 bilhões em 2020. Outra vantagem das enzimas é a sua rápida decomposição e não toxicidade, tornando-as ambientalmente limpas e não exigindo que haja um processo de tratamento de resíduos específico para tais. As principais indústrias a utilizarem as enzimas em seus processos são os setores: alimentício, farmacêutico, têxtil, de biocombustíveis, cosmético, de papel e de ração animal (FARIA, 2019; KUDDUS, 2018; MATEO *et al.*, 2007; MENDES; OLIVEIRA; GIORDANO, 2011; MONTERO *et al.*, 1993; PUNEKAR, 2018).

Pela alta diversidade das fontes enzimáticas, suas reações e mecanismos, no século XX uma Comissão de Nomenclatura de Enzimas (ECN, sigla em inglês) foi apontada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, sigla em inglês), a fim de nomear e classificar as enzimas. O primeiro relatório da comissão foi publicado em 1964, e desde então, vem sendo atualizado periodicamente. Sendo assim, as enzimas são classificadas em: oxidorreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (NC-IUBMB, 2020; KUDDUS, 2018; PUNEKAR, 2018).

As oxidorreduções (EC-1) são enzimas responsáveis pelas reações de oxirredução, catalisando a transferência de elétrons no substrato. Oxidases, peroxidases e hidrogenases são exemplos de enzimas dessa classificação. Já o grupo das liases (EC-4) são responsáveis por catalisarem a transferência de grupos funcionais em reações reversíveis e não-hidrolíticas. Como exemplo de liase, pode-se citar as anidrases carbônicas: presentes nos glóbulos vermelhos, são responsáveis por catalisar CO_2 e H_2O em ácido carbônico, e assim, acelerar o transporte do dióxido de carbono no sangue humano (KUDDUS, 2018; OFFERMANN; ROSENTHAL, 2008).

Isomerases são enzimas que catalisam reações de isomerização (cis-trans). Classificadas

como EC-5, possuem como exemplo a glicose-isomerase. Por sua vez, as ligases (EC-6) catalisam a sintetização de novos compostos a partir de duas outras moléculas, como por exemplo a DNA ligase e a RNA ligase (KUDDUS, 2018; FARIA, 2019; NC-IUBMB, 2020).

Transferases (EC-2) são enzimas responsáveis por catalisarem a transferência de grupos químicos, tais como radicais metil e carbonilas. Dentro da categoria 2, temos as subdivisões indicadas na Tabela 1. Dentro da subdivisão 2.4, as glicosiltransferases podem ser subdivididas de acordo com a Tabela 2. Ainda segundo a ECN, as FTases são classificadas como EC-2.4.1.9 (CUNHA *et al.*, 2019; NC-IUBMB, 2020; KUDDUS, 2018).

Tabela 1 - Classificação das enzimas transferases, de acordo com a ECN

Transferases	
2.1	Transferência de grupos de 1 carbono
2.2	Transferência de grupos aldeídos e cetonas
2.3	Aciltransferases
2.4	Glicosiltransferases
2.5	Transferência de grupos alquilas e arilas
2.6	Transferência de grupos nitrogenados
2.7	Transferência de grupos com fósforo
2.8	Transferência de grupos com selênio
2.9	Transferência de grupos com molibdênio ou tungstênio

Fonte: NC-IUBMB (2020).

Tabela 2 - Subdivisão das glicosiltransferases

Glicosiltransferases	
2.4.1	Hexosiltransferases
2.4.2	Pentosiltransferases
2.4.99	Transferência de outros grupos glicosídicos

Fonte: NC-IUBMB (2020).

Na reação de transfrutoseilação da sacarose em FOS, a enzima FTase se liga na posição $\beta(2\rightarrow1)$ da frutose contida na sacarose, rompendo a ligação e liberando a molécula de glicose no meio reacional. Em seguida, a FTase transfere o grupo frutossil a uma outra molécula de sacarose, formando assim FOS. A enzima também pode conectar o grupo frutossil a uma outra

molécula de FOS com cadeia curta, resultando em FOS com cadeias maiores (CUNHA, 2017; GUAN *et al.*, 2017; MAIORANO *et al.*, 2008; SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

Por fim, as enzimas hidrolases são classificadas como EC-3, e possuem a função de catalisar reações hidrolíticas. Como exemplo de enzimas dessa classificação tem-se as lipases e as invertases. No caso da invertase, sua função é a produção de frutose e glicose através da quebra das moléculas de sacarose e FOS. Nesse caso, as invertases são enzimas que prejudicam a atividade de transfrutossilacção, por se tratar de um processo enzimático concorrente (FARIA, 2019; KUDDUS, 2018; PUNEKAR, 2018).

3.2.1 Frutosiltransferase

Os fruto-oligossacarídeos podem ser sintetizados a partir da sacarose, tanto pela enzima frutosiltransferase (FTase) quanto pela β -D-frutofuranosidase (FFase). Contudo, a FTase catalisa apenas a transfrutossilacção, enquanto a FFase, além da transfrutossilacção, também exerce a atividade hidrolítica, no qual é prejudicial ao processo de formação de FOS (GARCIA, 2018; MAIORANO *et al.*, 2008; PANESAR *et al.*, 2014; ŠEDOVIĆ *et al.*, 2014).

A FTase é uma enzima produzida pelos fungos: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aureobasidium sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Sporotrichum thermophile*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhodotorula sp.*, *Kluyveromyces sp.* e *Candida sp.*; e (raramente) por bactérias: *Bacillus macerans*, *Arthrobacter sp.*, *Z. mobilis* e *Lactobacillus reuteri* (AHMAD *et al.*, 2010; LATEEF *et al.*, 2008; MAIORANO *et al.*, 2020; PANESAR *et al.*, 2014).

O método mais utilizado para a produção de FTase é o cultivo celular submerso (SmC), na qual os esporos do micro-organismo (no caso da utilização de fungos) são adicionados a um meio de cultura líquido. Após o tempo de cultivo submerso, a enzima pode ser encontrada livre (extracelular) ou em sua forma micelial (intracelular). Para a produção de FOS, a FTase reage com a sacarose na posição $\beta(2\rightarrow1)$, transferindo a frutose para outra molécula de sacarose (aceptora), resultando em FOS e glicose (AHMAD *et al.*, 2010; PANESAR *et al.*, 2014; RAMESH; PRAPULLA, 2004; SANGEETHA *et al.*, 2014; UHM *et al.*, 1999).

3.2.2 Atividade de transfrutossilacção

De acordo com a literatura especializada, a atividade de transfrutossilacção (A_t) é a

quantidade de enzima (FTase) capaz de produzir 1 μ mol de FOS por minuto (unidade representada por U), sendo FOS composto por 1-kestose, nistose e 1-frutofuranosil nistose (; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; MAIORANO *et al.*, 2008).

Sabendo-se que a produção de FOS se dá pela catalisação de sacarose em glicose + FOS, e que a hidrólise produz frutose e glicose, podemos calcular as concentrações destes açúcares de tal modo que (CUNHA, 2017; MORALES *et al.*, 2020):

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

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

$$[F_T] = [G] - [F] = 2[G] - [AR]. \quad (3)$$

Nas Equações 1, 2 e 3, $[AR]$ representa a concentração dos açúcares redutores, $[F]$ a concentração de frutose, $[G]$ a concentração de glicose e $[F_T]$ a concentração de frutose transfrutosilada.

Com $[F_T]$, pode-se calcular a atividade de transfrutosilação (A_t , dada em $U \cdot mL^{-1}$) (FARIA, 2019; PUNEKAR, 2018):

$$A_t = \frac{[F_T] \cdot V_r}{t_r \cdot V_e}. \quad (4)$$

Na Equação 4, F_t representa a concentração de frutose transfrutosilada ($\mu mol \cdot L^{-1}$), V_r é o volume do meio reacional (L), t_r é o tempo de reação (min) e V_e é o volume de caldo fermentado utilizado na reação enzimática (mL).

Perna *et al.* (2018) afirmam que para a FTase extracelular proveniente de *Aspergillus oryzae* IPT-301, a faixa ótima de temperatura para a atividade de transfrutosilação é de 55 a 65 °C, e a faixa ótima de pH é de 5,0 a 6,0.

3.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Apesar das vantagens na utilização de enzimas em processos industriais (como discorrido anteriormente), o maior obstáculo encontrado é a fácil e rápida desnaturação enzimática, dificultando a produção contínua. Isso dificulta a utilização de enzimas em larga escala, devido ao alto custo operacional causado por esse obstáculo (KRAJEWSKA, 2004; MILETIĆ *et al.*, 2009; MINTEER, 2017; OLIVEIRA, 2007).

Uma técnica muito utilizada para contornar a instabilidade operacional enzimática é a imobilização enzimática, na qual consiste em imobilizar a enzima em um suporte sólido e

insolúvel. A imobilização mantém a função catalítica da enzima, proporciona maior estabilidade operacional e permite que a essa seja reutilizada por um longo período. Isso faz com que seja possível o uso de enzimas (imobilizadas) em reatores contínuos, permitindo a produção industrial em larga escala e reduzindo custos. A imobilização enzimática pode ser realizada através de: adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada, encapsulamento e confinamento em matriz (ARICA; ALTINTAS; BAYRAMOĞLU, 2009; ASGHER *et al.*, 2014; BRADY; JORDAAN, 2009; DATTA *et al.*, 2012; FARIA, 2019; KESSI; ARIAS, 2018; KRAJEWSKA, 2004; MINTEER, 2017; OLIVEIRA, 2007).

3.3.1 Adsorção física

A adsorção física compreende o método mais simples e amplamente utilizado, no qual a enzima é imobilizada em um suporte que seja inerte no meio reacional, através de ligações mais fracas, como ponte de hidrogênio, interações hidrofóbicas e força de Van der Waals. Além de ser um método facilmente aplicável, a adsorção física conserva boa parte da atividade enzimática, já que a enzima se liga ao suporte por ligações fracas, portanto, não sendo capaz de danificar sua conformidade original. Todavia, os parâmetros operacionais do meio reacional, tais como temperatura, pH e agitação, devem ser restritamente controlados para que a imobilização seja mantida. Outro ponto negativo deste método é a possibilidade de o suporte bloquear o sítio ativo da enzima (MENDES; OLIVEIRA; GIORDANO, 2011; KUDDUS, 2018; OLIVEIRA, 2007).

3.3.2 Outras técnicas de imobilização

A imobilização enzimática por ligação covalente é um método muito mais forte e estável que a adsorção física, já que a enzima é ligada ao suporte através de reações químicas nos grupos funcionais presentes na enzima. Esta imobilização pode ser unipontual (na qual a enzima e o suporte são ligados por apenas um ponto) ou multipontual (apresentando vários pontos de ligação) (KUDDUS, 2018; OLIVEIRA, 2007).

No caso da ligação covalente unipontual, a enzima sofre menos alterações conformacionais, mantendo uma maior atividade, porém, podendo ser mais facilmente separada do suporte em relação a multipontual. Já a ligação covalente multipontual possui maior estabilidade, contudo, uma menor atividade, já que a enzima sofre uma maior conformidade estrutural, devido aos vários pontos de ligação com o suporte (KUDDUS, 2018; KUMAR *et*

al., 2013; MINTEER, 2017).

Outra característica da imobilização por ligação covalente é a necessidade de ativação da superfície do suporte através de tratamentos químicos (como tratamento em glutaraldeído, por exemplo), fazendo com que o custo operacional seja consideravelmente mais elevado que a adsorção física (KUDDUS, 2018; MINTEER, 2017).

Também conhecida como copolimerização, a ligação cruzada é uma técnica de imobilização que envolve o agrupamento de várias enzimas em único aglomerado, sem a necessidade de utilização de suporte sólido. O agrupamento das enzimas se dá através de agentes químicos, tal como glutaraldeído. Devido à alta concentração enzimática, o complexo possui alta reatividade, sendo um método com baixo custo operacional. Como pontos negativos, pode-se ressaltar a baixa atividade enzimática, já que estas sofrem grandes alterações de conformidade ao se unirem. Geralmente, este método é utilizado em conjunto com outras técnicas, com a finalidade de reduzir a perda de enzimas (KUDDUS, 2018; MINTEER, 2017; OLIVEIRA, 2007).

Imobilização por aprisionamento ocorre quando a enzima é contida em uma matriz permeável, tal como alginato de cálcio ou ágar. Desse modo, o substrato possui passagem livre, mas, a enzima é impedida de deixar a matriz. Este método é simples e de baixo custo. Porém, pode-se destacar duas desvantagens: a transferência de massa pode limitar significativamente a quantidade de substrato em contato com a enzima, e a enzima pode ser desnaturada durante o processo de aprisionamento (KUDDUS, 2018; MINTEER, 2017; OLIVEIRA, 2007).

Por sua vez, o encapsulamento é uma técnica muito utilizada em indústrias de bebida, na qual a enzima é mantida dentro de uma membrana semipermeável, podendo ser feita de nitrocelulose ou nylon. É uma técnica mais simples que as demais, sendo possível encapsular uma grande quantidade de enzima em um mesmo conjunto. O problema é que a membrana possui poros que podem ser menores que muitos substratos e produtos (KUDDUS, 2018; MINTEER, 2017; OLIVEIRA, 2007).

3.3.3 Suportes para imobilização de enzimas

O desempenho da imobilização enzimática é diretamente correlata às características do suporte utilizado para este processo. Pode-se considerar como propriedades ideais dos suportes a hidrofobicidade, biocompatibilidade, alta porosidade, resistência física à compressão, resistência à ataques microbianos e disponibilidade a baixo custo (BRENA; VIERA, 2006; MATEO *et al.*, 2007).

Em contrapartida, a afinidade entre a enzima e o suporte é fundamental para que a imobilização seja eficiente. Uma baixa afinidade no sistema enzima-suporte permite que a enzima seja dispersa no meio reacional, enquanto uma afinidade muito alta pode dificultar a catálise do substrato (FARIA, 2019).

Como suportes enzimáticos, podem ser utilizados materiais orgânicos ou inorgânicos, sendo estes naturais ou sintéticos. Faria (2019) imobilizou FTase em sílica-gel, um exemplo de suporte inorgânico sintético. Kessi e Arias (2018) imobilizaram a enzima β -Galactosidase em pó de membrana de casa de ovo aviária, um suporte orgânico natural (BRENA; VIERA, 2006).

3.3.4 Sabugo de milho

O sabugo de milho é um material orgânico natural fibroso composto principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. Costa (2015) apresenta a composição do sabugo de milho como sendo: $27,4 \pm 0,8$ % de celulose, $24,3 \pm 1,4$ % de hemicelulose e $35,7 \pm 1,1$ % de lignina.

O sabugo de milho é um resíduo agroindustrial com alta disponibilidade e baixo custo, fatores positivos para um suporte enzimático. A Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) prevê a produção de mais de 102 milhões de toneladas de milho para a safra 2020/21, sendo que aproximadamente 70 % será consumido pela demanda interna do país (CONAB, 2020).

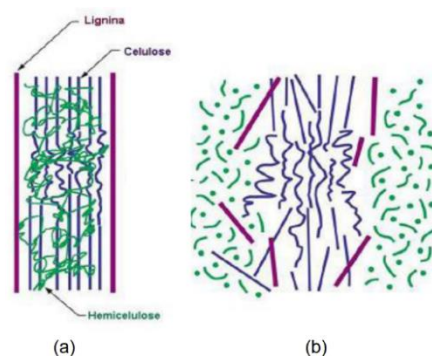
Para cada 100 kg de milho produzido, são gerados em torno de 18kg de sabugo de milho (TSAI *et al.*, 2001). Sendo o terceiro maior produtor de milho do mundo, o Brasil possui grande quantidade de milho, e conseqüentemente, grande disponibilidade de sabugo. Por ser um resíduo agroindustrial, possui baixo custo. Por fim, além da grande quantidade e do baixo custo, o milho é cultivado em todas as regiões brasileiras, sendo, portanto, de fácil acesso por todo país (CONAB, 2020).

3.3.5 Extração alcalina

A funcionalização do suporte possui como objetivo o aumento do desempenho da imobilização enzimática. Um dos métodos de funcionalização química é a extração alcalina, o qual consiste na desorganização estrutural da lignina e de parte da hemicelulose, procedendo no aumento da área interna, diminuição da cristalinidade e separação de enlace estrutural entre a lignina e os hidratos de carbono. Como consequência, a enzima possuirá maior acessibilidade ao suporte, elevando a sua imobilização. A Figura 2 ilustra representações da estrutura fibrosa

do sabugo de milho em seu estado natural e após sua funcionalização, por extração alcalina. (COSTA, 2015).

Figura 2 - Representação da estrutura do sabugo de milho antes e após a funcionalização



Fonte: Costa (2015, p.34).

Legenda: (a) Estado natural.

(b) Após extração alcalina.

3.3.6 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização permitem o estudo do desempenho da imobilização de uma determinada enzima em um determinado suporte. O rendimento de imobilização (RI , em %), pode ser calculado através da atividade de transfrutoseilação inicial (A_{ti} , em $U.mL^{-1}$) e atividade de transfrutoseilação final do sobrenadante (A_{tf} , em $U.mL^{-1}$), de acordo com a Equação 5 (CARDIAS *et al.*, 1999; FARIA, 2019; MIRANDA *et al.*, 2014):

$$RI = \frac{A_{ti} - A_{tf}}{A_{ti}} \cdot 100. \quad (5)$$

Outro parâmetro de imobilização, a atividade recuperada (A_{tr} , em %) é calculada através da atividade do derivado (A_D , em $U.g^{-1}$) em razão da perda de atividade de transfrutoseilação no tempo de ensaio (FARIA, 2019; RAMOS *et al.*, 2015).

$$A_{tr} = \frac{A_D \cdot m_D}{(A_{ti} - A_{tf}) \cdot V_C} \cdot 100. \quad (6)$$

Na Equação 6, m_D é a massa do derivado (suporte com a enzima imobilizada) após seco na estufa (g) e V_C é o volume de caldo utilizado no processo de imobilização (mL).

3.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Todo processo metabólico é essencialmente uma reação química, sendo que em sua maioria, reações são dependentes de catalisadores (entre eles, enzimas). Independentemente de ser catalisada ou não, as reações químicas podem ser melhor compreendidas através dos princípios fundamentais da cinética química (PUNEKAR, 2018).

No caso de uma reação genérica de um derivado gerando um produto, a determinação do ponto no tempo em que esta reação acontece é feita por considerações termodinâmicas e cinéticas. Os conceitos termodinâmicos possibilitam saber o quão longe e o quão rápido uma determinada reação pode ser levada. Por outro lado, os conceitos cinéticos descrevem as taxas das reações químicas e os mecanismos pelos quais ela ocorre (PUNEKAR, 2018).

Para o caso específico de reações enzimáticas, a cinética é descrita pelo modelo matemático de Michaelis-Menten, o qual prediz que a formação do complexo enzima-substrato ([ES]) é de primeira ordem em relação à enzima e em relação ao substrato. Para este modelo, são feitas algumas considerações, entre elas o fato de que a reação enzimática é irreversível e que a formação e dissociação do [ES] é extremamente rápido (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; FERREIRA, 2017; OLIVEIRA, 2007; PUNEKAR, 2018; SHULER; KARGI, 2002).

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

A Equação 7 apresenta o modelo de Michaelis-Menten, sendo que v é a velocidade de reação, $[S]$ é a concentração de substrato, $v_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de reação e K_M é a constante de Michaelis, a qual denota a afinidade entre a enzima e o substrato (representando a concentração de substrato no qual a velocidade de reação é a metade da velocidade máxima). Linearizando esta equação, é possível encontrar os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para a maioria das reações enzimáticas (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; PUNEKAR, 2018; OLIVEIRA, 2007).

O modelo de Michaelis-Menten apresenta as reações enzimáticas através de um ajuste de curva hiperbólica, o que descreve bem a maioria dos casos. Todavia, algumas enzimas apresentam múltiplos sítios ativos ou múltiplas subunidades (enzimas alostéricas), resultando em reações enzimáticas com a presença de ligações cooperativas entre o substrato e o sítio ativo da enzima. Para estes casos, a equação de Michaelis-Menten necessita ser adaptada (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; PUNEKAR, 2018; WEISS, 1997).

As ligações cooperativas das enzimas alostéricas podem ser positivas ou negativas. As ligações cooperativas positivas sucedem quando a primeira ligação enzima-substrato aumenta

a afinidade da enzima com relação à concentração de substratos presente no meio reacional. Em contrapartida, ligações cooperativas negativas atenuam essa mesma afinidade (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; PUNEKAR, 2018; WEISS, 1997).

Portanto, para estes casos, a reação enzimática pode ser melhor descrita por um ajuste de curva sigmoide, o qual é adaptado pelo Modelo de Hill (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; PUNEKAR, 2018; SHULER; KARGI, 2002; WEISS, 1997):

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [S]^n}{K_{0,5}^n + [S]^n} \quad (8)$$

Na Equação 8, $K_{0,5}$ é a constante de Hill (análoga à K_M) e n é o coeficiente de Hill. Quando $n = 1$, o modelo cinético de Michaelis-Menten é representado. Se $n \neq 1$, há ligações cooperativas na reação enzimática, podendo estas cooperatividades serem positivas ($n > 1$) ou negativas ($n < 1$) (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; PUNEKAR, 2018; WEISS, 1997).

3.5 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

3.5.1 Efeitos da temperatura e estabilidade térmica

A energia cinética é diretamente influenciada pela temperatura do meio reacional. Com o acréscimo da temperatura, ocorre o aumento da movimentação das enzimas e dos substratos no meio, aumentando assim, conseqüentemente, a probabilidade de contato entre os substratos e os sítios ativos das enzimas, decorrendo em uma maior taxa reacional. Conjuntamente, a enzima pode ser desnaturada em temperaturas muito altas. Desse modo, há uma temperatura ótima (para cada enzima, seja ela livre ou imobilizada) na qual se desenrola a máxima taxa reacional (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; FIELDS, 2001; PUNEKAR, 2018).

A temperatura ótima de uma reação é descrita pela Equação de Arrhenius (CATANA *et al.*, 2007; FARIA, 2019):

$$k_d = A \cdot e^{-E_d/RT}, \quad (9)$$

em que k_d é a constante de desnaturação térmica, A é a constante de Arrhenius, E_d é a energia de desnaturação térmica, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta. Para uma maior taxa de reação possível, é desejável que a energia de desnaturação térmica seja a maior possível (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; OLIVEIRA, 2007).

Para o estudo dos parâmetros de desnaturação térmica, tem-se o Modelo de Sadana-

Henley, o qual é expresso pela Equação 10, onde α é a relação entre a atividade no estado final e estado inicial e t é o tempo (PERNA *et al.*, 2017).

$$A_t = (1 - \alpha) \cdot e^{(-k_d \cdot t)} + \alpha. \quad (10)$$

Outros fatores para se estudar a estabilidade térmica enzimática é o tempo de meia-vida enzimático $t_{1/2}$ e do fator de estabilidade (FE), descritos nas Equações 11 e 12, respectivamente. O tempo de meia-vida enzimático é o tempo necessário para reduzir a atividade enzimática à metade do seu valor inicial, sendo inversamente proporcional à constante de desnaturação térmica (FARIA *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2014; PERNA *et al.*, 2017; SAQID *et al.*, 2010).

$$t_{1/2} = \frac{1}{-k_d} \ln \left[\frac{(0,5 - \alpha t)}{(1 - \alpha t)} \right], \quad (11)$$

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ imobilizada}}{t_{1/2} \text{ livre}}. \quad (12)$$

Na Equação 12, FE é calculado através da razão do tempo de meia-vida da enzima imobilizada pelo tempo de meia-vida da enzima livre (FARIA, 2019; MIRANDA *et al.*, 2014; SAQID *et al.*, 2010).

A desnaturação térmica enzimática se sucede quando há a transição de um estado de menor energia para outro estado de maior energia. Para que esta transição transcorra irreversivelmente é necessário que seja fornecida uma quantidade mínima de energia, em forma de calor, denominada energia de desnaturação térmica (E_d). A Equação 13 fornece o modelo matemático para o cálculo da entalpia de ativação da desnaturação térmica (ΔH_d). Destarte, altos valores de entalpia apontam para uma maior estabilidade térmica enzimática (FARIA, 2019; KUMAR *et al.*, 2013; SAQID *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015).

$$\Delta H_d = E_d - RT. \quad (13)$$

Por dar importância a ambas entalpia e entropia, a energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação (ΔG_d) é considerada a forma mais adequada e confiável de se estudar a estabilidade térmica enzimática. Valores elevados de ΔG_d acusam maior estabilidade térmica da enzima. A Equação 14 apresenta o cálculo da energia livre de Gibbs para a ativação da desnaturação enzimática, de tal modo que h é a constante de Planck ($11,04 \cdot 10^{-36} \text{ J} \cdot \text{min}^{-1}$) e k_B é a constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) (FARIA, 2019; KUMAR *et al.*, 2013; SAQID *et al.*, 2010).

$$\Delta G_d = -RT \cdot \ln \left(\frac{k_d h}{k_B T} \right). \quad (14)$$

A entropia de desnaturação térmica (ΔS_d) é calculada através da Equação 15. Esta representa a aleatoriedade do processo de desnaturação enzimática (FARIA, 2019; KUMAR *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2015).

$$\Delta S_d = \frac{\Delta H_d - \Delta G_d}{T}. \quad (15)$$

3.5.2 Efeitos do pH

As enzimas apresentam grupos iônicos em seus sítios ativos, podem estes serem básicos ou ácidos. Por esse fator, o meio reacional necessita possuir um pH adequado às características de cada enzima, afim de que elas possam atuar como catalisadoras de modo satisfatório. Além do mais, uma faixa inadequada de pH é capaz de alterar inclusive o formato tridimensional da enzima. Por conseguinte, há uma faixa ótima de pH na qual a taxa reacional enzimática seja a máxima possível. Para a definição desta faixa de pH, deve-se levar em consideração as características da enzima e do substrato (geralmente, de forma empírica) (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; SHULER; KARGI, 2002;).

3.5.3 Efeitos da concentração

O aumento da concentração de substrato no meio reacional enzimático é capaz de alavancar a taxa de reação enzimática até o ponto em que há a saturação dos sítios ativos das enzimas. Com isso, após alcançar a saturação, o aumento de concentração de substrato passa a não interferir na taxa reacional (FARIA, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARO DO SUPORTE

O sabugo de milho doado foi coletado em campo de plantação após ter sido feita a colheita do milho. Utilizando um ralador caseiro, ralou-se o sabugo seco, em seguida, foi peneirado (1,70 a 0,300 mm) e o armazenado protegido contra umidade.

Com a finalidade de se elevar o desempenho da imobilização enzimática, funcionalizou-se quimicamente o suporte ralado através do processo de extração alcalina. Para isto, adaptou-se o processo descrito por Paul *et al.* (2010), onde o suporte foi mergulhado em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10 % (m.v⁻¹) por uma 1 h, sob agitação constante. Em seguida, o suporte foi lavado rigorosamente com água destilada, para a remoção do excesso de NaOH do material. Por fim, o suporte foi filtrado e levado à estufa a 60 °C por 24 h, e por fim, armazenado protegido contra umidade (PAUL *et al.*, 2010).

4.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE

4.2.1 Preparo do inóculo do micro-organismo

O micro-organismo utilizado para a produção da FTase é o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, o qual é fornecido, através de cepas, pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP).

As cepas são enviadas pelo IPT-SP em um *pellet* contendo 5 g de esporos liofilizados do fungo, sendo necessário a repicagem. Com isso, inicialmente, o *pellet* é ressuspenso em 10mL de água destilada estéril. Feito isso, alíquotas de 70 µL (da água contendo os esporos) são inoculadas em meio sólido contendo os reagentes descritos na Tabela 3, utilizando-se placas de Petri. Por fim, as placas de Petri (contendo os esporos inoculados) são levadas para a incubadora BOD, onde permanecem por 7 dias a 30 °C (CUNHA, 2017; FARIA, 2019).

Tabela 3 - Reagentes e suas devidas proporções para a inoculação dos esporos do fungo

Reagentes	% (massa.volume ⁻¹)
Ágar batata dextrose	2,0
Glicerina	2,5
Extrato de levedura	0,5
Glicose	2,5

Fonte: Faria (2019).

Após o período de incubação, os esporos produzidos são coletados, através de raspagem, com o auxílio de uma alça de vidro de Drigalski, e inseridos em 10 mL de solução constituída por 0,95 % (m.v⁻¹) de NaCl e 0,1 % (v.v⁻¹) de Tween-80. A suspensão é então homogeneizada com solução de glicerina 20 % (m.v⁻¹), variando o volume de tal modo que a concentração final de esporos seja de 1×10^7 esporos.mL⁻¹ (quantificação feita com câmara de Neubauer). Por fim, é feito o armazenamento sob refrigeração a -12 °C (CUNHA, 2017; FARIA, 2019).

4.2.2 Cultivo celular submerso

Para a produção da FTase, foi necessário o cultivo do *Aspergillus oryzae* IPT-301 através de cultivo celular submerso (SmC), de acordo com o protocolo experimental proposto por Fernandez *et al.* (2007). Primeiramente, foi preparado um meio de cultura com os reagentes descritos na Tabela 4.

Após a mistura dos reagentes (utilizando água destilada como solvente), o pH foi ajustado para 5,5 (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; FARIA, 2019).

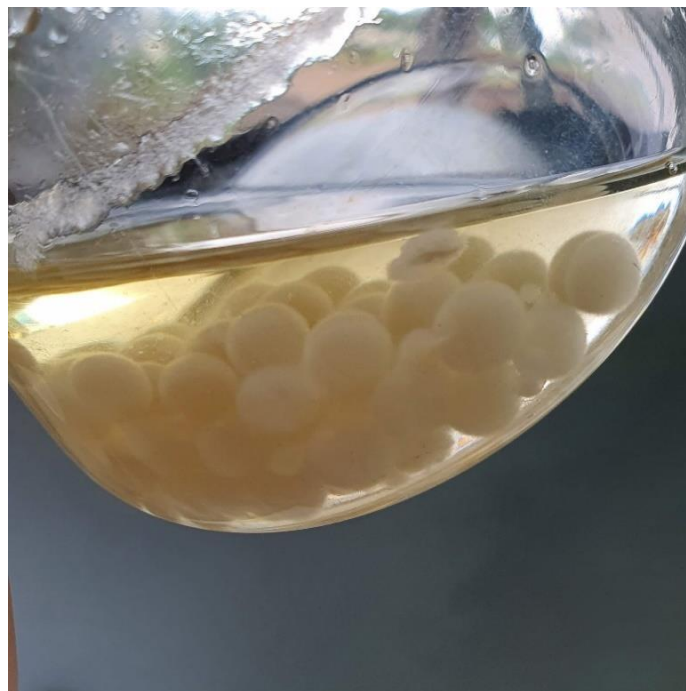
Em seguida, foram distribuídos 50mL do meio de cultura em cada frasco de Erlenmeyer, e cada frasco foi tapado com algodão e papel pardo (para o processo de esterilização). Os recipientes foram então levados à autoclave por 20 min, com temperatura de 120 °C e pressão de 1,1 bar. Concluído os 20 min, em uma capela esterilizada, foi inoculado 0,5mL de esporos em cada frasco (utilizando micropipeta e ponteiras igualmente autoclavadas). Com isso, o cultivo submerso foi conduzido em um agitador orbital a 30 °C e 200 rpm, durante 64 h ininterruptas (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; FARIA, 2019). A Figura 3 mostra o frasco contendo o micro-organismo após 64 h de SmC, sendo que: a enzima extracelular encontra-se dispersa no caldo; a enzima intracelular (ou micelial) encontra-se na biomassa (fase sólida).

Tabela 4 - Reagentes e suas devidas proporções para o preparo do meio de cultura para o cultivo submerso do micro-organismo

Reagentes	% (massa.volume ⁻¹)
Sacarose comercial	15
Extrato de levedura	0,5
NaNO ₃	0,5
KH ₂ PO ₄	0,2
Mg ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0,05
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001

Fonte: Fernandez *et al.* (2007).

Figura 3 - Frasco contendo o micro-organismo após o cultivo submerso



Fonte: Autor (2020).

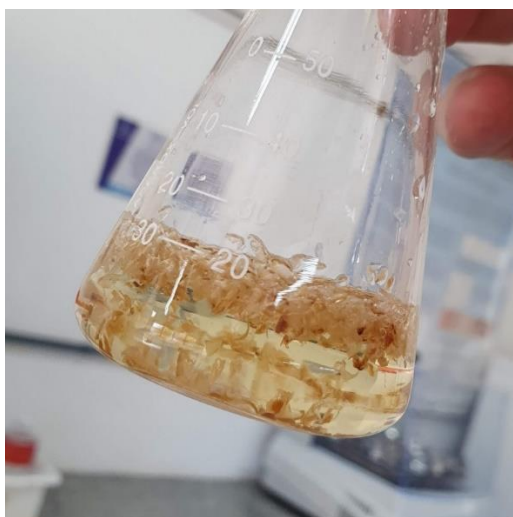
Concluído o tempo de cultivo, o conteúdo dos frascos foi filtrado à vácuo com papel filtro qualitativo número 1. A torta (contendo a enzima micelial) foi armazenada sob refrigeração (para a utilização em outros trabalhos); o permeado, contendo o caldo com a enzima extracelular, foi utilizado para a atividade enzimática e imobilização. Com o intuito de diminuir a perda da atividade enzimática, os processos de imobilização e de medição de

atividade inicial foram iniciados logo em seguida à coleta do caldo (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; FARIA, 2019).

4.3 IMOBILIZAÇÃO DA FTASE EM SABUGO DE MILHO

Para a imobilização, primeiramente, foi medido 0,25 g de suporte ralado e colocado em um Erlenmeyer de 25 mL. Junto ao suporte, foram adicionados 10 mL de caldo enzimático (permeado do processo de cultivo). A Figura 4 mostra os recipientes contendo o suporte com o caldo enzimático.

Figura 4 - Erlenmeyer contendo o suporte com o caldo enzimático

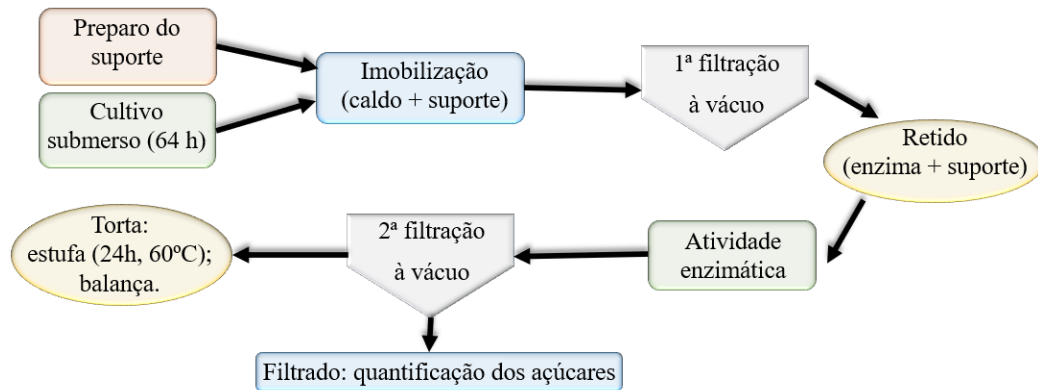


Fonte: Autor (2020).

O frasco foi então levado ao agitador (com rotação e temperatura controladas) durante 8h utilizando as seguintes configurações: 175 rpm e 20, 25, 30 e 35 °C. As amostras foram preparadas em triplicata. Para o controle, também foi colocado no agitador um Erlenmeyer contendo apenas o caldo com a enzima (sem adição de suporte). Além da atividade inicial (0 h) foram retiradas alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante de cada frasco em 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8 h, para a realização da atividade enzimática.

Encerrado o processo de imobilização enzimática, o conteúdo de cada recipiente foi filtrado à vácuo (utilizando papel de filtro qualitativo número 1) separadamente. Após a filtração, foi realizada a atividade enzimática com biocatalisador heterogêneo (torta retida no filtro). A Figura 5 mostra um fluxograma de todo o processo de imobilização enzimática.

Figura 5 - Fluxograma do processo de imobilização enzimática



Fonte: Autor (2021).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA FTASE IMOBILIZADA EM SABUGO DE MILHO FUNCIONALIZADO

4.4.1 Planejamento de experimentos: efeitos de pH e temperatura na reação enzimática

Com a finalidade de se estudar os efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade biocatalisador heterogêneo, utilizou-se um planejamento experimental fatorial padrão Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR, 2²) com três pontos centrais e quatro pontos fatoriais extras. Os intervalos mínimos e máximos de temperatura e pH foram, respectivamente: 43 – 57 °C e 4,8 – 6,2. Adotou-se tais valores se baseando nas condições ótimas de temperatura e pH do biocatalisador solúvel obtidas por Cunha (2017) e Faria, Morales, *et al.* (2021). A matriz de experimentos está representada pela Tabela 5 (CUNHA, 2017; FARIA *et al.*, 2021).

Realizou-se os experimentos de atividade enzimática seguindo o descrito no Tópico 4.5.1, variando a temperatura ambiente e o pH do tampão, conforme o planejamento experimental. Os resultados foram analisados com o auxílio de ferramenta computacional.

Tabela 5 - Matriz de planejamento para os ensaios do DCCR 2²

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

Fonte: Autor (2021).

A superfície de resposta foi ajustada para uma variável resposta: atividade do biocatalisador heterogêneo (Y , em %). O modelo de segunda ordem para os fatores estudados está expresso pela Equação 16, em que x_1 e x_2 representam os fatores temperatura (°C) e pH, respectivamente, e β representa os coeficientes estimados pelo modelo estatístico em questão.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_{11} \cdot x_1^2 + \beta_{22} \cdot x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2. \quad (16)$$

Devido à grande inconstância intrínseca aos micro-organismos e bioprocessos enzimáticos, os parâmetros foram considerados significativos tendo p-valores inferiores a 10 % ($p \leq 0,10$) (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

4.4.2 Efeito da concentração de substrato

Para avaliar os efeitos da concentração de substrato na reação enzimática, realizou-se a atividade enzimática do complexo (suporte funcionalizado contendo as enzimas imobilizadas) conforme descrito no Tópico 4.5.1, contudo, utilizando diferentes concentrações de sacarose, sendo: 200 g.L⁻¹, 300 g.L⁻¹, 400 g.L⁻¹, 470 g.L⁻¹, 500 g.L⁻¹ e 600 g.L⁻¹. Por fim, quantificou-se as concentrações de açúcares para a análise dos resultados. Para a análise dos dados, aplicou-se os modelos de Michaelis-Menten e o de Hill utilizando ferramenta computacional.

4.4.3 Estabilidade enzimática frente ao pH

Para a avaliação dos efeitos de pH na estabilidade enzimática, após o processo de imobilização em sabugo de milho funcionalizado, as amostras foram incubadas em solução tampão tris-acetato (0,2 M) com diferentes valores de pH (4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5) por 24 h sob refrigeração de 4 °C. Após o período de incubação, realizou-se a atividade enzimática conforme Tópico 4.5.1 (porém, utilizando tris-acetato com os valores de pH especificados).

4.4.4 Estabilidade térmica

A avaliação da estabilidade térmica foi feita para as temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. Para tal, após a imobilização enzimática em sabugo de milho funcionalizado, o biocatalisador heterogêneo foi incubado em solução tampão tris-acetato (0,2 M e pH 5,5) em banho termostaticado (nas temperaturas especificadas) pelo período de 1, 2, 4, 6 e 24 h. Ao término da incubação, realizou-se a atividade enzimática conforme o Tópico 4.5.1. Por fim, quantificou-se os açúcares e calculou-se os parâmetros termodinâmicos utilizando ferramenta computacional.

4.4.5 Estabilidade operacional

Para estudar a estabilidade operacional, após o processo de imobilização enzimática, foi feita a atividade enzimática do biocatalisador heterogêneo conforme o Tópico 4.5.1. Todavia, a enzima não foi denaturada ao fim dos 60 min: a amostra foi levada para a filtração à vácuo, sendo que o permeado foi separado e quantificado, já o retido (contendo o biocatalisador heterogêneo) foi colocado em um novo meio reacional para a realização de uma nova atividade enzimática (reciclo). Repetiu-se o processo de reciclo até que a atividade de transfrutoseilação (A_t) do complexo fosse significativamente baixa.

4.5 ENSAIOS ANALÍTICOS

4.5.1 Atividade enzimática

O método para a realização da atividade enzimática foi seguido conforme o proposto por Faria (2019): foi preparada uma solução contendo: 3,7 mL de solução de sacarose comercial

(63,6 % m.v⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato (0,2 M e pH 5,5). A solução, primeiramente, foi ambientada a 50 °C (aproximadamente 10 min). Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de biocatalisador solúvel: no caso da atividade inicial, foi utilizado o caldo enzimático (permeado), já para as demais atividades, foi utilizado o sobrenadante do processo de imobilização.

Para a realização de atividade do biocatalisador heterogêneo manteve-se o mesmo processo, alterando-se apenas o volume da solução de sacarose (para 3,8 mL) e acrescentando o complexo (suporte + enzima) filtrado.

A solução contendo o biocatalisador foi mantida em agitação constante de 190 rpm com temperatura controlada de 50 °C por exatamente 60 min. Ao fim desse período, a fim de se interromper a atividade (desnaturando a enzima), a amostra foi levada ao banho-maria (água a 100 °C) por 10 min, seguido por resfriamento em banho contendo gelo por, ao menos, 5 min. Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

4.5.2 Tratamento do biocatalisador heterogêneo após atividade enzimática

Após a realização da atividade enzimática com o complexo (suporte + enzima), esse foi novamente filtrado à vácuo. O permeado foi separado para a quantificação da concentração dos açúcares. A torta foi levemente lavada com água destilada, a fim de retirar os açúcares restantes que poderiam estar retido entre o suporte.

Após a filtração à vácuo, o retido (complexo) foi então colocado em placa de Petri e levado à estufa a 60 °C por 24 h. Após esse período, foi medida a massa do complexo seco. A Figura 6 mostra o complexo suporte + enzima após a secagem na estufa.

Figura 6 – Suporte com enzima após a secagem em estufa



Fonte: Autor (2020).

4.5.3 Quantificação da concentração dos açúcares

Conforme explicado no Tópico 3.2.2, a concentração de açúcar transfrutossilado pode ser calculada através das concentrações de AR e G. Para tal, primeiramente, as amostras oriundas da atividade enzimática foram diluídas conforme a necessidade em cada situação.

4.5.3.1 Açúcares redutores

Para a determinação da concentração dos açúcares redutores (AR), foi utilizado o método DNS, conforme descrito no protocolo da Embrapa. Para isso, foi preparada uma solução de DNS e feito uma curva de calibração, conforme descrito no protocolo (FARIA, 2019; VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Para a quantificação, foi acrescentado 0,5 mL de DNS juntamente com 0,5 mL de amostra proveniente da atividade enzimática. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e levadas ao banho-maria (100 °C) por 15 min. Ao fim desse tempo, as amostras foram resfriadas em banho contendo gelo por 5 min. A Figura 7 mostra as amostras com DNS, possuindo forte coloração alaranjada.

Figura 7 - Amostras com DNS em banho-maria a 100 °C



Fonte: Autor (2020).

Após o resfriamento, acrescentou-se 4 mL de água destilada em cada amostra e homogeneizou-as. Por fim, as amostras foram analisadas pelo espectrofotômetro a 540 nm. O equipamento quantifica a absorbância da amostra. Com esse valor, utilizando a curva de calibração, é possível calcular a concentração de AR através da equação da reta. O branco foi

realizado utilizando o mesmo procedimento, contudo, a amostra foi substituída por água destilada.

4.5.3.2 Glicose

Com a finalidade de se quantificar a concentração de glicose (G), foi utilizado o método GOD-PAP®. Para tal, foi adicionado 1 µL de amostra em 1 mL da solução GOD-PAP®. Em seguida, as amostras contendo a solução quantificadora foram mantidas em banho a 37 °C com baixa agitação por 5 min. Por fim, as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm. O branco foi realizado seguindo o mesmo procedimento, porém, contendo apenas GOD-PAP® (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; OLIVEIRA, 2007; VEJA; ZÚÑIGA-HANSEN, 2011).

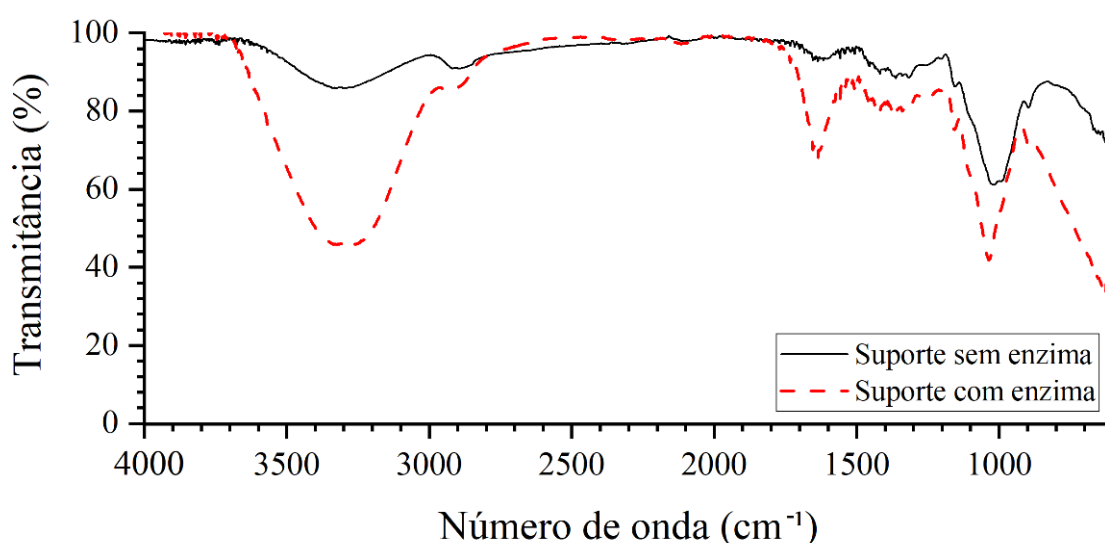
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO SUPORTE ENZIMÁTICO

Para a análise da área, utilizou-se o método de Brunauer, Emmett e Teller (BET), o qual resultou em um valor de $0,3410 \pm 0,0251 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ para o sabugo de milho funcionalizado por extração alcalina. Para o estudo dos poros, utilizou-se o método de Barrett, Joyner e Halenda (BJH), chegando a uma porosidade com volume de $0,2077 \pm 0,1471 \text{ mm}^3.\text{g}^{-1}$ e diâmetro médio de $37,74 \pm 5,89 \text{ \AA}$.

Realizou-se a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do sabugo de milho funcionalizado e do sabugo de milho funcionalizado com a FTase adsorvida. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para o sabugo de milho funcionalizado sem e com a FTase adsorvida



Fonte: Autor (2021).

Ambas as amostras apresentaram bandas significativas nas regiões 3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} . Neste caso, a banda na região de 3300 cm^{-1} refere-se a vibrações de estiramentos O-H pertencentes aos grupos hidroxilas. Já as bandas na região de 1650 cm^{-1} estão associadas com estiramentos C=C de grupos aromáticos. Por sua vez, as bandas na região de 1000 cm^{-1} podem ser atribuídas aos grupos éteres e ésteres (estiramento C-O) (OJEDOKUN; BELLO, 2016; PADILLA *et al.*, 2019; PIÑA-BARRERA *et al.*, 2014).

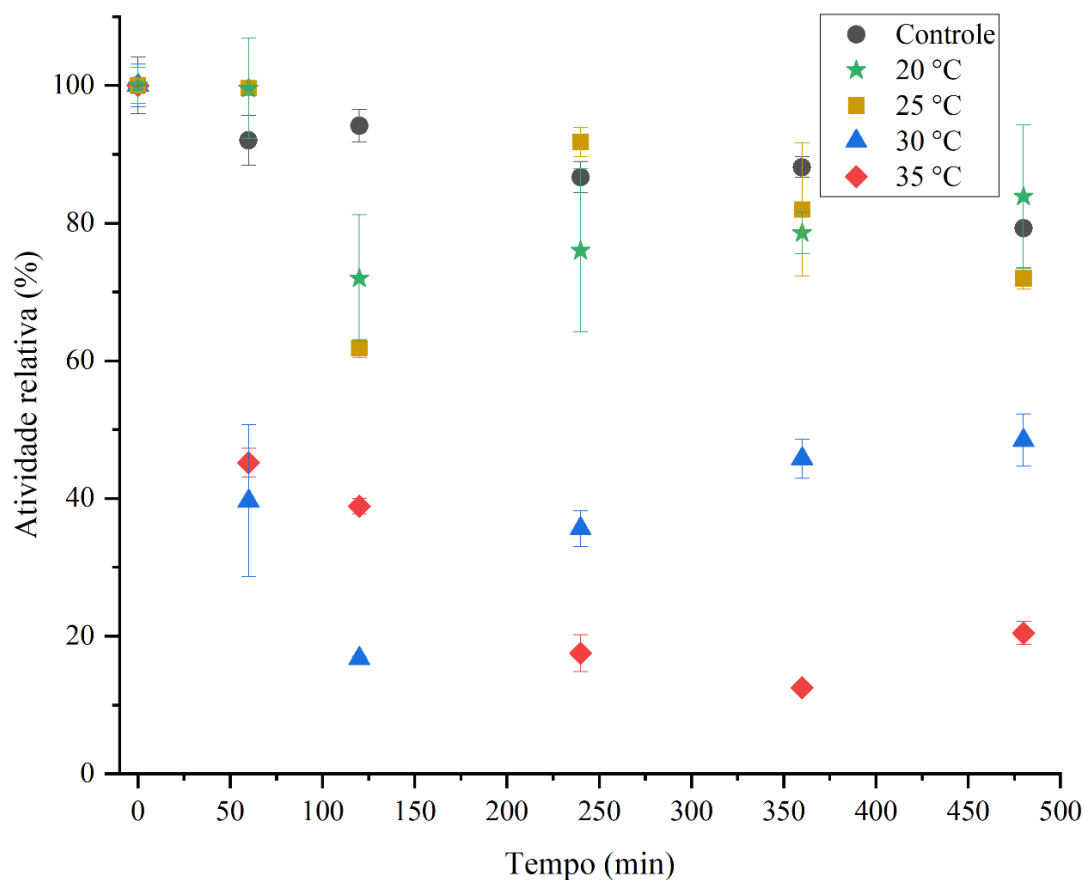
Para o sabugo de milho sem a enzima, Ojedokun; Bello (2016) obtiveram bandas nas regiões de 3301 cm^{-1} , 1643 cm^{-1} e 1029 cm^{-1} . Padilla *et al.* (2019) obtiveram bandas nas regiões de 3459 cm^{-1} , 1659 cm^{-1} e 1044 cm^{-1} . Por sua vez, Piña-Barrera *et al.* (2014) obtiveram bandas nas regiões de 3296 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 950 cm^{-1} . Os resultados similares apresentados por diversos autores reiteram que o material utilizado é, de fato, sabugo de milho.

Já no caso do sabugo de milho com a enzima adsorvida, nota-se que houve um aumento expressivo nas bandas nas regiões de 3300 e 1650 cm^{-1} . A banda da região de 3300 cm^{-1} possivelmente corresponde aos grupos amins (N–H) presentes na FTase, provavelmente com sobreposição de bandas associadas ao estiramento O–H, enquanto a banda da região de 1650 cm^{-1} pode estar relacionada aos grupos amida da enzima (estiramentos C–N e C–O) (AN *et al.*, 2010; TAMMER, 2004). Estes resultados comprovam que há presença de material enzimático no suporte em questão após o processo de imobilização.

5.2 PERFIS CINÉTICOS DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FTASE EM SABUGO DE MILHO

Com o intuito de se estudar a imobilização da enzima FTase em sabugo de milho, foram realizados ensaios de imobilização de acordo com o discorrido no Tópico 4.3. Após a quantificação de açúcares (Tópico 4.5.3) e os cálculos de atividades (Tópico 3.2.2), foi possível obter os perfis cinéticos para as temperaturas de 20 °C , 25 °C , 30 °C e 35 °C . Tais perfis cinéticos, dispostos na Figura 9, descrevem o comportamento da atividade de transfrutossilção (A_t) para o biocatalisador solúvel presente no sobrenadante do caldo enzimático em contato com o sabugo de milho *in natura*. Para controle, utilizou-se caldo enzimático sem contato com suporte sob temperatura de 35 °C .

Figura 9 - Perfis cinéticos de A_t da enzima FTase extracelular no sobrenadante do caldo enzimático em contato com o suporte *in natura*



Fonte: Autor (2020).

Analisando-se a Figura 9, observa-se uma queda significativa de A_t (no sobrenadante) ao longo das 8h (480min) para as temperaturas de 30 °C e 35 °C, diferentemente do controle que apresentou uma pequena queda. Tal fato aponta para a adsorção da enzima pelo suporte. De igual maneira, é possível verificar que a A_t se estabiliza nas primeiras horas, indicando a saturação enzimática no suporte. Já a leve queda de A_t apresentada pelo controle se justifica pelo fato de o biocatalisador solúvel ser instável quando livre do micélio (biomassa microbiana), sendo esta (a enzima extracelular) desnaturada no meio reacional ao decorrer do tempo (FARIA, 2019).

Os ensaios de imobilização realizados com as temperaturas de 20 e 25 °C apresentaram perfis cinéticos semelhantes ao perfil de controle, portanto, não havendo adsorção adequada da enzima pelo suporte. Como explicado no Tópico 3.5.1, o aumento da temperatura proporciona maior agitação das moléculas e desobstrução dos poros do suporte, permitindo que haja maior contato entre as enzimas e o suporte, maximizando a possibilidade de adsorção física da FTase

pelo sabugo de milho. Por estes motivos, o perfil cinético para a imobilização realizada a 35 °C apresentou a maior queda de A_t , seguido pela realizada a 30 °C.

Faria (2019) obteve perfis cinéticos semelhantes ao imobilizar a FTase (proveniente do mesmo micro-organismo) em sílica-gel, indicando que o comportamento enzimático foi o mesmo para ambas as imobilizações por adsorção física.

Através dos dados coletados pelos ensaios de imobilização em sabugo de milho *in natura*, foi possível calcular os rendimentos de imobilização (RI) para cada temperatura utilizada nos ensaios (Tabela 6), de acordo com o Tópico 3.3.5. Similarmente, nota-se claramente que a maior temperatura obteve o melhor RI , sendo este de $74,26 \pm 5,61$ % (estando de acordo com o que foi apontado pelos perfis cinéticos).

Tabela 6 - Rendimento de imobilização (RI) para cada temperatura (T) para o sabugo de milho *in natura*

T (°C)	35	30	25	20
RI (%)	$74,26 \pm 5,61$	$51,53 \pm 8,20$	$19,42 \pm 7,56$	$16,13 \pm 8,85$

Fonte: Autor (2020).

Realizou-se o mesmo ensaio de imobilização utilizando sabugo de milho funcionalizado para a temperatura de 35 °C, obtendo RI de $64,58 \pm 3,05$ %. Embora o RI tenha sido inferior para o suporte funcionalizado (se comparado ao *in natura*), ressalta-se que a atividade recuperada foi significativamente superior para o suporte funcionalizado, constituindo, por fim, resultados mais expressivos.

Até a finalização deste trabalho, não foram encontrados na literatura outros trabalhos de imobilização da enzima FTase em sabugo de milho, à vista disso, não é possível fazer comparações cabíveis. Porém, deparou-se com a imobilização de outras enzimas em sabugo de milho, com a finalidade de se nortear os resultados aqui obtidos.

Já que o biocatalisador heterogêneo obteve o melhor RI a 35 °C, realizou-se ensaios para a obtenção da atividade recuperada (A_{tr}) a esta temperatura. A Tabela 7 apresenta os valores de A_{tr} calculados de acordo com o descrito no Tópico 3.3.5 para ambos os suportes *in natura* e funcionalizado. A baixa atividade recuperada para a FTase imobilizada em sabugo de milho *in natura* justificam-se pelo o fato de o suporte ser natural, ou seja, não ter sido submetido

a qualquer tratamento químico para a ativação da superfície: com isso, a imobilização se dá por adsorção física.

Tabela 7 - Atividade recuperada (A_{tr}) para 35 °C

Suporte	A_{tr} (%)
<i>In natura</i>	2,33 ± 0,23
Funcionalizado	9,05 ± 0,58

Fonte: Autor (2020).

O suporte funcionalizado em solução alcalina apresentou atividade recuperada próxima a quatro vezes superior em relação ao suporte *in natura*, o que era esperado, já que o processo de funcionalização do sabugo de milho aumentou a sua área, permitindo assim, que a capacidade de adsorção física enzimática do suporte fosse maximizada. Por conseguinte, é plausível a A_{tr} ser maior para o suporte funcionalizado.

Com o objetivo de catalisar ésteres, Costa (2015) utilizou o sabugo de milho para a imobilização enzimática da lipase, obtendo RI de 65 % (sob agitação vigorosa por 2 h a 25 °C e pH 7) para o suporte sem tratamento, valor próximo ao obtido neste trabalho.

Galárraga *et al.* (2013), com o intuito de descolorir azul de bromofenol, imobilizaram peroxidase em pó de sabugo de milho ativado (através de extração alcalina). Após ensaio de 3h em leve agitação, 25 °C e pH 10, a enzima foi imobilizada, obtendo RI de 74 % e 86 % e A_{tr} de 57 % e 69 % (valores estes cujos desvios-padrões não foram superiores a 5 %) (GALÁRRAGA *et al.*, 2013).

Para a obtenção de peptídeos a partir de soro de queijo, Bassan *et al.* (2016) imobilizaram a enzima tripsina em pó de sabugo de milho sob agitação constante por 24 h, 25 °C e pH 10. Neste caso, o suporte foi tratado através de hidrólise, extração alcalina e glioxal. O RI obtido foi de 85,34 % (BASSAN *et al.*, 2016).

Os trabalhos imobilizando lipase, peroxidase e tripsina em sabugo de milho obtiveram resultados satisfatórios. Contudo, levanta-se a questão de serem outras enzimas, possuindo, portanto, diferentes estruturas físicas e químicas, além de distintas finalidades. Não obstante, nota-se que o sabugo de milho se revela um ótimo suporte enzimático a ser considerado.

Ademais, não foram encontrados trabalhos na literatura sobre a utilização de sabugo de milho como suporte enzimático para FTase ou para produção de açúcares, apontando para a inovação tecnológica desta pesquisa.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

5.3.1 Planejamento de experimentos: efeitos de pH e temperatura na atividade de transfrutoseilação da FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado

Realizou-se um planejamento de experimentos fatorial completo para duas variáveis (2^2) do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 3 pontos centrais e 4 pontos fatoriais adicionais (a fim de se compor um modelo de segunda ordem), de acordo com o Tópico 4.4.1. Os fatores variáveis foram a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e o pH, e a resposta foi a atividade de transfrutoseilação (A_t , em $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Matriz do planejamento de experimento com as respostas

Ensaio	Valores codificados		Resposta
	T	pH	A_t ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	-1	-1	2,82
2	-1	+1	3,41
3	+1	-1	1,17
4	+1	+1	3,20
5	-1,41	0	3,64
6	+1,41	0	4,52
7	0	-1,41	1,91
8	0	+1,41	2,13
9	0	0	4,70
10	0	0	5,35
11	0	0	4,88

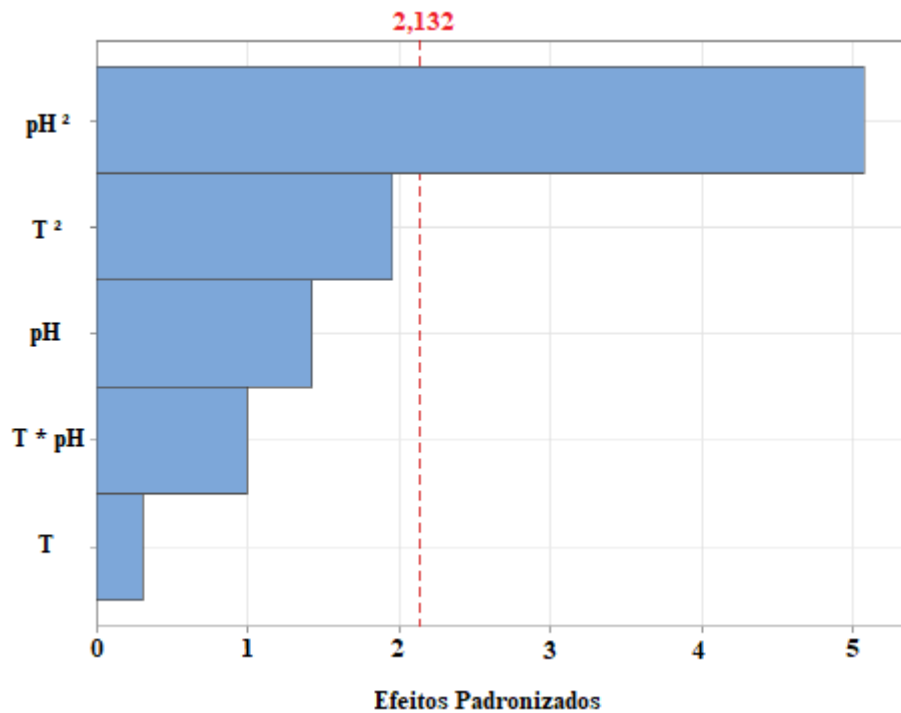
Fonte: Autor (2021).

Com as repostas do planejamento experimental, fez-se a análise estatística dos dados utilizando ferramenta computacional apropriada, com nível de significância p-valor menores que 10 % ($p\text{-valor} \leq 0,10$). Isto posto, obteve-se o diagrama de Pareto (Figura 10), a tabela de efeitos (Tabela 9), a análise de variância (Tabela 10), a curva de contorno (Figura 11) e a superfície de resposta (Figura 12).

Ao se analisar o Diagrama de Pareto (disposto na Figura 10), observa-se que o único

efeito significativo (considerando nível de significância de 10 %) é a função quadrática do pH. Tal fator pode ser igualmente comprovado pela tabela de efeitos (Tabela 9), em que o único p-valor inferior a 0,010 foi referente ao pH^2 , sendo este 0,007. De igual modo, na Tabela 8 é possível verificar que a atividade de transfrutoseilação sofreu as maiores alterações quando alterado o pH, em relação a alterações na temperatura. De mesmo modo, os trabalhos Cunha *et al.* (2019) e Faria *et al.* (2021) concluíram que a atividade de transfrutoseilação de ambas FTase livre e imobilizada em sílica-gel também sofreram maior influência do pH, apontando que a imobilização da FTase não modificou os efeitos de pH sobre a atividade de transfrutoseilação.

Figura 10 - Diagrama de Pareto para as variáveis temperatura (T) e pH sobre a atividade de transfrutoseilação do biocatalisador heterogêneo



Fonte: Autor (2021).

Tabela 9 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH sobre a atividade de transfrutossilacção do biocatalisador heterogêneo

Variáveis	Efeitos estimados	Erro padrão	p-valor
Média	96,72	9,17	0,000
T	-1,47	4,79	0,774
pH	6,84	4,79	0,226
T ²	-12,12	6,18	0,122
pH²	-31,38	6,18	0,007
T.pH	6,75	6,77	0,376

Fonte: Autor (2021).

Por conseguinte, gerou-se o modelo estatístico para a atividade de transfrutossilacção (A_t), disposto pela Equação 17.

$$A_t = 96,72 - 31,38 \cdot pH^2 \quad (17)$$

Com o intuito de se avaliar o ajuste do modelo aos dados experimentais, o coeficiente de determinação (R^2) indicou que o modelo acima é capaz de descrever 88,44 % das variabilidades das respostas sobre as amostras. Por se tratar de biotecnologia, tal valor pode ser justificado por variações nos processos de cultivo e de produção enzimática. Ainda assim, através da Tabela 8 é possível verificar que os pontos centrais possuíram resultados relativamente próximos, apontando para uma boa reprodutibilidade do processo.

Seguidamente, realizou-se a Análise de Variância (ANOVA) do modelo proposto, assim como o teste-F, com a finalidade de ser verificado se o modelo proposto justifica apropriadamente os dados experimentais obtidos. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10 - Análise de variância para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH sobre a atividade de transfrutossilção do biocatalisador heterogêneo

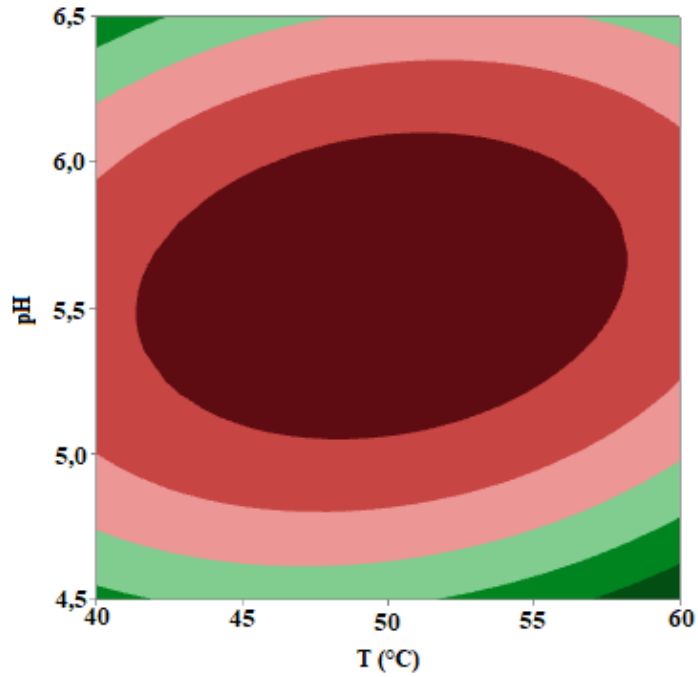
ANOVA	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}	p-valor
Modelo	5620,06	6	936,68	5,1	0,068
Resíduos	734,29	4	183,5725		
Falta de ajuste	654,8				
Erro puro	79,5				
Total	6354,35	10			
R² (%)	88,44				
F _{tabelado} (10 %)	4,01				

Fonte: Autor (2021).

A ANOVA aponta para um p-valor do modelo de 0,068: sendo inferior a 0,010, o modelo representa bem os dados experimentais com significância de 10 %. Para o teste-F, o $F_{\text{calculado}}$ foi obtido através do quadrado médio do modelo em razão do quadrado médio dos resíduos, sendo este de 5,1. Para o F_{tabelado} , utilizou-se os graus de liberdade de ambos modelo e resíduos (com significância de 10 %), obtendo um valor de 4,01. Mais uma vez, o modelo é considerado válido, já que o F_{tabelado} é inferior ao $F_{\text{calculado}}$ (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

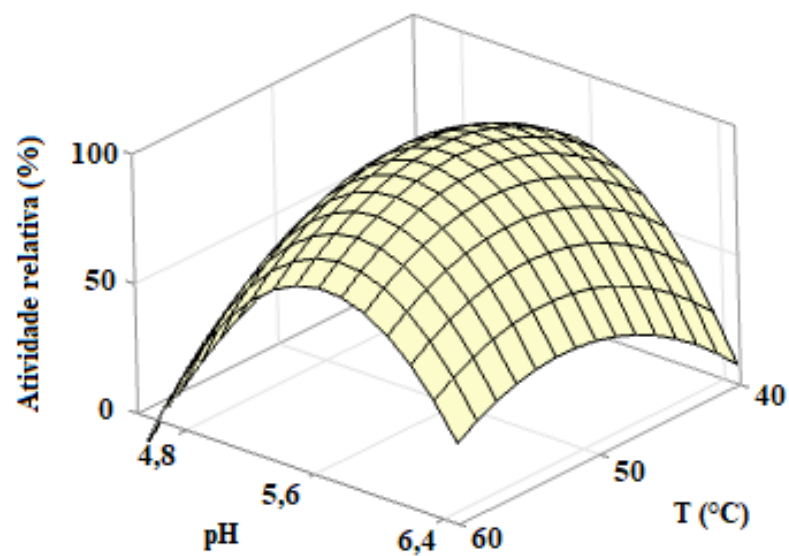
Sendo o modelo apropriado ao experimento realizado, plotou-se a curva de contorno e a superfície de resposta, sendo estas apresentadas pelas Figuras 11 e 12. Através de ambas as imagens, é visível a maior influência do pH sobre A_t em relação a temperatura. De igual modo, pode-se designar as melhores condições de pH e temperatura para A_t , sendo 5,5 e 50 °C. Similarmente, diversos pesquisadores obtiveram as mesmas condições ótimas para a FTase proveniente de *Aspergillus oryzae*, sendo livre ou imobilizada em sílica-gel, significando que a imobilização da FTase não modifica os efeitos de pH e temperatura sobre a atividade de transfrutossilção (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; OTTONI *et al.*, 2012; PERNA *et al.*, 2018).

Figura 11 - Curva de contorno da atividade de transfrutoseilação do biocatalisador heterogêneo em função do pH e da temperatura



Fonte: Autor (2021).

Figura 12 - Superfície de resposta da atividade de transfrutoseilação do biocatalisador heterogêneo em função do pH e da temperatura

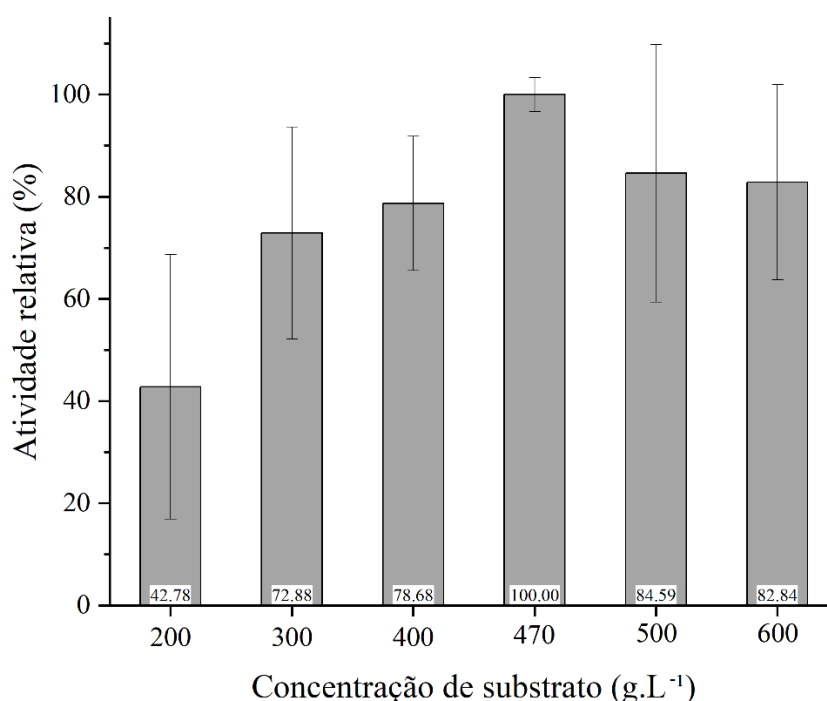


Fonte: Autor (2021).

5.3.2 Efeito da concentração de substrato e parâmetros cinéticos

Realizou-se o ensaio descrito no Tópico 4.4.2. Os resultados se encontram na Figura 13, em que 100 % da atividade relativa se refere a $5,35 \pm 0,70 \text{ U.g}^{-1}$ de atividade absoluta.

Figura 13 - Efeito da concentração de substrato na atividade relativa da FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado



Fonte: Autor (2021).

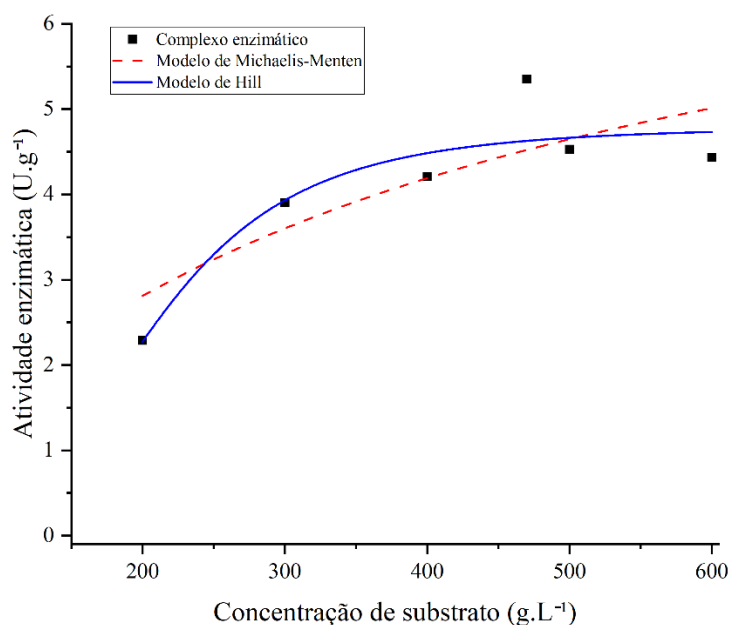
Assim como o resultado do biocatalisador solúvel obtido por Cunha *et al.* (2019), a FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado obteve a melhor A_t para 470 g.L⁻¹ de solução de sacarose (referente a 63,6 % m.v⁻¹ na solução final). Nota-se também que as atividades relativas para as concentrações de 400 g.L⁻¹ a 600 g.L⁻¹ de substrato foram próximas a 80 %.

A atividade enzimática para a concentração de substrato de 200 g.L⁻¹ foi a pior dentre as estudadas, indicando que possivelmente não houve a saturação de substrato. Para este último caso, Faria *et al.*, 2021 apontam que para baixas concentrações de sacarose, a atividade hidrolítica é favorecida. Faria *et al.* (2021) imobilizaram FTase (proveniente do mesmo micro-organismo) em sílica-gel e obtiveram atividade relativa superior a 80 % para as concentrações

de 400 g.L⁻¹, 470 g.L⁻¹, 500 g.L⁻¹ e 600 g.L⁻¹ de sacarose, sendo estes resultados semelhantes aos obtidos para a FTase imobilizado em sabugo de milho funcionalizado. Sendo assim, nota-se que há um comportamento semelhante da enzima FTase tanto extracelular quanto imobilizada em ambos suportes.

Com o propósito de se estudar a cinética enzimática do biocatalisador heterogêneo, ajustou-se os dados do ensaio de concentração a ambos Modelo de Michalis-Menten e Modelo de Hill, com o auxílio de ferramenta computacional. O resultado está disponível na Figura 14.

Figura 14 - Modelos de Michalis-Menten e de Hill para o biocatalisador heterogêneo



Fonte: Autor (2021).

A Tabela 11 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados aos Modelos de Michaelis-Menten e de Hill. Para a FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado, o Modelo de Hill foi o modelo que melhor se ajustou aos dados, possuindo um coeficiente de determinação de 86 %. Somando a isto, o coeficiente de Hill (n) apresentou valor superior a 1,00, indicando que há ligações cooperativas positivas na reação enzimática: isto se remete ao fato de a enzima ser alostérica, conforme explicado no Tópico 3.3.

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos para o biocatalisador heterogêneo

	Michaelis-Menten	Hill
$v_{m\acute{a}x}$ (U.g ⁻¹)	8,23 ± 3,02	4,80 ± 0,46
$K_{0,5}$ (g.L ⁻¹)	385,92 ± 297,58	205,34 ± 21,28
n	-	3,99
R^2	0,73	0,86

Fonte: Autor (2021).

Para o caso de enzimas alostéricas, o Modelo de Michaelis-Menten não é adequado para se estudar a cinética enzimática (conforme pode ser visto pelos resultados apresentados na Tabela 11). De acordo com Aguiar-Oliveira; Maugeri (2011), as enzimas frutossiltransferases são majoritariamente encontradas na forma dimérica.

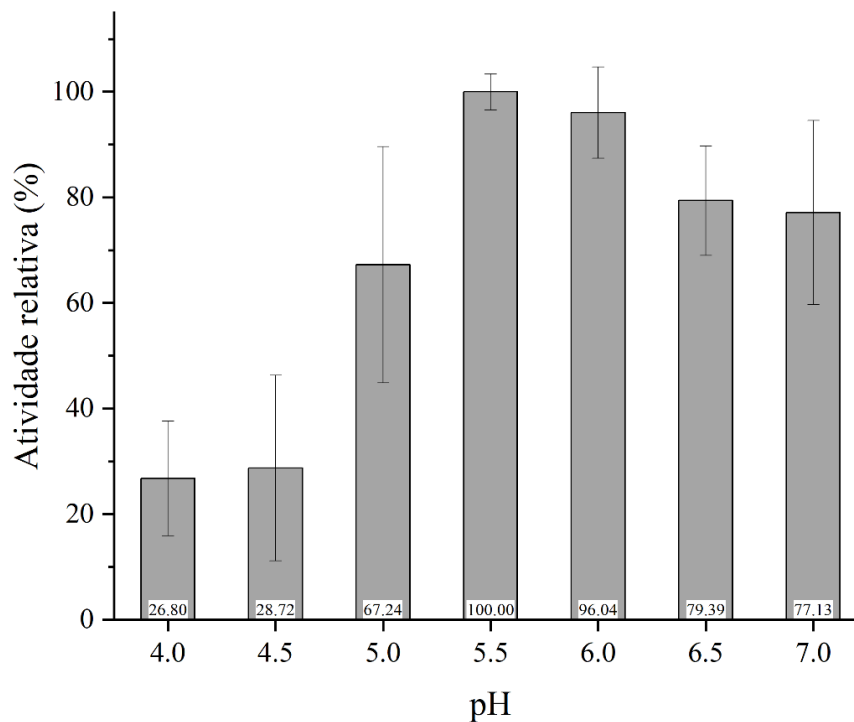
Dada por $K_{0,5}$, a concentração de substrato para que seja atingida a metade da atividade enzimática máxima foi de 205,34 ± 21,28 g.L⁻¹ para o Modelo de Hill. Considerando o desvio padrão, este valor foi próximo à metade da concentração de substrato que proporcionou a maior atividade enzimática (470 g.L⁻¹). Faria *et al.* (2021) obtiveram $K_{0,5}$ de 233,8 g.L⁻¹ ao imobilizar FTase em sílica-gel, outra vez apontando para um comportamento análogo da FTase proveniente de *A. oryzae* IPT-301.

5.3.3 Efeito do pH

Avaliou-se a estabilidade do biocatalisador heterogêneo frente ao pH seguindo o método discorrido no Tópico 4.4.3. A Figura 15 aponta os resultados obtidos para a FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado, sendo que a atividade relativa máxima (100 %) se refere a atividade absoluta de 5,36 ± 0,48 U.g⁻¹.

Analisando-se a Figura 15, observa-se que o biocatalisador heterogêneo apresentou maior estabilidade frente a pH próximos a 6,0, sendo que o máximo foi obtido em pH 5,5. Faria *et al.* (2021) e Cunha *et al.* (2019) obtiveram perfil semelhante para o biocatalisador solúvel, porém, com atividade máxima em pH 6,0. Para a FTase imobilizada em sílica-gel, Faria *et al.* (2021) obtiveram atividade máxima em pH 5,5, assim como para a FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado

Figura 15 - Estabilidade da FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado frente ao pH

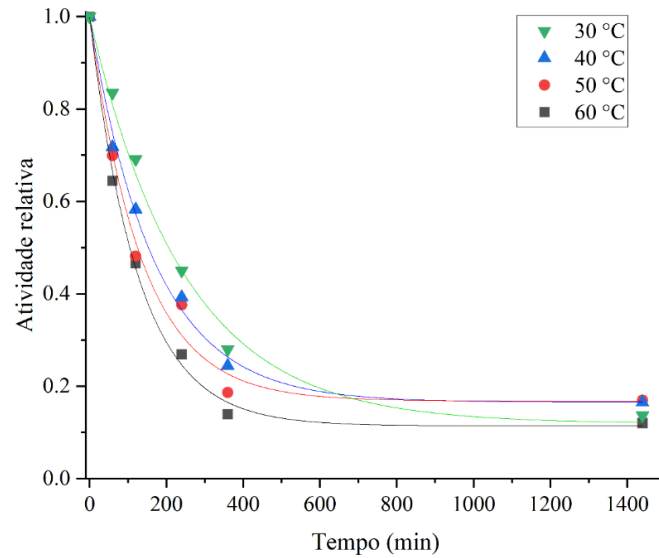


Fonte: Autor (2021).

5.3.4 Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos

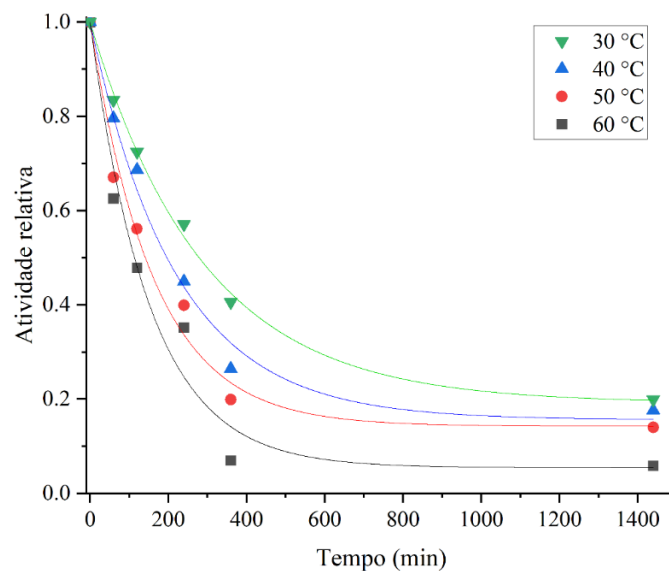
Realizou-se experimentos de acordo com o Tópico 4.4.4 para ambos biocatalisadores solúvel e heterogêneo, com o intuito de se estudar a estabilidade térmica e se obter os parâmetros termodinâmicos. Primeiramente, com o auxílio de ferramenta computacional, plotou-se dois gráficos com os valores experimentais de atividade relativa em função do tempo de incubação e ajustou-se o Modelo de Sadana-Henley para cada temperatura, de acordo com o discutido no Tópico 3.5.1. Os gráficos para os biocatalisadores solúvel e heterogêneo (sabugo de milho funcionalizado) estão representados pelas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Figura 16 - Curvas de desnaturação térmica para atividade de transfrutossilação relativa do biocatalisador solúvel com ajuste do Modelo de Sadana-Henley



Fonte: Autor (2021).

Figura 17 - Curvas de desnaturação térmica para atividade de transfrutossilação relativa do biocatalisador heterogêneo com ajuste do Modelo de Sadana-Henley



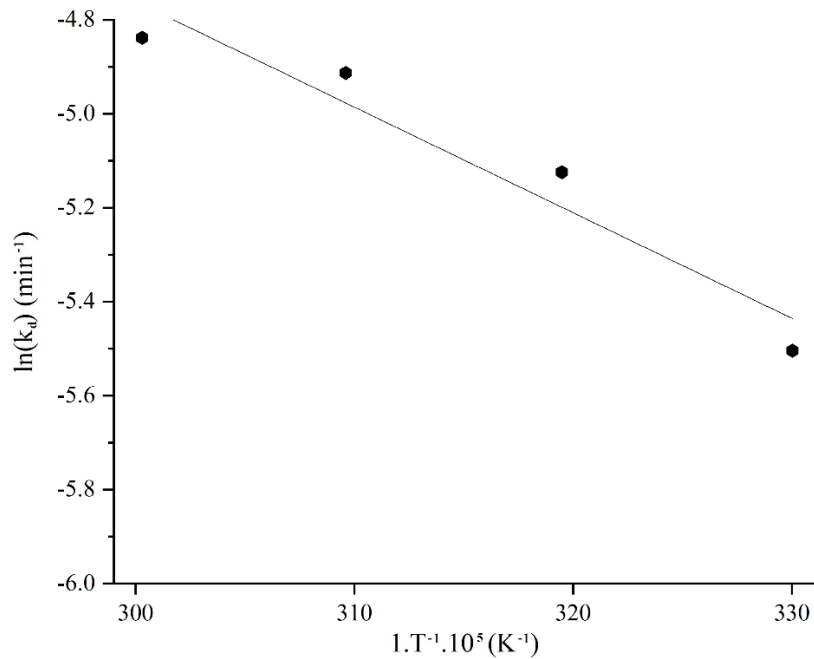
Fonte: Autor (2021).

Através do ajuste dos dados ao Modelo de Sadana-Henley, obteve-se os valores das constantes de desnaturação térmica (k_d) para cada temperatura para ambos os biocatalisadores,

e com estes valores calculou-se os tempos de meia vida, de acordo com o disposto no Tópico 3.5.1.

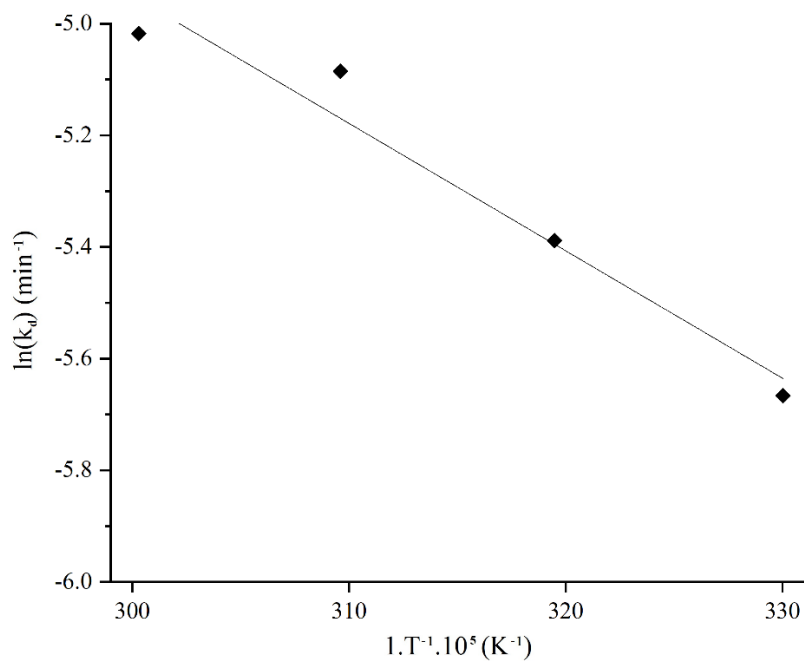
Possuindo os valores de k_d , plotou-se um gráfico do inverso da temperatura pelo logaritmo natural de k_d , conforme as Figuras 18 e 19. Ajustou-se esses perfis à Equação de Arrhenius e obteve-se a energia de desnaturação térmica (E_d) para ambos biocatalisadores. Por fim, calculou-se a entalpia (ΔH_d), a entropia (ΔS_d) e a energia livre de Gibbs (ΔG_d) para a ativação da desnaturação térmica e o fator de estabilidade (FE). Os parâmetros termodinâmicos seguem nas Tabelas 12, 13 e 14.

Figura 18 - Ajuste linear da Equação de Arrhenius para a obtenção de E_d para o biocatalisador solúvel, com R^2 de 92,80 %



Fonte: Autor (2021).

Figura 19 - Ajuste linear da Equação de Arrhenius para a obtenção de E_d para o biocatalisador heterogêneo (sabugo de milho funcionalizado), com R^2 de 95,59 %



Fonte: Autor (2021).

Tabela 12 - Parâmetros termodinâmicos para o biocatalisador solúvel

T (°C)	30	40	50	60
$k_d (10^{-5}.min^{-1})$	407	595	735	792
α	0,119	0,165	0,168	0,114
$t_{1/2} (min)$	205,91	153,51	124,90	104,87
$\Delta H_d (kJ.mol^{-1})$	16,15	16,07	15,99	15,91
$\Delta G_d (kJ.mol^{-1})$	98,43	100,78	103,52	106,60
$\Delta S_d (kJ.mol^{-1}.K^{-1})$	-0,272	-0,271	-0,271	-0,272
$R^2 (%)$	99,33	99,55	98,64	99,71
$E_d (kJ.mol^{-1})$	18,67			

Fonte: Autor (2021).

Tabela 13 - Parâmetros termodinâmicos para o biocatalisador heterogêneo

T (°C)	30	40	50	60
k_d ($10^{-5} \cdot \text{min}^{-1}$)	346	457	619	662
α	0,192	0,156	0,142	0,054
$t_{1/2}$ (min)	278,43	196,34	141,23	113,59
ΔH_d (kJ.mol ⁻¹)	16,45	16,37	16,29	16,20
ΔG_d (kJ.mol ⁻¹)	98,84	101,46	103,98	107,09
ΔS_d (kJ.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	-0,272	-0,272	-0,271	-0,273
R ² (%)	99,70	98,96	98,18	96,83
E_d (kJ.mol ⁻¹)	18,97			

Fonte: Autor (2021).

Tabela 14 - Fator de estabilidade (FE) para o biocatalisador heterogêneo em razão do biocatalisador solúvel

T (°C)	30	40	50	60
FE	1,35	1,28	1,13	1,08

Fonte: Autor (2021).

Primeiramente, observando os valores dos tempos de meia vida ($t_{1/2}$) e os fatores de estabilidade (FE) apresentados nas Tabelas 12, 13 e 13, nota-se claramente que a imobilização enzimática em sabugo de milho funcionalizado aumentou a estabilidade térmica da FTase para todas as temperaturas, sendo o maior aumento de 1,35 vezes, para 30 °C. Nota-se que o fator de estabilidade foi de 1,13 para 50 °C. Ademais, o tempo de meia-vida (ou seja, o tempo para que a atividade enzimática decaia em 50 % de seu valor inicial) diminui com o aumento da temperatura: este fator indica que a desnaturação da enzima em questão se dá com maior facilidade com o aumento da temperatura, ou seja, a desnaturação enzimática da FTase é um processo que requer energia térmica, o que pode ser comprovado pelos valores negativos da variação de entropia de desnaturação térmica (ΔS_d). A entropia de desnaturação térmica representa a energia necessária para que ocorra a transição do estado nativo da enzima para seu estado desnaturado. Para algumas enzimas, a desnaturação térmica conduz a um estado mais ordenado, requerendo assim, energia para o processo de desnaturação (FARIA, 2019; GARCIA, 2018).

A energia de desnaturação térmica (E_d) para o biocatalisador heterogêneo foi inexpressivamente superior à do solúvel, sendo estes valores de 18,97 e 18,67 kJ.mol⁻¹, respectivamente. Apesar da estabilidade térmica ter sido superior para a FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado, esta característica não apresentou superioridade significativa. Como pode ser observado pelas tabelas supracitadas, além de E_d , os valores de entalpia (ΔH_d) e de energia livre de Gibbs (ΔG_d) foram relativamente aproximados. Neste caso, maiores valores de ΔH_d apontam para maior estabilidade térmica. Com maior confiabilidade por levar em consideração ambas as características entálpicas e entrópicas da enzima estudada, baixos valores de ΔG_d representam que há maior espontaneidade para que ocorra a desnaturação térmica (AHMED *et al.*, 2019; CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021).

De acordo com Costa (2015), a extração alcalina é responsável pela separação do enlace e pelo rompimento estrutural da lignina, tendo como consequência o inchamento do suporte e o aumento de sua área. Além disso, o tratamento por hidrólise alcalina é responsável pela remoção de grande parte da hemicelulose presente na composição do sabugo de milho, o que também poderia acarretar no aumento da área do suporte. O aumento da área é um fator que facilita a imobilização por adsorção física, visto que há maior área de contato entre suporte e enzima. Em seu trabalho, Costa (2015) apontou que a extração alcalina do sabugo de milho removeu $49,3 \pm 1,7$ % da hemicelulose e $12,9 \pm 0,5$ % da lignina. Neste caso, a funcionalização do sabugo de milho pode ter aumentando sua área, aumentando a capacidade do suporte adsorver fisicamente a enzima. Contudo, a FTase adsorvida fisicamente é facilmente dessorvida durante os procedimentos experimentais, fato que justifica a inexpressiva superioridade da estabilidade enzimática para o biocatalisador heterogêneo (em relação ao biocatalisador solúvel (BASSAN *et al.*, 2016; GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020).

Em seu trabalho, ao imobilizar lipase para a produção de ésteres, Costa (2015) obteve tempo de meia-vida 7,8 vezes superior para a enzima imobilizada em sabugo de milho funcionalizado por extração alcalina em relação à enzima livre.

Por sua vez, Bassa *et al.* (2016) imobilizaram tripsina em pó de sabugo de milho tratado para a obtenção de peptídeos a partir do soro de leite e obtiveram tempo de meia-vida de até 1156 vezes superior em relação à enzima livre. Porém, além de ser outra enzima imobilizada em pó de sabugo de milho altamente tratado, obteve-se atividade máxima de $3,04 \pm 0,01$ U.g⁻¹ (BASSAN *et al.*, 2016).

Ao imobilizar FTase (proveniente do mesmo micro-organismo) em sílica-gel para a produção de FOS, Faria, Morales, *et al.* (2021) obtiveram tempo de meia-vida 2,5 vezes superior para o biocatalisador heterogêneo em comparação ao solúvel.

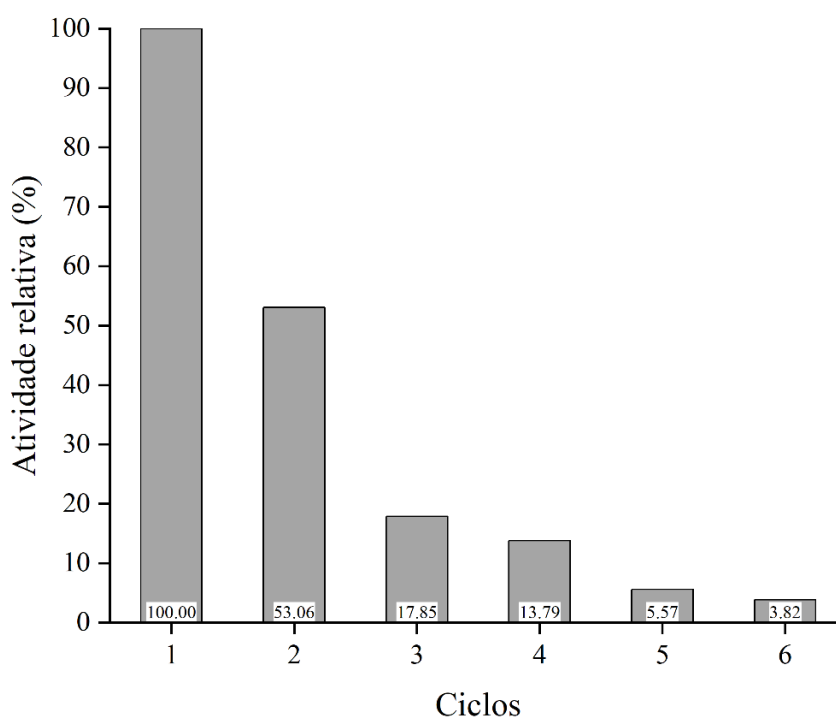
Apesar da FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado apresentar uma pequena variação em relação à FTase livre, o suporte natural e de baixo custo aumentou a estabilidade térmica e proporcionou maior tempo de meia-vida ao biocatalisador.

5.3.5 Estabilidade operacional

Com o intuito de se estudar a estabilidade do biocatalisador heterogêneo, realizou-se o ensaio experimental de acordo com o Tópico 4.4.5. Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 20, sendo que a atividade relativa máxima (100 %) corresponde à atividade absoluta de $5,86 \pm 0,62 \text{ U.g}^{-1}$.

De acordo com a Figura 20, o segundo ciclo manteve 53,06 % da atividade enzimática inicial. Já os terceiro e quarto ciclos mantiveram 17,85 % e 13,79 %, respectivamente, da atividade relativa inicial. Tais quedas podem ser explicadas pelo fato de haver dessorção enzimática do suporte nas etapas de filtração à vácuo.

Figura 20 - Estabilidade operacional da FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado



Fonte: Autor (2021).

Para a FTase immobilizada em sílica-gel por Faria *et al.* (2021), a atividade relativa foi mantida em 100 % nos dois primeiros ciclos, apontando para uma maior estabilidade operacional. Entretanto, apesar da menor estabilidade operacional, ressalta-se que o sabugo de milho é um suporte natural, podendo ser obtido como resíduo da agroindústria. No entanto, o uso de estabilizantes químicos ou o estudo de outros métodos de funcionalização poderiam aprimorar a estabilidade operacional para a FTase immobilizada em sabugo de milho (FARIA *et al.*, 2021).

6 CONCLUSÃO

Constatou-se que a enzima frutossiltransferase foi imobilizada em sabugo de milho, sendo que as melhores atividades recuperadas foram para o sabugo de milho funcionalizado, com A_{tr} de $9,05 \pm 0,58$ % para o suporte funcionalizado e $2,33 \pm 0,23$ % para o suporte *in natura*.

Caracterizou-se física e quimicamente o sabugo de milho e relatou-se que as vibrações dos grupos funcionais presentes no material são semelhantes às presentes no sabugo de milho e na enzima FTase.

Traçou-se os perfis cinéticos de imobilização da FTase em sabugo de milho *in natura* para 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C, e observou-se que o maior rendimento de imobilização foi para a 35 °C. Neste caso, O *RI* foi de $74,26 \pm 5,61$ % para o sabugo de milho *in natura* e de $64,58 \pm 3,05$ % para o suporte funcionalizado.

Nos estudos dos efeitos de pH e de temperatura sobre a atividade de transfrutossilação da FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado, fez-se um planejamento de experimentos tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) e determinou-se que as condições ótimas são 50 °C e pH 5,5.

O ensaio para a avaliação do efeito da concentração de substrato apontou que concentrações entre 400 g.L⁻¹ e 600 g.L⁻¹ de sacarose apresentaram as melhores condições para a atividade de transfrutossilação, sendo 470 g.L⁻¹ a condição ótima. Os dados do biocatalisador heterogêneo melhor se ajustaram ao Modelo de Hill.

O biocatalisador heterogêneo apresentou boa estabilidade frente a faixa de pH entre 5,5 e 6,0, com atividades relativas superiores a 80 %. Relatou-se que meios reacionais mais ácidos apresentaram as piores condições para a atividade enzimática da FTase imobilizada no suporte estudado.

Os ensaios de estabilidade térmica apontaram que o biocatalisador heterogêneo apresentou um inexpressivo aumento na estabilidade térmica se comparado ao biocatalisador solúvel. A energia de desnaturação térmica (E_d) foi de 18,97 kJ.mol⁻¹ para o biocatalisador heterogêneo e 18,67 kJ.mol⁻¹ para o biocatalisador solúvel. Para a temperatura de 50 °C, o tempo de meia-vida foi 1,13 superior para a FTase imobilizada em sabugo de milho funcionalizado.

O estudo de estabilidade operacional indicou a possibilidade de reuso do biocatalisador heterogêneo em até 4 ciclos, mantendo condições adequadas de atividade enzimática. Este é um atrativo para processos industriais, já que é possível reutilizar a enzima imobilizada em

sabugo de milho funcionalizado e assim, reduzir custos operacionais.

Por fim, observa-se que os objetivos deste trabalho foram alcançados, concluindo-se que o sabugo de milho é um suporte adequado para a imobilização da FTase extracelular proveniente de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para a produção de FOS, considerando ainda que o suporte é um resíduo agroindustrial disponível em grande quantidade em várias localizações do mundo. Além do mais, destaca-se a inovação e o pioneirismo desta pesquisa ao imobilizar a enzima frutossiltransferase em sabugo de milho para a produção de açúcares prebióticos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a continuidade deste trabalho, propõe-se a avaliação do pH e da agitação durante o processo de imobilização, assim como o estudo de imobilização em sabugo de milho funcionalizado por outros métodos e o uso de estabilizantes químicos, com a finalidade de se aumentar a atividade recuperada, conseqüentemente, maximizando a produção de FOS. De igual modo, propõe-se a quantificação direta dos FOS e a realização de ensaios laboratoriais em reatores químicos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Thermal Stability of the Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.* **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 28, n. 03, p. 363-372, 2011.
- AHMAD, Z. *et al.* Nonlinear process modeling of fructosyltransferase (FTase) using bootstrap re-sampling neural network model. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 599-606, 2010.
- AHMED, S. A. *et al.* Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of free and immobilized caseinase on mica glass-ceramics. **Heliyon**, v. 5, 2019.
- AN, D. *et al.* A green route to preparation of silica powders with rice husk ash and waste gas. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 509-514, 2010.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: The Enzyme Catalyzing Production of Fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, p. 350-358, 2001.
- ANTOŠOVÁ, M. *et al.* Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 58-63, 2008.
- ARICA, M. Y.; ALTINTAS, B.; BAYRAMOĞLU, G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly (GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 665-669, 2009.
- ASGHER, M. *et al.* Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, 2014.
- BACIU, I. E. *et al.* Investigations of the transfructosylation reaction by fructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogue galactosyl-fructoside. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 347-357, 2005.
- BASSAN, J. C. *et al.* Immobilization of Trypsin in Lignocellulosic Waste Material to Produce Peptides with Bioactive Potential from Whey Protein. **Materials**, v. 357, 2016.
- BEDZO, O. K. K.; MANDEGARI, M.; GÖRGENS, J. F. Comparison of immobilized and free enzyme system in industrial production of short-chain fructooligosaccharides from sucrose using a techno-economic approach. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 13, p. 1274-1288, 2019.
- BOLIBOK, P. *et al.* Controlling enzymatic activity by immobilization on graphene oxide. **The Science of Nature**, v. 104, n. 36, 2017.
- BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1639-1650, 2009.

BRENA, B. M.; VIERA, F. B. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *In*: GUISAN, José M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2^a. ed. Totowa: Humana Press, 2006. Cap. 2, p. 15-30.

BÚRIGO, T. *et al.* Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 5, p. 491-497, 2007.

CARDIAS, H. C. T. *et al.* Influence of Activation on the Multipoint Immobilization of Penicillin G Acylase on Macroporous Silica. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, p. 141-148, 1999.

CATANA, R. *et al.* Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 101, p. 260-266, 2007.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos - Safra 2020/21, 3^o Levantamento. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília, p. 48-59, 2020.

COSTA, Diego Melo. **Sabugo de Milho como Suporte para Imobilização de Lipase**. 2015. 157 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes. Aracaju, SE, 2015.

COSTA, G. T.; GUIMARÃES, S. B.; SAMPAIO, H. A. C. Fructo-oligossacharide effects on blood glucose. An overview. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 279-282, 2012.

CUERVO-FERNANDEZ, R. *et al.* Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 87-93, 2007.

CUNHA, Josivan de Sousa. **Produção e Caracterização da Enzima Frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 Visando a Obtenção de Frutooligossacarídeos**. 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química - Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas, MG, 2017.

CUNHA, J.S. *et al.* Synthesis and Characterization of Fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for High Frutooligosaccharides Production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 657-668, 2019.

DATTA, S. *et al.* Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2012.

FARIA, Larissa Lima. **Imobilização da Enzima Frutossiltransferase Extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em Sílica-Gel para Produção de Frutooligossacarídeos**. 2019. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas, MG, 2019.

FARIA, L. L. *et al.* Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, v. 43, n. 3, p. 43-59, 2021.

FERREIRA, Matheus Moreira. **Avaliação de Diferentes Estratégias de Imobilização, Caracterização das Propriedades Catalíticas e Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos para Lipase Produzida Por *Geotrichum candidum*, Visando seu Emprego na Produção de Ácidos Graxos Concentrados.** 2017. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas, MG, 2017.

FIELDS, P. A. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 129, p. 417-431, 2001.

FLORES-MALTOS, A. *et al.* Production of a Transfructosylating Enzymatic Activity Associated to Fructooligosaccharides. *In*: PARAMESWARAN, Binod; VARJANI, Sunita; RAVEENDRAN, Sindhu. **Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing.** Singapura: Springer, 2019. p. 345-355.

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

GALÁRRAGA, J. C. V. *et al.* Bromophenol blue discoloration using peroxidase immobilized on highly activated corncob powder. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 321-326, 2013.

GANAIE, M. A.; LATEEF, A.; GUPTA, U. S. Enzymatic Trends of Fructooligosaccharides Production by Microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2143-2159, 2014.

GARCIA, Rogério Lopes. **Imobilização da Biomassa Catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, Caracterização e Aplicação na Produção de Fructooligosacarídeos.** 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas, MG, 2018.

GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, 2020.

GONÇALVES, MARIA Carolina Pereira. **Imobilização de Frutosiltransferase Microbiana em Gel de Alginato e sua Caracterização para a Produção de Fructooligosacarídeos.** 2019. 143 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas, MG, 2019.

GONÇALVES, M. C. P. *et al.* Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 95-110, 2019.

GONÇALVES, M. C. P. *et al.* Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 9, p. 2473-2482, 2020.

GUAN, L, *et al.* Expression and Activity Analysis of Fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae*. **Protein Journal**, v. 36, n. 4, p. 352-360, 2017.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Properties of thermostable extracellular FOS-producing fructofuranosidase from *Cryptococcus sp.* **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 2, p. 213-221, 2008.

KESSI, E.; ARIAS, J. L. Using Natural Waste Material as a Matrix for the Immobilization of Enzymes: Chicken Eggshell Membrane Powder for β -Galactosidase Immobilization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 1, p. 101-115, 2018.

KIM, B.G W.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Selective production of GF4-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 1031-1034, 1998.

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

KUMAR, D. *et al.* Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 51-61, 2013.

LATEEF, A. *et al.* *Rhizopus stolonifer* LAU 07: a novel source of fructosyltransferase. **Chemical Papers**, v. 6, p. 635-638, 2008.

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

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

LIM, J. S. *et al.* Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase. **European Food Research and Technology**, v. 225, p. 457-462, 2007.

LOZADA-RAMÍREZ, J. D.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCÍA-CARMONA, F. Enzymatic synthesis of S-adenosylhomocysteine: immobilization of recombinant S-adenosylhomocysteine hydrolase from *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2317-2325, 2012.

MAIORANO, A. E. *et al.* Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 11, p. 1867-1877, 2008.

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.

MARTINS, J. F. L. *et al.* Produto a base de yacon e modulação da microbiota, perfil de ácidos graxo e lipídico em ratas ovariectomizadas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 29, n. 5, p. 709-719, 2016.

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

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de Quitosana como Suporte para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.

MILETIĆ, N. *et al.* Macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins - Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 196-201, 2009.

MINTEER, SHELLEY D. **Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols**. 2^a. ed. Hatfield: Human Press, 2017. 231 p.

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

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

MORALES, S. A. V. *et al.* Imobilização de Frutossiltransferase em Sílica Gel e Bucha Vegetal para a Síntese de Frutooligossacarídeos. *In: SILVA, Clécio Danio Dias da. Ciências Biológicas: Realidades e Virtualidades*. Ponta Grossa: Atena, 2020. Cap. 6, p. 56-67.

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

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

NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (NC-NC-IUBMB). **Enzyme Nomenclature**. [2020]. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by Reactions they Catalyse. Disponível em: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/NC-IUBMB/enzyme/>. Acesso em: 7 Abril 2020.

OFFERMANN, S.; ROSENTHAL, W. Carbonic Anhydrase. *In: Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Berlim: Springer, 2008. p. 34.

OJEDOKUN, A. T.; BELLO, O. S. Liquid Phase Adsorption of Congo Red Dye on Functionalized Corn Cobs. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 9, p. 1285-1294, 2016.

OLARTE-AVALLENADA, S. *et al.* In Silico Analysis of the Structure of Fungal Fructooligosaccharides-Synthesizing Enzymes. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 10, fev. 2016.

OLIVEIRA, Elizama Aguiar de. **Imobilização da Enzima Frutosiltransferase Extracelular de *Rhodotorula sp.* e Aplicação na Produção de Frutooligossacarídeos.** 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2007.

OTTONI, C. A. *et al.* Media Optimization for β -fructofuranosidase Production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 01, p. 49-59, 2012.

PADILLA, E. R. D. *et al.* Thermogravimetric and FTIR Analyzes of Corn Cob Pyrolysis. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 566-569, 2019.

PANESAR, P.S. *et al.* Prebiotics. *In*: BRAR, Satinder; DHILLON, Gurpreet; SOCCOL, Carlos. **Biotransformation of Waste Biomass Into High Value Biochemicals.** New York: Springer Science & Business Media, 2014. p. 237-259.

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

PAUL, S. A. *et al.* Influence of polarity parameters on the mechanical properties of composites from polypropylene fiber and short banana fiber. **Composites: Part A**, v. 41, p. 1380-1387, 2010.

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

PERNA, R. F. *et al.* Effects of Triton X-100 and PEG on the Catalytic Properties and Thermal Stability of Lipase from *Candida rugosa* free and Immobilized on Glyoxyl-Agarose. **The Open Biochemistry Journal**, v. 11, p. 66-76, 2017.

PIÑA-BARRERA, A. *et al.* Identification and quantification of corncob as adulterant in corn dough and tortilla by MIR-FTIR spectroscopy and multivariate analysis. **CyTA - Journal of Food**, v. 12, n. 1, p. 65-72, 2014.

PUNEKAR, N. S. **Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms.** 1. ed. Mumbai: Springer, 2018. 562 p.

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

RISSO, F. V. A. *et al.* Assessment of fructooligossacarídeos production from sucrose in aqueous and aqueous-organic systems using immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 245-249, 2012.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos. 2ª. ed. Campinas: Cárita, 2009. 358 p.

SÁNCHEZ, O. F. *et al.* Sucrose Biotransformation to Fructooligosaccharides by *Aspergillus sp.* N74 Free Cells. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 662-673, 2010.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 5, p. 530-537, 2004.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. **Food Science and Technology**, v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005.

SAQID, A. N. *et al.* Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, p. 641-646, 2010.

ŠEDOVIÁ, M. *et al.* Production of fructosyltransferase in mechanically stirred and air-lift bioreactors. **Chemical Papers**, v. 12, p. 1639-1648, 2014.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Enzymes. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2ª Edição. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall PTR, 2002. p. 57-104.

SINGH, A. *et al.* Methods of Enzyme Immobilization and Its Applications in Food Industry. *In*: KUDDUS, Mohammed. **Enzymes in Food Technology**. Hail: Springer, 2018. p.103-124.

SINGH, S. P. *et al.* Prebiotic Oligosaccharides: Special Focus on Fructooligosaccharides, Its Biosynthesis and Bioactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 12, p. 613-635, set. 2017.

SOUZA, P. M. *et al.* Kinect and thermodynamics studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17-21, 2015.

TÁMBARA, Y. *et al.* Structural analysis and optimised production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 117-121, 1999.

TAMMER, M. G. Sokrates: Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, n. 235, 2004.

TOLKIEN, J. R. R. **A Sociedade do Anel: Primeira Parte de O Senhor dos Anéis**. Tradução de RONALD KYRMSE. 1ª. ed. Harper Collins, 2019. p. 385.

TSAI, W. T. *et al.* Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification with CO₂. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 203-208, 2001.

UHM, T. B. *et al.* Synthesis of new oligosaccharides from raffinose by *Aspergillus niger* fructosyltransferase. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 169-171, 1999.

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

VASCONCELOS, N. M. D.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. D. 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. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Fortaleza, v. 88, 2013.

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

WANG, S. *et al.* Enhanced production of fructosyltransferase in *Aspergillus oryzae* by genome shuffling. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 3, p. 391-396, 2016.

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

YUN, J. W.; SONG, S. K. Continuous Production of Fructooligosaccharides Using Fructosyltransferase Immobilized on Ion Exchange Resin. **Biotechnology Techniques**, v. 9, p. 18-21, 1996.