

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NATHÁLIA ROMANI BARBOSA

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM ESPONJA DE
POLIURETANO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS**

Poços de Caldas/MG

2022

NATHÁLIA ROMANI BARBOSA

IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM ESPONJA DE
POLIURETANO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA 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.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Michelle C. A. Xavier

Poços de Caldas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Barbosa, Nathália Romani.

Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja de poliuretano para a produção enzimática de fruto-oligossacarídeos / Nathália Romani Barbosa. - Poços de Caldas, MG, 2022.

92 f. : il. -

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.

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

Bibliografia.

1. Fruto-oligossacarídeos. 2. Frutosiltransferase. 3. *Aspergillus oryzae*. 4. Células imobilizadas. 5. Poliuretano. I. Perna, Rafael Firmani, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

NATHALIA ROMANI BARBOSA

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM ESPONJA DE POLIURETANO
PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

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

Aprovada em: 16 de dezembro de 2022.

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

Dr. Alfredo Eduardo Maiorano
Instituição: Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Instituição: Universidade Estadual de Campinas



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2023, às 10:01, 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 **Everson Alves Miranda, Usuário Externo**, em 14/07/2023, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alfredo Eduardo Maiorano, Usuário Externo**, em 18/07/2023, às 13:33, 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 **1037366** e o código CRC **BAC72D2A**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela presença durante essa caminhada, por me conceder saúde durante toda a pandemia da COVID-19.

Aos meus pais Romildo e Cássia, a minha irmã Débora, que sempre me apoiaram, incentivaram e nunca mediram esforços para me ajudar, que contribuírem diretamente na minha formação profissional e pessoal. Eu sou muito grata por ter vocês em minha vida. Agradeço a confiança que sempre depositaram em mim. Ao meu namorado Pedro pelo suporte ao longo desses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, pela oportunidade concedida em fazer parte do grupo de pesquisa, apoio, paciência e todo o conhecimento transmitido no decorrer dos experimentos.

A minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Michelle da Cunha Abreu Xavier, por acompanhar e enriquecer as discussões pertinentes ao trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP) pelo fornecimento da cepa microbiana e auxílio na realização das análises laboratoriais.

Aos amigos e parceiros de pesquisa, em especial a Mariana, que sempre se fez presentes e dispostos a compartilhar conhecimentos, mesmo durante momentos de incerteza, amizade e companheirismo durante o mestrado.

A Érica e João César, alunos de IC, por todo o auxílio prestado na realização dos experimentos.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pelos conhecimentos fornecidos ao longo dos anos.

Aos técnicos e funcionários da UNIFAL-MG, em especial Talita e Jucilene, por estarem sempre dispostos a ajudar e disponibilizar os recursos necessários à pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa e pelo financiamento deste projeto de pesquisa (Processo APQ-00085-21), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro (CNPq – Processo 404912/2021-4) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose benéficos à saúde e nutrição humana por exibirem propriedades nutracêuticas. Sua produção ocorre por reação de transfrutosilação em moléculas de sacarose catalisadas por enzimas frutossiltransferases (FTase, E.C.2.4.1.9) aderidas às células microbianas. A imobilização de células em materiais de suporte permite obter biocatalisadores heterogêneos robustos e resistentes às condições adversas do meio reacional. Esponjas de poliuretano (EPU) são suportes indicados para a imobilização por apresentarem estabilidades térmica e mecânica, além de tamanho e distribuição de poros que possibilitam a difusão gasosa e de substrato, essenciais para o crescimento microbiano. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, por cultivo celular submerso, e sua imobilização concomitante em esponjas de EPU. Para isso, foram investigados a capacidade de crescimento e adsorção das células em função do tempo de cultivo e da atividade de transfrutosilação (A_T), assim como realizados estudos de caracterização das propriedades bioquímicas e de estabilidade das células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas, visando obter biocatalisadores robustos, estáveis e ativos para a síntese de FOS. A produção das células microbianas, confinadas em EPU, ocorreu em meio de cultura sintético, pH 5,5, 200 rpm à 30 °C. A curva de crescimento microbiano mostrou que o melhor tempo de cultivo celular ocorreu para 32 h de processo. A temperatura de 50 °C, o pH de 5,5 e a concentração de 480,2 g L⁻¹ foram os parâmetros do meio reacional que forneceram os máximos valores de A_T . A avaliação da cinética enzimática mostrou que o modelo de Hill se ajustou satisfatoriamente aos perfis cinéticos apresentados para ambos os biocatalisadores. Parâmetros termodinâmicos indicaram que as células imobilizadas proporcionaram um aumento da termoestabilidade do biocatalisador. Os ensaios de estabilidade frente ao pH mostraram que ambas as células (imobilizadas e imobilizadas e reticuladas) mantiveram estáveis em uma faixa de pH entre 4,5 e 6,0 e retiveram até 40 % de A_T inicial quando armazenadas por 28 dias sob refrigeração. Por fim, os resultados de estabilidade operacional indicaram que as células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas retiveram 50,23% e 60,90% de suas atividades enzimáticas iniciais, respectivamente, após 12 ciclos reacionais consecutivos, alcançando uma produção média de 100 g L⁻¹ de FOS. Esse conjunto de resultados evidencia a potencialidade da aplicação de células catalíticas, imobilizadas em EPU, na produção de FOS e representa o início de uma sequência de estudos sobre a imobilização dessas células microbianas, por adsorção, em diferentes materiais de suporte para a obtenção de biocatalisadores na síntese de bioprodutos de interesse industrial e na implementação de bioprocessos diversos.

Palavras-chave: células; *Aspergillus*; imobilização; poliuretano; fruto-oligossacarídeos.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are fructose oligomers beneficial to human health and nutrition by exhibiting nutraceutical properties. Their production occurs by transfructosylation reaction on sucrose molecules catalyzed by fructose-transferase enzymes (FTase, E.C.2.4.1.9) adhered to microbial cells. Immobilization of cells on support materials allows to obtain heterogeneous biocatalysts that are robust and resistant to the adverse conditions of the reaction medium. Polyurethane (EPU) sponges are suitable supports for immobilization because they present thermal and mechanical stabilities, besides pore size and distribution that allow gas and substrate diffusion, essential for microbial growth. Therefore, the objective of this work was to evaluate the production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells, by submerged cell culture, and its concomitant immobilization in EPU sponges. To this end, the growth capacity and uptake of the cells as a function of culture time and transfructosylation (TA) activity were investigated, as well as characterization studies of the biochemical properties and stability of the immobilized and immobilized/reticulated cells, aiming to obtain robust, stable and active biocatalysts for FOS synthesis. The production of the microbial cells, confined in EPU, occurred in synthetic culture medium, pH 5.5, 200 rpm at 30 °C. The microbial growth curve showed that the best cell culture time occurred for 32 h of process. The temperature of 50 °C, pH 5.5 and concentration of 480.2 g L⁻¹ were the parameters of the reaction medium that provided the maximum values of AT. Evaluation of the enzyme kinetics showed that the Hill model fitted satisfactorily to the kinetic profiles presented for both biocatalysts. Thermodynamic parameters indicated that the immobilized cells provided an increase in the thermostability of the biocatalyst. The pH stability tests showed that both cells (immobilized and immobilized and reticulated) were stable over a pH range between 4.5 and 6.0 and retained up to 40% initial AT when stored for 28 days under refrigeration. Finally, the results of operational stability indicated that the immobilized and immobilized and reticulated cells retained 50.23% and 60.90% of their initial enzymatic activities, respectively, after 12 consecutive reaction cycles, reaching an average production of 100 g L⁻¹ of FOS. This set of results shows the potentiality of the application of catalytic cells, immobilized in EPU, in the production of FOS and represents the beginning of a sequence of studies on the immobilization of these microbial cells, by adsorption, in different support materials to obtain biocatalysts in the synthesis of bioproducts of industrial interest and in the implementation of various bioprocesses.

Key Words: cells; *Aspergillus*; immobilization; polyurethane; fructooligosaccharides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de FOS a partir da sacarose pela frutossiltransferase.....	21
Figura 2 – Diagrama de blocos simplificado das etapas da metodologia aplicada...	39
Figura 3 - EPU comercial previamente cortadas a cubos de 0,8 cm de aresta para a imobilização de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301.....	40
Figura 4 - Cubos de EPU contendo células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas durante o cultivo celular submerso.	41
Figura 5 – Cubos de EPU contendo células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas e reticuladas com solução de glutaraldeído 25% (v v ⁻¹).	43
Figura 6 - Concentração de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301, imobilizadas em partículas cúbicas de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm), e concentração dos açúcares sacarose [S], glicose [G] e frutose [F] em função do tempo de cultivo celular.....	51
Figura 7 – Imagens de MEV.....	52
Figura 8 - Influência do tempo de cultivo celular nas atividades de transfrutossilatação (A _T) de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm) e progressão do pH do meio de cultura em função do tempo de cultivo celular.	55
Figura 9 - Influência da temperatura do meio reacional nas atividades de transfrutossilatação de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm).....	57
Figura 10 - Influência do pH do meio reacional nas atividades de transfrutossilatação de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm).	59
Figura 11 - Influência da concentração de substrato nas atividades de transfrutossilatação de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm) e na concentração de FOS.	60
Figura 12 - Ajuste dos resultados experimentais ao modelo cinético de Hill para células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em matrizes cúbicas de esponjas de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm).	62

Figura 13 - Ajuste dos resultados experimentais ao modelo cinético de Hill para células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada/reticuladas em matrizes cúbicas de esponjas de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm)	63
Figura 14 - Estabilidade operacional de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponjas de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm) e concentração de FOS avaliadas durante ciclos reacionais consecutivos em batelada	65
Figura 15 - Estabilidade frente ao pH de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponjas de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm)	67
Figura 16 - Perfil de estabilidade térmica das células de <i>A. oryzae</i> IPT-301, com atividade de transfrutossilacção, imobilizadas em matriz de esponja de poliuretano (A) e imobilizadas e reticuladas em matriz de esponja de poliuretano (B) (0,8 x 0,8 x 0,8 cm) ao decorrer de 36 horas de incubação para diferentes temperaturas	68
Figura 17 - Determinação da energia de ativação de desnaturação térmica (E_D)	69
Figura 18 - Determinação da energia de ativação de desnaturação térmica (E_D)	70
Figura 19 – Perfis de estabilidade de armazenamento das células de <i>A. oryzae</i> IPT-301, com atividade de transfrutossilacção, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matriz cúbica de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm)	74
Figura 20 - Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR).....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de FOS, em porcentagem de massa fresca, em algumas plantas e vegetais.	21
Tabela 2 - Microrganismos produtores de FTase E.C. 2.4.1.9.	25
Tabela 3 - Definição da atividade de transfrutoseilação por diferentes autores	26
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos e coeficiente de determinação de erros obtidos para o modelo cinético de Hill para células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja de poliuretano e imobilizada/reticuladas.	62
Tabela 5 - Parâmetros termodinâmicos obtidos para as células de <i>A. oryzae</i> IPT-301, com atividade de transfrutoseilação, imobilizadas (CI) e imobilizadas e reticuladas (CIR) em matriz de esponja de poliuretano.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE/HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EPU	Espuma de Poliuretano
FOS	Fruto-oligossacarídeos
FTase	Frutofuranosiltransferase
IPT	Instituto de Pesquisa e Tecnologia
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PU	Poliuretano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS	20
3.2	FRUTOSILTRANSFERASE E ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO	24
3.3	CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	26
3.4	ESTABILIDADE ENZIMÁTICA.....	27
3.4.1	Efeitos da temperatura e estabilidade térmica	27
3.4.2	Efeitos do pH na atividade enzimática	30
3.5	IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS.....	31
3.5.1	Tipos de suporte	32
3.5.2	Esponja de poliuretano	32
3.6	RETICULAÇÃO DE CÉLULAS.....	34
3.6.1	Aplicação de glutaraldeído como agente reticulante	35
3.7	IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS VISANDO A PRODUÇÃO DE FOS	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	SÍNTESE DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO	38
4.1.1	Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo	38
4.1.2	Preparo do material de suporte	40
4.1.3	Preparo do meio de cultivo	40
4.2	CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO	41
4.3	MONITORAMENTO DO PH DO MEIO DE CULTURA	42
4.4	ENSAIOS DE RETICULAÇÃO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS	42
4.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO BIOCATALISADOR	43
4.6	ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E DE ESTABILIDADE	44
4.6.1	Influência da temperatura do meio reacional na atividade enzimática	44
4.6.2	Influência do pH do meio reacional na atividade enzimática	44

4.6.3	Influência da concentração de substrato do meio reacional na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos	44
4.6.4	Ensaio de estabilidade operacional	45
4.6.5	Ensaio de estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos	45
4.6.6	Ensaio de estabilidade frente ao ph de incubação	46
4.6.7	Ensaio de estabilidade de armazenamento	46
4.7	MÉTODOS ANALÍTICOS	46
4.7.1	Determinação da atividade enzimática	46
4.7.2	Quantificação dos açúcares do meio reacional	47
4.7.3	Quantificação de açúcares durante o cultivo microbiano e de fruto-oligossacarídeos	49
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO E MONITORAMENTO DO PH DO MEIO DE CULTURA	50
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E ESTABILIDADE DAS CÉLULAS IMOBILIZADAS E IMOBILIZADAS E RETICULADAS	56
5.2.1	Influência da temperatura do meio reacional na atividade enzimática	56
5.2.2	Influência do ph do meio reacional na atividade enzimática	58
5.2.3	Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos	60
5.2.4	Estabilidade operacional	64
5.2.5	Estabilidade enzimática frente ao pH	66
5.2.6	Estabilidade térmica das células integras imobilizadas	68
5.2.7	Estabilidade de armazenamento das células integras imobilizadas	74
6	CONCLUSÃO	76
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE A	92

1 INTRODUÇÃO

A mudança de hábitos alimentares tem despertado, na indústria de alimentos, o interesse pela pesquisa, desenvolvimento e produção de edulcorantes funcionais, das quais constituem, atualmente, a composição nutricional de diversos produtos introduzidos no mercado. Os fruto-oligossacarídeos (FOS), desde então, tem melhor representado a classe de nutracêuticos e, portanto, mostrado maior relevância industrial para a saúde e nutrição humana e animal (CUNHA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2022; GONÇALVES *et al.*, 2020).

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

A produção de FOS ocorre mediante a reação de transfrutossilacção de moléculas de sacarose, catalisadas por enzimas de origem microbiana como as frutossiltransferases (FTase, E.C.2.4.1.9), as quais apresentam elevada atividade de transfrutossilacção (CUNHA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2022; FLORES-MALTOS *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; MAIORANO *et al.*, 2020; PERNA *et al.*, 2018). As FTases são sintetizadas, majoritariamente, por fungos dos gêneros *Aureobasidium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (CASTRO *et al.*, 2017; ANTOSOVÁ *et al.*, 2008), podendo ser excretadas para o meio de cultura, como enzima extracelular solúvel e/ou aderidas nas células microbianas, como enzima micelial. Especificamente, o *Aspergillus oryzae* IPT-301 tem sido reportado como fonte potencialmente produtora da FTases, com elevada atividade de transfrutossilacção, dentre as dezessete linhagens de fungos filamentosos avaliadas (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007). Para a produção máxima de FOS em nível

industrial, é necessário o desenvolvimento de enzimas com alta atividade e estabilidade. Isso tem atraído a atenção de biotecnólogos e microbiologistas em todo o mundo (GANAIE *et al.*, 2104).

A abundância de matéria-prima (sacarose), o valor agregado ao produto de interesse (FOS), comercializado por € 150 /kg (CHOUKADE; KANGO, 2021) e, principalmente, o mercado mundial de FOS, estimado em US\$ 2,8 bilhões com perspectiva de crescimento anual de 5,0 % entre os anos de 2021 e 2027, tornam a produção industrial atrativa para esse açúcar nutracêutico (ABSOLUTE REPORTS, 2021; MORDOR INTELLIGENCE, 2017). No entanto, o Brasil ainda não possui tecnologia eficaz para a sua produção em larga escala que corresponda à demanda existente, suprida por importações. Os custos relacionados à produção enzimática e ao rendimento reacional continuam desafiadores frente ao escalonamento do processo. O uso de enzimas requer a recuperação e a reutilização destas para tornar o processo economicamente viável (SOUZA *et al.*, 2017). A produção de FOS com FTase solúvel, mediante biocatálise homogênea, pode gerar altos custos de síntese e purificação da enzima, instabilidade da sua estrutura tridimensional quando isolada do seu ambiente natural e possível perda de atividade devido às condições do processo ou inibição pelo substrato e/ou produto. Além disso, as enzimas solúveis contaminam o produto desejado e muitas vezes não podem ser recuperadas do meio reacional na forma ativa (KRAJEWSKA, 2004).

Em engenharia de bioprocessos, o aperfeiçoamento de técnicas de imobilização de células com atividade biocatalítica e a exploração de materiais de suportes orgânicos de baixo custo para este fim são fundamentais para o desenvolvimento de biocatalisadores heterogêneos estáveis que possibilitem a produção viável, sustentável e em larga escala de bioprodutos de interesse comercial nas indústrias farmacêuticas e de alimentos, e que oferecem propriedades terapêuticas e nutricionais à saúde e nutrição humana (CASTRO *et al.*, 2017; GUIBAN, 2013). Portanto, a aplicação de células imobilizadas, por adsorção, pode se tornar uma alternativa promissora frente às problemáticas levantadas. A imobilização consiste em confinar, física ou quimicamente, células microbianas a um suporte sólido insolúvel em meio aquoso ou solvente orgânico, obtendo-se um biocatalisador heterogêneo com elevada especificidade,

seletividade e estabilidade (DWEVEDI, 2016). Desta forma, a imobilização tem sido considerada uma técnica promissora para tornar a aplicação de enzimas usual no setor industrial (SOUZA *et al.*, 2017).

A aplicação de células imobilizadas permite obter biocatalisadores heterogêneos robustos, estáveis e resistentes às condições adversas do ambiente reacional, como temperatura e pH, reutilizáveis e relativamente fáceis de serem separados do produto, além da possibilidade de implementar e conduzir processos contínuos (SHELDON, 2007; SOUZA *et al.*, 2017).

Usualmente, a fabricação industrial de bioprodutos enzimáticos envolve três fases: (i) a produção e purificação da enzima, mediante processos fermentativos e de separação; (ii) a imobilização da enzima para maior estabilidade térmica, operacional e frente ao pH, utilizando-se de técnicas como encapsulação, reticulação e adsorção; e, (iii) a otimização das condições de reação tais como concentração de substrato, pH e temperatura (DWEVEDI, 2016).

Ressalta-se ainda que, a imobilização de células é considerada mais vantajosa que a de enzimas porque não necessita das etapas de extração ou purificação prévia da proteína, já que utiliza a própria estrutura celular como suporte natural da enzima. Inclusive, a imobilização de células por encapsulação e reticulação têm possibilitado a preparação de biocatalisadores estáveis, com aplicação em biorreatores de leitos fixo (PBR) e fluidizado (FBR) para a produção de FOS (DIAS *et al.*, 2022; GANAIE *et al.*, 2014; LORENZONI *et al.*, 2015; ZAMBELLI *et al.*, 2016).

Entre os numerosos suportes reportados na literatura, a esponja de poliuretano (EPU) tem sido identificada como suporte orgânico promissor no processo de imobilização de células por adsorção (KILONZO *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2015). Castro *et al.*, (2017) avaliaram a imobilização de células de *Aureobasidium pullulans* em EPU, fibras vegetais, peneiras moleculares e esponjas de vidro e reportaram os maiores rendimentos de FOS para células imobilizadas em EPU reticulada. As EPUs apresentam elevada área específica com interstícios para o crescimento celular, porosidade uniforme que possibilita a troca gasosa, o fluxo de substrato e produtos metabólicos, boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica, resistência à degradação enzimática, além de proporcionarem fácil imobilização. (SOARES *et al.*, 2012). Portanto, tais

características evidenciam o uso potencial do suporte para a imobilização de células com atividade biocatalítica durante processos fermentativos.

Diante disso, o presente trabalho aborda as etapas de produção e imobilização de células de *A. oryzae* IPT-301, com atividade de FTase, durante o cultivo celular submerso em meio de cultura sintético.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Imobilizar células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja de poliuretano durante o cultivo celular submerso e caracterizá-las visando obter um biocatalisador heterogêneo ativo e estável para a síntese de fruto-oligossacarídeos (FOS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

- *Quanto a síntese do biocatalisador heterogêneo*
 - a) produzir células de *A. oryzae* IPT-301 por cultivo celular submerso em meio de cultura sintético e imobilizá-las, concomitantemente, em esponjas de poliuretano;
 - b) determinar a capacidade de crescimento das células biocatalíticas nas esponjas de poliuretano em função do tempo de cultivo e da atividade enzimática mediante a avaliação da curva de crescimento microbiano;
 - c) reticular, com glutaraldeído, as células biocatalíticas imobilizadas em esponjas de poliuretano;
 - d) realizar a caracterização física do material de suporte nas condições *in natura*, com células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

- *Quanto aos estudos de caracterização das propriedades bioquímicas e de estabilidade do biocatalisador*
 - a) avaliar os efeitos da temperatura, do pH e da concentração de substrato do meio reacional nas atividades de transfrutossilacção para os biocatalisadores, imobilizado e imobilizado e reticulado;

- b) obter os parâmetros cinéticos para os biocatalisadores, imobilizado e imobilizado e reticulado, por meio de ajustes de modelos enzimáticos de velocidades de reação, reportados na literatura, aos dados experimentais obtidos;
- c) avaliar as estabilidades térmica, de armazenamento e frente ao pH de incubação dos biocatalisadores, imobilizado e imobilizado e /reticulado, assim como obter seus parâmetros termodinâmicos;
- d) monitorar o desempenho dos biocatalisadores, imobilizado e imobilizado e reticulado, em ciclos consecutivos em bateladas para avaliação de suas estabilidades operacionais e síntese de FOS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

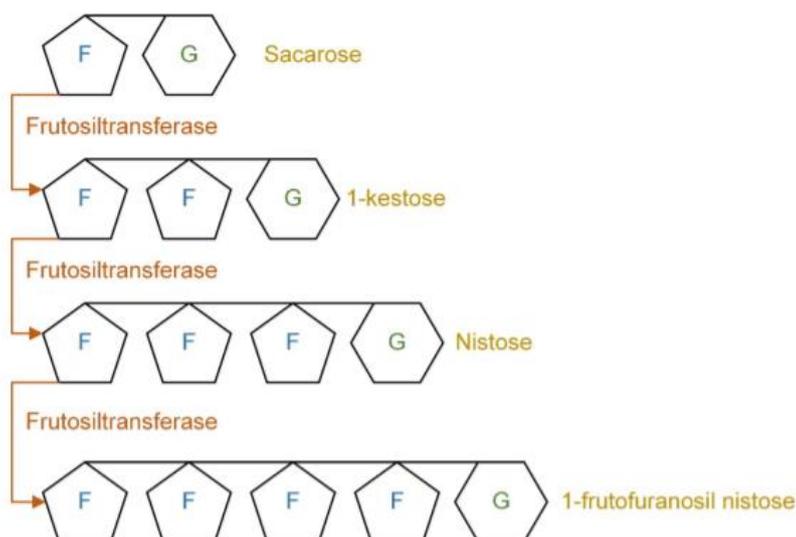
3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Os carboidratos são nutrientes básicos e representam a principal fonte de energia da dieta. Encontram-se naturalmente nos alimentos de origem vegetal ou animal, e podem ser adicionados como ingredientes, durante o processamento. São classificados em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (DAMODARAN *et al.*, 2010; ORDÓNEZ *et al.*, 2005; ZAKRZEWSKA *et al.*, 2010).

As fibras são carboidratos não digeríveis, podendo ser classificadas segundo as suas características químicas, botânicas e fisiológicas (COSTA, 2012). Nesse grupo, destacam-se os frutanos, que compreendem polímeros naturais formados por frutose, ligada ou não a uma molécula terminal de sacarose. Os frutanos podem ser classificados em levanas [polímeros lineares com ligações glicosídicas $\beta(2\rightarrow6)$], compostos ramificados [polímeros que possuem ligações tipo $\beta(2\rightarrow6)$ e $\beta(2\rightarrow1)$] e inulina [polímero linear com ligações glicosídicas $\beta(2\rightarrow1)$]. Os fruto-oligossacarídeos (FOS), por sua vez, pertencem ao grupo da inulina (LORENZONI *et al.*, 2014; ROBERFROID, 1993; SHIOMI *et al.*, 2016) e, nos últimos anos, têm despertado grande interesse das indústrias de alimentos dadas suas propriedades tecnológicas e funcionais (SINGH *et al.*, 2016).

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos pertencentes ao grupo dos frutanos, os quais podem ser encontrados na natureza. O termo FOS é utilizado para frutanos do tipo inulina que apresentam ou não um grupo terminal de glicose. Na composição dos FOS, de duas a nove unidades de frutose estão ligadas através de ligações glicosídicas $\beta(2\rightarrow1)$ e a ligação com a glicose é do tipo $\alpha(1\rightarrow2)$ como ocorre na sacarose. Os FOS são encontrados, principalmente, nas formas de 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄), mostrados na figura 1 (ANTOSOVÁ *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2010; VEJA *et al.*, 2015; YUN, 1996).

Figura 1 - Produção de FOS a partir da sacarose pela frutossiltransferase



Fonte: Macedo; Vimercati; Araújo (2020, p. 4)

Os FOS são compostos de origem natural e podem ser encontrados em mais de 36 mil espécies de plantas. (L'HOMME *et al.*, 2003; MUSSATTO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2003) (Tabela 1)

Tabela 1 - Teor de FOS, em porcentagem de massa fresca, em algumas plantas e vegetais

Alimentos	FOS (%)
Alcachofra	<1
Alcachofra de Jerusalém	10-15
Alho	3,6-6,4
Alho-poró	2,4-8,0
Aspargos	2-3
Banana	0,3-0,7
Cebola	1,1-7,5
Centeio	0,5-1
Cevada	0,5-1,5
Chicória	05-10
Trigo	1-4
Yacon	3-19

Fonte: Adaptado de Singh (2010) e Alles (2012).

A obtenção comercial dos FOS pode ocorrer a partir de fontes vegetais, seja por extração direta ou por hidrólise enzimática da inulina (ANTOSOVÁ *et al.*, 2001; SANGEETHA *et al.*, 2005; VORAGEN, 1998). Além disso, um terceiro método consiste na síntese de FOS pela transfrutossilacção da sacarose (ANTOSOVÁ *et al.*, 2001; SANGEETHA *et al.*, 2005; VORAGEN, 1998).

No primeiro caso, a extração dos FOS é economicamente inviável devido ao baixo rendimento e elevado custo do processo. Desta forma, entre os métodos comerciais, esse é o menos utilizado (FIGUEROA-GONZÁLEZ *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2016). No segundo caso, a inulina pode ser extraída por diversos métodos, tais como por difusão em água quente e ultrassom (LINGYUN *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2015).

Para a produção dos FOS, a inulina sofre uma hidrólise enzimática realizada por enzimas inulinases, formando unidades lineares com duas a sete unidades de frutossil com ou sem uma unidade de glicose terminal. As inulinases são classificadas em endo e exoinulinase, podendo ser obtidas a partir de tecidos de plantas e por microrganismos, respectivamente. No entanto, o uso de enzimas oriundas de plantas é limitado devido às condições sazonais e ao baixo rendimento para a produção do açúcar. As endoinulinases hidrolisam aleatoriamente a inulina para a produção de uma mistura de FOS com diferentes graus de polimerização. Já, as exoinulinases hidrolisam a ligação $\beta(2\rightarrow1)$ a partir da extremidade não redutora da inulina (COURTIN *et al.*, 2009; MORRIS *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2016; VORAGEN, 1998).

Na terceira situação, os FOS são sintetizados pela transfrutossilacção em resíduos de sacarose, realizada pelas enzimas frutossiltransferases ou β -frutofuranosidases (BLANCH *et al.*, 2011). As estruturas dos produtos dessa reação dependem da origem das enzimas utilizadas na síntese. Essas enzimas podem ser produzidas pelos fungos *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sydowi*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium rugulosum* e *Scopulariopsis brevicaulis*, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e pela bactéria *Bacillus macerans* (Antošová & Polakovič, 2001). De modo geral, os FOS obtidos pelo processo de síntese enzimática apresentam entre uma e cinco unidades de frutossil (PASSOS *et al.*, 2003). Esses FOS são produzidos e comercializados como Neosugar® (Neolife Corporate S.L.) e Nutraflora® (Ingredion) (FORTES *et al.*, 2009).

Os FOS possuem um perfil adoçante semelhante ao da sacarose, mas com cerca de 35% da sua doçura. Devido a essa característica, podem substituir o açúcar parcial ou totalmente, se combinado com edulcorantes de alta intensidade, fornecendo um perfil de sabor balanceado e mascarando o sabor residual (GONZALEZTOMAS *et al.*, 2008). Como possuem propriedades semelhantes às da sacarose, também podem ser usados para melhorar o “*mouthfeel*” (sensação bucal) dos produtos em que são adicionados, mas sem formar cristais (MEYER *et al.*, 2011; TÁRREGA *et al.*, 2011). Como não possuem sabores indesejáveis e não alteram a viscosidade dos produtos, diferentemente de outras fibras, possibilitam o desenvolvimento de alimentos ricos em fibras, semelhantes aos originais. A sua alta solubilidade ainda permite que ele seja utilizado em produtos lácteos; isso aumenta a ação das culturas probióticas adicionadas, exercendo efeito simbiótico (FRANCK, 2002; NINESS, 1999).

Os FOS são considerados como prebióticos e fibras solúveis, ou seja, são componentes alimentares que não sofrem hidrólise pelas enzimas no trato digestivo, chegando intactos ao intestino grosso. Posteriormente, são fermentados, levando à produção de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), com consequente diminuição do pH no intestino grosso. Desta forma, o crescimento de bactérias benéficas ao cólon, como bifidobactérias e lactobacilos, é favorecido. (GIBSON *et al.*, 1995; ROBERFROID, 1993) Sabe-se que as bifidobactérias e os lactobacilos são classificados como micro-organismos benéficos ao cólon intestinal em termos de saúde e nutrição, promovendo uma redução da incidência de doenças intestinais, enquanto alguns micro-organismos, como a *Escherichia coli* e o *Clostridium perfringens* são classificados como prejudiciais (HIDAKA *et al.*, 1986; WANG, 2015).

Vaz-Tostes *et al.* (2014) avaliou o efeito do FOS sobre o estado nutricional de ferro e zinco, e biomarcadores de resposta imune em crianças em idade pré-escolar, foi observado que o FOS melhorou a resposta imune intestinal. Lobo *et al.* (2006) verificaram que, em ratos saudáveis alimentados com uma dieta contendo 5 % de FOS, promoveu-se uma redução do pH luminal, contribuindo para uma melhor absorção de cálcio e magnésio, e evidenciando o papel importante dos FOS na manutenção da saúde dos ossos.

De acordo com as alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde, da ANVISA, os FOS podem ser utilizados desde que a recomendação de consumo diário do produto pronto como um todo para consumo forneça, no mínimo, 5 gramas de FOS, sendo que a porção especificada pelo produto deve fornecer, no mínimo, 2,5 gramas.

O uso do ingrediente não deve ultrapassar 30 gramas na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).

Os aspectos relacionados à estabilidade dos FOS são de suma importância, visto que a sua adição em produtos processados pode acarretar a sua degradação e consequente perda do efeito prebiótico. Os FOS são açúcares não redutores. Esses compostos são estáveis a pH entre 3 e 7, e à temperatura de até 140 °C. A maioria dos processos térmicos, portanto, não é capaz de degradar os FOS. Além disso, por serem não redutores, não são susceptíveis a reação de MAILLARD e caramelização (COURTIN *et al.*, 2009; PASSOS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2007).

3.2 FRUTOSILTRANSFERASE E ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

A síntese de FOS ocorre mediante a reação de transfrutosilação de moléculas de sacarose. As enzimas frutossiltransferases (FTase, E.C.2.4.1.9) apresentam elevada atividade de transfrutosilação e realizam a catálise da transferência de um grupo frutossil para uma molécula de sacarose para a produção de FOS (CUNHA *et al.*, 2019; FLORES-MALTOS *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2020; PERNA *et al.*, 2018).

As fontes para obtenção da FTases podem ser de origem vegetal ou microbiana sintetizadas majoritariamente por fungos que tem como fonte os microrganismos listados na tabela 2. (BRENDA, 2018)

As frutossiltransferases obtidas da cepa de *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresentaram elevada atividade de transfrutosilação, tanto na forma micelial quanto na forma extracelular, o que faz com que esse microrganismo tenha grande potencial para aplicação industrial (CUERVO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

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

Tabela 2 - Microrganismos produtores de FTase E.C. 2.4.1.9.

Microrganismo	
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533
<i>Aspergillus japonicus</i> FCL 119T	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Aspergillus japonicus</i> JN19	<i>Lactobacillus reuteri</i> 121
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.106
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Aspergillus oryzae</i> CRF 202	<i>Leuconostoc citreum</i> CW2.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Leuconostoc citreum</i> CW28
<i>Aureobasidium pullulans</i> CFR77	<i>Paenibacillus macerans</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i> KCCM12017	<i>Paenibacillus macerans</i> EG-6
<i>Aureobasidium</i> sp	<i>Paenibacillus macerans</i> EG-7
<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Penicillium citrinum</i> FERM P-15944
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20604	<i>Penicillium purpurogenum</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Thermothelomyces heterothallica</i>

Fonte: Adaptado de BRENDA, 2018.

$$GF_n + GF_n FTase \leftrightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1} \quad (1)$$

em que G e F referem-se às moléculas de glicose e frutose, respectivamente. Quando o índice n tem o valor de um, temos a molécula de sacarose (GF). Os demais termos representam os oligossacarídeos formados, sendo mais comumente formados oligossacarídeos apresentando duas unidades frutossil (GF_2 , 1-kestose), três unidades (GF_3 , nistose) e quatro unidades frutossil (GF_4 , frutofuranosilnistose)

A atividade de transfrutossilização, At , possui diversas definições de acordo com o autor, divergindo em função da molécula transferida em função do tempo e, tais definições (Tabela 3).

Tabela 3 - Definição da atividade de transfrutossilacção por diferentes autores

Definição	Autores
Quantidade de enzima que transfere 1 μ mol de frutose por minuto	(CHEN; LIU, 1996), (DORTA <i>et al.</i> , 2006), (HAYASHI <i>et al.</i> , 1990), (KURAKAKE; ONOUE; KOMAKI, 1996), (VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011). (CUNHA <i>et al.</i> , 2019), (GONÇALVES <i>et al.</i> , 2020), (GARCIA <i>et al.</i> , 2021) e (DIAS <i>et al.</i> , 2022)
Quantidade de enzima que libera 1 μ mol de glicose por minuto	(PARK; OH; YU, 2001) e (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005)
Quantidade de enzima que produz 1 μ mol de 1-kestose por minuto	(L'HOCINE <i>et al.</i> , 2000) e (VANDÁKOVÁ <i>et al.</i> , 2004).
Quantidade de enzima capaz de produzir 1 μ mol da mistura de FOS por minuto, sendo esta composta por 1-kestose, 1-nistose e 1-frutofuranosilnistose	(OTTONI <i>et al.</i> , 2012).

Fonte: Adaptado de DIAS (2020).

3.3 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Qualquer etapa do metabolismo é uma reação química e a grande maioria de reações em sistemas vivos são catalisadas e a complexa teia do metabolismo é possível através de enzimas. Catalisada por enzima ou não, uma reação química é melhor compreendida através dos princípios fundamentais da cinética química e da termodinâmica. Vários fatores influenciam a velocidade de uma reação. Entre eles, destacam-se: concentração dos reagentes, temperatura do sistema e presença de um catalisador. Desta forma, são obtidas equações empíricas ou modelos matemáticos para o comportamento enzimático em função dos fatores que mais afetam sua

cinética. Uma equação de taxa dá a dependência observada experimentalmente de taxa de concentração dos reagentes. (PUNEKAR, 2018)

O modelo de Hill é apresentado na Equação (2), em que V é a taxa de reação, $K_{0,5}$ é a concentração de substrato em que a velocidade de reação é metade da velocidade máxima, representando a afinidade entre a enzima e o substrato, $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de reação, $[S]$ é a concentração do substrato e n é o coeficiente de Hill (WEISS, 1997).

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]^n}{[S]^n(K_{0,5})^n} \quad (2)$$

O coeficiente de Hill (n) representa a cooperatividade da ligação entre enzima e substrato. A cooperatividade é positiva quando n assume valores maiores do que 1, indicando a presença de mais de um sítio de ligação na enzima ou a possibilidade de formação de subunidades múltiplas da enzima, cada uma com um sítio de ligação com o substrato. Quando o valor do coeficiente de Hill (n) é 1, a Equação 2 passa a representar uma cinética de Michaelis- Menten (WEISS, 1997).

Vale ressaltar, que no estudo a cinética enzimática, a concentração de um substrato afeta diretamente na atividade de uma determinada enzima, no qual as demais condições de ensaio são fixadas e analisa-se como a atividade varia em relação a concentração desse substrato. Inicialmente, com o aumento da concentração de substrato, aumenta-se a velocidade da reação. Todavia, quando a concentração de substrato é relativamente alta à concentração de enzima, a velocidade da reação não aumenta mais e a enzima pode estar saturada de substrato (FONTES, 2005).

3.4 ESTABILIZADE ENZIMÁTICA

3.4.1 Efeitos da temperatura e estabilidade térmica

As moléculas das enzimas são altamente susceptíveis ao processo de desnaturação térmica quando expostas a condições fora do seu microambiente. O processo de desnaturação envolve a alteração de estruturas secundárias ou terciárias

que podem afetar a conformação nativa da enzima e sua estabilidade (BADGUJAR; BHANAGE, 2017).

Os dados termodinâmicos das reações catalisadas por enzimas são essenciais para prever sua extensão em qualquer processo em que ocorram, e a estabilidade térmica da enzima diz respeito aos aspectos termodinâmicos. Enquanto a atividade de uma enzima é medida pela reação química catalisada por ela, sua estabilidade está relacionada à sua atividade relativa (GOHEL *et al.*, 2007).

A taxa de reação enzimática é diretamente afetada pela temperatura, de modo que até um valor limite, à medida que ela aumenta, tem-se um incremento na energia cinética das moléculas que compõem o sistema, aumentando a mobilidade entre elas e, conseqüentemente a frequência de colisões entre substratos e os sítios ativos das enzimas. Desse modo, para cada tipo de enzima existe uma temperatura ótima, na qual a taxa de reação é máxima. (ARAUJO, 2021; FIELDS, 2001; DIXON; WEBB, 1979).

A lei de Arrhenius descreve a relação entre a constante de velocidade k e a temperatura do sistema, em função da ativação como da desativação térmica da enzima, e estas são representadas pelas equações 3 e 4.

$$k_A = A_A e^{-E_A/RT} \quad (3)$$

$$k_D = A_D e^{-E_D/RT} \quad (4)$$

em que k_A e k_D são, respectivamente, as constantes de ativação e desativação térmicas, A_A e A_D são as constantes de Arrhenius, E_A é a energia requerida para promover a ativação térmica e E_D a energia necessária à desativação térmica, R representa a constante universal dos gases e T a temperatura absoluta (MIRANDA, *et al.*, 2014).

Parâmetros termodinâmicos, como energia de ativação, entropia, entalpia e energia livre de Gibbs, meia-vida ($t_{1/2}$) podem fornecer informações valiosas sobre a atividade de enzimas e sua termoestabilidade em determinadas temperaturas operacionais, permitindo assim uma melhor compreensão e previsão do comportamento de enzimas livres e imobilizadas (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Sadana e

Henley (1987) propuseram um modelo de ajuste exponencial não-linear capaz de estimar os parâmetros de inativação térmica, por meio do ajuste do modelo aos dados experimentais de atividade residual versus tempo de reação (Equação 5):

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1) \exp(-k_D t) + \alpha_1 \quad (5)$$

em que A/A_0 é a atividade residual adimensional, sendo A_0 a atividade inicial e A a atividade abordada, α_1 é o parâmetro do modelo, k_D é a constante de desativação térmica de primeira ordem (min^{-1}) e t , o tempo de reação (min).

Outro parâmetro crucial ao se estudar a estabilidade térmica enzimática é o tempo de meia-vida enzimático $t_{1/2}$, descrito na equação 6: 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).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_D} \quad (6)$$

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 7 fornece o modelo matemático para o cálculo da entalpia de ativação da desnaturação térmica (ΔH_d). (FARIA, 2019; KUMAR *et al.*, 2013; SAQID *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015).

$$\Delta H_D = E_D - RT \quad (7)$$

Embora um valor elevado para a entalpia de ativação da desnaturação (ΔH_D) sugira que a enzima seria termoestável, também é importante verificar os outros dois parâmetros termodinâmicos ΔG_D e ΔS_D . A energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação, ΔG_D (equação 8), é considerado um indicador mais confiável da estabilidade da enzima. Um menor valor ou valor negativo para a mudança na energia livre de Gibbs indica o favorecimento da reação de desnaturação térmica, portanto, uma menor estabilidade da proteína (MARANGONI, 2003).

$$\Delta G_D = -RT \ln \left(\frac{k_D h}{k_b T} \right) \quad (8)$$

em que T corresponde aos valores experimentais para a temperatura (K), R é a constante universal dos gases ideais (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹), h refere-se à constante de Planck (11,04 x 10⁻³⁶ J min⁻¹) e k_b à constante de Boltzmann (1,38 x 10⁻²³ J K⁻¹) (ARAUJO, 2021; FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2015).

A entropia de ativação da desnaturação térmica da enzima (ΔS_D) pode ser encontrada através da Equação 9.

$$\Delta S_D = \frac{\Delta H_D - \Delta G_D}{T} \quad (9)$$

A desnaturação térmica das enzimas também resulta num aumento da entropia (ΔS_D). Isto resulta em valores positivos para a entropia da reação de desnaturação, pois a aleatoriedade ou desordem é aumentada na transição do estado fundamental para o estado intermédio instável (KUMAR *et al.*, 2013).

3.4.2 Efeitos do pH na atividade enzimática

As enzimas apresentam grupos iônicos em seus sítios ativos, podem estes serem básicos ou ácidos. Por esse fator, o meio reacional necessita estar a um pH

adequado às características de cada enzima, a fim 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. Conseqüentemente, 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 (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; SHULER; KARGI, 2002).

3.5 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS

A imobilização de microrganismos por vários métodos tem sido frequentemente relatada em processos fermentativos; o aprisionamento em géis e o uso de um suporte de matriz são as técnicas mais comumente empregadas para imobilização de micélios. Várias vantagens têm sido relatadas para o uso de células imobilizadas, incluindo maior estabilidade celular, que pode muitas vezes resultar em maior produtividade celular; aumento da eficiência do processo devido à alta concentração de células no meio de cultivo; separação mais fácil das células do caldo de fermentação que permite operações de batelada repetidas e facilita o isolamento e purificação dos produtos; maior nível de atividade de culturas imobilizadas, que parecem mais resistentes a perturbações ambientais, como pH, ou exposição a concentrações químicas tóxicas, em comparação com culturas em suspensão. (MUSSATTO *et al.*, 2009)

Não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as células e suas várias aplicações. Isso se deve às diferentes características físico-químicas, às diferentes propriedades dos substratos e produtos e às diversificadas aplicações dos produtos obtidos.

Dentre os diferentes métodos de imobilização existentes encontram-se: confinamento da célula (encapsulamento e micro-encapsulamento), ligação em superfície sólida (adsorção física, covalente e iônica) e ligação cruzada com um material insolúvel multifuncional (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES *et al.*, 2011).

Durante o processo de imobilização, deve-se atentar para algumas questões como: mudanças conformacionais da estrutura da enzima que levem à sua inativação; perda da atividade catalítica e dessorção de moléculas de enzima do microambiente

do suporte; efeitos difusionais em decorrência de limitações do acesso de moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima e do produto para o meio reacional. Além disso, o custo da imobilização deve ser compensado pela vida útil do biocatalisador. (SOUZA *et al.*, 2017)

3.5.1 Tipos de suporte

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte e, apesar de existirem diferentes materiais que podem ser aplicados na imobilização de enzimas, a sua escolha dependerá, essencialmente, das características peculiares da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada. Os principais atributos a serem observados na seleção de um suporte para determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo, dentre outros (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES *et al.*, 2011).

De acordo com sua origem, os suportes podem ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto à sua morfologia, podem ser porosos, não porosos e de estrutura em gel. Os materiais porosos apresentam como principal vantagem uma elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, é importante atentar para o diâmetro dos poros do suporte, pois estes devem ser suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato. Os materiais orgânicos, em especial os polímeros, que podem ser naturais ou sintéticos, são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte de acordo com as características desejadas (SOUZA *et al.*, 2017)

3.5.2 Esponja de poliuretano

Os EPU's são polímeros versáteis devido à variedade dos grupos constitutivos e da possibilidade de polimerização controlada, o que permite a adaptação do processo e da composição para a obtenção de materiais para as mais variadas exigências, desde a sola de calçados a implantes cirúrgicos, pois um EPU pode conter

grupamentos: a) aromáticos, b) alifáticos, c) cíclicos, d) amidas, e) uréia, f) ésteres, g) éteres, entre outros (ZECK, 2004).

Além dos grupamentos encontrados no monômero utilizado, as diferentes características químicas e físicas dos poliuretanos também são obtidas pela adição de outros compostos químicos que atuam como catalisadores, agentes de expansão, agentes de reticulação, agentes de extensão de cadeia, surfatantes e aditivos, permitindo que o polímeros assumam estruturas celulares (espumas flexíveis e rígidas, elastômeros micro-celulares e membranas) ou uma forma sólida (elastômeros, revestimentos, selantes, adesivos, etc) (DE ORY *et al.*, 2004).

As EPU's podem possuir células abertas ou fechadas tornando-as permeáveis ou impermeáveis ao ar e podem ser produzidas objetivando uma gama de propriedades que incluem maciez, resistência mecânica e resiliência, entre outras. Devido à variação de suas propriedades, essas espumas vêm sendo estudadas há anos, com destaque para a cinética das reações de síntese, sua morfologia, a disposição dos segmentos rígidos e flexíveis e o as propriedades de aplicação (CORCUERA *et al.*, 2010; KAUSHIVA *et al.*, 2000; LAN *et al.*, 2011; SONNENSCHNEIN *et al.*, 2008).

Na bioquímica e biotecnologia, os cientistas têm atribuído às EPU características de suporte para imobilização de células e enzimas devido a sua resistência e durabilidade, sua estrutura de poros, a facilidade de controle de poros durante a síntese, sua área superficial, permeabilidade, facilidade do transporte de massa, espaço para o crescimento de biomassa, baixa toxicidade e baixo preço (DE ORY *et al.*, 2006).

Ao contrário da maioria dos polímeros, cujas unidades monoméricas são bem definidas, o poliuretano é um polímero que não apresenta unidades repetitivas (uretano) de forma regular, não possuindo assim, uma fórmula empírica representativa da macromolécula. Usualmente, representa-se o poliuretano por suas unidades monoméricas principais, o di-isocianato e o polioliol, não sendo representados todos os tipos de ligação que efetivamente podem fazer parte da estrutura do polímero formado. As principais reações de síntese dos EPU's envolvem a reação de adição entre um isocianato e um composto que possui hidrogênio ativo, normalmente um polioliol, responsável pela formação de ésteres de ácido carbâmico (ligações uretano) e pode ser considerada como a reação de propagação da cadeia poliuretânica.

As esponjas comerciais de poliuretano (EPU) vêm sendo utilizadas como matrizes para imobilização de células em diversos estudos tais como: produção de biodiesel derivadas de *Rhizopus oryzae* (HAMA *et al.*, 2004), *Pseudomonas fragi* (SCHUEPP *et al.*, 1997), *Penicillium cyclopium* (LEGIER; COMEAU, 1992), *Aspergillus niger* (ROMEROE *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2010) e *Mucor circinelloides* (ANTCZAK *et al.*, 2002), devido à sua disponibilidade a baixo custo e propriedades como grande resistência mecânica e elasticidade.

Este polímero também apresenta um alto nível de porosidade (próximo de 97%) e uma grande superfície de adsorção que reduz as limitações de difusão de oxigênio, fator importante para microrganismos aeróbicos (DE ORYE, 2006).

Pesquisas descrevem as maneiras pelas quais os microrganismos podem colonizar espumas de poliuretano em culturas em escala laboratorial. Normalmente, as células retidas em um suporte vêm em duas formas diferentes, uma das quais é um biofilme espesso e denso que se desenvolve na superfície do suporte imobilizador e a outra fica presa nos poros do suporte imobilizador (DACEWICZ; GRZYBOWSKA-PIETRAS, 2021).

Varesche *et al.* (2021) investigaram matrizes cúbicas de EPU como suporte imobilizador de células e identificaram pequenas estruturas multicelulares aderidas à superfície interna do poliuretano, células bacterianas únicas aderidas à superfície da espuma e microgrânulos retidos mecanicamente em seus poros.

Soares *et al.* (2012) avaliaram esponjas de poliuretano como base sintética para imobilização de células de *Mucor circinelloides* apresentando alta atividade lipolítica. Mussatto *et al.* (2009) imobilizaram *Aspergillus japonicus* em esponja de poliuretano para produzir fruto-oligossacarídeos (FOS), a imobilização ocorreu durante o cultivo celular.

3.6 RETICULAÇÃO DE CÉLULAS

A reticulação entre as células consiste na formação de um aglomerado celular, de forma natural ou induzida artificialmente por meio de agentes químicos que promovam ligações cruzadas entre as células, chamados de agentes de reticulação (agentes “*cross-linking*”). Este método possui a vantagem do baixo custo por não exigir o uso de um suporte sólido para a imobilização e proporcionar alta estabilidade

enzimática (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; CRUZ *et al.*, 2012; SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016).

A reticulação ou ligação cruzada envolve a formação de ligações covalentes entre moléculas de proteínas promovidas por um agente bifuncional, o qual é conhecido como agente reticulante (CRUZ *et al.*, 2012; MATEO *et al.*, 2007).

O agente de reticulação é uma molécula que tem pelo menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos de aminoácidos na superfície da enzima. Os reagentes de reticulação disponíveis comercialmente podem ser classificados quanto aos grupos reativos presentes em suas extremidades (homobifuncional e heterobifuncional), a especificidade de seus grupos reativos, o comprimento do braço espaçador (“*space arm*”) e sua solubilidade e reatividade (SOUZA, 2017)

3.6.1 Aplicação de glutaraldeído como agente reticulante

Os protocolos para a imobilização covalente das enzimas frequentemente se iniciam com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos.

O glutaraldeído é um dos reagentes mais empregados na ativação de suportes e/ou como braço espaçador, devido à simplicidade dos métodos de ativação e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis. Nesse caso, a molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima, e estas são imobilizadas covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminos (α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ proveniente de aminação química), que se ligam aos grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff (BARBOSA *et al.*, 2012; MATEO *et al.*, 2007).

Diversos fatores devem ser analisados para garantir a insolubilidade da enzima e consequente sucesso da imobilização, como a proporção entre concentração enzimática e de glutaraldeído, o pH, a temperatura e o tempo reacional. Alguns autores sugerem, ao término da reação de imobilização com glutaraldeído, uma etapa de redução das bases de Schiff reversíveis em ligações de aminoácidos secundárias mais estáveis e redução dos grupos de aldeído não reagidos para grupos inertes.

Ambas as reduções podem ser promovidas por meio da reação com borohidreto de sódio (NaBH_4) (MIGNEAULT *et al.*, 2004b; RUEDA *et al.*, 2016).

3.7 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS VISANDO A PRODUÇÃO DE FOS

Na literatura pode-se encontrar registros da imobilização da frutossiltransferase e de células microbianas com atividade enzimática visando a produção de FOS.

Chien, Lee e Lin (2001) estudaram a imobilização da biomassa de *Aspergillus japonicus* por envolvimento em glúten para a produção de FOS. Foi obtido um biocatalisador estável, o qual foi aplicado em um reator de leito empacotado, sendo observado uma redução da velocidade de reação de produção de FOS com a imobilização (a nova velocidade de reação passou a ser próxima a 70% da velocidade de reação catalisada pelo micélio sem tratamento), associada a possíveis limitações difusionais do substrato impostas pelo glúten.

A habilidade do *Aspergillus japonicus* ATCC 20236 de colonizar diversos materiais sintéticos durante a etapa de fermentação foi explorada por Mussatto *et al.* (2009), realizando a imobilização, *in situ* e por adsorção, da biomassa microbiana em diversos materiais tais como: esponja de poliuretano ($0,48 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$), esponja de aço inoxidável ($1,13 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$), fibra vegetal ($1,25 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$), pedrapomes ($0,13 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$), peneiras moleculares de zeólito ($0,19 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$) e esponja de vidro (não apresentou imobilização celular). Como melhor resultado, a adsorção micelial em fibra vegetal tornou possível obter uma produção de FOS similar à produção obtida com a biomassa livre, entretanto, tornou mais fácil a separação entre o biocatalisador e o meio reacional.

Huang *et al.* (2016) realizaram a imobilização de células de *Aspergillus aculeatus* M105, por encapsulamento em alginato de cálcio, obtendo um biocatalisador capaz de ser aplicado na produção de FOS por até 15 ciclos reacionais consecutivos. A imobilização de *Aspergillus aculeatus* em alginato de sódio foi estudada por Fernandez-Arrojo *et al.* 2013, em reator de batelada, medindo a atividade das esferas de alginato em uma sequência de 13 ciclos de reação sucessivos de 20 min cada.

Castro *et al.* (2017) estudaram a imobilização de células de *Aureobasidium pullulans* em diversos suportes (subprodutos sintéticos, agroindustriais e materiais minerais). A imobilização do micélio ocorreu *in situ* e, por adsorção, durante a etapa

de fermentação. Em todos os suportes estudados ocorreu a adsorção da biomassa, com destaque para a esponja de poliuretano reticulado ($1,88$ a $2,2 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$), fibra de poliéster ($2,30 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$) e lã de fibra de vidro ($2,0 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$), que adsorveram as maiores quantidades de células.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

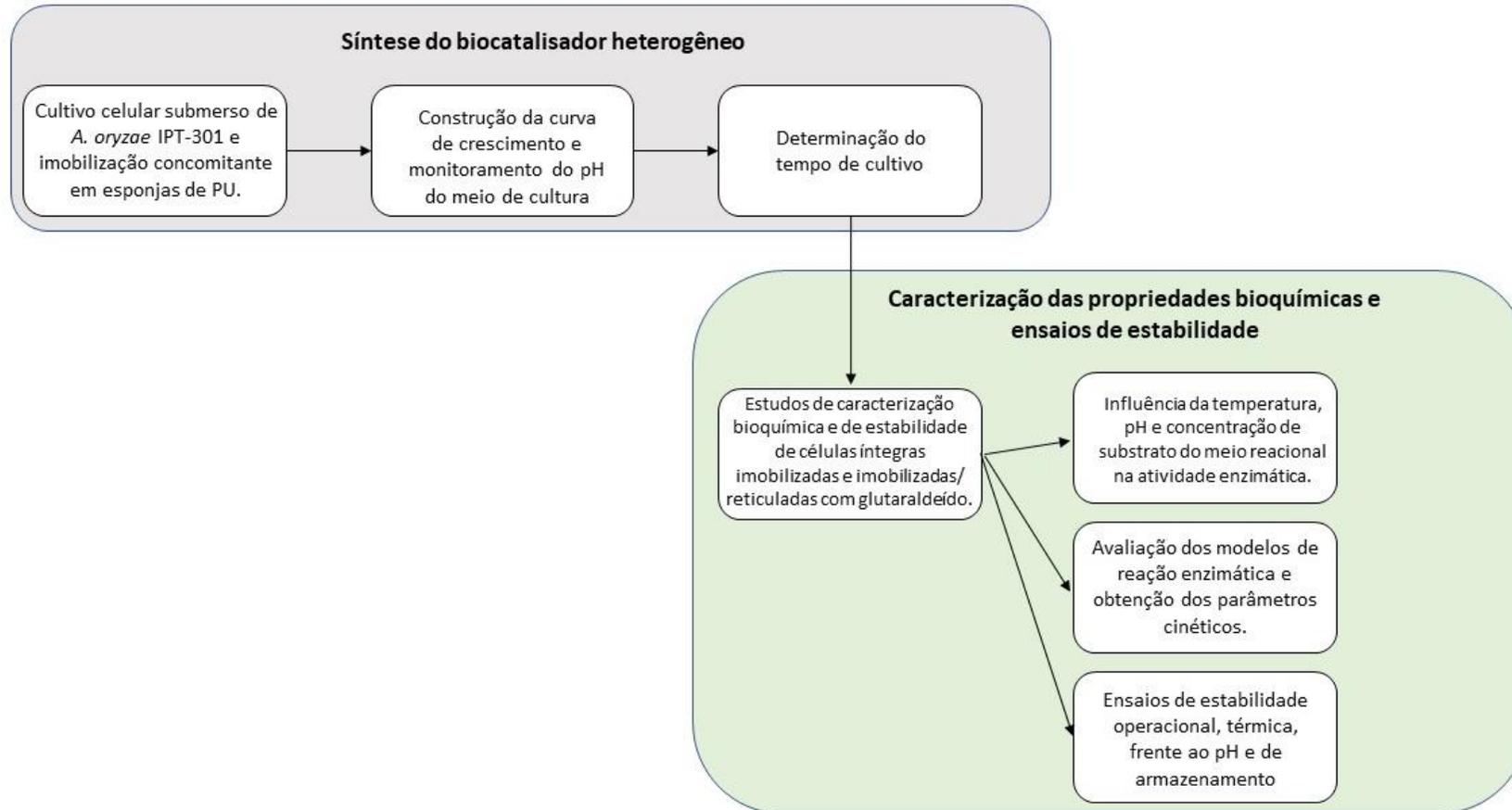
O presente trabalho foi subdividido em duas etapas dependentes entre si, sendo elas: (i) a síntese do biocatalisador heterogêneo e (ii) estudos de caracterização das suas propriedades bioquímicas e ensaios de estabilidade (Figura 2).

4.1 SÍNTESE DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO

4.1.1 Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo

Para a produção de células com atividade de FTase, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (LBI/IPT-SP). Os esporos do microrganismo liofilizados foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 70 µL foram inoculadas em meio de cultura sólido, preparado em placa de Petri, contendo (em %, m v⁻¹): ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0; glicerina (Isofar®) 2,5; extrato de levedura (Synth®) 0,5 e glicose (Dinâmica®) 2,5. Após incubação por sete dias a 30 °C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371), os esporos produzidos foram coletados, por meio de raspagem utilizando alça de Drigalski, em 10 mL de solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95% (m v⁻¹) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1% (v v⁻¹). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isolar®) 20,0% (m v⁻¹), e a concentração de esporos, com auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®), foi ajustada para 1 x 10⁷ esporos mL⁻¹, seguido de armazenamento sob refrigeração a - 6 °C (CUNHA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2022; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020).

Figura 2 - Diagrama de blocos simplificado das etapas da metodologia aplicada



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

4.1.2 Preparo do material de suporte

Os materiais de suporte utilizados para a imobilização de células microbianas foram esponjas de poliuretano (EPU) adquiridas comercialmente. As esponjas foram cortadas para formar cubos de 0,8 cm de aresta (Figura 3) e, posteriormente, adicionadas ao meio de cultivo e esterilizadas em autoclave, conforme condições descritas no tópico 4.1.3.

Figura 3 - EPU comercial previamente cortadas a cubos de 0,8 cm de aresta para a imobilização de células de *A. oryzae* IPT-301



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

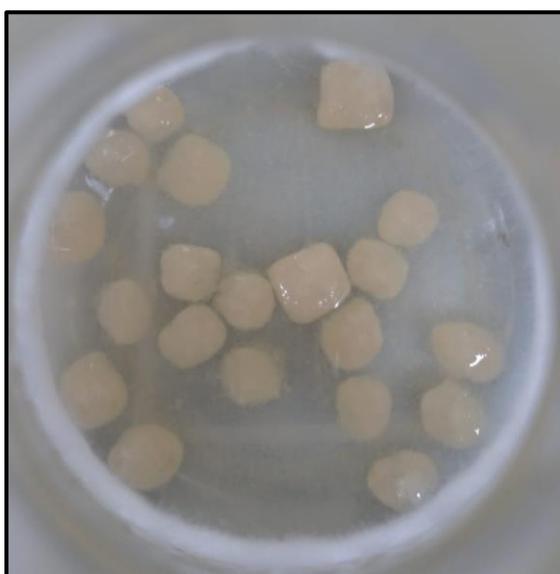
4.1.3 Preparo do meio de cultivo

O meio de cultura sintético utilizado para o cultivo celular e produção das células microbianas com atividade biocatalítica foi constituído por (em %, m v⁻¹): sacarose (Synth®) 15,0, extrato de levedura (Synth®) 0,5; NaNO₃ (Dinâmica®) 0,5; KH₂PO₄ (Synth®) 0,2; MgSO₄.7H₂O (Dinâmica®) 0,05; MnCl₂.4H₂O (Synth®) 0,03 e FeSO₄.7H₂O (Synth®) 0,001. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,5 com solução de NaOH (Synth®) 1 x 10⁻² mol L⁻¹. Foram distribuídos 50 mL deste meio de cultura, juntamente com 20 esponjas de PU com arestas de 0,8 cm, em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL e, em seguida, autoclavados a 120 °C e 2,0 atm durante 20 min (CUNHA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2022; GARCIA *et al.*, 2021; OTTONI *et al.*, 2012).

4.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO

Inoculou-se 500 μL de suspensão, contendo cerca de 1×10^7 esporos mL^{-1} , no meio de cultura descrito no tópico 4.1.3. O cultivo celular submerso foi conduzido em agitador orbital (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm por de 56 h com coleta de amostras em intervalos de tempo pré-determinados (Figura 4).

Figura 4 - Cubos de EPU contendo células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas durante o cultivo celular submerso



Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Nota: Condições experimentais: cultivo celular submerso em meio de cultura sintético (pH 5,5) conduzido em agitador orbital a 30 °C, 200 rpm por de 56 h. Concentração de inóculo: 1×10^7 esporos mL^{-1}

O conteúdo total do frasco foi filtrado a vácuo em funil de Buchner em papel do tipo Whatman nº1. As células microbianas imobilizadas, retidas no papel (torta), foram lavadas abundantemente com água destilada e armazenadas, sob refrigeração a 4 °C para ensaios de reticulação, de caracterização das propriedades bioquímicas e ensaios de estabilidade. A concentração efetiva de células em EPU foi obtida por meio da diferença entre as massas celular seca e de suporte contido no meio de cultivo ($\text{g célula g suporte}^{-1}$). A massa seca foi obtida após os ensaios de atividade enzimática mediante secagem das células imobilizadas em estufa por 24h a 60 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores médios de concentração

celular com seus respectivos desvios padrão foram plotados em função do tempo de cultivo.

4.3 MONITORAMENTO DO pH DO MEIO DE CULTURA

Concomitantemente com a construção da curva de crescimento microbiano, conforme método descrito no tópico 4.2, amostras do caldo de cultura foram obtidas, em intervalos de tempo pré-determinados ao decorrer de 56 h de processo, pelo processo de filtração à vácuo e seus respectivos valores de pH foram medidos com um pHmetro digital (DigiLab®, Modelo 82588). Os experimentos foram realizados em triplicatas. Os valores médios de pH com seus respectivos desvios padrão foram plotados em função do tempo de cultivo.

4.4 ENSAIOS DE RETICULAÇÃO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS

Após a determinação do tempo de cultivo, cujas células imobilizadas apresentaram os maiores valores de atividade de transfrutossilação, foram realizados ensaios de reticulação do biocatalisador heterogêneo de acordo com os métodos adaptados de Gonçalves *et al.* (2020) e Garcia *et al.* (2021).

Em um erlenmeyer, adicionaram-se 2 g de massa úmida efetiva de células imobilizadas, equivalente a 9 partículas cúbicas de EPU, oriundas do cultivo celular submerso, seguido da adição de 16,8 mL de solução aquosa de glutaraldeído 25% (v v⁻¹) (Dinâmica®), previamente dissolvido em solução tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,9, totalizando um volume reacional de 200 mL. A reação de reticulação foi realizada a 25 °C, 200 rpm durante 45 min em agitador orbital (Tecnal®, modelo TE-4200) e interrompida, por mais 30 min, pela adição de 2 mL de borohidreto de sódio (NaBH₄) (NEON®) 100 g L⁻¹, previamente dissolvido em solução 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®). Ao término desta etapa, o erlenmeyer contendo o meio reacional foi imerso em banho de água e gelo por 5 min e, posteriormente, o meio reacional contendo as células imobilizadas foi filtrada à vácuo. As células, imobilizadas em EPU e reticuladas, foram retidas em papel de filtro do tipo Whatman nº1 com diâmetro de 90 mm e lavadas abundantemente com água destilada

(Figura 5). Por fim, foram armazenadas, sob refrigeração a 4 °C, para ensaios de atividade enzimática, caracterização bioquímica e estudos de estabilidade.

Figura 5 – Cubos de EPU contendo células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e reticuladas com solução de glutaraldeído 25% (v v⁻¹)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Nota: Condições experimentais: a reação de reticulação foi realizada a 25 °C, 200 rpm durante 45 min em agitador orbital e finalizada, por mais 30 min, pela adição de 100 g L⁻¹ de borohidreto de sódio (NaBH₄)

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO BIOCATALISADOR

A morfologia das células imobilizadas em esponja de poliuretano e do suporte *in natura* foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando microscópio eletrônico (Zeiss EVO MA-10, Alemanha), com tensão de aceleração de 20 kV e distâncias de 10 mm e 21 mm. As amostras do material de suporte foram depositadas sobre uma fita de carbono em um porta-amostras (*stub*) e recobertas por uma fina película de liga de ouro-paládio por meio do processo de *sputtering*, com o uso de um mini *Sputter Coater* modelo POLARON EMITECH SC7620. O processo de recobrimento teve duração de 3 min. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT-SP.

4.6 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E DE ESTABILIDADE

4.6.1 Influência da temperatura do meio reacional na atividade enzimática

As atividades de transfrutossilacção das células, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas, foram determinadas variando-se a temperatura (T) do meio reacional ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \leq T \leq 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, com $\Delta = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), em pH 5,5, com intuito de se obter a temperatura de máxima atividade enzimática. As atividades de transfrutossilacção foram determinadas conforme método descrito no tópico 4.7.1, sob condições experimentais estabelecidas. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.6.2 Influência do pH do meio reacional na atividade enzimática

As atividades de transfrutossilacção das células, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas, foram determinadas variando-se o pH do meio reacional ($4,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$, com $\Delta = 0,5$), a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, com intuito de se obter o pH de máxima atividade enzimática. As atividades de transfrutossilacção foram determinadas conforme método descrito no tópico 4.7.1, sob condições experimentais estabelecidas. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.6.3 Influência da concentração de substrato do meio reacional na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos

As atividades de transfrutossilacção das células, imobilizadas e imobilizadas/reticuladas, foram determinadas a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio reacional constituído por 1,2 mL de tampão tris acetato $0,2\text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose comercial (substrato) nas concentrações de 75,5, 151,0, 302,0, 377,5, 480,2 e $604,0\text{ g.L}^{-1}$. Ao meio reacional, foi adicionado 0,7 g de massa úmida efetiva de células imobilizadas, equivalente a 03 partículas cúbicas de EPU, e as atividades foram determinadas conforme condições experimentais estabelecidas (tópico 4.7.1). Os parâmetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$, $K_{0,5}$ e n) foram estimados a partir de análises de regressão não linear

mediante ajuste do modelo de Hill (Equação 2) aos dados experimentais de atividade enzimática. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.4 Ensaio de estabilidade operacional

Uma massa efetiva de células úmida de 0,7 g (equivalente a 3 partículas cúbicas), imobilizada e imobilizada/ reticulada, foi adicionada em meio reacional contendo 3,7 mL de solução de sacarose comercial 48% ($m v^{-1}$) e 1,2 mL de tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5. A reação enzimática foi determinada sob condições experimentais estabelecidas (tópico 4.7.1). Ao término de cada ciclo batelada, correspondente a 1 h de reação, o biocatalisador heterogêneo foi removido do meio reacional por filtração à vácuo e, então, reintroduzido em um novo e similar meio reacional, sob as mesmas condições experimentais. As atividades de transfrutoseilação foram avaliadas considerando a quantidade de ciclos reacionais enzimáticos e os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.5 Ensaio de estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos

As células, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas, foram incubadas em tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5, na ausência de substrato, para uma ampla faixa de temperatura (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). As amostras foram retiradas em intervalos de tempo distintos (1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h e 36 h), imediatamente resfriadas em banho de água e gelo por 5 min e as atividades enzimáticas foram determinadas (tópico 4.7.1). Os experimentos foram realizados em triplicata. A constante de desativação térmica de primeira ordem (k_D , em min^{-1}) foi estimada por meio do ajuste do modelo de Sadana e Henley (1987) (Equação 5) aos dados experimentais de atividade residual *versus* tempo de incubação (ARAÚJO *et al.*, 2022; PERNA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2021). A energia de ativação (E_D , em kJ mol^{-1}) para a desnaturação térmica das células com atividade catalítica imobilizadas e imobilizadas e reticuladas foi determinada pela linearização da Equação de Arrhenius (Equação 4). O tempo de meia vida ($t_{1/2}$, em min), as variações de entalpia (ΔH_D , em kJ mol^{-1}), energia de Gibbs (ΔG_D , em kJ mol^{-1}) e entropia (ΔS_D , em $\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) de ativação para a desnaturação

térmica enzimática foram determinadas pelas Equações (6), (7), (8) e (9), respectivamente (FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; SAQIB *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2015), conforme descritas no tópico 3.4.

4.6.6 Ensaio de estabilidade frente ao pH de incubação

Uma massa efetiva de células úmida de 0,7 g (equivalente a 3 partículas cúbicas), imobilizada e imobilizada/ reticulada, foi armazenado em solução tampão tris acetato 0,2 mol L⁻¹, sob pH variável ($3,5 \leq \text{pH} \leq 8,5$, com $\Delta = 0,5$) na ausência de substrato, sob refrigeração a 4 °C, por 24h e suas atividades de transfrutoseilação foram determinadas sob condições experimentais estabelecidas (tópico 4.7.1). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.7 Ensaio de estabilidade de armazenamento

Os ensaios foram realizados com as células, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas ao decorrer de 1 (24 h), 2, 5, 7, 9, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. O biocatalisador heterogêneo foi armazenado em solução tampão tris acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5, na ausência de substrato, sob refrigeração a 4 °C e suas atividades de transfrutoseilação foram determinadas sob condições experimentais estabelecidas (tópico 4.7.1). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas foram determinadas conforme procedimento descrito por Cunha *et al.* (2019), Gonçalves *et al.* (2020) e Garcia *et al.* (2021). Para isso, 0,7 g de células, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas (equivalente a 03 partículas cúbicas) foram incubadas com 3,7 mL de solução de sacarose 48 % (m v⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5. A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 50 °C, 190 rpm por 1 h e interrompida pela imersão do meio reacional em água em ebulição por 10 min, seguido por resfriamento em banho

de água e gelo por 5 min para inativação enzimática. Posteriormente, o meio reacional foi filtrado à vácuo e a concentração de açúcares redutores (AR) e glicose (G) foram quantificadas (tópico 4.7.2). A atividade de transfrutossilação (A_T) foi calculada pela Equação (10).

$$A_t = \frac{F_T V_R}{t_R m_{ms}} \quad (10)$$

em que em F_T é a concentração molar de frutose transfrutossilada (em $\mu\text{mol L}^{-1}$), V_R é o volume do meio reacional (em L), t_R o tempo de reação (em min) e m_{ms} a massa seca efetiva de células microbianas imobilizadas em poliuretano (em g).

Por definição, uma unidade (1U) de atividade de transfrutossilação refere-se à quantidade de enzima que transfere um micromol (1 μmol) de frutose (F_T) por minuto, sob condições experimentais estabelecidas (CUNHA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2022; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020).

4.7.2 Quantificação dos açúcares do meio reacional

As concentrações de glicose (G) e açúcares redutores (AR) foram determinadas pelos métodos colorimétricos GOD/PAP® (kit enzimático glicose-oxidase) e DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico), respectivamente. As concentrações de frutose liberada (F) e frutose transfrutossilada (transferida) (F_T) no meio reacional foram determinadas pelas Equações (11) e (12) (CHEN; LIU, 1996; CUNHA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2022; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020).

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

$$[F_T] = [G] - [F] \quad (12)$$

4.7.2.1 Determinação da concentração de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores (AR), presentes no meio reacional, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), adaptado de Miller (1959), conforme descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013). A solução DNS (Reagente A) foi preparada pela dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico

(C₇H₄N₂O₇) (Dinâmica®) em 200,0 mL de solução 2 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®). Paralelamente, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (Reagente B) constituída por 600 g L⁻¹ de tartarato duplo de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) (Dinâmica®). Após a dissolução, ambos os reagentes (A e B) foram misturados e o volume final da mistura aferido para 1,0 L em balão volumétrico. A quantificação dos ARs foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 1,0 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 1,0 mL da solução preparada (Reagentes A + B) sob agitação vigorosa. A reação foi conduzida em banho maria a 100 °C por 10 min e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 8,0 mL de água destilada. Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) a 540 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos ARs mediante auxílio da curva de calibração obtida para o método DNS (Figura 20, Apêndice A).

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

4.7.2.2 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose, presente no meio reacional, foi determinada pelo método GOD-PAP® (CUNHA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2022; GANAIE *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; VEJA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011). O método consiste em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato. A oxidação da glicose pela glicose oxidase produz peróxido de hidrogênio, oxidado por meio da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem coloração rosácea ou vermelha (BOBBIO; BOBBIO, 2005; WONG; WONG; CHEN, 2008). O kit enzimático utilizado no presente trabalho foi da marca Laborlab®.

A quantificação da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 40 µL da amostra, oriunda da reação enzimática, em 4 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min. A coloração final foi analisada com auxílio de

espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) a 505 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações de glicose, por meio do “*fator f*” obtido a partir da amostra padrão fornecida pelo fabricante.

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

4.7.3 Quantificação de açúcares durante o cultivo microbiano e de fruto-oligossacarídeos

As concentrações de sacarose, glicose e frutose, monitoradas durante a obtenção da curva de crescimento microbiano, e a concentração de FOS, composto pelos açúcares 1-kestose, nistose e 1- β -frutofuranosilnistose, foram obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando duas colunas cromatográficas acopladas em série (Shodex SC 1011, 300 x 7,8 mm) acondicionadas a 72 °C. Foi utilizado um sistema HPLC Waters (EUA) constituído por uma bomba isocrática W515, por um detector de índice de refração W2414, por um injetor automático W2707 e por software de controle e tratamento de dados Empower 2.0. As amostras foram eluídas com solução de EDTACa(Na)₂ 5×10^{-2} mol L⁻¹ a uma vazão de 0,4 mL min⁻¹ e os componentes foram identificados por comparação de tempos de retenção com padrões analíticos dos mesmos analitos (Fuji Wako Chemicals, Japão).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o tratamento dos dados experimentais foi submetido ao teste de Tukey pela metodologia ANOVA, a um nível de significância de 5%. O teste de Tukey avaliou a diferença significativa entre os dados experimentais, comparando-os um a um.

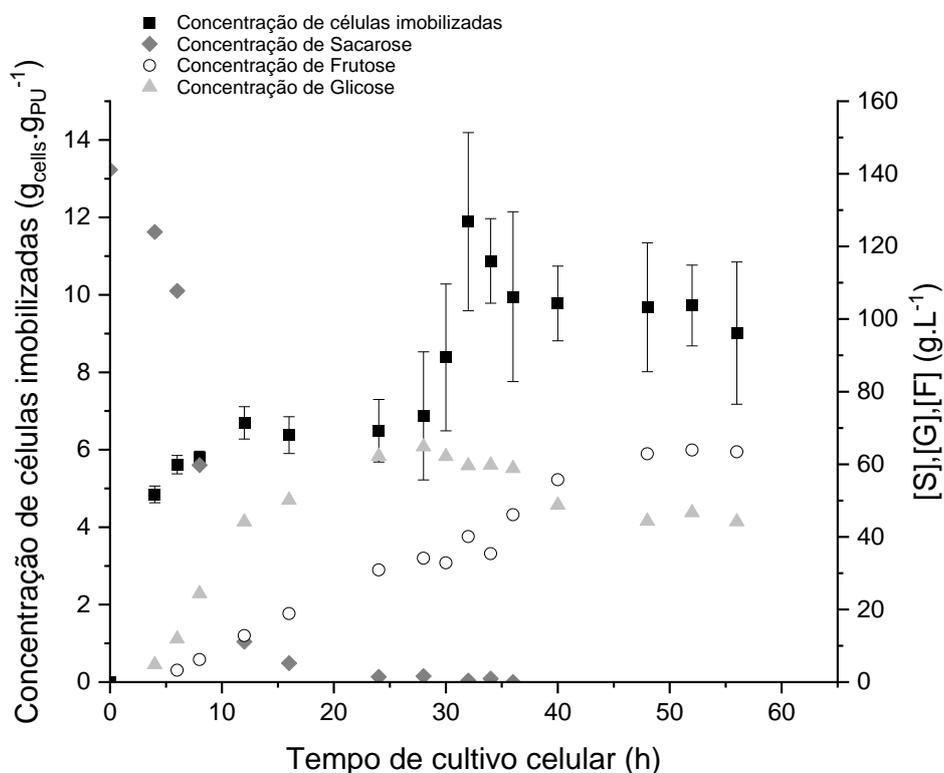
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO E MONITORAMENTO DO PH DO MEIO DE CULTURA

A curva de crescimento microbiano foi construída de acordo com o método descrito no tópico 4.2. A Figura 6 apresenta o perfil da curva de crescimento do fungo *A. oryzae* IPT-301 em função do tempo de cultivo celular. Não foi possível identificar a fase de latência (ou “fase lag”) de crescimento, nesta fase, que ocorre imediatamente após o processo de inoculação, as células passam pela adaptação ao novo meio ao qual se encontram, novas enzimas são sintetizadas e o crescimento celular se inicia de maneira mais lenta sem um grande aumento da massa celular (SHULER; KARGI, 2002). Primeiramente, foi identificada a fase de crescimento exponencial (ou “fase log”) que se estendeu até 32 h de cultivo, obtendo-se um pico de concentração de células imobilizadas igual a $11,89 \pm 2,29 \text{ g células gsuporte}^{-1}$. A fase log ocorre quando as células se ajustaram ao seu novo ambiente. Após esse período de adaptação, multiplicando-se rapidamente, e a massa celular e a densidade do número de células aumentam exponencialmente com tempo, o crescimento é equilibrado, todos os componentes de uma célula crescem em na mesma taxa (SHULER; KARGI, 2002).

Entre os tempos de 32 h e 36 h, observou-se a fase de desaceleração de crescimento, possivelmente devido a diminuição, para valores limitantes, de concentração de um ou mais nutrientes essenciais ao metabolismo celular e/ou ao aumento da concentração de produtos metabólicos tóxicos para as células microbianas (SHULER; KARGI, 2002) Após 36 h de cultivo, foi observado a fase estacionária para a curva de crescimento que se estendeu até o término do processo, cuja concentração de células imobilizadas foi de $9,01 \pm 1,83 \text{ g células gsuporte}^{-1}$. A fase estacionária começa no final da fase de desaceleração, quando a taxa de crescimento é zero ou quando a taxa de crescimento é igual à taxa de morte. Embora a taxa de crescimento líquida seja zero durante a fase estacionária, as células ainda são metabolicamente ativas e produzem metabólitos secundários (SHULER; KARGI, 2002).

Figura 6 - Concentração de células de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em partículas cúbicas de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm), e concentração dos açúcares sacarose [S], glicose [G] e frutose [F] em função do tempo de cultivo celular



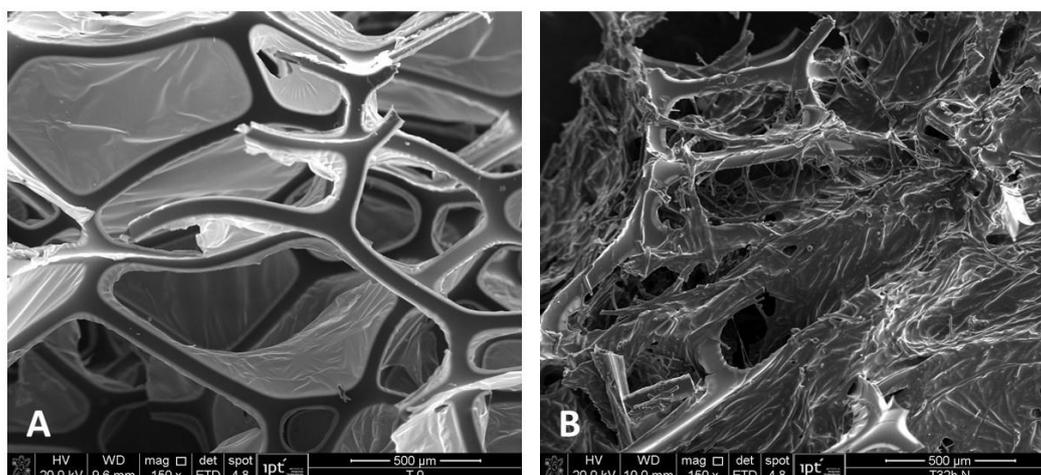
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (■) Concentração de células
 (◇) concentração de sacarose
 (▲) concentração de glicose
 (○) concentração de frutose

Após o pico de crescimento das células em 32 h, e o desaceleramento até 36h, as células continuaram a crescer; entretanto, na mesma proporção que se rompiam, foi possível observar, ao final da fase estacionária, fragmentos de células no meio de cultivo, o que se desprenderam do suporte, por possíveis choques devido a agitação ocorrida durante o cultivo celular. (SHULER; KARGI, 2002).

Pelo perfil da curva de crescimento microbiano não se pode afirmar que a fase de declínio ou morte celular foi atingida, uma vez que as concentrações permaneceram constantes a partir de 36 h do cultivo celular submerso.

Figura 7 – Imagens de MEV



Fonte: Instituto de Pesquisa e Tecnologia de São Paulo em parceria com a autora (2022).

Legenda: A) esponja de poliuretano antes do cultivo celular

B) após imobilização das células microbianas, tempo de cultivo de 32 h

Além do estudo realizado para os diferentes tempos de cultivo em relação ao crescimento microbiano, também foi realizada a caracterização física de imagem do microrganismo em questão. A Figura 7.1 (A) mostra o *suporte in natura* no qual foi realizada a imobilização de *A. oryzae* IPT-301, em que é possível evidenciar os poros e ranhuras da estrutura da esponja de forma limpa. A Figura 7.1 (B) evidencia o crescimento celular ao longo das ranhuras e filamentos da esponja, na qual as células se fixaram ao longo do cultivo celular. A imagem mostra as diferenças entre as condições pela qual o suporte foi submetido, sendo a condição B observada para o tempo de cultivo de 32 h, o qual apresentou melhores condições operacionais.

Mussatto *et al.* (2009) estudaram a produção e imobilização de células de *Aspergillus japonicus* em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano (0,3 x 0,3 x 0,3 cm), para a produção de FOS. Os autores obtiveram uma concentração de células imobilizadas de $0,48 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ após 48 h de processo, 28 °C e 160 rpm, em meio de cultura sintético; também avaliaram a imobilização em fibra vegetal, para as mesmas condições operacionais e obtiveram um melhor resultado em relação a esponja de poliuretano, $1,25 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$, produzindo $116,3 \text{ g L}^{-1}$ de FOS.

Castro *et al.* (2017) estudaram a imobilização de células integras de *Aureobasidium pullulans* em materiais sintéticos, subprodutos agroindustriais e materiais minerais, visando a produção de FOS. A concentração obtida de células imobilizadas foi de $2,2 \text{ g células g suporte}^{-1}$ e a quantidade de FOS obtida ao usar a esponja de poliuretano reticulada, partículas cúbicas com 1 mm de aresta, foi de $108,17 \text{ g L}^{-1}$, após 25 h de cultivo celular em meio sintético, a 28 °C e 150 rpm.

Soares *et al.* (2012) avaliaram a imobilização de *Mucor circinelloides* em diferentes matrizes cúbicas de poliuretano, com 6 mm de aresta, apresentando alta atividade lipolítica. Embora todas as formas analisadas tenham sido consideradas adequadas para imobilizar *M. circinelloides*, a formulação de EPUs afetou tanto a fixação das células ao suporte quanto as atividades lipolíticas, atingindo valores que variam de $1,4$ a $2,4 \text{ g células g EPU}^{-1}$ e atividades da lipase variando de 32 a 52 U g^{-1} . O cultivo celular se estendeu por 72 h, a 28 °C e 170 rpm.

Cunha *et al.* (2019) reportaram a produção de $9,35 \pm 1,26 \text{ g.L}^{-1}$ de células de *A. oryzae* IPT-301 para um tempo de cultivo de 48 h, sob as mesmas condições experimentais utilizadas neste trabalho. Ottoni *et al.* (2012) obtiveram uma concentração de $4,85 \text{ g L}^{-1}$ de células do mesmo microrganismo ao se utilizar composição do meio de cultura e condições experimentais similares. Ao longo do cultivo, também foi possível construir os perfis de concentração de sacarose, glicose, frutose (Figura 6). A quantidade inicial de sacarose diminuiu drasticamente. Mais de 95 % da concentração inicial de sacarose foi convertida em células integras, glicose e frutose após 24 h de cultivo. O rápido consumo de sacarose e a elevada produção de células integras até 24 h de cultivo estão diretamente relacionadas.

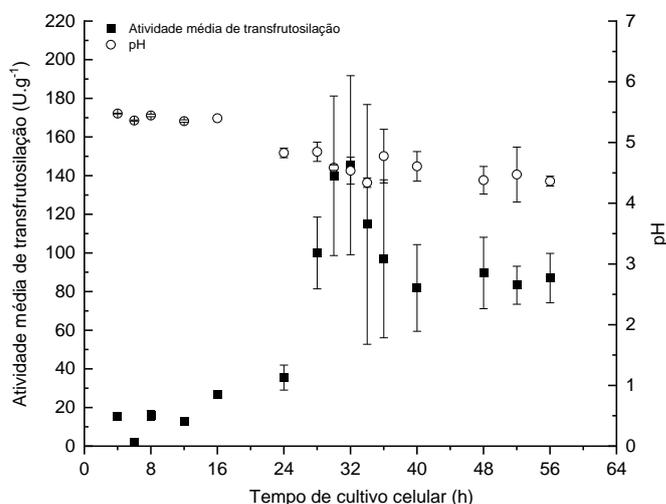
A variação da concentração desses açúcares é bastante complexa, pois muitas reações ocorrem simultaneamente, tais como: hidrólise da sacarose produzindo glicose e frutose, além do consumo de glicose e/ou frutose para crescimento e manutenção das atividades metabólicas. Vale ressaltar que o declínio na concentração de sacarose pode estar ligado a síntese de FOS a partir da sacarose e a quebra de FOS pode resultar em glicose e frutose presentes no meio de cultivo, pois durante o cultivo celular é possível que ocorra a síntese de FOS. (MAIORANO *et al.*, 2020; ŠEDOVIČ *et al.*, 2014).

Segundo Perna *et al.* (2006), pode-se presumir que há uma alta atividade hidrolítica do meio e que tenha favorecido um aumento considerável na concentração dos monômeros de glicose e frutose nas etapas finais do cultivo celular. Yun (1996) e Cuervo *et al.* (2007) relataram uma hidrólise parcial e consumo do conteúdo inicial de sacarose no meio de cultura para crescimento e manutenção do metabolismo celular, enquanto a sacarose restante é submetida à ação da enzima β -frutofuranosidase produzida pelos microrganismos em crescimento, gerando FOS, glicose e frutose.

Maiorano *et al.* (2020) estudaram o efeito da velocidade de agitação e taxa de aeração na produção de frutossiltransferase de *A. oryzae* IPT-301 em biorreator de tanque agitado e observaram que mais de 85 % da concentração inicial de sacarose foi convertida em biomassa, glicose, frutose e FOS após 20 h de cultivo. Perna *et al.* 2018, observa uma diminuição de aproximadamente 50% na concentração de sacarose e uma produção de 112 g L⁻¹ de FOS em 17 h de processo, ao avaliar um reator batelada de 10 L a 30°C e agitação de 800 rpm por 63 h de cultivo celular usando *Aspergillus oryzae* IPT-301, nesse período, a glicose e a frutose eram produzidas em pequenas quantidades.

Pela Figura 8, pode-se observar também a progressão do pH do meio de cultura em função do tempo de cultivo celular. Foi constatado que o meio de cultura, inicialmente com pH de 5,5, sofreu uma leve acidificação com o avanço do processo, atingindo um pH de 4,37. De acordo com Tsujita *et al.* (1997), Castro e Sato (2014) e Cunha *et al.* (2019), microrganismos como o *A. oryzae* são produtores de proteases ácidas, responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas e liberação de aminoácidos, o que ocasiona a acidificação do meio de cultura, interferindo também na atividade enzimática.

Figura 8 - Influência do tempo de cultivo celular nas atividades de transfrutossilatação (A_T) de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm) e progressão do pH do meio de cultura em função do tempo de cultivo celular



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: (■) Atividade de transfrutossilatação

(○) pH do meio de cultura.

Nota: A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 48 % (m v-1) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 5,5), com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min

A Figura 8 mostra a influência da atividade enzimática de células imobilizadas em EPU em função do tempo de cultivo celular. Para 32 h de processo, foi obtida uma atividade de transfrutossilatação (A_T) igual a $145,43 \pm 46,30 \text{ U g}^{-1}$.

Os resultados mostraram que os maiores valores de concentração de células, imobilizadas em esponja de poliuretano, e de atividade de transfrutossilatação foram obtidos para um tempo de cultivo celular de 32 h.

Cunha *et al.* (2019), sob as mesmas condições operacionais de cultivo, realizou o estudo visando a produção de FOS, com tempo de cultivo celular de 64 h. Ao analisar as etapas do cultivo celular, Cunha *et al.* (2019) destacaram o início da fase estacionária a partir de 48 h de cultivo e, ao analisar células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada, a fase estacionária se iniciou em 32 h de cultivo, podendo ser um dos fatores que demonstrou uma redução do tempo de cultivo celular. A fase log, segunda etapa do crescimento microbiano, na qual ocorre o ajuste das células ao novo ambiente. foi menor e conseqüentemente mais rápida.

Segundo Mussatto *et al.* (2009) o processo de imobilizar enzimas durante o cultivo celular tem mostrado diversas vantagens, incluindo maior estabilidade celular que pode muitas vezes resultar em maior produtividade celular; aumento da eficiência do processo devido à alta concentração de células no meio de fermentação; separação mais fácil das células do caldo de cultivo que permite operações de batelada repetidas e facilita o isolamento e purificação dos produtos; maior nível de atividade de culturas imobilizadas, que se mostram mais resistentes a perturbações ambientais, como pH, ou exposição a concentrações químicas tóxicas, em comparação com culturas em suspensão.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E ESTABILIDADE DAS CÉLULAS IMOBILIZADAS E IMOBILIZADAS E RETICULADAS

5.2.1 Influência da temperatura do meio reacional na atividade enzimática

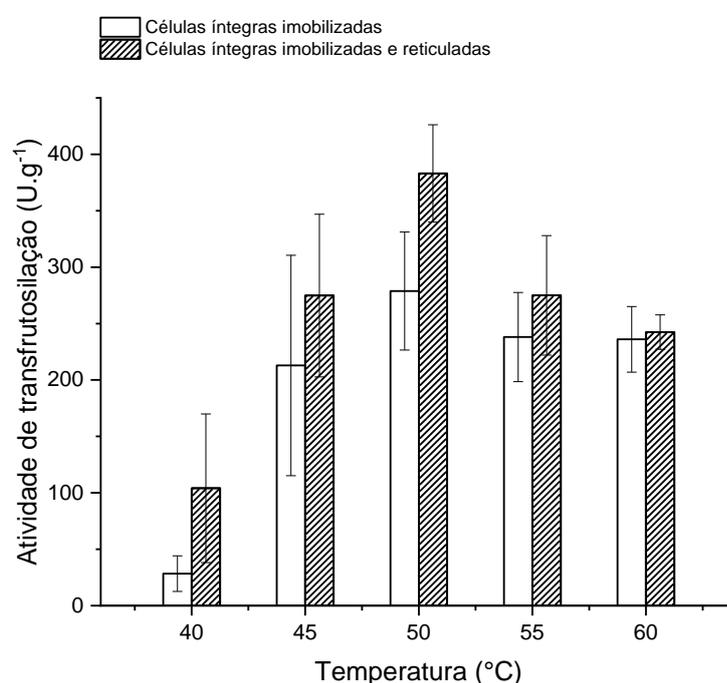
A influência da temperatura do meio reacional na atividade de transfrutossilagem de células de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas e imobilizadas/ reticuladas em esponja de poliuretano, é mostrada na Figura 9.

Observou-se que os maiores valores de atividade enzimática, iguais a $278,85 \pm 52,27 \text{ U g}^{-1}$ e $383,09 \pm 43,14 \text{ U g}^{-1}$, foram obtidos em meio reacional com temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, para as células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas, respectivamente.

A velocidade das reações catalisadas por enzimas aumenta com a temperatura até um certo limite. Acima de uma determinada temperatura, a atividade enzimática diminui com o aumento da temperatura devido à desnaturação do biocatalisador (SHULER; KARGI, 2002). Tal afirmação fica evidenciada ao observar o comportamento das atividades de transfrutossilagem da *A. oryzae* IPT-301 (Figura 9), cujo aumento da atividade enzimática ocorre até $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e, então, inicia-se o decréscimo da mesma. Quanto maior a temperatura, maior a frequência de colisões entre moléculas de substrato e sítios ativos. Isso resulta em mais moléculas de sacarose atingindo a energia de ativação, o que aumenta a taxa de reação enzimática devido ao aumento da velocidade e da energia cinética que acompanham os aumentos de temperatura (ALMEIDA; MARANA, 2019; FIELDS, 2001; GARCIA *et al.*, 2021;). Por

outro lado, em temperaturas mais elevadas, as enzimas sofrem desnaturação térmica, cujas interações moleculares que mantêm o equilíbrio de forças da proteína nativa (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals) são interrompidas, o que afeta a estrutura terciária da enzima fazendo com que sua atividade diminua (ANDRADES *et al.*, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2022; GOMES *et al.*, 2007).

Figura 9 - Influência da temperatura do meio reacional nas atividades de transfrutoseilação de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Nota: A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 48 % (m v⁻¹) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5, com velocidade de agitação de 190 rpm e durante 60 min

Os resultados foram similares aos dados reportados na literatura envolvendo células de *A. oryzae* IPT-301 *in natura* que apresentaram como melhor faixa de atividade temperaturas entre 45 e 60 °C (CUNHA *et al.*, 2019), células integras reticuladas com glutaraldeído com a melhor faixa de atividade entre 50 e 55 °C (GARCIA *et al.*, 2021), e células integras reticuladas com glutaraldeído e

encapsuladas em alginato de cálcio, cuja melhor faixa de atividade ocorreu entre 40 e 60 °C (GONÇALVES *et al.*, 2020).

Os menores valores de atividade de transfrutose, próximos ou abaixo de 100 U g⁻¹, foram observados à 40 °C para as células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas.

Verificou-se ainda que, para a faixa de temperatura compreendida entre 45 °C e 55 °C, as células imobilizadas/ reticuladas exibiram os maiores valores de atividade de transfrutose quando comparadas às células apenas imobilizadas, indicando um aumento de até 27 % para a temperatura de 50 °C. Para meios reacionais em temperatura similar, Garcia *et al.* (2021) reportaram um aumento de 34 % na atividade de transfrutose para células de *A. oryzae* IPT-301 reticuladas com glutaraldeído e Gonçalves *et al.* (2020) obtiveram um ganho de até 43 % na atividade enzimática para as células do mesmo microrganismo reticuladas e encapsuladas em gel de alginato. Os resultados mostram, portanto, que a técnica de imobilização de células por meio da reticulação com glutaraldeído é favorável ao aumento das atividades de transfrutose ao avaliar a influência da temperatura do meio reacional.

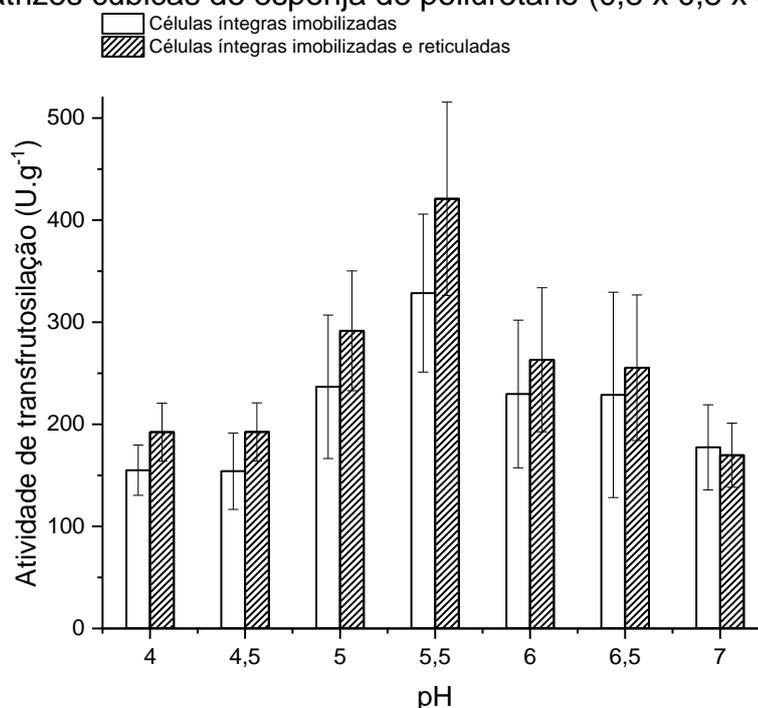
5.2.2 Influência do pH do meio reacional na atividade enzimática

A influência do pH do meio reacional na atividade de transfrutose de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e imobilizadas/ reticuladas em esponja de poliuretano é mostrada na Figura 10.

Observou-se que os maiores valores de atividade enzimática, iguais a 328,49 ± 77,34 e 420,87 ± 94,76 U. g⁻¹, foram obtidos em meio reacional com pH 5,5 para as células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas, respectivamente. Verificou-se ainda que, para a faixa de pH 4,0-6,5, as células imobilizadas/ reticuladas exibiram os maiores valores de atividade de transfrutose quando comparadas às células apenas imobilizadas, indicando um aumento de até 22% em pH 5,5. Os resultados foram similares aos dados reportados na literatura envolvendo células de *A. oryzae* IPT-301 *in natura* (CUNHA *et al.*, 2019), reticuladas com glutaraldeído (GARCIA *et al.*, 2021) e reticuladas com glutaraldeído e encapsuladas em alginato de cálcio (GONÇALVES *et al.*, 2020). Para meios reacionais em pH similar, Garcia *et al.* (2021) reportaram um aumento de 47 % na atividade de transfrutose para células de *A.*

oryzae IPT-301 reticuladas com glutaraldeído e Gonçalves *et al.* (2020) obtiveram um ganho de até 38 % na atividade enzimática para as células do mesmo microrganismo reticuladas e encapsuladas em gel de alginato.

Figura 10 - Influência do pH do meio reacional nas atividades de transfrutoseilação de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Nota: A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 48 % (m v⁻¹) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min

De acordo com Choukade e Kango (2021), a maioria das FTases fúngicas apresentam os maiores valores de atividade de transfrutoseilação para uma faixa de pH levemente ácido compreendida entre 4,5 e 6,0.

Os menores valores de atividade de transfrutoseilação, abaixo de 200 U g⁻¹ foram observados para faixas de pH extremos (pH 4 - 4,5 e pH 7,0) para as células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas. Extremos de pH podem levar a desnaturação enzimática e, essa mudança no pH, afeta diretamente a ionização dos resíduos de aminoácidos dos sítios ativos da enzima, afetando a ligação do substrato e a sua transformação em produto (CAMPESTRINI *et al.*, 2005).

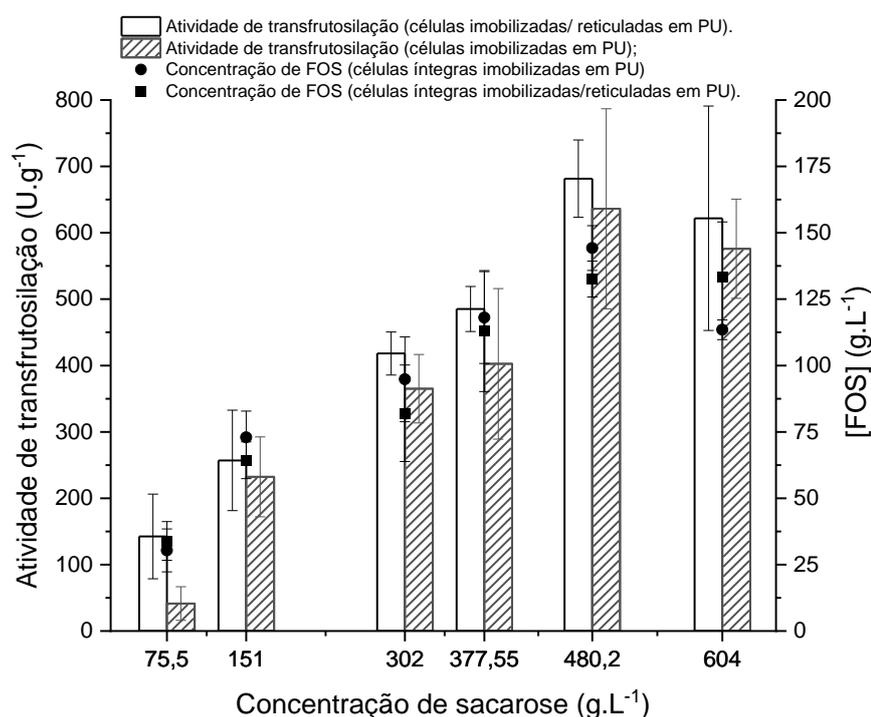
O efeito do pH sobre a catálise enzimática é devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da

concentração em H^+ . O processo de reticulação reduz os efeitos da queda de atividade enzimática, uma vez que as enzimas, aderidas às células, tornam-se mais resistentes às variações de forças iônicas do meio reacional (GARCIA *et al.*, 2021; LONG *et al.*, 1996; SHULER; KARGI, 2002).

5.2.3 Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos

A influência da concentração de sacarose do meio reacional na atividade de transfrutoseilação de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e imobilizadas/reticuladas em esponja de poliuretano está disposto na Figura 11.

Figura 11 - Influência da concentração de substrato nas atividades de transfrutoseilação de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm) e na concentração de FOS



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Nota: A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5, com velocidade de agitação de 190 rpm, 50 °C e durante 60 min

Para ambos os casos, verificou-se que os maiores valores de atividade enzimática, acima de 650 U g^{-1} , foram obtidos para concentração de sacarose igual a $480,2 \text{ g L}^{-1}$. Os resultados corroboram com Cunha *et al.* (2019), Garcia *et al.* (2021) e Gonçalves *et al.* (2020), cujos maiores valores de atividade enzimática ocorreram a $480,2 \text{ g L}^{-1}$, $377,5 \text{ g L}^{-1}$ e 400 g L^{-1} para as células de *A. oryzae* IPT-301 *in natura*, reticuladas e reticuladas e encapsuladas, respectivamente.

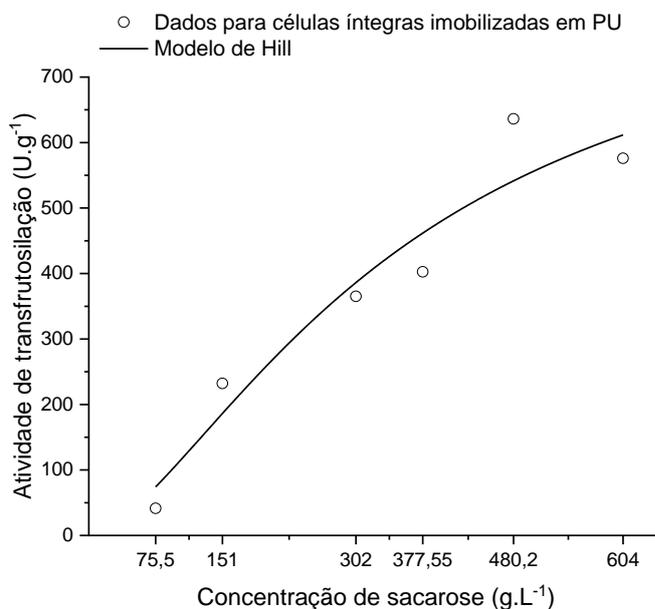
As atividades máximas de transfrutossilacção foram obtidas para concentrações de sacarose acima de 400 g L^{-1} ; o mesmo ocorre ao se avaliar a concentração de FOS em conjunto com a variação da concentração de sacarose no meio reacional. Para a concentração de $480,2 \text{ g L}^{-1}$ de substrato, foram obtidas as concentrações de FOS iguais a $144,2 \text{ g L}^{-1}$ e $132,5 \text{ g L}^{-1}$, para as células integras imobilizadas em EPU e imobilizadas e reticuladas, respectivamente. Isso mostra que a condição do meio enzimático é favorável a produção do açúcar prebiótico, sendo que sua máxima concentração coincide com a máxima atividade de transfrutossilacção.

Foi observado que, após as células microbianas atingirem seu nível mais alto de atividade enzimática, uma leve diminuição de A_T ocorreu para ambos os casos. Os resultados podem indicar a presença da inibição devido a saturação dos sítios ativos do complexo enzimático pelo substrato e/ou pelo produto ou uma possível limitação de acessibilidade do substrato aos sítios ativos das FTases aderidas às células microbianas (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001; ASHFAQUE *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2020). Por outro lado, valores relativamente baixos de atividade enzimática, menores que 250 U g^{-1} , foram obtidos para concentrações de sacarose abaixo de 151 g L^{-1} , indicando que a concentração de substrato foi insuficiente para a reação de transfrutossilacção. Em baixas concentrações de sacarose ($< 200 \text{ g L}^{-1}$), as atividades de transfrutossilacção são próximas às atividades da invertase do substrato (CUNHA *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2000). A hidrólise das moléculas de sacarose libera moléculas de glicose e frutose no meio reacional e as enzimas FTases, por sua vez, são inibidas pela glicose, ocasionando a redução na atividade de transfrutossilacção (CASTRO *et al.*, 2017; NOBRE *et al.*, 2018).

A cinética enzimática de transfrutossilacção das células de *A. oryzae* IPT-30 imobilizadas (Figura 12) e imobilizadas e reticuladas (Figura 13), foi avaliada de acordo com os modelos cinéticos clássicos reportados na literatura. O ajuste do

modelo de Hill aos dados experimentais para as células imobilizada em EPU, apresentou coeficiente de determinação de erro (R^2) igual a 0,928 (Tabela 4).

Figura 12 - Ajuste dos resultados experimentais ao modelo cinético de Hill para células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em matrizes cúbicas de esponjas de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Nota: A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5, com velocidade de agitação de 190 rpm, 50 °C e durante 60 min

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos e coeficiente de determinação de erros obtidos para o modelo cinético de Hill para células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja de poliuretano e imobilizada/reticuladas

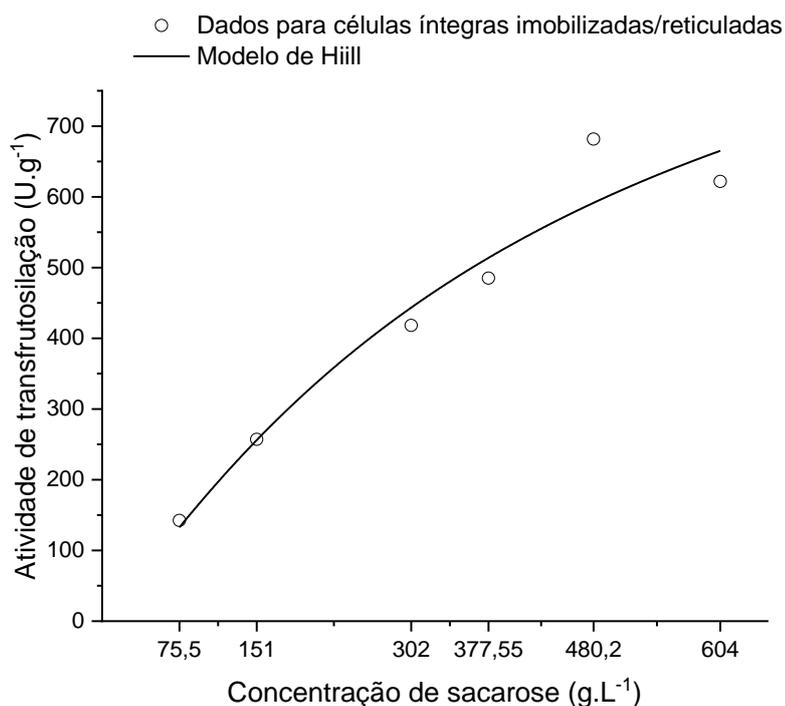
Parâmetros cinéticos do Modelo de Hill	Células imobilizadas em EPU	Células imobilizadas e reticuladas em EPU
$V_{\text{máx}}$ (U g ⁻¹)	879,6 ± 583,52	1142,52 ± 977,44
$K_{0,5}$ (g L ⁻¹)	353,9 ± 339,18	450,99 ± 376,39
n	1,54 ± 0,92	1,13 ± 0,62
R^2	0,928	0,946

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A cinética enzimática de transfrutossilção das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas/ reticuladas (Figura 13) também foi avaliada de acordo com o modelo

cinéticos citado. O ajuste do modelo de Hill aos dados experimentais para as células imobilizada/reticuladas em EPU, apresentou coeficiente de determinação de erro (R^2) igual a 0,946 (Tabela 4).

Figura 13 - Ajuste dos resultados experimentais ao modelo cinético de Hill para células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada/reticuladas em matrizes cúbicas de esponjas de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Nota: A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5, com velocidade de agitação de 190 rpm, 50 °C e durante 60 min

Os coeficientes de Hill, estimados para a FTase aderida nas células imobilizadas em EPU ($n = 1,54$) e para as células imobilizadas e reticuladas ($n = 1,13$), foram positivos e indicaram, portanto, um comportamento cooperativo positivo, isto é, a primeira molécula de sacarose que reage com a enzima causa um aumento da afinidade entre o resto dos sítios ativos e o substrato. O fato do coeficiente de Hill ser maior para a FTase aderida às células imobilizadas do que para as imobilizadas/reticuladas, indica que a cooperatividade é menor para as células imobilizadas/reticuladas.

Do ponto de vista prático, $K_{0,5}$ fornece informações sobre a eficiência com a qual a enzima se relaciona especificamente com o substrato. Baixos valores de $K_{0,5}$ indicam que, para uma igual concentração de substrato, a enzima se torna capaz de catalisar a transformação desse substrato a uma maior velocidade quando comparado a valores de $K_{0,5}$ elevados (SHULER; KARGI, 2002). Os valores obtidos para $K_{0,5}$ para as células imobilizadas e imobilizadas/ reticuladas foram de 353,9 g.L⁻¹ e 450,99 g.L⁻¹, respectivamente, sendo o menor para as células imobilizadas, demonstrando um melhor comportamento da enzima em relação ao substrato. A constante $K_{0,5}$ é independente da quantidade de enzima presente na reação e $V_{máx}$, a velocidade enzimática, depende dessa quantidade pois quanto mais enzima estiver presente no meio reacional, maior será a velocidade da reação. A velocidade máxima obtida para as células imobilizadas (879,6 U.g⁻¹) em comparação com as células imobilizadas e reticuladas (1142,52 U.g⁻¹), apresentou menor valor, fator discrepante ao com o coeficiente de Hill (n) e $K_{0,5}$ no qual as células imobilizadas apresentaram maior afinidade pelo substrato e cooperatividade quando apenas ligadas ao suporte.

O comportamento cinético de células integras *in natura*, reticuladas e reticuladas/encapsuladas de *A. oryzae* IPT-301 foram reportados na literatura. Os resultados obtidos por Garcia *et al.* (2021) demonstraram um melhor ajuste ao modelo de Hill para as células integras *in natura* e reticuladas. Gonçalves *et al.* (2020) obtiveram resultados semelhantes para células reticuladas/encapsuladas, o melhor ajuste foi para o modelo de Hill. O mesmo ocorreu para o coeficiente de Hill para ambos os autores, que também obtiveram valores positivos, para as imobilizações de células reticuladas e reticuladas/encapsuladas portanto, um comportamento cooperativo positivo, maior afinidade pelo substrato e cooperatividade.

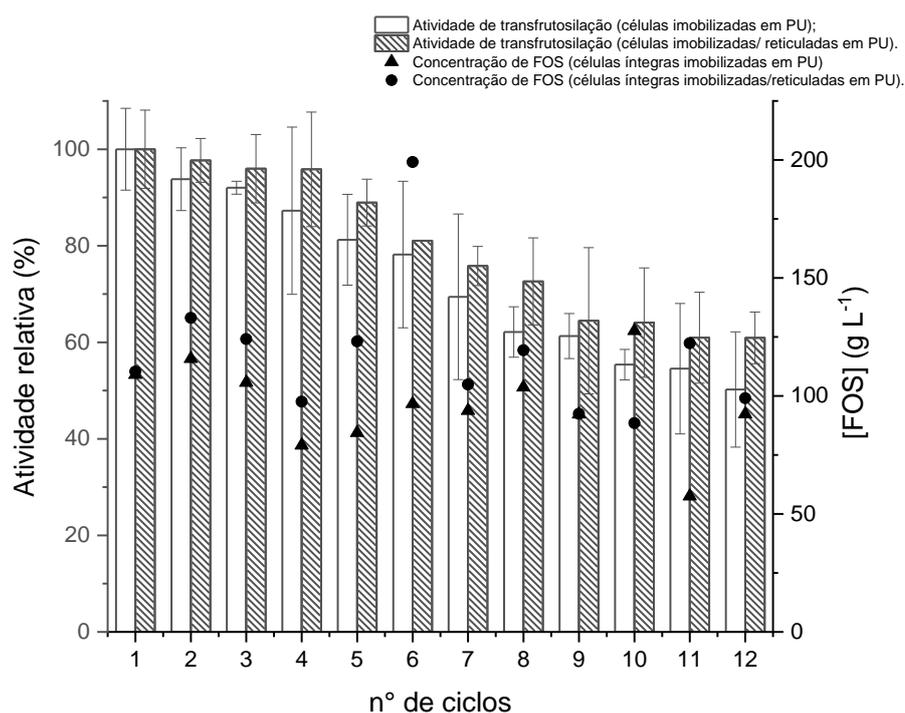
5.2.4 Estabilidade operacional

A avaliação da estabilidade operacional das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas foi realizada ao decorrer de 12 ciclos reacionais consecutivos em modo batelada (Figura 14).

Foi possível observar que os perfis de atividade de transfrutossilagem para ambos os casos apresentaram comportamentos distintos. Ao término de 12 ciclos reacionais, verificou-se que as células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas retiveram

atividades relativas de transfrutoseilação iguais a $50,23 \pm 11,90$ % e $60,90 \pm 5,30$ % da atividade enzimática inicial, respectivamente. Analisando ambos os perfis de estabilidade operacional, foi possível observar uma leve queda da atividade enzimática durante os primeiros quatro ciclos em batelada, cuja atividade do biocatalisador imobilizado/reticulado teve uma redução de apenas 4%, enquanto o biocatalisador imobilizado exibiu uma queda de atividade de 12%. Com a reticulação possivelmente ocorreu a formação de ligações entre o aldeído e grupos amino da proteína e da biomassa celular que provocaram um aumento da interação entre enzima e biomassa e são associadas ao aumento da estabilidade enzimática (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 2012; MONSAN, 1978)

Figura 14 - Estabilidade operacional de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponjas de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm) e concentração de FOS avaliadas durante ciclos reacionais consecutivos em batelada



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Nota: A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 48 % (m v⁻¹) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 5,5), com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C por 60 min. As atividades máximas de transfrutoseilação para as células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas foram de $922,77 \pm 85,56$ U g⁻¹ e $1089,95 \pm 99,48$ U g⁻¹, respectivamente, e definidas como 100 % para cálculo da atividade relativa

Foi possível observar ao longo dos ciclos reacionais que a concentração de FOS se manteve constante com pouca variação. Foram obtidas concentrações do açúcar prebiótico maiores que 90 g L^{-1} para ambas as condições de imobilização. Para as células imobilizadas em EPU, o maior valor para a concentração de FOS foi no 10º ciclo ($127,62 \text{ g L}^{-1}$), ao passo que ao se utilizar células microbianas imobilizadas e reticuladas, a concentração máxima de FOS ocorreu no 2º ciclo reacional ($133,1 \text{ g L}^{-1}$). Acredita-se que o resultado obtido para o 6º ciclo pode ser indicado como ponto fora da curva ($199,1 \text{ g L}^{-1}$).

Garcia *et al.* (2021), que reportaram um aumento da estabilidade operacional mediante reticulação de células de *A. oryzae* IPT-301 com glutaraldeído, obtiveram uma perda de apenas 11,1% da atividade inicial após 12 ciclos avaliados. Por sua vez, os estudos de estabilidade operacional realizados por Gonçalves *et al.* (2020) mostraram que a atividade de transfrutoseilação, de células de *A. oryzae* IPT-301 reticuladas e encapsuladas em alginato de cálcio, mantiveram em até 52% a atividade inicial, também para 12 ciclos reacionais avaliados.

5.2.5 Estabilidade enzimática frente ao pH

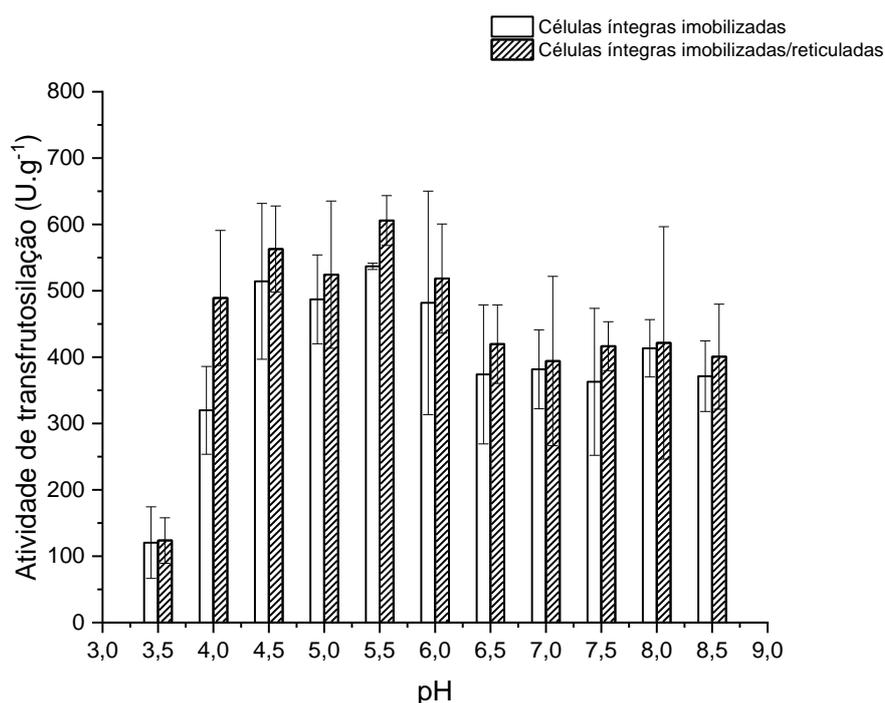
Na Figura 15 estão dispostos os resultados do efeito do pH de incubação na atividade de transfrutoseilação das células integras imobilizada em EPU e imobilizadas e reticuladas.

As células integras imobilizada e reticuladas em EPU exibiram maior estabilidade que o biocatalisador imobilizado em EPU, quando submetida a diferentes pH de incubação (Figura 15). Notou-se que, para ambas as condições de imobilização, os maiores valores de atividade de transfrutoseilação, foram obtidos para uma faixa de pH compreendida entre 4,5 e 6,0, sendo o pH 5,5 o que apresentou máxima atividade. Ressalta-se que, o comportamento da enzima imobilizada e imobilizada/reticulada, para a faixa de pH de 4,5 a 6,0, apresentou atividades com valores acima de 480 g L^{-1} e 515 g L^{-1} , respectivamente.

Cunha *et al.* (2019) observaram que a FTase *micelial in natura* de *Aspergillus oryzae* IPT-301 foi estável, quando avaliada a atividade de transfrutoseilação, após ser submetida ao armazenamento por 24 h, na ausência de substrato, em uma faixa de pH de 6,0 a 8,0. Garcia *et al.* (2021), estudando a mesma enzima, sob as mesmas

condições de armazenamento, verificaram que o biocatalisador tanto na sua *forma in natura* quanto reticulado com glutaraldeído se mostrou estável para pHs entre 4,5 e 7,5. Gonçalves *et al.* (2020), para o mesmo biocatalisador, verificou sua estabilidade na forma *in natura* e encapsulada em esferas de alginato, o qual se mostrou estável para pHs entre 4,5 e 6,5 para a forma pura e 5,5 a 7,5 para a enzima encapsulada.

Figura 15 - Estabilidade frente ao pH de células de *A. oryzae* IPT-301 immobilizadas e immobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponjas de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

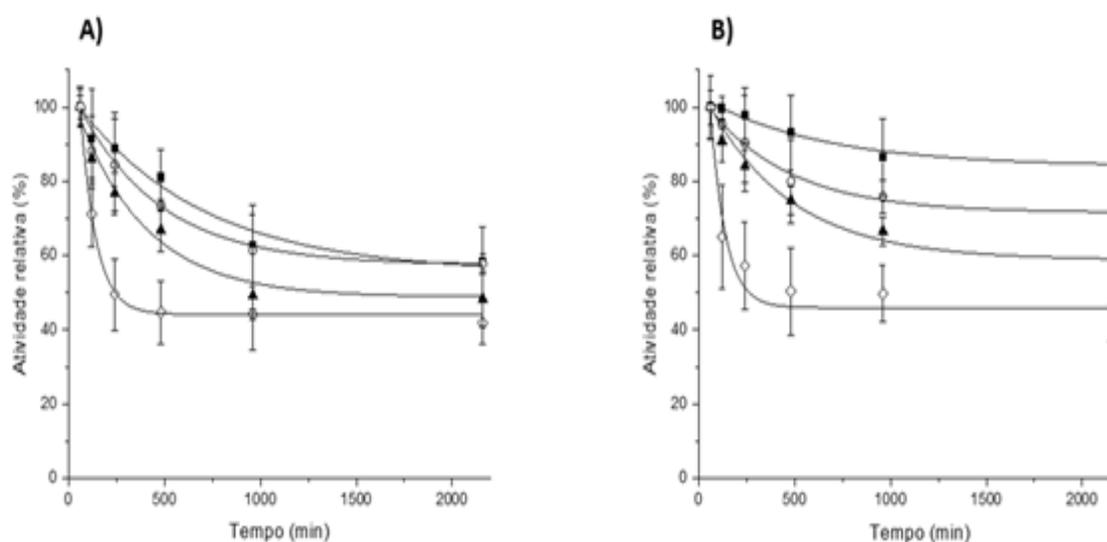
Nota: A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 48 % (m v-1) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min

Ressalta-se que enzimas estáveis para uma ampla faixa de pH são preferíveis por sua fácil produção, estocagem e aplicação industrial (HAYASHI *et al.*, 1990; XU *et al.*, 2015), características estas apresentadas pela FTase micelial, justificando, portanto, sua promissora aplicação em processos enzimáticos voltados à produção de FOS. (ARAÚJO *et al.*, 2022; CUNHA *et al.*, 2019)

5.2.6 Estabilidade térmica das células integras imobilizadas

Os perfis de estabilidade térmica, para diferentes temperaturas, das células de *A. oryzae* IPT-301, com atividade de transfrutoseilação, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matriz de esponja de poliuretano (EPU) são apresentados nas Figuras 16(A) e (B), respectivamente.

Figura 16 - Perfil de estabilidade térmica das células de *A. oryzae* IPT-301, com atividade de transfrutoseilação, imobilizadas em matriz de esponja de poliuretano (A) e imobilizadas e reticuladas em matriz de esponja de poliuretano (B) (0,8 x 0,8 x 0,8 cm) ao decorrer de 36 horas de incubação para diferentes temperaturas



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: 30 °C (■),
40 °C(○),
50 °C(▲)
60 °C(◇).

Nota: A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 48% (m v-1) em tampão tris-acetato (pH 5,5) 0,2 mol L⁻¹, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C por 60 min. A atividade máxima de transfrutoseilação para as células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas foi de 468,74 ± 22,29 U g⁻¹ e 529,26 ± 44,21 U g⁻¹, respectivamente, e definidas como 100 % para o cálculo da atividade relativa

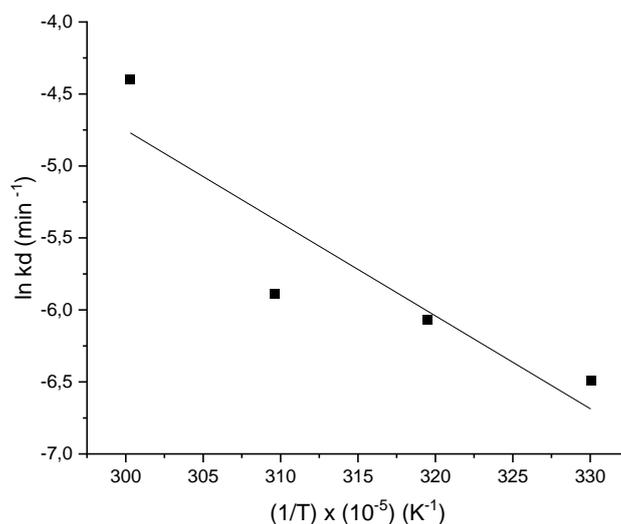
A Figura 16 (A) mostra as atividades relativas de transfrutoseilação após o pré-tratamento térmico das células integras imobilizadas em EPU. A maior retenção de atividade foi observada para as enzimas incubadas a 30 °C que, após 36 horas de

incubação, apresentaram atividade residual de $58,15 \pm 9\%$. Notou-se ainda que, para o mesmo tempo, a atividade residual expressou valores em torno de $57,8 \pm 2\%$, $48,2 \pm 7\%$ e $41,9 \pm 5\%$ para as temperaturas de $40\text{ }^\circ\text{C}$, $50\text{ }^\circ\text{C}$ e $60\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. De acordo com Garcia (2018), Cunha *et al.* (2019) e Gonçalves *et al.* (2020) as células de *A. oryzae* IPT-301, com atividade de transfrutossilção, apresentam maior termoestabilidade para uma faixa de temperatura compreendida entre $30\text{ }^\circ\text{C}$ e $40\text{ }^\circ\text{C}$.

A Figura 16 (B) mostra as atividades relativas de transfrutossilção após o pré-tratamento térmico das células integras imobilizadas e reticuladas em EPU. A maior retenção da atividade foi observada para as células catalíticas incubadas a $30\text{ }^\circ\text{C}$, cuja atividade residual foi de $84,8 \pm 4\%$ após 36 horas de incubação. Notou-se ainda que, para o mesmo tempo, a atividade residual expressou valores em torno de $68,8 \pm 11\%$, $47,7 \pm 10\%$ e $36,8 \pm 8\%$ para as temperaturas de $40\text{ }^\circ\text{C}$, $50\text{ }^\circ\text{C}$ e $60\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

As energias de ativação de desnaturação térmica (E_D , em kJ mol^{-1}) das células microbianas catalíticas imobilizada e imobilizadas e reticuladas em EPU foram determinadas pela linearização da Equação de Arrhenius (Figuras 17 e 18).

Figura 17 - Determinação da energia de ativação de desnaturação térmica (E_D)



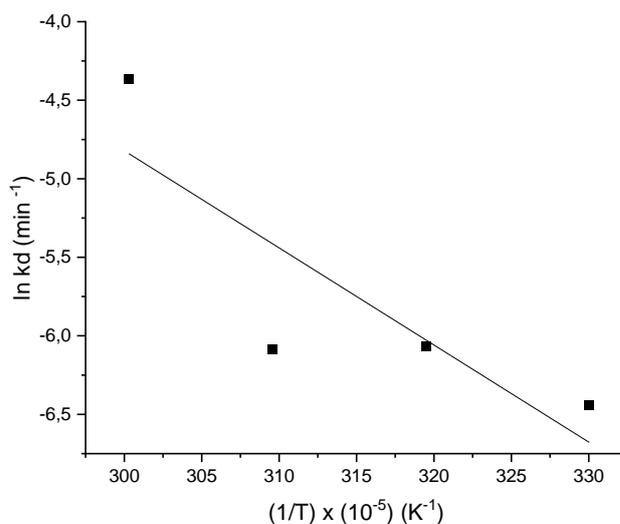
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Nota: A linearização da equação de Arrhenius [$\ln(kD)$ versus $(T-1)$] foi utilizada para estimar E_D das células catalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em matriz cúbica de esponja de poliuretano.

O ajuste mostrado na Figura 17 exibiu um coeficiente de correlação (R^2) de 82% e o parâmetro E_D foi obtida pela Equação (13).

$$\ln K_D = 14,59 - 0,06448 \frac{1}{T} \quad (13)$$

Figura 18 - Determinação da energia de ativação de desnaturação térmica (E_D)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Nota: A linearização da equação de Arrhenius [$\ln(k_D)$ versus $(T-1)$] foi utilizada para estimar E_D das células catalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e reticuladas em matriz cúbica de esponja de poliuretano

O ajuste mostrado na Figura 18 exibiu um coeficiente de correlação (R^2) de 72% e o parâmetro E_D foi obtida pela Equação (14).

$$\ln K_D = 13,72 - 0,06182 \frac{1}{T} \quad (14)$$

Os parâmetros termodinâmicos das células de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano, foram calculados a partir das curvas de inativação térmica e estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros termodinâmicos obtidos para as células de *A. oryzae* IPT-301, com atividade de transfrutoseilação, imobilizadas (CI) e imobilizadas e reticuladas (CIR) em matriz de esponja de poliuretano

Parâmetro	Biocatalisador	Temperatura (°C)			
		30	40	50	60
R ²	CI	0,98	0,99	0,97	0,99
	CIR	0,99	0,99	0,98	0,94
k _D (min ⁻¹)	CI	1,52 x 10 ⁻³	2,32 x 10 ⁻³	2,78 x 10 ⁻³	12,33 x 10 ⁻³
	CIR	1,59 x 10 ⁻³	2,32 x 10 ⁻³	2,28 x 10 ⁻³	12,69 x 10 ⁻³
t _{1/2} (min)	CI	456,01	298,78	249,33	56,21
	CIR	435,94	298,77	304,01	54,62
E _D (kJ mol ⁻¹)	CI	53,94			
	CIR	51,39			
ΔH _D (kJ mol ⁻¹)	CI	51,42	51,34	51,25	51,17
	CIR	48,87	48,79	48,71	48,63
ΔG _D (kJ mol ⁻¹)	CI	100,91	103,22	106,12	105,37
	CIR	100,79	103,22	106,65	105,28
ΔS _D (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	CI	-0,1633	-0,1657	-0,1698	-0,1627
	CIR	-0,1713	-0,1739	-0,1793	-0,1701

R², coeficiente de correlação para estimativa dos valores de k_D; k_D, constante de desnaturação térmica de primeira ordem; t_{1/2}, tempo de meia-vida; E_D, energia de ativação de desnaturação; ΔH_D, variação de entalpia de ativação de desnaturação; ΔG_D, variação da energia de Gibbs de ativação de desnaturação; ΔS_D, variação de entropia de desnaturação. Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O tempo de meia-vida (t_{1/2}) e a constante de desnaturação térmica de primeira ordem (k_D) para as células microbianas catalíticas, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas, diminuiu e aumentou, respectivamente, de forma progressiva com o aumento da temperatura, indicando a desnaturação térmica da FTase. Os valores de t_{1/2} obtidos foram muito próximos para ambos os biocatalisadores, sugerindo que a reticulação celular não afetou a termoestabilidade enzimática. Para a temperatura de 50 °C, cujo biocatalisador exibiu os maiores valores de atividade de transfrutoseilação, o t_{1/2} das células imobilizadas e reticuladas (CIR) se mostrou 1,2 vezes maior quando comparado ao t_{1/2} das células imobilizadas (CI). O t_{1/2} é definido como o tempo requerido para que a atividade enzimática se reduza à metade da atividade inicial a uma dada temperatura (ARAÚJO *et al.*, 2022; FARIA *et al.*, 2021; SAQIB *et al.*, 2010).

Um tempo de meia-vida mais longo indica que o biocatalisador pode resistir a essa temperatura por um período maior, aumentando a possibilidade de sua aplicação industrial (FERREIRA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2015).

De acordo com a Tabela 6, a energia de ativação de desnaturação (E_D) das células catalíticas imobilizadas (53,94 kJ mol⁻¹) foi ligeiramente maior que das células catalíticas imobilizadas e reticuladas (51,39 kJ mol⁻¹), cerca de 1,05 vezes, indicando que o processo de reticulação do biocatalisador na matriz de esponja de poliuretano não alterou fortemente a termoestabilidade do biocatalisador. A desnaturação térmica de enzimas consiste na modificação irreversível na conformação da biomolécula catalítica e sua ocorrência se deve ao fornecimento de energia de ativação. Logo, quanto maior o valor de E_D , maior a quantidade de energia requerida para a desnaturação da estrutura protéica e, portanto, maior a estabilidade térmica do biocatalisador (ARAÚJO *et al.*, 2022; FERREIRA *et al.*, 2018; SAQIB *et al.*, 2010). Garcia (2018), ao se avaliar a termoestabilidade de células catalíticas de *A. oryzae* IPT-301 reticuladas com glutaraldeído, verificou um aumento de 1,08 vezes na E_D quando comparado com as células catalíticas *in natura*. Gonçalves *et al.* (2020) reportaram um aumento de 4,5 vezes nesse parâmetro para o biocatalisador obtido a partir da combinação das técnicas de reticulação e encapsulação de células catalíticas do mesmo microrganismo.

A variação de entalpia de ativação de desnaturação térmica (ΔH_D), assim como E_D , é um importante parâmetro termodinâmico associado à quantidade total de energia requerida para a desnaturação enzimática (ARAÚJO, 2021; SAQIB *et al.*, 2010; MARANGONI, 2003). Valores elevados e positivos de ambos os parâmetros indicam elevada estabilidade térmica do biocatalisador (FARIA *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2015). De acordo com a Tabela 6, os maiores valores de ΔH_D foram obtidos para as células catalíticas imobilizadas em matriz de esponja de poliuretano para todas as temperaturas avaliadas, o que mostra um aumento de termoestabilidade do biocatalisador quando apenas imobilizado no suporte, sem necessidade do processo de reticulação.

Embora altos valores de ΔH_D sugiram a termoestabilidade do biocatalisador, a análise das variações de entropia de ativação de desnaturação térmica (ΔS_D) e da energia de Gibbs de ativação de desnaturação térmica (ΔG_D) é de fundamental importância para a complementação dos estudos de termoestabilidade enzimática

(ARAÚJO *et al.*, 2022; FARIA *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2020).

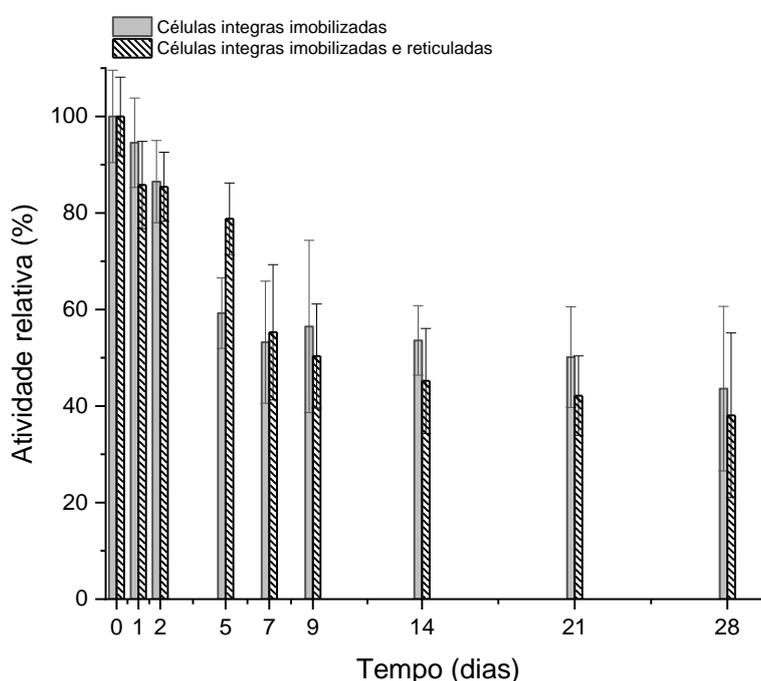
A desnaturação térmica da enzima causa a ruptura da estrutura protéica e gera um sistema desordenado, ocasionando o aumento da entropia (ARAÚJO *et al.*, 2022; GONÇALVES *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Desse modo, a desnaturação depende de ΔS_D , parâmetro este que expressa a quantidade de energia, por grau de desordem, envolvida na transição de um estado nativo para um estado desnaturado da enzima (ARAÚJO *et al.*, 2022; MARANGONI, 2003; SOUZA *et al.*, 2015). De acordo com a Tabela 6, os valores de ΔS_D obtidos foram negativos para ambos os biocatalisadores (CI e CIR) para toda faixa de temperatura avaliada, o que indica a transição para um estado mais ordenado. Ressalta-se ainda que o aumento da temperatura pode enfraquecer as interações polares da enzima e fortalecer suas interações hidrofóbicas. Isso pode explicar os valores negativos de ΔS_D , uma vez que a resistência da enzima ao desdobramento de sua estrutura, devido as interações hidrofóbicas mais fortes, supera a tendência da estrutura da enzima ser destruída devido às interações polares enfraquecidas em altas temperaturas (FARIA *et al.*, 2021; SAQIB *et al.*, 2010; SIDDIQUI *et al.*, 1997).

Finalmente, ΔG_D é o parâmetro mais preciso e confiável para se avaliar a termoestabilidade de biocatalisadores, pois considera simultaneamente as contribuições da entalpia e da entropia (ARAÚJO *et al.*, 2022; SAQIB *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015). Ressalta-se ainda que os valores de ΔG_D resultam das forças estabilizadoras presentes na estrutura molecular das enzimas, incluindo as ligações de hidrogênio e interações de van der Waals (FERREIRA *et al.*, 2018). Valores altos e positivos desse parâmetro termodinâmico indicam alta termoestabilidade do biocatalisador (DAMODARAN, 2005; MARANGONI, 2003). A obtenção de valores positivos de ΔG_D também sinalizam que, na condição de equilíbrio, a concentração de proteína no estado nativo é maior do que no estado desnaturado (FERREIRA *et al.*, 2018; SAQIB *et al.*, 2010). Portanto, para ambos os biocatalisadores obtidos (CI e CIR), a transição do estado nativo para o estado desnaturado da FTase indicou um processo de desnaturação térmica não-espontâneo (FERREIRA *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2020).

5.2.7 Estabilidade de armazenamento das células integras imobilizadas

Para verificar a estabilidade de armazenamento, os biocatalisadores foram mantidos sob refrigeração a 4 °C por 28 dias e suas atividades enzimáticas foram determinadas ao longo desse período (Figura 19).

Figura 19 – Perfis de estabilidade de armazenamento das células *de A. oryzae* IPT-301, com atividade de transfrutoseilação, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matriz cúbica de esponja de poliuretano (0,8 x 0,8 x 0,8 cm)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Nota: Condições experimentais: a reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 48 % (m v-1) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C por 60 min. As atividades máximas de transfrutoseilação para as células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas foram de 910,29 ± 98,56 U g⁻¹ e 1075,73 ± 97,05 U g⁻¹, respectivamente, e definidas como 100 % para o cálculo da atividade relativa

Verificou-se uma maior estabilidade de armazenamento das células integras imobilizadas e reticuladas em EPU nos primeiros 7 dias de incubação. Assim, após 7 dias de incubação, as células imobilizadas na matriz passaram a apresentar um comportamento mais estável. Ao decorrer dos ensaios de armazenamento, as atividades relativas das células imobilizada apresentaram queda, porém, de forma

menos acentuada e mantendo uma perda da atividade de transfrutoseilação inicial menor do que para condição das células imobilizada/reticulada ao decorrer de 28 dias de avaliação. As células integras imobilizadas em EPU após 28 dias exibiram retenção de 43 % da sua atividade inicial ($396,89 \pm 98,32 \text{ U g}^{-1}$), enquanto as células integras imobilizadas/reticulas apresentaram retenção de 38 % da sua atividade inicial ($409,62 \pm 107,84 \text{ U g}^{-1}$).

Gonçalves *et al.* (2020) realizaram o mesmo ensaio para as células de *A. oryzae* IPT-301 encapsuladas e obtiveram uma perda de apenas 5 % da sua atividade inicial ao final do 9º dia; entretanto, a duração do ensaio foi de 15 dias e a perda foi de aproximadamente $90 \text{ U g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Para a atual estudo a perda da atividade foi de aproximadamente $18 \text{ U g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para as células integras imobilizadas em EPU e $27 \text{ U g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para as células integras imobilizadas e reticuladas.

Ressalta-se que após o 5º dia de incubação, as células microbianas para ambas as condições de imobilização, apresentaram atividades de transfrutoseilação próximas a 50 % da atividade inicial e estas permaneceram estabilizadas e constantes até o término do experimento ao final de 28 dias.

A capacidade de armazenamento da enzima imobilizada, para aplicação futura, é um dos fatores mais significativos para se avaliar a usabilidade da enzima. Assim, os biocatalisadores imobilizados que apresentam maiores valores de estabilidade de armazenamento promovem a otimização do tempo e custos operacionais quando aplicados em processos de larga escala. (ARAUJO *et al.*, 2022; HORN *et al.*, 2006)

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a produção e imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT 301, com atividade de transfrutossilação, em esponja de poliuretano, por cultivo celular submerso em meio de cultura sintético. Concluiu-se que:

Por meio da curva de crescimento microbiano, ficou evidenciado que o melhor tempo de cultivo celular foi de 32 h, cuja concentração de células imobilizadas foi de 11,89 g_{células} g_{suporte}⁻¹ com atividade média de transfrutossilação igual a 145,43 U g⁻¹;

As melhores condições do meio reacional foram obtidas para concentração de sacarose 480,2 g L⁻¹, temperatura de 50 °C e pH 5,5.

O modelo cinético de Hill apresentou bons ajustes aos dados experimentais de atividade enzimática para as células imobilizadas ($V_{\text{máx}} = 879,60 \text{ U g}^{-1}$, $K_{0,5} = 353,90 \text{ g L}^{-1}$ e $n = 1,54$) e imobilizadas e reticuladas ($V_{\text{máx}} = 1142,52 \text{ U g}^{-1}$, $K_{0,5} = 450,99 \text{ g L}^{-1}$ e $n = 1,13$).

Os ensaios de estabilidade operacional mostraram que as células imobilizadas e imobilizadas e reticuladas retiveram cerca de 50,23% e 60,90% da atividade de transfrutossilação, respectivamente, após 12 ciclos reacionais consecutivos em batelada;

Os ensaios de estabilidade térmica mostraram uma maior termoestabilidade para as células imobilizadas em relação as células imobilizadas e reticuladas. Os valores de $t_{1/2}$ obtidos foram muito próximos para ambos os biocatalisadores, sugerindo que a reticulação celular não afetou a termoestabilidade enzimática. Para a temperatura de 50 °C, cujo biocatalisador exibiu os maiores valores de atividade de transfrutossilação, o $t_{1/2}$ das células imobilizadas e reticuladas (CIR) se mostrou 1,2 vezes maior quando comparado ao $t_{1/2}$ das células imobilizadas (CI).

Os ensaios de estabilidade frente ao pH evidenciaram a faixa de 4,5 a 6,0 para incubação da enzima, na qual as atividades de transfrutossilação foram maiores para ambas as imobilizações.

Os ensaios de armazenamento das células revelaram uma estabilidade próxima a 40% em relação a atividade de transfrutossilação inicial retida após 28 dias de incubação para ambas as condições de imobilização avaliadas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade desse trabalho, são propostas as seguintes sugestões:

- Aplicação dos biocatalisadores heterogêneos, desenvolvidos nesse trabalho, como leito de recheio em reatores de leito fixo e estudo da viabilidade técnico-econômica do processo operado em modo contínuo para a síntese de FOS;
- Otimização das variáveis de imobilização – temperatura, pH e velocidade de agitação – por meio de planejamento de experimentos, durante ensaios de cultivo celular;
- Desenvolvimento, *in loco*, das etapas simultâneas de cultivo e imobilização de células microbianas, com atividade catalítica, em reator de leito fixo recheado com estruturas monolíticas de materiais orgânicos e inorgânicos e avaliação dos parâmetros cinéticos, termodinâmicos, de transferência de massa e de desempenho do processo.

REFERÊNCIAS

ABSOLUTE REPORTS. **Global fructooligosaccharide (FOS) sales market report**, 2021. Disponível em: <<https://www.absolutereports.com/global-fructooligosaccharide-fos-sales-market-17387945>> Acesso em: 16 dez 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA - ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde**. 2019. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-de-produtos-origem-vegetal/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas_anvisa.pdf. Acesso em: 13 jun 2022.

ALLES, M. J. L. **Aplicação de processos de separação por membranas para a obtenção de fruto-oligossacarídeos funcionais a partir da raiz de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.

ALMEIDA, V. M.; MARANA, S.R. Optimum temperature may be a misleading parameter in enzyme characterization and application. **Plos one**, 2019.

ANDRADES, D.; GRAEBIN, N.G.; KADOWAKI, M.K.; AYUB, M.A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. Immobilization and stabilization of different β -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: optimal protocol depends on the enzyme. **Int J Biol Macromol** v. 129, p. 672-678, 2019.

ANTCZAK, T.; HILER, D.; KRYSZYNOWICZ, A.; SZCZESNA-ANTCZAK, M.; BIELECKI, S.; GALAS, E. Activity of immobilised *in situ* intracellular lipases from *Mucor circinelloides* and *Mucor racemosus* in the synthesis of sucrose esters. **Progress in Biotechnology**, v. 17, p. 221-227, 2002.

ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.

ARAÚJO, *et al.* Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. **J Chem Technol Biotechnol** p. 1-12, 2022.

ARAÚJO, I. M. **Imobilização de frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em polihidroxibutirato e sua caracterização bioquímica para a produção de fruto-oligossacarídeos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2021.

ASHFAQUE, M.; SOLOMON, S; PATHAK, N. Kinetic study of immobilized cellobiase produced from immobilized wild-type *Trichoderma longibrachiatum*. **Sugar Tech**; v. 18, p. 340-346, 2015.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Investigation of deactivation thermodynamics of lipase immobilized on polymeric carrier. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 5, p. 741–757, 2017.

BARBOSA, G. N. DE O. **Produção de frutossiltransferase por *Rhodotorula sp.*** 2007. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochem.** v. 47, p. 1220-1227, 2012.

BLANCH, M.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T.; ESCRIBANO, M. I.; MERODIO, C. Fructo-oligosaccharides in table grapes and response to storage. **Food Chemistry**, v. 129, p. 724-730, 2011.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

BRENDA. **Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig**. 2018. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.9>>.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 254-267, 2005.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.36, p.48-57, 2006.

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

CASTRO, R. J. S.; SATO, H.H. Protease from *Aspergillus oryzae*: Biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolases with antioxidant activities. **Journal of Food Processing**, v. 2014, 2014.

CHAPLIN, M.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 990.

CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 153-160, 1996.

CHIEN, C. S.; LEE, W. C.; LIN, T. J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4–5, p. 252–257, 2001.

CHOUKADE, R.; KANGO, N. Production, properties, and applications of fructosyltransferase: a current appraisal, **Critical Reviews in Biotechnology**, (2021).

CORCUERA, M. A.; D'ARLAS, B. F.; ARBELAIZ, A.; MARIETA, C.; MONDRAGON, I.; ECEIZA, A. Microstruture and properties of polyurethanes derived from castor oil. **Polymer Degradation an Stability**, v. 95, p. 2175-2184, 2010.

COURTIN, C. M.; SWENNEN, K.; VERJANS, P.; DELCOUR, J. A. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 112, p. 831-837, 2009.

CRUZ, J. *et al.* Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 7–14, 2012.

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

CUNHA, J. DE S. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de fruto-oligossacarídeos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2017.

CUNHA, J.S.; OTTONI, C.A.; MORALES, S.A.V.; SILVA, E.S.; MAIORANO, A.E.; PERNA, R.F. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Braz J Chem Eng**. v. 36, p. 657-658, 2019.

DACEWICZ, E.; GRZYBOWSKA-PIETRAS, J. Espumas de poliuretano para tratamento de esgoto doméstico. **Materiais** 2021; 14(4):933.
<https://doi.org/10.3390/ma14040933>

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.D.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**. v. 27, n. 4, p. 623-30, 2004.

DAMODARAN, S. Protein: denaturation, in Handbook of Food Science, **Technology and Engineering**, p. 1–14, 2005.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema** 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2010

DE ORY, I.; ROMERO, L. E.; CANTERO, D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter acet.* **Process Biochemistry**, v. 39, p. 547-555, 2004.

DE ORY, I.; CABRERA, G. M.; BLANDINO, A. Immobilization of Cells on Polyurethane Foam. In: Guisan, J. M. (Ed.) *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, **Humana Press Inc.**, p. 357-365, 2006.

DIAS, G. S *et al.* Study on the transfructosylation activity of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells in a packed bed reactor aiming at fructooligosaccharide production, **Chem Technology and Biotechnology**, v. 97, p. 2904-2911, 2022.

DIAS, G. S. **Implementação de reator de leito fixo empacotado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para produção de fruto-oligossacarídeos**. 2020. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2020.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**, 3rd Edition. Academic Press. New York. p.1116. 1979.

DORTA C. *et al.* Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 1003–1009, 2006.

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

FARIA, L.L. *et al.* Biochemical characterization of extracelular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on sílica gel for the production of fructooligossacarídeos. **Biotechnology letters**, v.43, p.43-59, 2021.

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

FERNANDEZ-ARROJO, L.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; GUTIERREZ-ALONSO, P.; FERNANDEZ-LOBATO, M.; ALCALDE, M.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J.

Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. **Process Biochem.**, v. 48, p. 677–682, 2013.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. *et al.* Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220–1227, 2012.

FERREIRA, M. M.; SANTIAGO, F.L.B.; SILVA, N.A.G.; LUIZ, J.H.H.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A.A. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochem**, v. 67, p. 55–63, 2018.

FIGUEROA-GONZÁLEZ, I.; QUIJANO, G.; RAMÍREZ, G.; CRUZ-GUERRERO, A. Probiotics and prebiotics-perspectives and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1341-1348, 2011.

FIELDS, P. A. Review: Protein function at thermal extremes: Balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 129, n. 2–3, p. 417–431, 2001.

FONTES, R. **Enzimas e cinética enzimática**. 2005. p. 32.

FORTES, R. C.; MUNIZ, L. B. Efeitos da suplementação dietética com fruto-oligossacarídeos e inulina no organismo humano: Estudo baseado em evidências. **Ciência & Saúde**, v. 20, p. 241-252, 2009.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 287-291, 2002.

GANAIE, M. A.; LATEEF, A.; GUPTA, U. S. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2143–2159, 2014.

GANAIE, M. A. *et al.* Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 840–844, 2014.

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

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic

microbiota-introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GOHEL, V.; NASEBY, D.C. 2007. Thermalstabilization of chitinolytic enzymes of *Pantoea dispersa*. **Biochem. Eng. J.** v. 35, p. 150–157.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. **Quim Nova**, v. 30(1), p.136-145, 2007.

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

GONZALEZ-TOMAS, L.; COLL-MARQUÉS, J.; COSTELL, E. Viscoelasticity of inulin-starch-based dairy systems. Influence of inulin average chain length. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1372-1380, 2008.

GUISAN, J.M. Immobilization of Enzymes and Cells. **Humana Press**, 3 ed, New York, 2013

HAMA, S.; YAMA, H.; KAIEDA, M.; ODA, M.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 155-160, 2004.

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

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

HORN, S. J., M. *et al.* Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*, **Biocatal. Biotransfor**, v. 24, p. 39–53, 2006.

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

INSTITUTO DE PESQUISA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO. **MEV**. Mensagem recebida por e-mail em 30 mar. 2022. Disponível em: <https://mail.google.com/>
Acesso em: 30 mar. 2022.

JITONNOM, J.; KETUDAT-CAIRNS, J.R.; HANNONGBUA S. QM/MM modeling of the hydrolysis and transfructosylation reactions of fructosyltransferase from *Aspergillus japonicas*, an enzyme that produces prebiotic fructooligosaccharide. **J. Mol. Graph. Model.** 79:175–184, 2018

JUNG, K.H. *et al.* Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, p. 491–494, 1989.

KAUSHIVA, B. D; MCCARTNEY, S. R.; ROSSMY, G. R.; WILKES, G. L. Surfactant level influences on structure and properties of flexible slabstock polyurethane foams. **Polymer**, v. 41, p. 285-310, 2000.

KILONZO, P.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. Effects of nuface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices **Bioresource Technology**, v 102. p 3662-3672, 2011.

KIM, B.W. *et al.* Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Bioprocess Engineering**, v.23, p.11–16, 2000.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

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.

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

LAN, Q.; HAUGSTAD, G. Characterization of polymer morphology in polyurethane foams using atomic force microscopy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, p. 2644-2651, 2011.

LEGIER, V.; COMEAU, L. C. Continuous synthesis of esters by cell-bound fungal lipases in an organic solvent. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 732-736, 1992.

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

L'HOMME, C.; PUIGSERVER, A.; BIAGINI, A. Effect of food-processing on the degradation of fructooligosaccharides in fruit. **Food Chemistry**, v. 82, p. 533-537, 2003.

LI, W.; ZHANG, J.; YU, C.; LI, Q.; DONG, F.; WANG, G.; GU, G.; GUO, Z. Extraction, degree of polymerization determination and prebiotic effect evaluation of inulin from Jerusalem artichoke. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 315-319, 2015.

LINGYUN, W.; JIANHUA, W.; XIAODONG, Z.; DA, T.; YALIN, Y.; CHENGGANG, C.; TIANHUA, F.; FAN, Z. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 1087-1093, 2007.

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

LONG, K. *et al.* In situ crosslinking of *Aspergillus flavus* lipase: improvement of activity, stability and properties. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 10, p. 1169–1174, 1996.

LORENZONI, A. S. G.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 193-197. 2014

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

MACEDO, L. L.; VIMERCATI, W. C.; & ARAÚJO, C. S. Fructooligosaccharides: nutritional, technological and sensory aspects. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, p.1-9, 2020

MAIORANO, A.E.; SILVA, E.S.; PERNA, R.F. *et al.* Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor. **Biotechnol Lett** v. 42, 2619–2629 (2020).

MANECKE, G. Immobilization of enzymes by various synthetic polymers. **Biotechnol Bioeng Symp**, v. 3, p. 185-187, 1972.

MARTINEZ, C. O. *et al.* Effective Immobilization of *Agrobacterium sp.* IFO 13140 Cells in LoofaSponge for Curdlan Biosynthesis. **Molecules**, v 20, p 7957-7973, 2015.

MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

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

MENDES, A.A. *et al.* Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-40, 2011

MEYER, D.; BAYARRI, S.; TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1881-1890, 2011.

MIGNEAULT, I. *et al.* Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004b.

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

MIRANDA, J. S. *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.

MORDOR INTELLIGENCE. Global nutraceuticals market - growth, trends and forecasts (2017 -2022). Mordor Intelligence. Abril de 2017. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-nutraceuticalsmarketindustry?gclid=CjsKDwjw6qnJBRDpoonDwLSeZhkAlpTR8Lv0J0UzcsFD-TDSowPYe15clf2l1hTNGZ5NW-D1GLKGgJKzPD_BwE>. Acesso em 20 de maio de 2017.

MORRIS, C.; MORRIS, G. A. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. **Food Chemistry**, v. 133, p. 237-248, 2012.

MONSAN, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 3, n. 5, p. 371–384, 1978.

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

MUSSATTO, S. I.; AGUILAR, C. N.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 6, p. 795–800, 2009.

NAJADA, A. R. AL. *et al.* Immobilisation of α -amylase on activated amidrazone acrylic: a new approach for the enhancement of enzyme stability and reusability. **Scientific Reports**, v.9, 2019.

NINESS, K. R. Inulin and oligoductose: What are they? **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1402-1406, 1999.

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

OLIVEIRA, A. E. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula Sp.* e aplicação na produção de fruto-oligossacarídeos.** 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

OLIVEIRA, R. L., *et al.* Immobilization of a commercial *Aspergillusaculeatus* enzyme preparation with fructosyltransferase activity in chitosan beads: A kinetic/thermodynamic study and fructo-oligosaccharides continuous production in enzymatic reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 122, p. 169–182, 2020.

ORDÓNEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de alimentos.** Porto Alegre: Artmed. 2005

OTTONI, C.A.; CUERVO-FERNÁNDEZ, R.; PICCOLI, R. M.; MOREIRA, R.; GUILARTE-MARESMA, B.; SABINO DA SILVA, E.; RODRIGUES, M. F. A.; MAIORANO, A. E. Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, ed. 1, p.49-59, 2012.

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

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

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

PERNA, R. F.; CUNHA, J. S.; GONÇALVES, M. C. P.; BASSO, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. Microbial Fructosyltransferase: Production by Submerged Fermentation and Evaluation of pH and Temperature Effects on Transfructosylation and Hydrolytic Enzymatic Activities. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 4, Issue-3, 2018.

PUNEKAR, N.S. **Enzymes: Catalysis, kinetics and mechanisms**. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: A review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, p. 103-148. 1993

ROMERO, C. M.; PERA, L. M.; OLIVARO, C.; VAZQUEZ, A.; BAIGORI, M. D. Tailoring chain length selectivity of a solvent-tolerant lipase activity from *Aspergillus niger* MYA 135 by submerged fermentation. **Fuel Processing Technology**. v. 98, p. 23-29, 2012.

RUEDA, N. *et al.* Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: a mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 128, p. 10–18, 2016.

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

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Maximization of fructooligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up. **Journal of Food Engineering**, v. 68, p. 57-64, 2005.

ŠEDO VÁ, M.; ILLEOVÁ, V.; ANTOŠOVÁ, M. *et al.* Production of fructosyltransferase in mechanically stirred and air-lift bioreactors. **Chem. Pap**. v. 68, p. 1639–1648, 2014.

SCHUEPP, C.; KERMASHA, S.; MICHALSKI, M. C.; MORIN, A. Production, partial purification and characterization of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037 **Process Biochemistry**, v. 32, p. 225-232, 1997.

SHELDON, R.A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance.

Advances in Synthesis and Catalysis, v.349, p.1289-1307, 2007.

SHIOMI, N.; ABE, T.; KIKUCHI, H.; ARITSUKA, T.; TAKATA, Y.; FUKUSHI, E.; FUKUSHI, Y.; KAWABATA, J.; UENO, K.; ONODERA, S. Structural analysis of novel kestose isomers isolated from sugar beet molasses. **Carbohydrate Research**, v. 424, p. 1-7. 2016.

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

SILVA, A. S. S.; HAAS, P.; SARTORI, N. T.; ANTON, A. A.; FRANCISCO, A. Frutoligossacarídeos: Fibras alimentares ativas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, p. 295-304, 2007.

SILVA, M. B. P. O. *et al.* Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, 24, 2021.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P. Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 435-450, 2010.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P.; KENNEDY, J. F. Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 565-572. 2016.

SIDDIQUI, K. S.; SAQIB, A.A.N.; RASHID, M.H.; RAJOKA, MI. Thermostabilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnol Lett**, v. 19, p. 325–329, 1997.

SOARES, M. S., **Síntese e caracterização de esponjas de poliuretano para imobilização de células e aplicação na síntese de biodiesel** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, 2012.

SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R.; RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2016.

SONNENSCHNIG, M.; WENDT, B. L.; SCHROCK, A. K.; SONNEY, JEAN-MARIE; RYAN, A. J. The relationship between polyurethane foam microstructure and foam aging. **Polymer**, v. 49, p. 934-942, 2008.

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

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

TÁRREGA, A.; TORRES, F. D.; COSTELL, E. Influence of the chain-length distribution of inulin on the rheology and microstructure of prebiotic dairy desserts. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 356-363, 2011.

TSUJITA, Y.; ENDO, A. Extracelular acid protease of *Aspergillus oryzae* grown on liquid media: multiple forms and association with heterogeneous polysaccharides. **Journal of Bacteriology**. p. 48-56. 1997.

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

VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; VAZOLLER, R.F.; FORESTI, E. Colonização microbiana de matrizes de espuma de poliuretano em reator anaeróbio de lodo imobilizado de fluxo horizontal. **Aplic. Microbiol. Biotecnologia**. 1997, 48 , 534-538.

VAZ-TOSTES, M.; VIANA, M. L.; GRANCIERI, M.; LUZ, T. C.; PAULA, H DE.; PEDROSA, R. G.; COSTA, N. M. Yacon effects in immune response and nutritional status of iron and zinc in preschool children. **Nutrition**, v. 30, p. 666-672, 2014

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

VEGA, R.; ZUNIGA-HANSEN, M. E. The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. **Food Chemistry**, v. 173, p. 784-789. 2015.

VORAGEN, A. G. J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 328-335, 1998.

XIAO, M.; MATHEW, S.; OBBARD, J. P. A newly isolated fungal strain used as whole-cell biocatalyst for biodiesel production from palm oil. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 2, p. 45-51, 2010.

WANG, T. Synthesis of neofructooligosaccharides. **Organic Chemistry Insights**, v.5,

p. 1-6, 2015.

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

WIHODO, M.; MORARU, C. I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical and properties of protein films: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 114, p. 292-302, 2013.

WONG, C. M.; WONG, K. H.; CHEN, X. D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 927–938, 2008.

XU, Q. *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, v.50, p. 1237–1246. 2015.

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

ZAMBELLI, P.; TAMBORINI, L.; CAZZAMALLI, S.; PINTO, A.; ARIOLI, S.; BALZARETTI, S.; PLOU, F. J.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; MOLINARI, F.; CONTI, P. ROMANO, D. An efficient continuous flow process for the synthesis of a non-conventional mixture of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, p. 607–613, 2016.

ZAKRZEWSKA, M. E.; BOGEL-ŁUKASIK, E.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Solubility of carbohydrates in ionic liquids. **Energy & Fuels**, v. 24, 2^a ed., p. 737-745. 2010

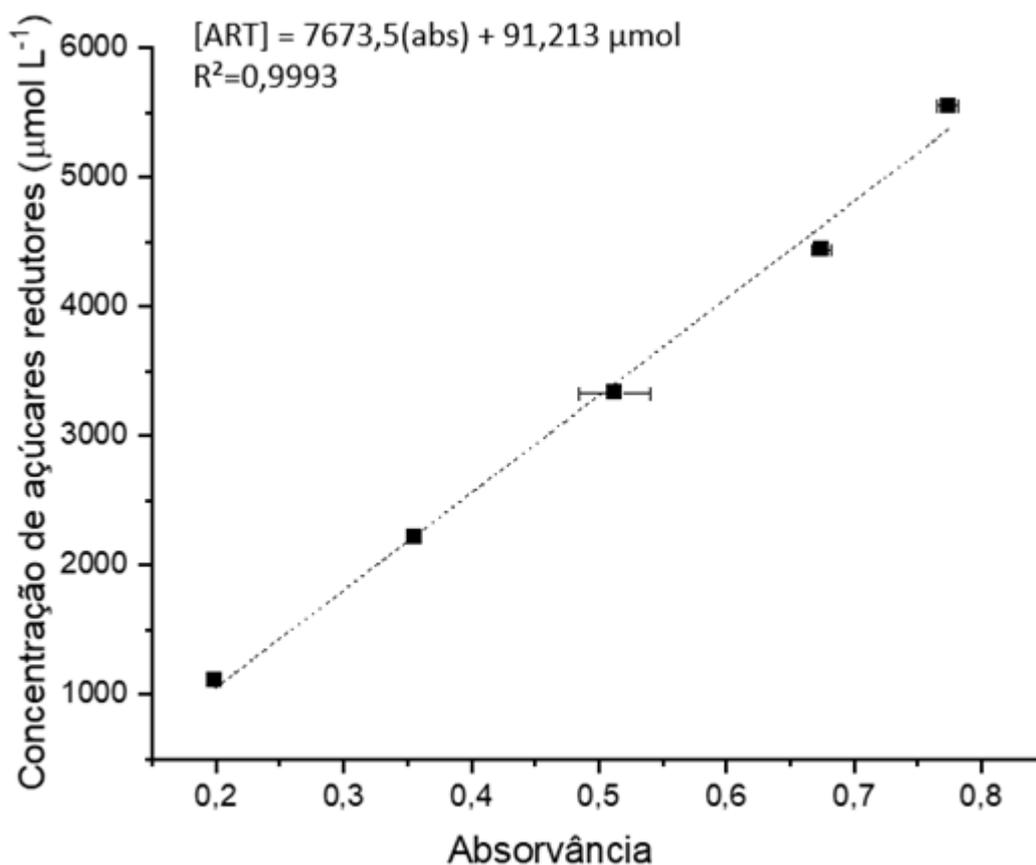
ZECK, S. E. C. **Utilização de espumas uretânicas no tratamento de óleo mineral isolante contaminado com PCB.** (Dissertação de Mestrado), Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba 2004.

ZHANG, J. *et al.* Enhancing fructooligosaccharides production by genetic improvement of the industrial fungus *Aspergillus niger* ATCC 2061. **Journal of Biotechnology**, v. 249, p. 25-33, 2017.

ZHOU, Z. *et al.* Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous Mesoporous Mat.**, v. 154, p. 133-141, 2012.

APÊNDICE A – Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR).

Figura 20 - Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).