

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
CAMPUS AVANÇADO POÇOS DE CALDAS

FÁBIO MEGDA

**IMOBILIZAÇÃO DA FRUTOSILTRANSFERASE DE *Aspergillus oryzae* IPT-301
EM ÓXIDO DE ZINCO PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

POÇOS DE CALDAS/ MG
2023

FÁBIO MEGDA

**IMOBILIZAÇÃO DA FRUTOSILTRANSFERASE DE *Aspergillus oryzae* IPT-301
EM ÓXIDO DE ZINCO PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas - *Campus* Avançado Poços de Caldas. Área de concentração: Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melina Savioli Lopes.
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna.

POÇOS DE CALDAS/ MG
2023

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

Megda, Fábio.

Imobilização da frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em óxido de zinco para produção de frutooligossacarídeos / Fábio Megda. - Poços de Caldas, MG, 2023.

67 f. : il. -

Orientador(a): Melina Savioli Lopes.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Frutossiltransferase. 2. *Aspergillus*. 3. Imobilização. 4. Óxido de zinco. 5. Caracterização enzimática. I. Lopes, Melina Savioli, orient. II. Título.

IMOBILIZAÇÃO DA FRUTOSILTRANSFERASE DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM ÓXIDO DE ZINCO PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

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

Aprovada em: 29 de março de 2023.

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

Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida
Instituição: Universidade Federal do Tocantins

Profa. Dra. Sylma Carvalho Maestrelli
Instituição: Universidade Federal de Alfnas



Documento assinado eletronicamente por **Melina Savioli Lopes, Professor do Magistério Superior**, em 29/03/2023, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sylma Carvalho Maestrelli, Professor do Magistério Superior**, em 29/03/2023, às 22:41, 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 **Alex Fernando de Almeida, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 11:38, 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 **0942277** e o código CRC **02255A1B**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me conceder saúde, força e sabedoria para conseguir vencer essa caminhada.

Aos meus pais, Murilo e Natalina, aos meus irmãos, minha cunhada e pelos meus sobrinhos que sempre firmou que sempre o estudo e o conhecimento foram os melhores caminhos a se seguir, agradeço também pelo apoio, confiança e luta e todo suporte durante essa árdua trajetória.

Aos meus amigos, em especial, Gabriel, Marcus e Marina que foram essenciais durante essa reta final e a todos meus amigos de longa e curta data.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Melina Savioli Lopes, pelo conhecimento compartilhado e paciência durante essa caminhada, sem medir esforços durante toda minha pesquisa para que eu conseguisse alcançar meu objetivo, os meus sinceros agradecimentos. Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, pelo apoio durante as atividades de laboratório durante essa trajetória.

Agradeço também a Prof^a. Dr^a. Sylma Carvalho Maestrelli pela disponibilidade, suporte e confecção das peças de óxido de zinco, aos técnicos do laboratório: Talita, Cristiano, Luana e Guilherme. Um agradecimento especial à Ju pelos ensinamentos e por me encorajar todos os dias durante minhas atividades, que levava uma leveza aos dias árdus e corridos de laboratório.

A todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que de certa forma, cada um com sua singularidade, que me fizeram chegar até aqui. À Nathália e Aline, que me acompanharam durante essa jornada e à Beatriz Zama, aluna de IC, pelo auxílio em meus experimentos.

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 docentes do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pelos conhecimentos fornecidos ao longo dos anos e por todas as experiências compartilhadas.

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

RESUMO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são açúcares prebióticos e, portanto, benéficos à saúde e nutrição humana. Esses açúcares apresentam baixo teor calórico e podem ser consumidos por pessoas diabéticas, além de ser grande potencial de aplicação na indústria alimentícia podem ser substitutos por açúcares convencionais. A síntese enzimática de FOS ocorre pela atividade de transfrutossilação (A_T) em moléculas de sacarose, por meio da enzima microbiana frutossiltransferase (FTase, E.C. 2.4.1.9), sendo que as FTases podem ser produzidas a partir do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 por meio do cultivo celular submerso. Deste modo, este trabalho teve como objetivo estudar a imobilização da frutossiltransferase em peças de óxido de zinco (ZnO) por meio da adsorção física. Os parâmetros de imobilização em óxido de zinco apresentaram um rendimento de imobilização de 38,00% e uma atividade recuperada de 3,22%. O estudo do efeito de concentração mostrou que a maior atividade foi atingida para concentração de 600 g. L⁻¹ de substrato, tendo ajuste ao modelo de Hill. O ensaio de estabilidade ao pH indicou que o biocatalisador apresenta maiores estabilidades em pH entre 6,0 e 6,5. A estabilidade térmica do biocatalisador não foi expressiva em comparação à enzima solúvel; portanto, apresentou tempo de meia-vida em 1,70 vezes que a enzima solúvel a 30°C. A enzima imobilizada apresentou estabilidade ao armazenamento com atividade relativa acima de 75% após 2 dias. Os estudos de caracterização físico-químico comprovaram a imobilização da enzima na superfície do suporte, corroborando com uma imobilização satisfatória da FTase.

Palavras-chave: frutossiltransferase; *Aspergillus*; imobilização; óxido de zinco; caracterização enzimática.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are prebiotic sugars and therefore beneficial to human health and nutrition. These sugars have a low caloric content and can be consumed by diabetic people, in addition to having great potential for application in the food industry, they can be substitutes for conventional sugars. The enzymatic synthesis of FOS occurs through the activity of transfructosylation (A_T) in sucrose molecules, through the microbial enzyme fructosyltransferase (FTase, E.C. 2.4.1.9), and FTases can be produced from the fungus *Aspergillus oryzae* IPT-301 by submerged cell culture medium. Thus, this work aimed to study the immobilization of fructosyltransferase in pieces of zinc oxide (ZnO) through physical adsorption. The immobilization parameters in zinc oxide showed an immobilization yield of 38.00% and a recovered activity of 3.22%. The concentration effect study showed that the highest activity was achieved for a concentration of 600 g. L⁻¹ of substrate, having fit to the Hill model. The pH stability test indicated that the biocatalyst has greater stability at pH between 6.0 and 6.5. The thermal stability of the biocatalyst was not significant compared to the soluble enzyme; therefore, it presented a half-life of 1.70 times that of the soluble enzyme at 30°C. The immobilized enzyme showed storage stability with relative activity above 75% after 2 days. The physical-chemical characterization studies confirmed the immobilization of the enzyme on the surface of the support, corroborating with a satisfactory immobilization of the FTase.

Keywords: fructosyltransferase; *Aspergillus*; immobilization; zinc oxide; enzymatic characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Moléculas dos principais frutooligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C)	13
Figura 2 - Esquema da reação de transfrutossilacção	16
Figura 3 - Métodos de imobilização de enzimas.	22
Figura 4 - Estrutura cristalina do ZnO (<i>wurtzita</i>).....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas estabelecida pela NC-IUBMB.....	15
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Frutossiltransferase (FTase)	14
2.1.1. Atividade de Transfrutossililação (A_T)	15
2.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA	16
2.3. Estabilidade enzimática	17
2.3.1. Influência da temperatura na cinética enzimática	17
2.3.2. Efeitos do pH na atividade enzimática	20
2.4. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	21
2.4.1. Adsorção Física	22
2.5. TIPOS DE SUPORTES	23
2.5.1. Óxido de Zinco (ZnO)	24
2.6. IMOBILIZAÇÃO DA FTase	25
3. Imobilização da frutossiltransferase de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em óxido de zinco para produção de frutooligossacarídeos	27
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

FOS são oligossacarídeos constituídos de 1-kestose, nistose e frutofuranosil nistose; esses açúcares podem ser encontrados em vegetais, podendo ser produzidos pela hidrólise enzimática da inulina, sendo encontrados em baixas concentrações ou por meio da reação de transfrutossilação da sacarose por enzimas específicas, como a frutossiltransferase (EC 2.4.1.9) (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; FARIA *et al.*, 2021; PASSOS; PARK, 2003). Dentre as diversas vantagens à saúde humana, destaca-se sua atuação como agentes de controle do colesterol, além de poderem ser consumidos por diabéticos. Os FOS têm grandes perspectivas de substituição do açúcar convencional, pois seu poder adoçante é de 40 a 60% vezes maior em relação à sacarose (CUNHA *et al.*, 2019; KUMAR; DUBEY, 2019).

Segundo Reports and Data (2020) estima-se que, entre os anos de 2019 e 2027, há perspectiva de crescimento da produção de FOS em 10,4% ao ano, além de alcançar um faturamento de U\$\$ 3,88 bilhões no ano de 2027. Porém, atualmente não há tecnologia desenvolvida no mercado nacional que torne viável a produção em grande escala devido aos custos operacionais (SOUZA *et al.*, 2017).

As enzimas apresentam excelentes perspectivas como biocatalisadores e diversas vantagens, como baixo tempo de reação e menor produção de resíduos quando comparados aos catalisadores químicos. Entretanto, o uso de enzimas livres não é viável industrialmente, já que oferecem baixa estabilidade e estão presentes em baixa quantidade quando solúveis, além de dificuldades em fazer o reuso da mesma. Uma opção para contornar esses obstáculos é a sua imobilização, a qual minimiza esses problemas ocasionados com o uso da enzima livre, tornando os custos mais acessíveis e diminuindo etapas de purificação e refinamento do produto (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006; THANGARAJ; SOLOMON, 2019).

Um biocatalisador heterogêneo consiste em uma enzima solúvel imobilizada em um material de suporte, tendo em vista que a técnica de imobilização elimina processos de separação do produto de interesse, além de oferecer resistência à solventes e estabilidade aos agentes desnaturantes como temperatura e pH, podendo ser utilizadas em processos contínuos (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006). Para uma melhor performance do biocatalisador heterogêneo, a escolha do material, deve-

se considerar as interações entre enzima e o suporte, para uma maior retenção e atividade enzimática.

Diversos tipos de materiais estão disponíveis no mercado, e podem vir a ser testados experimentalmente. Alguns fatores que interferem na eficiência da imobilização de enzimas incluem a flexibilidade conformacional, grupos funcionais na superfície do suporte, estabilidade de imobilização, hidrofília e hidrofobia e presenças de aditivos (LIU *et al.*, 2021).

Assim, para o presente trabalho, visando intensificar a produção dos frutooligossacarídeos e propor uma metodologia em escala industrial, imobilizou-se a enzima frutossiltransferase (FTase) extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em peças cerâmicas de óxido de zinco. Além disso, buscou-se um biocatalisador robusto e estável em meio os parâmetros de desnaturação da enzima, como temperatura, concentração e armazenamento. Vale evidenciar que esses estudos foram os primeiros obtidos para a FTase de *Aspergillus oryzae* ITP-301 adsorvida em óxido de zinco, um semicondutor com elevada estabilidade química e térmica, apresentando uma continuidade nos estudos dessa enzima e para inserção nos processos biotecnológicos em escala piloto e industrial.

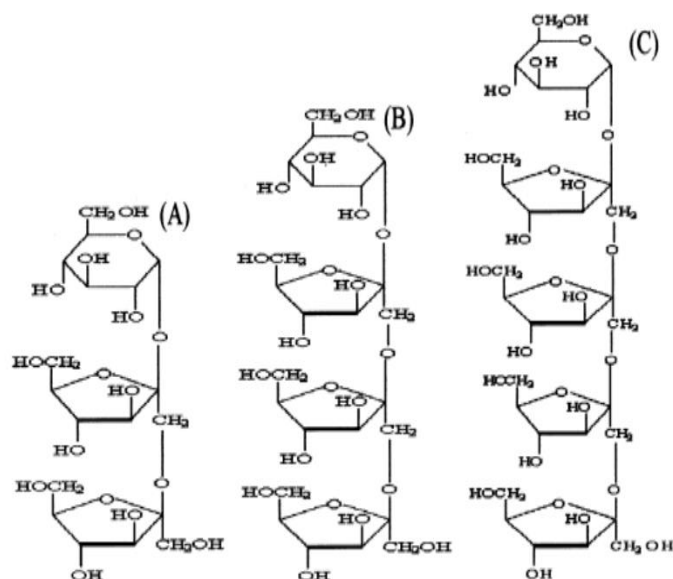
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os frutooligossacarídeos são açúcares prebióticos que apresentam algumas vantagens em relação ao açúcar convencional, dos quais destacam-se os baixos níveis de colesterol, serem não carcinogênicos, redução da absorção de lipídeos e carboidratos, prevenindo cáries e o câncer de cólon, entre outros (BOUHNİK *et al.*, 1996; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; PASSOS; PARK, 2003).

Estudos demonstram que a ingestão de baixa dose de frutooligossacarídeos (5 gramas por dia) proporciona um crescimento seletivo de bifidobactérias que atuam na microbiota. Outra característica deste açúcar é o baixo índice glicêmico e apresentam baixo valor calórico (1,5 kcal/ grama) (KHANVILKAR; ARYA, 2015).

A composição dos frutooligossacarídeos é dada por oligômeros de frutose como a 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄), no qual as unidades de frutossil (F) são ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose (YUN, 1996; OJWACH *et al.*, 2020). Os FOS apresentam viscosidade maior que a sacarose devido ao maior peso molecular dos oligossacarídeos; além disso, são altamente higroscópicos e possuem alta solubilidade em água (KHANVILKAR; ARYA, 2015; KUMAR; DUBEY, 2019). A Figura 1 demonstra a estrutura química das principais moléculas constituintes do FOS.

Figura 1 - Moléculas dos principais frutooligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C)



Fonte: Adaptado de Passos e Park (2003)

O FOS, por meio da inulinase, contém grau de polimerização de 2 a 10, em que normalmente se encontra de grau 5 e são presentes em diversos alimentos, como alcachofra, chicória, banana, alho, cebola, entre outros (KUMAR *et al.*, 2018; SANTOS, 2002). A concentração de frutooligossacarídeos em fontes naturais varia de 0,15% a 0,75% (KHANVILKAR, ARYA, 2015; SANTOS, 2002). A produção deste açúcar nesses alimentos se dá por meio da hidrólise enzimática da inulina, utilizando a enzima inulinase, sendo formado subprodutos como a frutose e glicose (CUNHA, 2017; MUTANDA *et al.*, 2014).

Diante do rendimento baixo por meio da enzima inulinase, a alternativa para produção destes frutooligossacarídeos é a partir de enzimas específicas como a frutossiltransferase (EC 2.4.1.9), que é capaz de transferir grupos frutossil para moléculas de sacarose, formando assim cadeias maiores (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; CUNHA *et al.*, 2019).

Em sua maioria, os FOS podem apresentar maior poder adoçante em relação aos açúcares convencionais, de aproximadamente 40% a 60%, além de apresentar alta solubilidade por não cristalizarem (CUNHA, 2017; MUTANDA *et al.*, 2014).

2.1. FRUTOSILTRANSFERASE (FTase)

As enzimas são proteínas de alto peso molecular que variam entre 15000 até milhões de Daltons, conhecidas por atuarem como catalisadores biológicos altamente seletivos e ativos (ZDARTA *et al.*, 2018; SHULER; KARGI, 2002). Assim como os catalisadores convencionais, uma enzima possibilita que uma reação ocorra mais rapidamente caso não houvesse um catalisador no meio, acelerando a velocidade de reação por meio da queda da energia de ativação, tornando a reação termodinamicamente espontânea (CUESTA *et al.*, 2015).

Segundo a classificação da Comissão de Enzimas (EC) do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB), estas são classificadas em 6 classes, apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação das enzimas estabelecida pela NC-IUBMB.

Classificação e classes	Catalisam
EC 1 – Oxido-redutases	Reações de óxido-redução ou troca de elétrons
EC 2 – Transferases	Reação de transferência de grupos reativos
EC 3 – Hidrolases	Reações hidrolíticas
EC 4 – Liases	Reações por oxidação ou hidrólises
EC 5 – Isomerases	Reação de isomerização
EC 6 – Ligases	Reação derivação da união de dois componentes

Fonte: Adaptado de CUESTA *et al.* 2015.

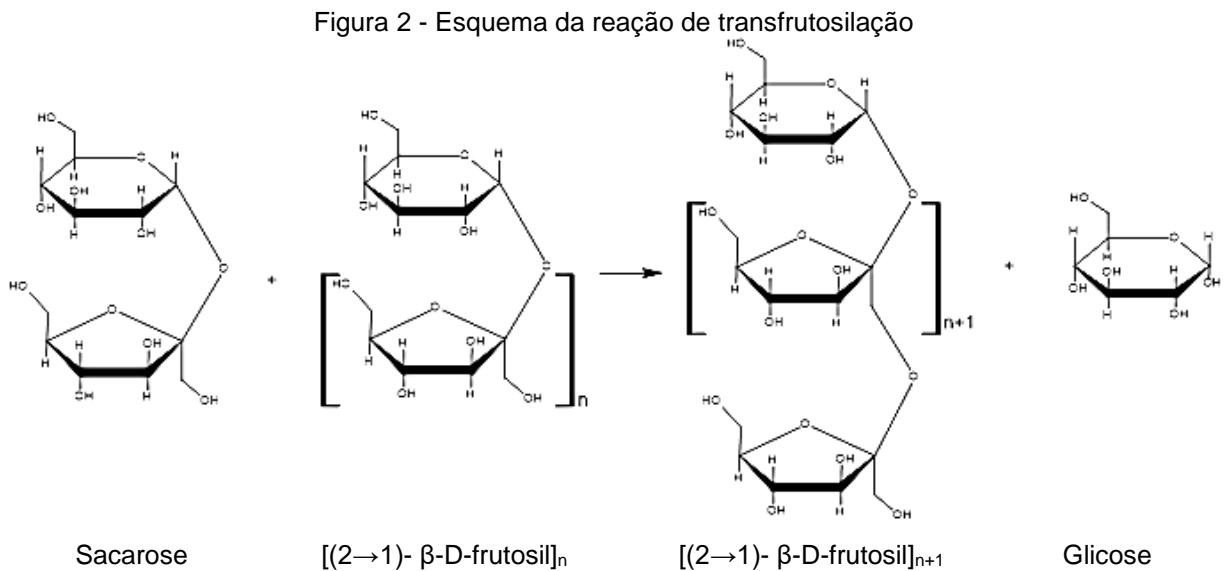
Dentre as diversas classificações de enzimas, a FTase (EC 2.4.1.9) pode ser classificada como transferases já que seu mecanismo de reação se dá por meio de transferência de grupos frutossil para a molécula de sacarose, produzindo os frutooligossacarídeos (FARIA *et al.*, 2021; GANAIE *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020). Segundo FARIA *et al.* (2021), a enzima FTase apresenta baixa atividade hidrolítica, caracterizando a baixa afinidade com a água; além disso, apresentando altos rendimentos de produção de frutooligosacarídeos (FOS).

Alguns microorganismos são utilizados para síntese dessa enzima, a saber: *Aspergillus sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Pencillium sp.* e *Fusarium sp.* Diversos estudos relatam que o *Aspergillus oryzae* IPT – 301 obtém alto poder de produção da FTase (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; GANAIE *et al.*, 2014; MUSSATO; MANCILHA, 2007). Cunha *et al.* (2019) produziram a enzima frutossiltransferase extracelular a partir do micro-organismo *Aspergillus oryzae* IPT-301, destacando um alto poder de produção da enzima com os parâmetros de cultivo de celular a 200 rpm, pH 5,5, 30°C durante um tempo total de 72 horas.

2.1.1. Atividade de Transfrutosilação (A_T)

A atividade de transfrutosilação promovidas pela enzima frutossiltransferase, consistena na transferência de grupos frutossil para a molécula de sacarose ou de outro frutooligossacarídeo (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001). Dessa forma, esta reação consiste em clivar as ligações do tipo β -(2→1) da molécula de sacarose que liga a

metade frutossil à outra de glicosil, transferindo o grupo frutossil para uma molécula aceptora, que pode ser a sacarose ou molécula de FOS, produzindo a glicose como subproduto (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001, CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2021; YUN *et al.*, 1996). A Figura 2 ilustra a reação de transfrutosilação.



Fonte: Adaptado de Cunha (2017)

Faria *et al.* (2021) e Cunha *et al.* (2019) definem a atividade de transfrutosilação como a quantidade de enzima necessária para transferir um micromol ($1\ \mu\text{mol}$) de frutose transfrutosilada por minuto sob condições experimentais definidas.

2.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

A cinética enzimática é o estudo de fatores que influenciam a velocidade de reação que são catalisadas por enzimas, diversos fatores são capazes de alterar a cinética enzimática como o pH, temperatura, concentração de reagentes e das enzimas, presença ou não de ativadores e inibidores. Desta forma, para descrever o comportamento e a influência que essas variáveis impactam a cinética da reação, alguns modelos matemáticos e equações empíricas são obtidas como resposta (ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010; WEISS, 1997).

O modelo de Hill é apresentado na Equação 1, 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).

$$v = \frac{V_{max} [S]^n}{[S]^n + (K_{0,5})^n} \quad (1)$$

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 1 passa a representar uma cinética de Michaelis-Menten (WEISS, 1997).

Para o entendimento do efeito da concentração de substrato na cinética enzimática, no qual a concentração da enzima não sofre variação, pode-se observar que a velocidade de reação será diretamente proporcional a concentração, ou seja, a baixas concentrações, a velocidade será igualmente baixa. Quando se tem o aumento da concentração de substrato, a velocidade de reação também é crescente. Todavia, há um limite desse aumento de velocidade com a concentração, de acordo com a saturação de substrato na enzima (ARAÚJO *et al.*, 2022; FARIA *et al.*, 2021).

2.3. ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

2.3.1. Influência da temperatura na cinética enzimática

A temperatura do meio reacional influencia diretamente a energia cinética da enzima e dos componentes presentes no meio, sendo que com o aumento da temperatura, aumentará a energia cinética que é responsável pelas colisões, ocasionando um maior contato entre substrato e sítio ativo da enzima, decorrendo em uma maior taxa reacional. Conjuntamente, a enzima pode ser desnaturada em temperaturas muito altas. Desse modo, há uma temperatura ótima (para cada enzima,

seja ela livre ou imobilizada) na qual se desenrola a máxima taxa reacional (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2021)

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, essas estão representadas pelas Equações 2 e 3, respectivamente.

$$k_A = A_A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (2)$$

$$k_D = A_D \cdot e^{\frac{-E_D}{RT}} \quad (3)$$

em que k_A e k_D são 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 ($8,314 \text{ J. mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) e T a temperatura absoluta (K) (ARAÚJO *et al.*, 2022; MIRANDA *et al.*, 2014).

Sadana e Henley (1987) estudaram um modelo matemática para estimar os parâmetros de inativação térmica, por meio do ajuste aos dados experimentais da atividade residual *versus* tempo de incubação da enzima. O modelo matemático é apresentado pela Equação 4.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1) \exp \exp (k_D t) + \alpha_1 \quad (4)$$

em que A/A_0 é a atividade residual adimensional, 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 incubação (minutos).

Outros parâmetros termodinâmicos são utilizados como tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e o fator de estabilidade (FE), descritos pelas Equações 5 e 6, respectivamente.

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln \ln 2}{k_D} \quad (5)$$

$$FE = \frac{t_{\frac{1}{2}}^{\text{imobilizada}}}{t_{\frac{1}{2}}^{\text{solúvel}}} \quad (6)$$

O tempo de meia-vida enzimática 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; MIRANDA *et al.*, 2014; PERNA *et al.*, 2017; SAQID *et al.*, 2010). Já o fator de estabilidade (FE), utilizado para estabelecer a eficiência da imobilização, considera o tempo de meia vida antes e após o processo de imobilização (ARAÚJO *et al.*, 2022; FARIA *et al.*, 2021).

A desnaturação enzimática se dá pela transição de um estado menor de energia para outro de maior energia, para que ocorra a transição irreversível, é necessário uma quantidade de energia mínima, caracterizada como energia de desnaturação mínima (E_D). A variação de entalpia de ativação da desnaturação (ΔH_D), calculada pela Equação 7, equivale à energia necessária para a desnaturação da enzima. Assim, altos valores de entalpia apontam uma maior termoestabilidade enzimática (FARIA *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2013; SAQID *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015).

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

Outros dois parâmetros para analisar a termoestabilidade enzimática são a energia livre de Gibbs (ΔG_D) e a entropia (ΔS_D). A energia livre de Gibbs é o parâmetro de mais confiável para se analisar a termoestabilidade enzimática, devido que este engloba entalpia e entropia para determinar a espontaneidade da perda de estabilidade da enzima. Há uma tendência maior de desnaturação da enzima para valores menores e mais negativos de energia de Gibbs. Assim, valores elevados apontam uma maior estabilidade térmica da enzima (KUMAR *et al.*, 2013; SAQIB *et al.*, 2010).

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

em que T corresponde aos valores experimentais para a temperatura (K), R é a constante universal dos gases ideais ($8,314 \text{ J. mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), h refere-se à constante de Planck ($11,04 \times 10^{-36} \text{ J. min}^{-1}$) e k_b à constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J. K}^{-1}$) (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) é descrita pela 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 (FARIA *et al.*, 2021; SAQID *et al.*, 2010).

2.3.2. Efeitos do pH na atividade enzimática

Os sítios ativos das enzimas apresentam grupos iônicos, que podem ter seu pH tanto ácido como básico. Cada enzima possui características próprias e esse pH deve estar em uma faixa adequada do meio reacional, para que sua função como catalisadoras seja eficiente. A enzima em uma faixa inadequada de pH, pode sofrer mudança em seu formato tridimensional. Levando em consideração as características da enzima e substrato, possui uma faixa de pH que seja essencial para máxima taxa reacional enzimática (ARAÚJO *et al.*, 2022; FARIA *et al.*, 2021).

O estudo do pH e sua dependência é de muita importância para a dedução da natureza química dos grupos enzimáticos que possuem relação com a cinética. Mudanças no pH afetam a atividade enzimática, pois enzimas são moléculas proteica anfóteras e possuem, principalmente em sua superfície, grupos básicos e ácidos em grande quantidade, que apresentam elevada sensibilidade a constantes de ionização e pH do meio (FARIA *et al.*, 2019; SHULER, 2002). Essas mudanças fazem que os grupamentos do sítio ativo encontrem a melhor forma química para interagir com o substrato. Há uma faixa ideal de pH, no qual a velocidade de reação catalítica se dá

em seu máximo, o que leva em consideração características do sítio ativo, como número e tipo de grupos ionizáveis (ARAÚJO *et al.*, 2022; FARIA *et al.*, 2019; SHULER; KARGI, 2002).

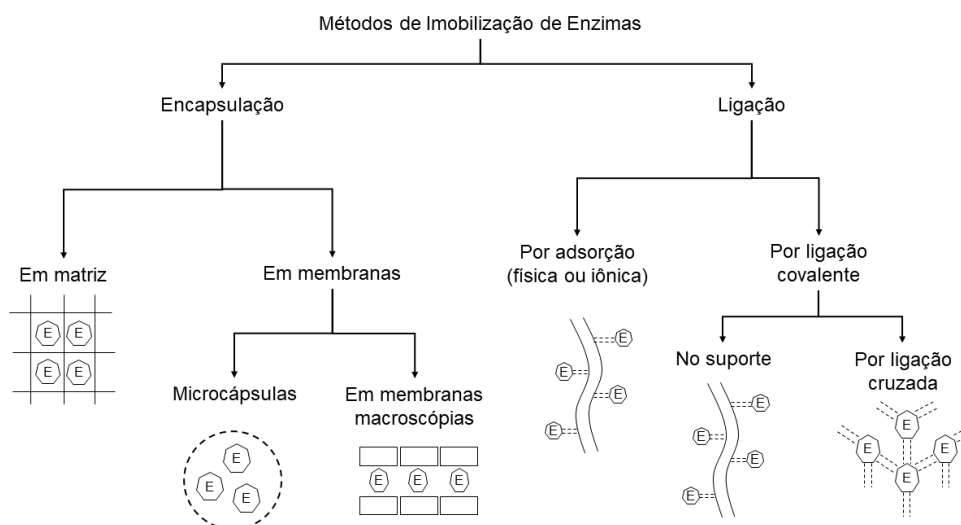
2.4. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A tecnologia de imobilização de enzimas é composta por um conjunto de técnicas, entretanto, o principal objetivo é o aprisionamento da enzima em um suporte sólido insolúvel no meio, podendo ser aderida de forma física ou química. O material de suporte deve apresentar algumas propriedades para performance da estabilidade da enzima, como bem sua imobilização. Pode-se destacar propriedades como estabilidade térmica e química, insolubilidade no meio reacional, afinidade com a enzima por meio de forças intermoleculares, biocompatibilidade, apresentar grupos reativos, além de biodegradável, custo e disponibilidade (MENDES *et al.*, 2011; ZDARTA *et al.*, 2018).

Devido à desnaturação da enzima que ocasiona a mudança na estrutura tridimensional da proteína, ocasionadas pela mudança de ligações covalentes e promovendo a perda de atividade catalítica, algumas variáveis promovem essa desnaturação das enzimas, como o pH, temperatura, agitação, solventes orgânicos, entre outros fatores intrínsecos do meio (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021). Assim, uma alternativa para a produção de FOS é a utilização de enzimas imobilizadas, a fim de se obter redução de custos e otimizar parâmetros que façam com que a enzima se torne mais estável e robusta em comparação com aquelas livres, com uma boa alternativa e tecnologia de imobilização (MENDES *et al.*, 2011).

Os métodos de imobilização são agrupados em: confinamento (encapsulamento e microencapsulamento), adsorção (física ou iônica), ligação covalente e ligação cruzada entre suporte e enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; ZDARTA *et al.*, 2018). A Figura 3 demonstra os métodos de imobilização de enzimas.

Figura 3 - Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Adaptado de Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, (2004).

Diante dos diversos métodos de imobilização de enzimas, o método de adsorção física, utilizados para imobilizar a FTase em óxido de zinco – tema desta pesquisa - está detalhado no tópico 2.4.1.

2.4.1. Adsorção Física

A adsorção física é a técnica mais simples de imobilização e com menor custo em relação à outras metodologias, já ocorre por meio das interações físicas geradas pelo suporte e enzima, podendo incluir interações de forças de Van der Waals, interações iônicas e ligações de hidrogênio (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; JESIONOWSKI *et al.*, 2014; THANGARAJ; SOLOMON, 2019).

Devido a ligação ser caracterizada como ligações fracas, geralmente não alteram a estrutura conformacional da enzima, porém, ocorrem problemas como a lixiviação da enzima do suporte, diminuindo assim, seu rendimento de imobilização durante o processo de adsorção (JESIONOWSKI *et al.*, 2014; MOHAMED *et al.*, 2015).

Além disso, pode-se citar que, em geral, a adsorção física é de fácil aplicabilidade e tem grande potencial comercial devido à sua simplicidade, baixo custo e por reter altas cargas enzimáticas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MOHAMED *et al.*, 2015). Segundo Mohamed *et al.* (2015), o suporte com alta carga

de substratos ou produtos podem apresentar problemas como a distorção da cinética devido aos fenômenos de partição ou difusão; ou seja, atingindo a saturação do suporte e alterando-se a parâmetros de estabilidade como pH.

Khoshnevisan *et al.* (2011) estudou a imobilização de celulase em nanopartículas supermagnéticas de Fe_3O_4 pelo método de adsorção física, obtendo eficiência de imobilização de aproximadamente 95%, além de obter maior estabilidade em relação ao pH, já em relação à temperatura teve pontos de menor estabilidade e atividade durante as 3 horas de teste e posteriormente aumentando-se sua estabilidade e atividade catalítica até 5 horas.

Faria *et al.* (2019) estudaram a imobilização da FTase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel e esponja vegetal, concluindo que há grande potencial de potencial de produção de frutooligossacarídeos. O estudo demonstra que os rendimentos de imobilização e e atividades recuperada de 85% e 9,07% para sílica gel e 34% e 83,64% para esponja vegetal, respectivamente.

2.5. TIPOS DE SUPORTES

Para seleção do método e do material do suporte a ser utilizado para a imobilização, os parâmetros que caracterizam um bom suporte são a: elevada área superficial específica, afinidade pela água, estabilidade química, resistência mecânica, porosidade, custos de aplicação, toxicidade dos reagentes e tamanho médio de partículas (LIU *et al.*, 2021; SOUZA, 2017).

Em termos de imobilização de enzimas, os suportes ou carreadores podem ser compreendidos em diferentes materiais, como por exemplo, materiais orgânicos, inorgânicos ou compósitos (MENDES *et al.*, 2011; ZDARTA *et al.*, 2018). Geralmente, os suportes inorgânicos têm maior resistência térmica e mecânica quando comparados aos suportes orgânicos; além disso, estes suportes podem agir como inibidores de crescimento de bactérias e fungos, por não se tratarem de substratos (ZUCCA; SANJUST, 2014)

Dentro dessa classificação pode-se enquadrar, segundo sua morfologia, podendo ser materiais porosos, não porosos e podem ainda possuir estrutura em gel. Os materiais porosos podem ser enquadrados quando o diâmetro dos poros varia entre 2 a 50 nm; isso traz consigo uma vantagem por apresentar alta área superficial

específica, permitindo também a acomodação da enzima nos poros, ocasionando uma proteção à enzima (ZDARTA *et al.*, 2018; MOHAMED *et al.*, 2015). Já em suportes não porosos a enzima se interage somente na superfície do suporte, facilitando a interação com o substrato, entretanto, normalmente não apresentam problemas difusionais (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES *et al.*, 2011).

Dentre os diversos materiais estudados como suportes para enzimas, nos quais são classificados em orgânicos, inorgânicos e compósitos/ híbridos, pode-se citar:

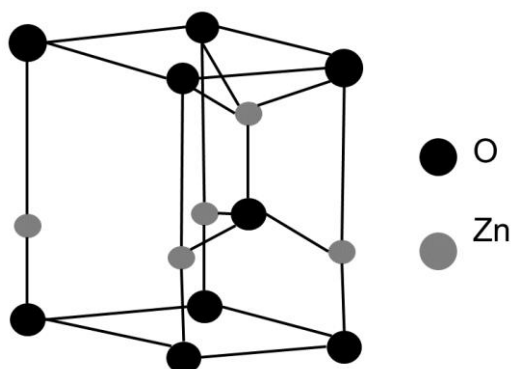
- i) Suportes inorgânicos: sílica-gel, óxido de zinco, Fe_2O_3 , entre outros.
- ii) Suportes orgânicos: materiais lignocelulósicos, polímeros naturais ou polímeros sintéticos (álcool polivinílico, poliácido láctico, polietilenoglicol, entre outros).
- iii) Suportes híbridos: combinação de materiais (inorgânicos/ orgânicos, orgânicos/ orgânicos, inorgânico/ inorgânico).

2.5.1. Óxido de Zinco (ZnO)

Óxido de zinco (ZnO) é um material inorgânico e sólido iônico; apresenta propriedades semicondutoras entre a banda GAP de 3,37 eV e energia de excitação de 60 meV (BASKOUTAS, 2018; SHAH *et al.*, 2015). Segundo Shah *et al.* (2015), o óxido de zinco é um material que apresenta alta biocompatibilidade e biodegradabilidade.

As estruturas cristalinas do óxido de zinco podem ser encontradas em diferentes formas: *wurtzita*, blenda de zinco e sal-gema, sendo a *wurtzita* (Figura 4) sua forma mais estável termodinamicamente (ÖZGÜ, Ü *et al.*, 2005). Possui ampla gama de aplicabilidade devido às suas vantagens, como biosensores, fotocatalisadores, suportes de enzimas, sensores de gás, entre outros (SRIVASTAVA; GUSAIN; SHARMA, 2013).

Figura 4 - Estrutura cristalina do ZnO (wurtzita)



Fonte: Adaptado de Özgü *ET AL.*, (2005)

Antony, Balachandran e Mahanan (2016) estudaram a imobilização da enzima diástase α -amilase em nanopartículas de óxido de zinco por meio da adsorção via interação eletroestática com o grupo funcional hidroxila. Os resultados da enzima imobilizada foram melhores em comparação com a enzima livre em termos de temperatura e rendimento de imobilização de 64,21. Além disso, a enzima imobilizada manteve sua atividade inicial em 70% depois de 30 dias enquanto a livre desnaturou em 7 dias.

2.6. IMOBILIZAÇÃO DA FTASE

Poucos estudos foram desenvolvidos e reportados na literatura sobre a imobilização da enzima frutossiltransferase (FTase) visando a produção de frutooligossacarídeos (FOS).

Oliveira *et al.* (2020) reportaram um rendimento de imobilização de 94,84% da enzima comercializada Pectinex Ultra SP-L em suporte de nanopartículas de Fe_3O_4 e quitosana por meio de ligação covalente promovida a partir do glutaraldeído, retendo até 86% da atividade de transfrutosilação depois de 6 ciclos de reuso da enzima. Além disso, os mesmos estudaram por meio de planejamento de experimentos as variáveis como as concentrações de glutaraldeído, tempo de contato e de reação, concluindo os melhores parâmetros de concentração de glutaraldeído, tempo de ativação e de contato, apresentaram os valores de 3% v/v, 180 minutos e 30 minutos, respectivamente.

Garcia *et al.* (2021) estudaram a reticulação da biomassa catalítica do *Aspergillus oryzae* IPT-301 com glutaraldeído com o objetivo de produção de FOS. Os resultados se mostraram atrativos, devido que as células íntegras obtiveram razões de atividade de transfrutoseilação superiores a enzima livre. O ensaio operacional, após 12 ciclos de reuso da enzima imobilizada e livre, obtiveram resultados de 88,90% e 50,30% de atividade enzimática inicial.

Ojwach *et al.* (2020) utilizou *Aspergillus niger* sp. XOBP48 para produção de de FTase extracelular com o objetivo de estudar a purificação da enzima para produção de frutooligossacarídeos, sendo que o estudo demonstrou alto poder produção de FOS purificando a enzima em coluna de cromatografia com atividade específica de 1219,17 U/ mg.

Yun e Song (1996), realizaram a imobilização da FTase em uma resina de alta porosidade (Diaioa HPA 25®). O biocatalisador obteve maior resistência a variações de pH. Já em relação à atividade de transfrutoseilação obtiveram resultados similares à enzima livre. Além disso, em relação à temperatura e pH não houve mudanças; portanto, a enzima foi conduzida em processo contínuo para avaliação obtendo resultados satisfatórios com redução de 8% da atividade de transfrutoseilação inicial após 30 dias.

Ansari *et al.* (2012) analisaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em nanopartículas de prata funcionalizadas e não funcionalizadas em glutaraldeído, sendo assim, não obtiveram mudança no pH ótimo de atividade enzimática, porém, o suporte funcionalizado obteve 93% de atividade enzimática, enquanto o outro sem ser funcionalizado obteve 81% de atividade enzimática.

Por fim, Faria *et al.* (2021) estudaram a FTase extracelular produzida pelo *Aspergillus oryzae* IPT-301, a imobilização foi realizada por meio de sílica-gel, sendo que a atividade transfrutoseilação otimizada por meio de planejamento de experimentos em função do pH e temperatura da reação, onde a atividade de transfrutoseilação relativa obteve valores de 97,09% a 100% e baixas atividades hidrolíticas, no pH 5,5 e temperatura em torno de 45°C a 50°C.

3. IMOBILIZAÇÃO DA FRUTOSILTRANSFERASE DE *ASPERGILLUS ORYZAE* IPT-301 EM ÓXIDO DE ZINCO PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Imobilização da frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em óxido de zinco para produção de frutooligossacarídeos

Resumo

Os frutooligossacarídeos (FOS) são açúcares prebióticos de baixa caloria e que podem ser consumidos por pessoas diabéticas. A síntese dos frutooligossacarídeos ocorrem por meio da reação de transfrutossilacção catalisadas pela enzima frutossiltransferase (FTase, E.C. 2.4.1.9), de *Aspergillus oryzae* IPT-301. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar o processo imobilização da FTase extracelular por meio da adsorção física, utilizando óxido de zinco como suporte, para produção de FOS. Foram realizados testes de imobilização, por adsorção física, na temperatura de 35 °C, pH 5,5, durante 8 horas, com agitação de 175 rpm, com massa de suporte e volume de caldo fermentado na proporção de 1:10, respectivamente. Avaliou-se as estabilidades térmica, de concentração de substrato, e frente ao pH e armazenamento. Os parâmetros de imobilização em óxido de zinco apresentou um rendimento de imobilização de 38,00% e a atividade recuperada de 3,22%. O estudo do efeito de concentração mostrou que as maiores atividades foram atingidas para concentrações entre 470 g. L⁻¹ a 700 g. L⁻¹, tendo ajuste ao modelo de Hill. Os ensaios de estabilidade ao pH indicaram que o biocatalisador heterogêneo foi estável frente à faixa de pH entre 6,0 e 6,5. O ensaio conseguinte indicou que não houve um aumento expressivo da estabilidade térmica do biocatalisador heterogêneo frente ao solúvel, portanto, o tempo de meia-vida da enzima FTase imobilizada em 1,70 vezes, para a temperatura de 30°C, em relação ao biocatalisador na sua forma livre. A enzima imobilizada apresentou estabilidade ao armazenamento por até 2 dias, sendo que a FTase apresentou maiores estabilidades em relação à enzima solúvel. Ao caracterizar o suporte de óxido de zinco foi possível comprovar a adsorção da enzima em sua

superfície, desta forma, foi possível concluir que a FTase extracelular foi imobilizada satisfatoriamente em óxido de zinco.

Palavras- chaves: Frutosiltransferase. *Aspergillus*. Imobilização. Óxido de Zinco (ZnO). Caracterização Enzimática

Introdução

Nos tempos atuais a atenção para melhores hábitos alimentares tem despertado o interesse das indústrias de alimentos, principalmente nos açúcares prebióticos por promover diversos benefícios à saúde humana. Os frutooligossacarídeos têm se mostrado grandes potenciais para a nutrição como agentes de controle do colesterol, baixa caloria, não carcinogênico, prevenção do câncer de cólon, além de serem possíveis para o consumo por pessoas diabéticas (Kumar e Dubey 2019; Cunha *et al.*, 2019; Cuervo-Fernandez *et al.*, 2007).

Os frutooligossacarídeos são oligômeros de frutose compostos de 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄ em que as unidade de frutossil (F) são ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (Yun e Song 1996; Ojwach *et al.*, 2020). Estes podem ser encontrados em duas formas, extraído através de vegetais como alcachofra, alho, cebola, entre outros. Outra via mais viável e mais cotidiana são por meio de enzimas biocatalíticas para produção de FOS (Cunha *et al.*, 2019).

A reação de transfrutosilação consiste na clivagem das ligações do tipo β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose que liga a metade frutossil à outra de glicosil, transferindo o grupo frutossil para uma molécula aceptora, que pode ser a sacarose ou molécula de FOS, produzindo a glicose como subproduto (Antosová e Polakovic 2001; Perna *et al.*, 2018). Por definição, uma unidade (1 U) de atividade enzimática de transfrutosilação foi definida como a quantidade de enzima que produz um micromol (1 μ mol) de frutose transfrutossilada por minuto (Cuervo-Fernandez *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2019; Faria *et al.*, 2021).

A enzima frutosiltransferase (EC 2.4.1.9) é classificada no grupo das transferases que são capazes de transferir grupos de frutossil para a molécula de

sacarose, sintetizando-se os frutooligossacarídeos (Faria *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Ganaie *et al.*, 2014). Dentre os diversos tipos de de micro-organismos que sintetizam essa enzima como o *Aspergillus sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Pencillium sp.* e *Fusarium sp.*, diversos estudos relatam que o *Aspergillus oryzae* IPT – 301 obtém alto poder de produção da enzima frutossiltransferase (Cuervo-Fernandez *et al.*, 2007; Ganaie *et al.*, 2014; Mussato e Mancilha 2007). Cunha *et al.*, (2019) estudou a enzima frutossiltransferase extracelular produzida a partir do micro-organismo *Aspergillus oryzae* IPT-301, obtendo resultados relevantes da atividade de transfrutossililação com parâmetros a 200 rpm, pH 5,5, 30°C durante um tempo total de 64 horas de cultivo celular.

Devido à desnaturação da enzima que ocasiona a mudança na estrutura tridimensional da proteína, promovidas pela mudança de ligações covalentes e a perda de atividade catalítica, sendo assim, algumas variáveis promovem essa desnaturação das enzimas, como o pH, temperatura, agitação, solventes orgânicos, entre outros fatores intrínsecos do meio (Cunha *et al.*, 2019; Faria *et al.*, 2021). A imobilização de enzimas tem objetivo do aumento da estabilidade frente a estas variáveis, sendo um grande aliado para produção de biocatalisadores e considerada uma técnica promissora para implementação da produção em escala industrial.

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2011) reportaram que a frutossiltransferase imobilizada em minério de nióbio por meio da adsorção física apresentou estabilidades térmicas maiores em relação à enzima livre. O estudo demonstra que a enzima imobilizada à pH 6,0 e abaixo de 51°C apresenta os melhores resultados, em contrapartida, a enzima livre apresentou menor estabilidade.

Diante das diversas técnicas de imobilização de enzimas, a adsorção física tem se destacado devido à sua simplicidade e menor custo, esta que por meio se dá pelas interações físicas entre suporte e enzima podem incluir ligações interações de forças de Van der Waals, interações iônicas e ligações de hidrogênio (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Jesionowski *et al.*, 2014; Thangaraj e Solomon 2019). Devido à ligação ser caracterizada como ligações fracas, geralmente não alteram a estrutura conformacional da enzima, porém, ocorre problemas como a lixiviação da enzima do suporte, diminuindo assim, seu rendimento de imobilização durante o processo de adsorção (Jesionowski *et al.*, 2014; Mohamed *et al.*, 2015).

Faria *et al.*, (2020) imobilizaram FTase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel e esponja vegetal por meio da adsorção física, obtendo rendimentos de imobilização e atividades recuperada de 85% e 9,07% para sílica gel e 34% e 83,64% para esponja vegetal, concluindo que os suportes são promissores para produção de frutooligossacarídeos.

Dentre os diversos materiais inorgânicos para o uso como suporte de enzimas, o óxido de zinco apresenta grande potencial para aplicação como suporte de biocatalisadores, devido a sua alta biocompatibilidade e biodegradabilidade (Patel *et al.*, 2016). O óxido de zinco pode ser encontrado em diferentes estruturas cristalinas como a *wurtzita*, blenda de zinco e sal-gema, entretanto, a *wurtzita* é a estrutura cristalina termodinamicamente estável (Özgür *et al.*, 2005). Sendo que este material apresenta diversas aplicabilidade como biossensores, fotocatalisadores, suportes de enzimas, sensores de gás, entre outros (Srivastava, Gusain e Sharma 2013).

Antony, Balachandran e Mahanan (2016) estudaram a imobilização da enzima diástase α -amilase em nanopartículas de óxido de zinco por meio da adsorção via interação eletroestática com o grupo funcional hidroxila. Os resultados da enzima imobilizada foram melhores em comparação com a enzima livre em termos de temperatura e rendimento de imobilização de 64,21%, além disso, a enzima imobilizada manteve sua atividade inicial em 70% depois de 30 dias enquanto a livre desnaturou em 7 dias.

Husain *et al.*, (2011) imobilizou β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em ZnO e nanopartículas de ZnO, resultando em uma maior estabilidade em relação à enzima livre, promovendo um grande potencial de aplicação para imobilização de enzimas.

Neste contexto, esse trabalho tem como objetivo imobilizar a enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em óxido de zinco por meio da adsorção física para produção de frutooligosacarídeos, além disso, avaliou-se a estabilidade da enzima imobilizada frente ao pH, temperatura, armazenamento e caracterização física e química do biocatalisador.

Materiais e Métodos

Síntese e reuso do material de suporte

Os suportes de óxido de zinco foram obtidos a partir de parceria com a professora Dra. Sylma Carvalho Maestrelli e o Laboratório de Materiais – LABMAT da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG, Campus Avançado de Poços de Caldas. A rota de processamento das peças porosas de ZnO envolveu a preparação de barbotina seguida da técnica de réplica, onde utilizou-se espuma de poliuretano comercial como material a ser replicado, conforme Faria *et al* (2022).

Para a reutilização, os suportes foram lavados abundantemente com água destilada. Em seguida, foram colocados em forno mufla (EDG Equipment 3000 3P-S) a 300°C a uma taxa de aquecimento de 5°C/ min durante 2 horas.

Produção e imobilização da enzima extracelular microbiana

Produção da enzima e micro-organismo

Para a produção da enzima FTase extracelular, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). O meio de cultura sintético, utilizado para o cultivo celular do micro-organismo e da enzima frutossiltransferase, foi constituído por: sacarose comercial (150 g. L⁻¹), extrato de levedura (5,0 g. L⁻¹), NaNO₃ (5,0 g. L⁻¹), KH₂PO₄ (2,0 g. L⁻¹), Mg₂SO₄.7H₂O (0,5 g. L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (0,3 g. L⁻¹) e FeSO₄.7H₂O (0,01 g. L⁻¹), em pH 5,5.

Foram distribuídos 50 ml do meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 ml e autoclavados a 120 °C e 1 atm durante 20 minutos (CUNHA *et al.*, 2019). Após a esterilização do meio de cultura, inoculou-se 500 µL da suspensão de esporos com concentração de 10⁷ esporos m.L⁻¹. Sendo assim, iniciou-se o cultivo celular submerso, no qual foi conduzido em agitador orbital do tipo *Shaker* (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm por um tempo de 64 horas (Cunha *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020; Faria *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021). Ao término do cultivo celular submerso, o meio de cultura constituído pela frutossiltransferase extracelular foi utilizada para estudos posteriores de imobilização da enzima e de estabilidades.

Ensaio de imobilização enzimática

Os ensaios de imobilização da FTase extracelular foram realizados segundo Faria *et al.* (2021). Foi adicionada de forma proporcional a massa do suporte (óxido de zinco) juntamente com o volume de caldo permeado (contendo FTase extracelular), na proporção de 1:10, respectivamente. Os suportes foram mantidos previamente em estufa de secagem à 60 °C durante 24 horas.

A imobilização foi realizada sob agitação de 175 rpm e 35 °C conduzidas em Banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) durante 8 horas. Ao término da imobilização, coletou-se alíquota de 0,1 ml do sobrenadante para monitorar a atividade final de transfrutoseilação do caldo enzimático. Em seguida, as amostras foram filtradas à vácuo, utilizando a bomba à vácuo TE-058 (Tecnal®) e a torta retida (derivado suporte/ enzima) foi submetida aos ensaios de atividade enzimática para determinar os parâmetros de imobilização. Ao término das atividades enzimáticas, o derivado foi filtrado e lavado abundantemente com água destilada e levados à estufa à 60 °C durante 24 horas, com o objetivo de determinar sua massa seca.

Parâmetros de Imobilização

Para a análise do método e do material do suporte utilizado para a imobilização, deve-se fundamentar em parâmetros para viabilidade do método de imobilização e suporte utilizado. Entretanto, Ferreira *et al.*, (2018) propõe alguns parâmetros para esta análise. A atividade recuperada (AR) está relacionada do quanto da atividade inicial fornecida foi aproveitada pelo suporte, sendo calculada pela equação 1.

$$AR (\%) = \frac{A_{T_{\text{imobilizado}}}}{A_{T_0} - A_{T_f}} \quad (1)$$

Em que AR é a atividade recuperada (%); $A_{T_{\text{imobilizado}}}$ é atividade aparente do derivado imobilizado (U. g⁻¹ do suporte); A_{T_0} é a atividade oferecida no início da imobilização (U. ml⁻¹ da proteína); e A_{T_f} é a atividade no sobrenadante no final da imobilização (U. ml⁻¹ da proteína).

O rendimento de imobilização (RI) é a relação entre a atividade enzimática imobilizada pela atividade inicialmente oferecida ao suporte, demonstrado pela equação 2:

$$RI (\%) = \frac{A_{T_0} - A_{T_f}}{A_{T_0}} \quad (2)$$

Caracterização física e química do suporte

A morfologia do óxido de zinco, *in natura* e reutilizado, foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mediante o 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 foram recobertas por uma fina película de liga de ouro-paládio por meio do processo de *sputtering*, com o uso de um mini *Sputter Coater*, modelo POLARON EMITECH SC7620. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT-SP. Foi realizada a Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), que visa analisar a composição elementar em determinada área do material.

A caracterização das ligações químicas e estrutura do suporte, na presença e ausência da enzima imobilizada, foi determinada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) usando Espectrômetro (Agilent Technologies Cary 630, EUA) operado para uma faixa de 600 a 4000 cm^{-1} . As análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Materiais da UNIFAL-MG.

Caracterização bioquímica da enzima frutossiltransferase

Avaliação do efeito da concentração de substrato e determinação dos parâmetros cinéticos

As atividades de transfrutosição da enzima imobilizada em óxido de zinco foram determinadas em meio reacional constituído por 3,7 ml de solução de sacarose

em diferentes concentrações (200 g.L⁻¹, 300 g.L⁻¹, 400 g.L⁻¹, 470 g.L⁻¹, 500 g.L⁻¹, 600 g.L⁻¹ e 700 g.L⁻¹) a 50°C, com 1,2 ml de tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ e pH 5,5. Ao meio reacional foi adicionado o biocatalisador e as atividades foram determinadas mediante procedimento e condições experimentais, onde o experimento foi conduzido em triplicata. O modelo de Hill (Equação 3) foi utilizado para determinar os parâmetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$, $K_{0,5}$ e n).

$$v = \frac{V_{max} [S]^n}{[S]^n + (K_{0,5})^n} \quad (3)$$

onde v é a taxa de reação, V_{max} é a taxa de reação máxima alcançada pelo sistema, na concentração de substrato saturado (U. g⁻¹), $[S]$ é a concentração de sacarose (g. L⁻¹), $K_{0,5}$ é a constante de dissociação aparente (g. L⁻¹) e n é o coeficiente de Hill.

Ensaio de estabilidade enzimática frente ao pH

O biocatalisador foi incubado, na ausência de substrato, em tampão tris acetato 0,2 mol.L⁻¹ em diferentes pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5), durante 24 horas a 4 °C. Ao término da incubação, as atividades de transfrutossilacção foram determinadas sob condições experimentais padrão. Os experimentos foram conduzidos em triplicata (FARIA *et al.*, 2021).

Ensaio de estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos

A FTase extracelular solúvel e imobilizada em óxido de zinco, foram incubadas em tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5, na ausência de substrato, para uma ampla faixa de temperatura (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). As amostras foram retiradas em intervalos de tempo distintos (1 h, 2 h, 4 h e 24 h), imediatamente resfriadas em banho de água e gelo por 5 min e as atividades enzimáticas residuais foram determinadas sob condições experimentais padrão. 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 4) aos dados experimentais de atividade residual versus tempo de

incubação (Perna *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2021). A energia de ativação (E_D , em kJ. mol⁻¹) para a desnaturação térmica das enzimas solúvel e imobilizada foi determinada pelo gráfico de $\ln(k_D)$ versus $1/T$. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$, em min), o fator de estabilidade (FE) e as variações de entalpia (ΔH_D , em kJ. mol⁻¹), energia de Gibbs (ΔG_D , em kJ. mol⁻¹) e entropia (ΔS_D , em kJ. mol⁻¹. K⁻¹) de ativação para a desnaturação térmica enzimática foram determinadas pelas seguintes equações (Saqib *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2020; Faria *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021).

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1) \exp \exp (k_D t) + \alpha_1 \quad (4)$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln \ln 2}{k_D} \quad (5)$$

$$FE = \frac{t_{\frac{1}{2}}^{\text{imobilizada}}}{t_{\frac{1}{2}}^{\text{solúvel}}} \quad (6)$$

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

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

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

Em que A/A_0 é a atividade residual adimensional, α_1 é o parâmetro do modelo, k_D é a constante de desativação térmica de primeira ordem (min⁻¹), t é o tempo de incubação (min), T é a temperatura experimental (K), R é a constante universal dos gases (8,314 J. mol⁻¹. K⁻¹), h é a constante de Planck (11,04 x 10⁻³⁶ J. min⁻¹) e k_b é a constante de Boltzmann (1,38 x 10⁻²³ J. K⁻¹).

Ensaio de estabilidade frente ao armazenamento

O biocatalisador foi incubado em solução tampão tris-acetato a 0,2 mol. L⁻¹ e pH 5,5, na ausência de substrato e sob refrigeração a 4°C. O ensaio foi conduzido ao decorrer de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, ao final suas atividades de transfrutoseilação foram determinadas a partir de condições experimentais padrões. Os experimentos foram realizados em triplicata (FARIA *et al.*, 2021).

Métodos analíticos

Ensaio de atividade enzimática padrão

As atividades de transfrutoseilação da FTase extracelular foram realizadas segundo Cuervo-Fernandez *et al.* (2007); Faria *et al.* (2021) e Cunha *et al.* (2019). Foram adicionados 0,1 ml do caldo enzimático (contendo a FTase) ou 1 peça do biocatalisador em meio reacional constituído por 3,7 ml de solução de sacarose comercial (União®) (63,6 %, m/v) e 1,2 ml de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5. A reação enzimática foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) com agitação de 190 rpm e temperatura de 50 °C durante 60 minutos.

Para encerrar a reação enzimática imergiu-se o meio reacional em água em ebulição durante 10 minutos, seguido por resfriamento em banho de gelo durante 5 minutos, visando a inativação enzimática. O meio reacional foi filtrado à vácuo e a quantificação das concentrações dos açúcares redutores totais (AR) e glicose por meio dos métodos colorimétricos do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e GOD-PAP®, respectivamente (Cunha *et al.*, 2019; Faria *et al.*, 2021). As atividades enzimáticas da enzima solúvel e do derivado (suporte/ enzima), foram calculados a partir das equações 10 e 11:

$$A_t^{solúvel} = \frac{[F_t] \cdot V_R}{V_E \cdot t_R} \quad (10)$$

$$A_t^{\text{derivado}} = \frac{[F_t] \cdot V_R}{m \cdot t_R} \quad (11)$$

Em que $[F_t]$ é a concentração de frutose transfrutossilada ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), V_R o volume do meio reacional (L), t_R o tempo de reação (min), V_E o volume do caldo fermentado utilizado na reação enzimática (ml) e m é a massa seca do derivado (g).

Análise de carboidratos

A partir das concentrações de açúcares redutores (AR) e glicose (G), determinou-se as concentrações de frutose (F) e frutose transferida (F_T) no meio de reação, segundo as equações (12) e (13) (Faria *et al.*, 2021; Cunha *et al.*, 2019).

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

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

Resultados e Discussões

Caracterização físico-química do biocatalisador e parâmetros de imobilização

A Figura 1 mostra os suportes utilizados para a imobilização da enzima FTase que foram sintetizadas em formato cilíndrico com massa média de 0,50 grama e com dimensões aproximadas de 0,50 x 0,50 cm de altura e diâmetro, respectivamente.

Observou-se que o óxido de zinco reutilizado (a) obteve um aspecto mais escuro em relação ao *in natura* (b), fato que se deve ao processo de reutilização do suporte. Algumas das hipóteses da coloração do óxido de zinco reutilizado são incrustações do processo de reuso em sua superfície, sendo corroborado na microscopia eletrônica de varredura (MEV).

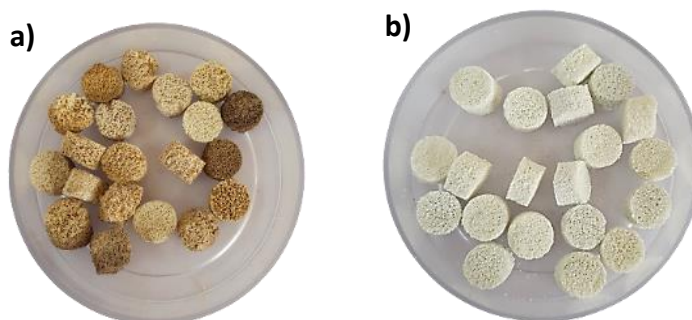


Figura 1 - Integridade do suporte de a) óxido de zinco reutilizado e b) óxido de zinco in natura
Fonte: do autor

Os testes de imobilização possibilitaram a determinação dos parâmetros de imobilização enzimática, como: rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR) para o óxido de zinco. Para calcular o rendimento de imobilização foram consideradas a atividade transfrutoseilação inicial e final do caldo permeado contendo a FTase e, para o cálculo de atividade recuperada utilizou a atividade de transfrutoseilação oferecida pelo derivado (suporte/ enzima). Os dados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de imobilização da FTase em óxido de zinco após 8 horas de imobilização.

	RI (%)	AR (%)
ZnO ⁽¹⁾	38,00 ± 0,11	3,22 ± 0,04

⁽¹⁾ os testes de imobilização foram conduzidos a 35°C, pH 5,5 e 175 rpm, com a proporção de 1:10 (massa de suporte: volume de caldo contendo a FTase).

O biocatalisador ofereceu um rendimento de imobilização de 38,00% e atividade recuperada de 3,22%, onde a atividade recuperada foi cerca de 10 vezes menor do que o rendimento de imobilização, fato que pode ser atribuído pelas mudanças conformacionais da enzima ou pela dessorção da enzima da superfície do suporte devido ao processo reacional. Os resultados foram similares ao reportado por Faria *et al.*, (2021) que imobilizaram frutoseiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel nas mesmas condições reacionais, com 85% de rendimento de imobilização e 9% de atividade recuperada.

Husain *et al.*, (2011) imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em ZnO e nanopartículas de ZnO, sendo que o rendimento de imobilização resultou em 60% e 85%, respectivamente.

El-Shishtawy *et al.*, (2021), estudaram a imobilização da catalase em nanopartículas de óxido de zinco com citosana com variação de concentração do óxido de zinco, os resultados demonstram que a imobilização da catalase com 20% de óxido de zinco e 2% de citosana resultaram em um rendimento de imobilização de 37%.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) referentes à morfologia das amostras do suporte óxido de zinco *in natura* e reutilizado, estão dispostas na Figura 2. Observa-se que pela Figura 2a os poros do material são distribuídos homogênea e interconectados com um tamanho médio de 0,50 μ m. A interconecção e a morfologia dos poros são fundamentais no desempenho da imobilização de enzimas, oferecendo altas cargas enzimáticas adsorvidas na superfície do material. Os poros altamente ordenados e a superfície química uniforme favorece facilidade nos métodos de adsorção, além de prever os comportamentos da enzimas durante a imobilização (Zhao *et al.*, 2006; Califano *et al.*, 2019).

Hu *et al.*, (2021) estudaram a comparação da imobilização de zeólitas convencionais e zeólitas com macroporos ordenados para imobilização lipase a partir do *Aspergillus niger* para produção de biodiesel, a imobilização em um material macroporoso demonstrou atividades superior e estabilidade térmica maiores em relação ao material com microporos.

A Figura 2b demonstra que a técnica de processamento adotada para a obtenção de elevada porosidade (técnica de réplica), atendeu às necessidades e que, apesar da elevada porosidade, o material apresentou baixo trincamento, o que favorece maior resistência mecânica.

A Figura 2c apresenta uma heterogeneidade no tamanho dos grãos constituintes da microestrutura; observa-se que as condições de queima permitiram que a amostra passasse pelas três etapas de sinterização. Observa-se ainda um crescimento anisotrópico dos grãos, sem a presença de fase líquida ou vítrea observável na microestrutura final da peça. Além disso, as condições de queima, cujo

objetivo não era controlar o crescimento dos grãos, mas sim promover a sinterização, conferindo-lhe maior resistência mecânica e porosidade, foi bem sucedida.

Diante da Figura 2d do óxido de zinco reutilizado é possível observar diversos resíduos provenientes de processos anteriores de imobilização, sendo estes, fixados à superfície do óxido de zinco. Em comparação com a Figura 2a, os poros são bem mais definidos em relação ao reutilizado, com a hipótese de desgaste ou deterioração dos poros durante o processo de imobilização e do tratamento do suporte para o seu reuso.

A presença desses resíduos na superfície do material que estão dispostos emovelos (Figura 2e), que por hipótese são característicos de sais, sendo formados durante o aquecimento, tendo em vista que estes são provenientes do caldo contendo a FTase. Com a aproximação em 10000 vezes (Figura 2f) há presença de um material filamentososo que pode ser proveniente do meio de cultura utilizado, sendo provavelmente hifas filamentosas ou debris celular, que são dejetos do processo do cultivo celular submerso, como reportado por Faria *et al.*, (2021) e Dias *et al.*, (2022).

Com o aumento da micrografia em 2500 vezes nos resíduos são apresentados a partir Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) que foi utilizada concomitante ao MEV, a Figura 3 demonstra os perfis elementares presentes no material.

Na Figura 3a é apresentado a composição elementar do óxido de zinco *in natura*, foi obtido em uma maior composição em zinco e oxigênio corroborando para a síntese bem sucedida do suporte, em contrapartida, o óxido de zinco reutilizado (Figura 3b) apresentou elementos presentes nas incrustações na superfície do material com presença de manganês, alumínio, magnésio e potássio, que por sua vez, são provenientes do meio de cultura sintético utilizado para o cultivo celular do *A. oryzae* IPT-301. Diante de ambas Figuras 3a e 3b, há presença de ouro e paládio que é devido ao recobrimento para o MEV.

Com base na análise da Espectrofotometria de Transformada de Fourier (FT-IR) dos suportes reutilizado e *in natura*, na presença e na ausência da enzima foram coletados comprimentos de ondas para se entender os grupos funcionais desses suportes, conforme mostrado na Figura 4. A análise de FT-IR foi performado na faixa de 600 - 4000 cm^{-1} .

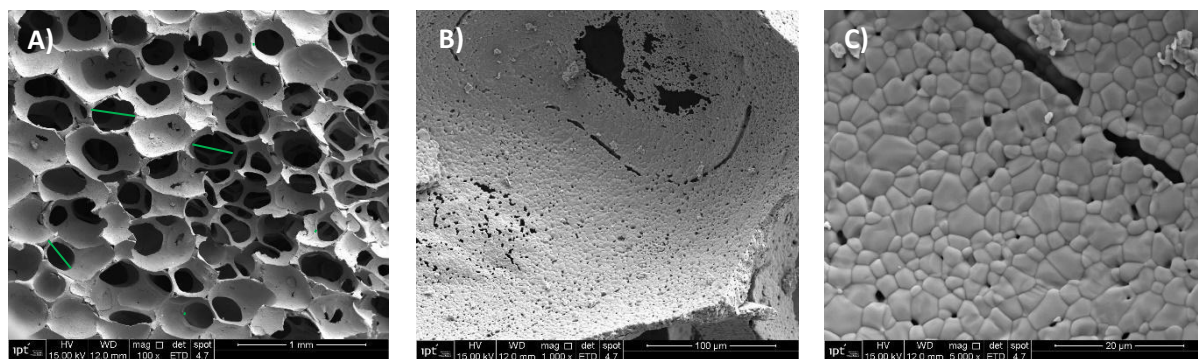
De acordo com Patel *et al.*, (2016), os comprimentos de onda mais baixos entre 446 - 630 cm^{-1} correspondem a ligações do metal-oxigênio (ZnO). Assim, observa-se que bandas visíveis no comprimento de onda entre 600 – 630 cm^{-1} nos suportes sem enzima são características desta ligação.

Jayarambabu, Kao e Prabhu (2015) reportaram que a absorção devido ao estiramento da ligação ZnO foi observado entre os comprimentos de onda de 731,9 a 608,6 cm^{-1} . Na faixa de comprimento de onda de 4000 - 630 cm^{-1} não houveram absorção espectral que evidencie ligações características de outros materiais, portanto, pode-se concluir que os suportes utilizados obtiveram nenhuma presença de água ou impurezas detectáveis pelo FT-IR.

Nos espectros das amostras de óxido de zinco *in natura* (linha azul) e óxido de zinco reutilizado (linha verde), contendo a enzima FTase imobilizada, nota-se bandas visíveis entre 3000 a 3500 cm^{-1} que são vibrações características das ligações dos grupos O-H e -NH, sendo grupos presentes na enzima (Husain *et al.*, 2011).

Uma acentuada banda de 1636 cm^{-1} pode ser atribuída a ligação O-H da absorção de água na superfície do óxido de zinco, além de ser características de vibrações intensas dos grupos amidas, caracterizando o alongamento das C–O e C–N, o que corrobora a presença da enzima imobilizada no óxido de zinco (Faria *et al.*, 2020).

Diante disso, os picos referentes a 1634 e 630 cm^{-1} pertencem às vibrações de alongamento e deformação da ligação metal – oxigênio, além disso, a absorção de 1068 cm^{-1} corresponde a interação do grupo -CO da enzima com o óxido de zinco (Abdullah *et al.*, 2018; Selvarajan *et al.*, 2015).



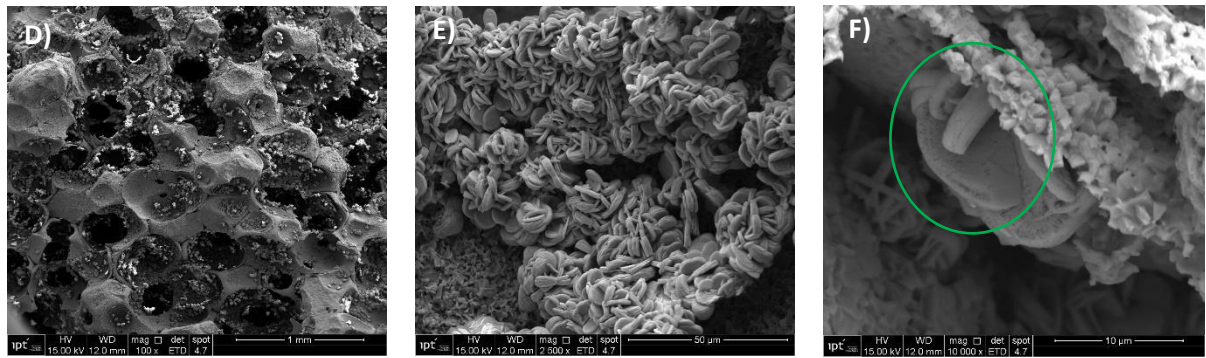


Figura 2 - Micrografias MEV do óxido de zinco *in natura* (a-c) e do óxido de zinco reutilizado (d-f).

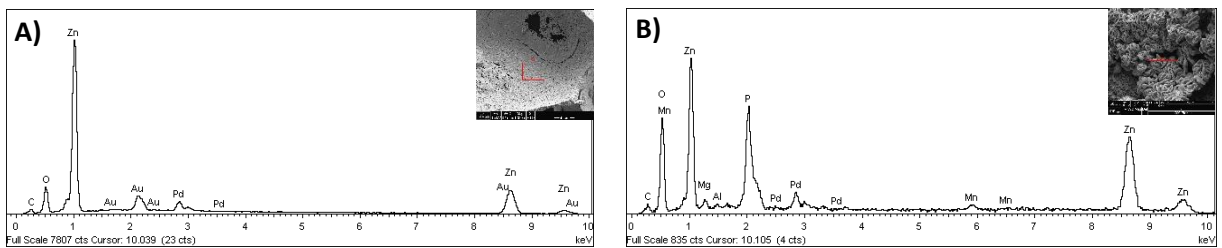


Figura 3 - Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) da superfície do óxido de zinco *in natura* (a) e da superfície do resíduo do óxido de zinco reutilizado (b).

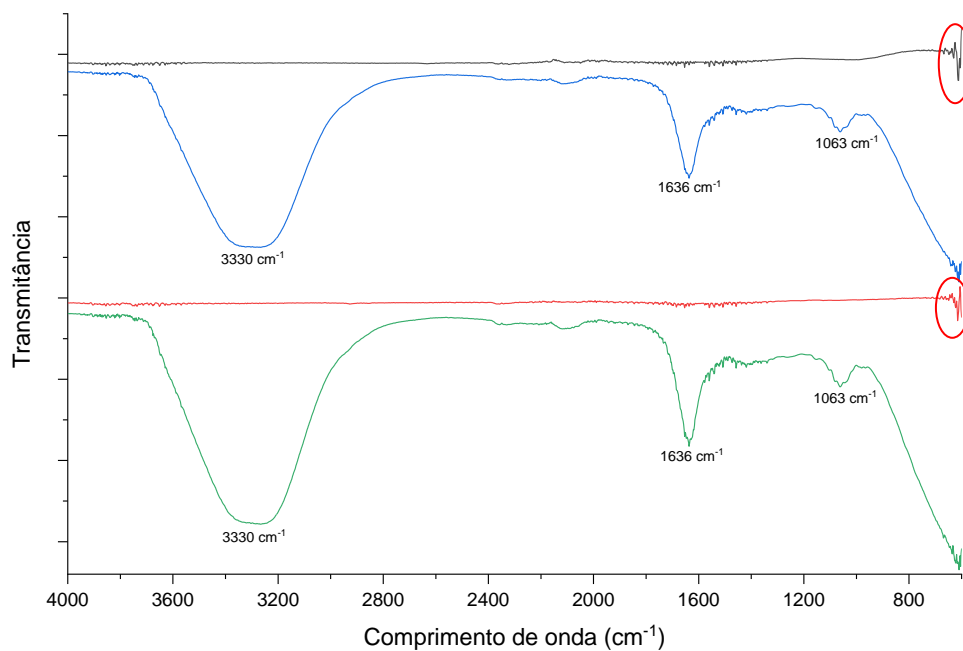


Figura 4 – Espectro FT-IR do óxido de zinco *in natura* (linha preta), óxido de zinco *in natura* após a imobilização da FTase (linha azul), óxido de zinco reutilizado (linha vermelha) e óxido de zinco reutilizado após a imobilização da FTase (linha verde).

Influência da concentração de sacarose na atividade enzimática e parâmetros cinéticos

O efeito da concentração de sacarose nas atividades de transfrutoseilação da FTase imobilizada em óxido de zinco é mostrado na Figura 5.

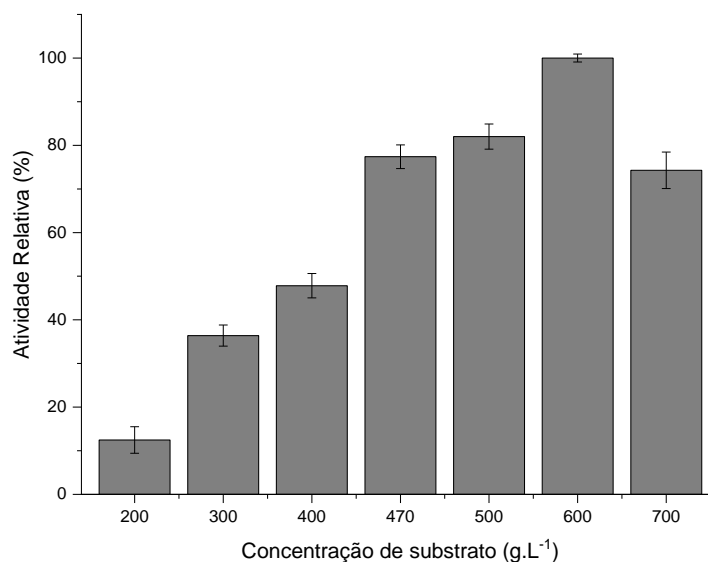


Figura 5 – Efeito da concentração de substrato na atividade de transfrutoseilação da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em óxido de zinco. Condições reacionais: tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 5,5), com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min, para as concentrações de sacarose de 200, 300, 400, 470, 500, 600 e 700 (g. L⁻¹). A atividade de transfrutoseilação máxima (5,01 ± 0,05 U. g⁻¹) foi definida como 100% de atividade relativa.

A maior atividade de transfrutoseilação (A_T) foi observada para a concentração de sacarose de 600 g. L⁻¹, sendo que os maiores valores foram em concentrações superiores a 400 g. L⁻¹, em contrapartida, a concentração de substrato a 200 g. L⁻¹ apresentou a menor atividade de transfrutoseilação, sendo explicado pela insuficiência de substrato para maximizar a performance da atividade de transfrutoseilação (Cunha *et al.*, 2019; Faria *et al.*, 2021).

Alvarado-Huallanco e Maugeri (2011) produziram frutooligossacarídeos a partir da FTase de *Rhodotorula sp*; os estudos concluíram que para concentrações acima de 70% de sacarose, ocorre efeitos da inibição pelo substrato. Similarmente, foi observado que a imobilização da FTase extracelular em óxido de zinco houve redução da atividade de transfrutoseilação na concentração de 700 g. L⁻¹.

Segundo Mohamed *et al.*, (2015) o suporte com alta carga de substratos ou produtos podem apresentar problemas como a distorção da cinética devido aos fenômenos de partição ou difusão, ou seja, atingindo a saturação do suporte.

Os parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Hill para a FTase extracelular adsorvida fisicamente em óxido de zinco estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos para a FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em óxido de zinco.

Parâmetros Cinéticos	Modelo de Hill
V_{\max} (U. g ⁻¹)	4,71 ± 0,91
$K_{0,5}$ (g. L ⁻¹)	345,58 ± 52,30
n	4,11 ± 2,11
R^2	0,92

O modelo de Hill foi ajustado aos dados experimentais de atividade de transfrutossilção da FTase extracelular imobilizada em óxido de zinco para obtenção dos parâmetros cinéticos, sendo que o ajuste está disposto na Figura 6. O coeficiente de determinação encontrado foi de $R^2 = 0,92$, o que demonstra alta acuracidade para o ajuste do modelo aos valores de A_T .

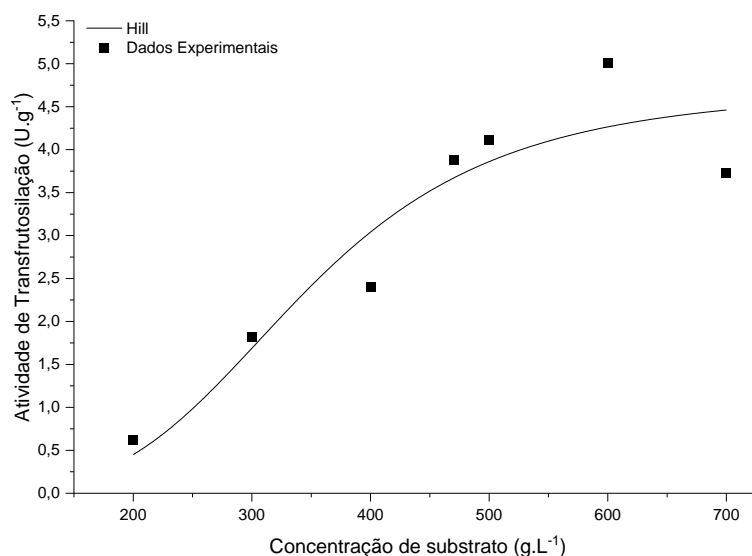


Figura 6 – Ajuste do modelo cinético de Hill aos dados experimentais de atividade de transfrutossilacção da enzima FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em óxido de zinco.

O parâmetro $K_{0,5}$ é a concentração de substrato na qual a velocidade de reacção é a metade da velocidade máxima, desta forma, quanto maior o seu valor menor será a afinidade entre o substrato e sítio ativo da enzima (Faria *et al.*, 2019). Os estudos demonstram que o ajuste por modelo de Hill resultou em $K_{0,5} = 345,58 \pm 46,78$ (g.L⁻¹), o alto valor de $K_{0,5}$ da enzima pode ser explicada pelas mudanças conformacionais da enzima, que diminuíram a probabilidade de formar um complexo substrato-enzima ou a acessibilidade do substrato aos sítios ativos da enzima (El-Shishtawy *et al.*, 2021).

Araújo *et al.*, (2022) estudaram os parâmetros cinéticos da imobilização da FTase de *A. oryzae* IPT-301 por meio ajuste dos dados experimentais no modelo de Hill, cuja os valores de $K_{0,5}$ (g. L⁻¹) foram $221,14 \pm 13,00$ e $205,9 \pm 4,72$ em polihidroxibutirato puro e funcionalizado com glutaraldeído, respectivamente.

El-Shishtawy *et al.*, (2021) estudaram a imobilização da catalase em dois tipos de suportes, sendo, citosana/ ZnO e citosana/ ZnO/ Fe₂O₃, conferindo valores acima de 200 mM para os imobilizados e da enzima solúvel com valor de 91,28 mM, portanto, foi observável o aumento na velocidade máxima de reacção na catalase imobilizada.

Outro parâmetro cinético é a velocidade máxima que descreve a velocidade de reacção quando a enzima está completamente saturada do substrato. O valor obtido de $4,71 \pm 0,82$ (U. g⁻¹) foi menor que o reportado por Araújo *et al.*, (2022) ($8,023 \pm 0,45$ U g⁻¹) que imobilizou em polihidroxibutirato puro e maior que Faria *et al.*, (2021) ($1,45 \pm 0,03$ U g⁻¹) que imobilizou FTase em sílica gel. Algumas hipóteses podem ser explicadas para estes valores de $V_{m\acute{a}x}$ como a diminuição dos sítios ativos e o aumento da camada limite de transferência de massa que resultou em uma menor velocidade de reacção (Chiang *et al.*, 1997; Faria *et al.*, 2021; Araújo *et al.*, 2022).

Cunha *et al.*, (2019) ajustaram o perfil cinético com o modelo de Michaelis-Menten para a enzima frutossiltransferase extracelular, no qual resultaram em $V_{m\acute{a}x} = 16,23$ U. ml⁻¹ e $K_m = 50,41$ g. L⁻¹, o que sugere que a enzima solúvel possui alta afinidade com o substrato, além de demonstrar atividades maiores ao demonstrado neste trabalho.

Com relação ao coeficiente de Hill (n), o valor apresentado na Tabela 2 de $4,11 \pm 1,89$ de $6,38 \pm 2,35$, que corresponde à cooperatividade positiva entre os sítios ativos

da enzima e as moléculas de substrato, no qual depende do tipo e da força da interação entre os múltiplos sítios ativos e das moléculas de substrato, sendo reportado esse comportamento em enzimas com mais de um sítio catalítica e múltiplas subunidades (Weiss 1997).

Estabilidade térmica da enzima solúvel e imobilizada

As estabilidades térmicas da FTase solúvel e imobilizada foram determinadas na faixa de temperatura de 30°C a 60°C, durante um período de 24 horas. As Figuras 7 e 8 demonstram a atividade relativa durante a incubação da enzima solúvel e imobilizada, respectivamente.

A FTase imobilizada mostrou retenção de atividades relativas maiores que à FTase solúvel diante de todos os testes de incubação. A atividade de transfrutossilacção (A_T) com maior retenção foi observada para as enzimas incubadas à 30°C. Na temperatura de incubação de 30°C a FTase mostrou atividade relativa de 66% e 68% depois de 24 horas de incubação para as enzimas solúvel e imobilizada, respectivamente. Na temperatura de incubação de 40°C, pode-se observar o mesmo comportamento de valores próximos de atividades relativas, sendo, 58% de retenção para a FTase solúvel e 61% para a FTase imobilizada, ambas depois de 24 horas. Entretanto, observou-se um potencial de incubação à temperaturas de 50°C e 60°C, depois de 24 horas, a enzima imobilizada mostrou atividades relativas de 43% e 44%, respectivamente. E a enzima solúvel apresentou 31% e 33% para as mesmas temperaturas.

Os parâmetros termodinâmicos da FTase imobilizada e solúvel foram calculados a partir das Figuras 7 e 8. Os parâmetros de constante de desnaturação térmica (k_D) e energia de desativação térmica (E_D) foram obtidos a partir da linearização da Equação 4, além disso, os parâmetros de $t_{1/2}$, FE , ΔH_D , ΔG_D e ΔS_D , disposto na Tabela 3.

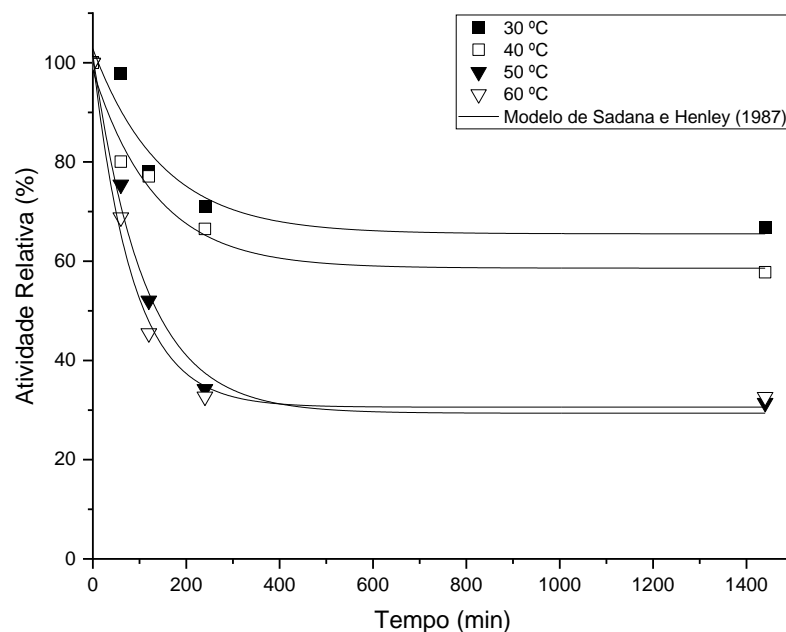


Figura 7 - Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 solúvel ao decorrer de 24 horas para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m.v⁻¹) em tampão tris-acetato (pH 5,5) 0,2 mol.L⁻¹, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. A atividade máxima de transfrutoseilação foi definida como 100% da atividade relativa.

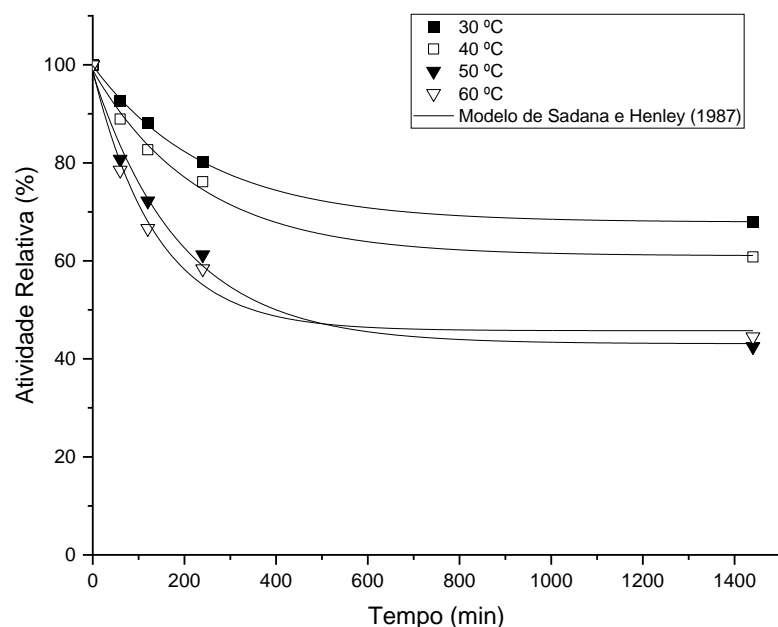


Figura 8 - Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 immobilizada em óxido de zinco ao decorrer de 24 horas para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m. v⁻¹) em tampão tris-acetato (pH 5,5) 0,2 mol. L⁻¹, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. A atividade máxima de transfrutoseilação foi definida como 100% da atividade relativa.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é definido como o tempo requerida para sua atividade original cair para 50% em uma dada temperatura. Sendo assim, um maior tempo de meia vida indica que o biocatalisador pode ser utilizado por um longo período de tempo (Saqib *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2020). Os resultados da Tabela 3 demonstram que o $t_{1/2}$ há um decréscimo progressivo com o aumento da temperatura. O fator de estabilidade da FTase imobilizada à 50°C foi de 1,8 em relação à enzima solúvel.

A energia de ativação para denaturação térmica (E_D) é a energia mínima que deve ser fornecida à enzima solúvel (estado nativo) para denaturar, desta forma, valores maiores indicam que uma maior termoestabilidade enzimática (Saqib *et al.*, 2010; Faria *et al.*, 2021). Os ensaios de estabilidade térmica apontaram que o biocatalisador heterogêneo não apresentou um aumento expressivo na termoestabilidade enzimática em comparação à enzima solúvel. A energia de ativação de denaturação térmica foi de de 16,46 kJ. mol⁻¹ para o biocatalisador heterogêneo e 15,38 kJ. mol⁻¹ para o biocatalisador solúvel.

Além disso, pode-se observar que os valor de entalpia (ΔH_D), energia livre de Gibbs (ΔG_D) e entropia (ΔS_D) foram relativamente próximos, como demonstrado com E_D . Sendo assim, valores maiores de ΔH_D indicam maiores estabilidades térmicas. A energia livre de Gibbs (ΔG_D) descreve as contribuições entálpicas e entrópicas, sendo um dos parâmetros mais assertivos para o estudo da termoestabilidade enzimática (Saqi *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2022).

Silva (2021) avaliaram a termoestabilidade enzimática da FTase solúvel obtida através do cultivo celular submerso com o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 para a faixa de 30°C a 60°C por 8 horas, e obteve uma atividade residual de até 80% para a temperatura de 30°C.

Faria (2021) estudou a estabilidade térmica da FTase imobilizada em sílica gel pura, comparando com a enzima livre nas faixas de temperatura de 30°C a 60°C durante 17 horas, e obteve que o processo de imobilização aumentou a estabilidade da enzima, apresentando maiores valores de tempo de meia vida ($t_{1/2}$), de energia de denaturação térmica (E_D) e de energia livre de Gibbs (ΔG_D).

Tabela 3 - Parâmetros termodinâmicos para a FTase extracelular solúvel (S) e imobilizada em óxido de zinco (I), obtidos para diferentes temperaturas de incubação.

Parâmetro	FTase	Temperatura (°C)			
		30	40	50	60
R ²	S	0,91	0,97	0,98	0,99
	I	0,99	0,98	0,99	0,98
k _D (min ⁻¹)	S	6,78 x 10 ⁻³	7,45 x 10 ⁻³	9,11 x 10 ⁻³	11,70 x 10 ⁻³
	I	3,98 x 10 ⁻³	4,29 x 10 ⁻³	5,19 x 10 ⁻³	7,23 x 10 ⁻³
t _{1/2} (min)	S	102,23	93,04	76,09	59,24
	I	174,16	161,57	133,55	95,87
Fator de estabilidade (FE)	I	1,7	1,7	1,8	1,6
	S		15,38		
E _D (kJ mol ⁻¹)	I		16,46		
	S	12,86	12,78	12,69	12,61
ΔH _D (kJ mol ⁻¹)	I	13,94	13,85	13,77	13,69
	S	97,19	100,24	102,98	105,56
ΔG _D (kJ mol ⁻¹)	I	98,53	101,67	104,49	106,89
	S	-0,278	-0,279	-0,279	-0,279
ΔS _D (kJ mol ⁻¹)	I	-0,279	-0,280	-0,281	-0,280

Efeito do pH na atividade enzimática

A estabilidade da FTase imobilizada em óxido de zinco frente ao pH foi investigada em vários pH e está disposta na figura 7. Foi observado que a enzima foi estável e manteve sua atividade relativa maior no pH 6,0, onde se manteve estável com atividade relativa de acima de 90% no pH 6,5. Entretanto, a estabilidade do pH da FTase em óxido de zinco diminuiu com a diminuição do valor do pH, como observado na figura 7.

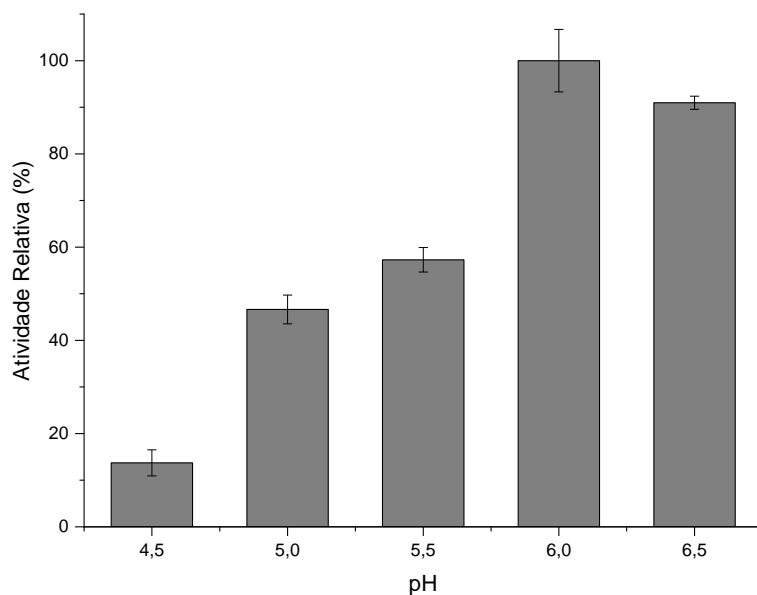


Figura 9 - Estabilidade da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em óxido de zinco após 24 horas de incubação a 4°C em tris-acetato (0,2 mol. L⁻¹) para diferentes valores de pH. Condições reacionais: solução de sacarose 47 % (m v⁻¹) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 5,5), com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. A atividade enzimática máxima (3,06 ± 0,21 U g⁻¹) a pH 6,0 foi definida como 100% de atividade relativa.

Wei e Chatterton (2001) reportaram que as enzimas frutossiltransferases apresentam ponto isoelétrico em torno de 5,02 a 5,96. As partículas de ZnO apresentam ponto isoelétrico de aproximadamente 9,5 que é adequado para a adsorção física de enzimas com baixo ponto isoelétrico, como a frutossiltransferase, sendo assim, maiores interações entre o suporte e enzima serão promovidas, que por sua vez, favorecendo melhor estabilidade à enzima. A FTase imobilizada em óxido de zinco exibiu maior estabilidade nos pHs mais alcalinos. Em contrapartida, Husain *et al.*, (2011) estudou o efeito do pH e β -galactosidase em óxido de zinco e nanopartículas de óxido de zinco, tendo como maior estabilidade no pH de 4,5. O pH do meio influencia diretamente na atividade catalítica da enzima, modificando a distribuição de cargas da proteína, do substrato e dos produtos. Desta forma, o deslocamento do pH ótimo para regiões alcalinas podem ser explicados pelos grupos presentes na enzima e dos grupos funcionais do suporte (Verma *et al.*, 2013).

Faria *et al.*, (2021) reportaram maior estabilidade da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica gel para uma faixa de pH compreendida entre 5,0 e 6,5, com atividade relativa superior a 95 % em pH 6,0.

Silva *et al.*, (2021) estudaram o efeito do pH na FTase extracelular na faixa de 3,5 a 8,5, onde a enzima se demonstrou com maior estabilidade no pH 5,5 e em pH 6,5 sua atividade relativa foi para aproximadamente 60%. Um estudo da estabilidade ao pH da celulase em nanopartículas de óxido de zinco no pH 7,5 a 12, mostrou alta estabilidade superior a 80% no que tange o pH de 7,5 a 9,5, indicando um grande potencial de aplicação de imobilização de enzimas em óxido de zinco (Srivastara *et al.*, 2016).

Verma *et al.*, (2013) estudaram a estabilidade frente ao pH da enzima β -glucosidase de *Aspergillus niger* e foi observado um pH ótimo de 6,0 para imobilização em nanopartículas magnéticas.

Estabilidade de armazenamento da FTase imobilizada

A estabilidade de armazenamento da FTase imobilizada em óxido de zinco foi determinada durante 4 dias de armazenamento a 4°C em solução tampão de tris-acetato. Os resultados demonstram que a enzima imobilizada em óxido de zinco se manteve a uma taxa de caimento da atividade relativa de 15% comparado ao dia anterior, sendo que esta taxa permaneceu até o segundo dia de armazenamento.

Silva *et al.*, (2021), estudaram a estabilidade de armazenamento da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 sob as mesmas condições experimentais e constataram que a enzima solúvel reteve apenas 45,6 % de sua atividade inicial nas primeiras 9 horas de armazenamento. Após este período, a atividade de transfrutoseilação continuou diminuindo até atingir aproximadamente 35 % da atividade inicial após 96 horas de incubação.

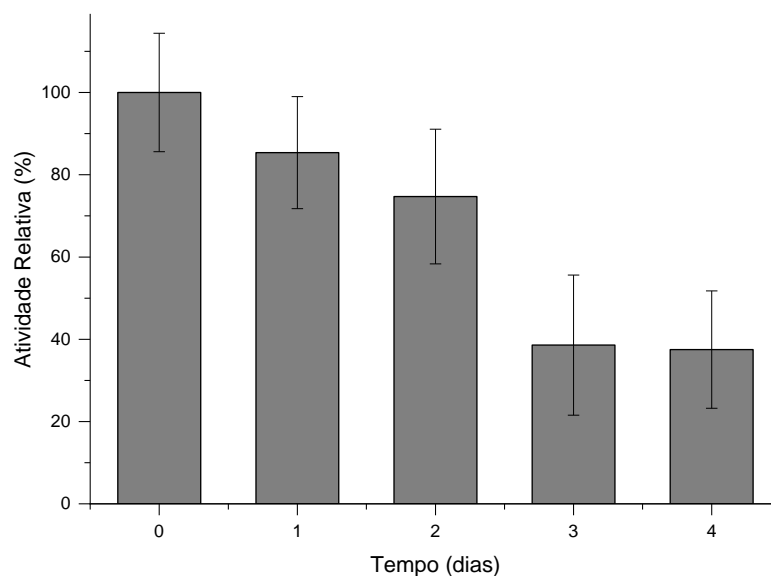


Figura 10 - Estabilidade de armazenamento da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 immobilizada em óxido de zinco. Condições reacionais: solução de sacarose 47 % ($m v^{-1}$) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 5,5), com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. A atividade enzimática máxima ($3,84 \pm 0,31 U g^{-1}$) foi definida como 100% de atividade relativa.

Em comparação com o trabalho de Silva *et al.*, (2021) que estudou o armazenamento da FTase extracelular solúvel é possível observar que a queda de atividade de transfrutossilação é mais acentuada durante as 9 horas incubação nas mesmas condições, atingindo uma atividade 45% após 24 horas de incubação, sendo assim, a enzima immobilizada em óxido de zinco após 24 horas permaneceu em uma atividade relativa de aproximadamente 82%.

Uma maior estabilidade ao armazenamento do biocatalisador promove o uso deste em escala industrial, fator importante para redução de custos e maior eficiência (Araújo *et al.*, 2022).

Conclusões

A partir dos resultados apresentados, constatou-se que a FTase extracelular foi immobilizada por adsorção física, de forma satisfatória em óxido de zinco durante 8 horas, 175 rpm e a 35°C, com rendimento de imobilização de 30,00% e atividade recuperada de 3,22%.

Os estudos de caracterização física dos suportes *in natura* e reutilizado, como demonstrado nos espectros de FT-IR indicam a presença de FTase adsorvida na superfície de ambos os suportes, além de que, o MEV apresenta incrustações na superfície do suporte reutilizado.

A partir da caracterização enzimática, o ensaio para a avaliação do efeito da concentração de substrato apontou que concentrações entre 470 g.L⁻¹ a 700 g.L⁻¹ de sacarose apresentaram as melhores condições para a atividade de transfrutoseilação, sendo 600 g.L⁻¹ a condição ótima. Em relação a cinética da FTase imobilizada em óxido de zinco, o modelo ajustado foi de Hill. Quanto a estabilidade frente ao pH, a imobilização aumentou a faixa em que a FTase é estável, sendo que de 6,0 a 6,5 a atividade relativa permaneceu acima de 90%. A estabilidade térmica da enzima também aumentou com o processo de imobilização, de modo que o tempo de meia vida da enzima foi maior em até 1,70 vezes para o estudo de estabilidade a temperatura de 30°C. Outro estudo realizado foi a estabilidade ao armazenamento, indicando a possibilidade de armazenagem do biocatalisador heterogêneo, sem a perda de atividade de transfrutoseilação, em até 2 dias, onde a atividade relativa permaneceu acima de 70%.

Referências

Abdullah E A, Anber AA, Edan FF, Fraih AJ (2018) Synthesis of ZnO Nanoparticles by Using an Atmospheric-Pressure Plasma Jet, Open Access Library Journal 5(7):1-7. <https://doi.org/10.4236/oalib.1104755> 2018

Aguiar-Oliveira E, Maugeri F (2011) Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. Braz J Chem Eng 28(3):363–372. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000300002>

Alvarado-Huallanco MB, Maugeri F (2011) Kinetic studies and modelling of the production of fructooligosaccharides by fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. Catal Sci Technol 1:1043–1050. <https://doi.org/10.1039/C0CY00059K>

Antony N, Balachandran S, Mahanan PV (2016) Immobilization of diastase α -amylase on nano zinc oxide. *Food Chem.* 211(1):624-630, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.049>

Araújo IM, Becallete PC, Silva ES, Dias GC, Xavier MCA, Almeida AF, Maiorano AE, Morales SAV, Perna RF (2022) Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 98(2):419-430 <https://doi.org/10.1002/jctb.7255>

Califano V, Costantini A, Silvestri B, Venezia V, Cimino S, Sannino F (2019) The effect of pore morphology on the catalytic performance of β -glucosidase immobilized into mesoporous silica. *Pure Appl. Chem.* 91(10):1583–1592. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-1202>

Chiang CJ, Lee WC, Sheu DC, Duan KJ (1997) Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides. *Biotechnol Prog* 13(5):577–582. <https://doi.org/10.1021/bp970067z>

Cuervo-Fernandez R, Ottoni CA, Silva ES, Matsubara RMS, Carter JM, Magossi LR, Wada MAA, Rodrigues MFA, Maresma BG, Maiorano AE (2007) Screening of β -fructofuranosidase producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. *Appl Microbiol Biotechnol* 75(1):87–93. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0803-x>

Cunha JS, Ottoni CA, Morales SAV, Silva ES, Maiorano AE, Perna RF (2019) Synthesis and characterization of fructo-syltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. *Braz J Chem Eng* 36(2):657–668. <https://doi.org/10.1590/0104-6632>.

Dalla-Vechia R, Nascimento MG, Soldi V (2004) Aplicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, 27:623-630. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400017>

Dias GS, Santos ED, Xavier MCA, Almeida AF, Silva ES, Maiorano AE, Perna RF (2022) Study on the transfructosylation activity of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells in a packed bed reactor aiming at fructooligosaccharide production *J Chem Technol Biotechnol* 97(10):2904-2911. <https://doi.org/10.1002/jctb.716>

El-Shishtawy, R, M. Ahmed, N. S. E., Almulaiky, Y. Q. (2021) Immobilization of Catalase on Chitosan/ZnO and Chitosan/ZnO/Fe₂O₃ Nanocomposites: A Comparative Study. *Catalysts* 11(7):820. <https://doi.org/10.3390/catal11070820>

Faria LL, Morales SAV, Prado JPZ, Dias GS, Almeida AF, Xavier MCA, Silva ES, Maiorano AE, Perna RF (2021) Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. *Biotech Letters*, 43:43-59. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03016-7>

Faria LL, Xavier MCA, Júnior LRS, Silva ES, Maiorano AE, Morales SV, Perna RF (2020) Immobilization of fructosyltransferase on silica gel and vegetable sponge for fructooligosaccharides production. In: XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos e XIII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. DOI:[10.13140/RG.2.2.30766.74562](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30766.74562)

Faria FP, Ruelas TMO, Roveri CD, Malafatti JOD, Paris EC, Giraldi TR, Maestrelli SC (2022) Obtaining porous zinc oxide ceramics using the replica technique: application in photocatalysis. *Mat. Res*, 25(1):1-12. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2021-0083>

Ferreira MM, Santiago FLB, Silva NAG, Luiz JHH, Fernández-Lafuente R, Mendes AA, Hirata DB (2018) Different strategies to immobilize lipase from

Geotrichum candidum: kinetic and thermodynamic studies. *Process Biochem* 67:55–63. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.028>

Ganaie MA, Lateef A, Gupta US (2014) Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol* 172:2143–2159. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0661-9>

Garcia RL, Dias GS, Morales SAV, Xavier MCA, Silva ED, Maiorano AE, Tardioli PW, Perna RF (2021) 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. <https://doi.org/10.1007/s43153-021-00110-9>

Gonçalves P, Bertholdo R, Diasb JA, Maestrelli SC, Giraldi TC (2017) Evaluation of the Photocatalytic Potential of TiO₂ and ZnO Obtained by Different Wet Chemical Methods *Mat. Res.* 20(2):181-189. <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2016-0936>

Gonçalves MCP, Morales SAV, Silva ES, Maiorano AE, Perna RF, Kieckbusch TG (2020) Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. *J Chem Technol Biotechnol.* <https://doi.org/10.1002/jctb.6429>

Husain Q, Ansai AS, Alan F, Azam A (2011) Immobilization of *Aspergillus oryzae* β galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism *Int J Biol Macromol* 49(1):37-43 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.03.011>

Jayarambabu N, Rao KV, Prabhu YT (2015) Beneficial role of zinc oxide nanoparticles on green crop production *Int. j. multidiscip. adv. res. trends* 2(1):273-282

Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B (2014) Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption* 20:801–821 <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>

Kumar P, Dubey KK (2019) *Applied Microbiology and Bioengineering: An Interdisciplinary Approach* 10:185-202. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02340-6>

Hu Y, Zhou H, Dai L, Liu D, Al-Zuhair S, Du W (2021) Lipase Immobilization on Macroporous ZIF-8 for Enhanced Enzymatic Biodiesel Production. *ACS Omega*, 6(3):2143–2148. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05225>

Mussatto SI, Mancilha IM (2007) Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydr. Polym*, 68:587-597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>

Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA (2015) An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotech & Biotech Equip*. 29(2):205-220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

Ojwach J, Kumar A, Mokatirwa S, Mutanda T (2020) Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase enzyme from *Aspergillus niger* sp. XOBP48: implication in fructooligosaccharide production. *Biotech*. 10(10):459, <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02440-w>

Oliveira RL, Silva MF, Silva SP, Araújo ACV, Cavalcanti JVFL, Converti A, Porto TS (2020) Fructo-oligosaccharides production by an *Aspergillus aculeatus* commercial enzyme preparation with fructosyltransferase activity covalently immobilized on Fe₃O₄-chitosan-magnetic nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 150:922–929. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.152>

Özgür U, Alivov Y, Liu C, Teke A (2005) A comprehensive review of ZnO materials and devices. *Journal of Applied Physics*. 98(4):1-105. <https://doi.org/10.1063/1.1992666>

Patel V, Shah C, Deshpande M. *et al.*, (2016) Zinc Oxide Nanoparticles Supported Lipase Immobilization for Biotransformation in Organic Solvents: A Facile Synthesis of Geranyl Acetate, Effect of Operative Variables and Kinetic Study. *Appl Biochem Biotechnol* 178:1630–1651. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1972-9>

Perna RF, Cunha JS, Gonçalves MCP, Basso RC, Silva ES, Maiorano AE (2018) Microbial fructosyltransferase: production by submerged fermentation and evaluation of pH and temperature effects on transfructosylation and hydrolytic enzymatic activities. *Int J Eng Res Sci* 4(3):43–50. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1213538>

Perna RF, Tiosso PC, Sgobi LM, Vieira MAS, Vieira MF, Tardioli PW, Soares CM, Zanin GM (2017) Effects of Triton X-100 and PEG on the Catalytic Properties and Thermal Stability of Lipase from Free and Immobilized on Glyoxyl-Agarose. *Open Biochem. J.* 11:66-76. <https://doi.org/10.2174/1874091X01711010066>

Sadana A, Henley JP (1987) Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotech and Bioeng*, 30:717-723. <https://doi.org/10.1002/bit.260300604>

Saqib AAN, Hassan M, Khan NF, Baig S (2010) Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochem* 45:641–646. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.12.011>

Selvarajan E, Mohanasrinivasan V, Devi CS, Doss GPC (2015) Immobilization of b-galactosidase from *Lactobacillus plantarum* HF571129 on ZnO nanoparticles:

characterization and lactose hydrolysis. *Bioprocess Biosyst Eng.* 38(9):1655-1669. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1407-6>

Silva MBPO, Abdal D, Prado JPZ, Dias GS, Morales SAV, Xavier MCA, Alemida AF, Silva ES, Maiorano AE, Perna RF (2021). 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, e2020283. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.28320>

Souza PM, Aliakbarian B, Ferreira EXF, Magalhães PO, Pessoa AJ, Converti A, Perego P (2015) Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. *Int J Biol Macromol* 81:17–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.043>

Srivastava N, Srivastava M, Mishra PK and Ramteke PW (2016) Application of ZnO Nanoparticles for Improving the Thermal and pH Stability of Crude Cellulase Obtained from *Aspergillus fumigatus* AA001. *Front. Microbiol.* 7:514. doi: 10.3389/fmicb.2016.00514

Srivastava V, Gusain D, Sharma YC (2013) Synthesis, characterization and application of zinc oxide nanoparticles (n-ZnO) *Ceramics International* 39(8). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.04.110>

Thangaraj B, Solomon PR (2019) Immobilization of Lipases—A Review. Part I: Enzyme Immobilization. *Chem Bio Eng.* 6:157-166. <https://doi.org/10.1002/cben.201900016>

Verma ML, Chaudhary R, Tsuzuki T, Barrow CJ, Puri M (2013) Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 135:2-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.047>

Yun JW, Song SK (1996) Continuous production of fructooligosaccharides using fructosyltransferase immobilized on ion exchange resin. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 1:18–21 <https://doi.org/10.1007/BF02949138>

Wei JZ; Chatterton NJ (2001) Fructan biosynthesis and fructosyltransferase evolution: Expression of the 6SFT (sucrose : fructan 6-fructosyltransferase) gene in crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*). *Journal of Plant Physiology* 158(9):1203-1213. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00241>

Weiss JN (1997) The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J* 11:835–841. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.11.9285481>

Zhao XS, Bao XY, Guo W, Lee FY (2006) Immobilizing catalysts on porous materials. *Materials Today.* 9(3):32-39. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(06\)71388-](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(06)71388-8)

8

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A FTase extracelular foi imobilizada por adsorção física, de forma satisfatória em óxido de zinco num período de 8 horas, a uma temperatura de 35°C e 175rpm, com 30% de rendimento de imobilização e 3,22% de atividade recuperada.

Os suportes *in natura* e reutilizado indicam a presença de FTase adsorvida, que foi demonstrado nos espectros de FT-IR nos estudos de caracterização física. Foi demonstrado também que o MEV apresenta incrustações na superfície do suporte utilizado.

O ensaio para a avaliação do efeito da concentração de substrato, através da caracterização enzimática, obteve condição de maior atividade de transfrutoseilação na concentração de substrato de 600 g. L⁻¹, além disso, a enzima apresentou atividades maiores de 70% na faixa de concentração de 470 g. L⁻¹ a 700 g. L⁻¹. O modelo de Hill foi utilizado na cinética da FTase imobilizada em óxido de zinco. Em relação a estabilidade e pH, obteve um aumento na imobilização a faixa em que a FTase é estável, sendo que a atividade relativa se manteve acima de 90% com o pH mais alcalinos. Ocorreu também o aumento da estabilidade térmica com o processo de imobilização, sendo que o tempo de meia vida da enzima foi 1,70 vezes maior em uma temperatura a 30°C. A estabilidade ao armazenamento também foi uma variável estudada, sendo que em até 2 dias, a atividade relativa permaneceu acima dos 70%, sem a perda de atividade de transfrutoseilação.

REFERÊNCIAS

- ANSARI, S. A. *et al.*, Cost effective surface functionalization of silver nanoparticles for high yield immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and its application in lactose hydrolysis. **Process Biochemistry**. v. 47, nº. 12, p. 2427-2433, 2012.
- ANTONY, N.; BALACHANDRAN, S.; MAHANAN, P. V. Immobilization of diastase α -amylase on nano zinc oxide. **Food Chemistry**. V. 211, nº 1, p. 624-630, 2016.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferase: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.
- ALVARADO-HUALLANCO, M. B.; MAUGERI-FILHO, F. Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.* **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 12, p. 1654–1662, 2010.
- ARAÚJO, I. M. *et al.*, Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. V. 98, nº. 2, p. 419-430, 2022.
- BASKOUTAS, S. Special Issue: Zinc Oxide Nanostructures: Synthesis and Characterization. **Materials**. 2018, v. 11, nº 6, p. 873, 2018.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.
- BOUHNİK, Y.; *et al.*, Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. **Lawrence Erlbaum Associates**, v. 26, nº. 1, pg. 21 – 29, 1996.
- 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.
- CUERVO-FERNANDEZ. R.; *et al.*, Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 75, p. 87-93, 2007.
- CUESTA, S. M., RAHMAN, S. A., FURNHAM, N., THORNTON, J. M. The Classification and Evolution of Enzyme Function. **Biophysical Journal**, v. 109, nº. 6, p. 1082–1086, 2015.
- CUNHA, J. S. **Produção e caracterização da enzima Frutosiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de Frutooligossacarídeos**. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas - MG, 2017.

CUNHA, J. S.; OTONI, C. A.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 657-668, 2019.

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

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

FARIA, L. L.; XAVIER, M. C. A; JUNIOR, L. R. S.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E; MORALES, S.; PERNA, R. F. Immobilization of fructosyltransferase on silica gel and vegetable sponge for fructooligosaccharides production. In: XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos e XIII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Uberlândia, 2019.

FERREIRA, M. M., SANTIAGO, F. L. B., SILVA, N. A. G., LUIZ, J. H. H., LAFUENTE, R. F., MENDES, A. A, HIRATA, D. B. Different Strategies to Immobilize Lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and Thermodynamic Studies. **Process Biochemical**, v. 67, p. 55-63, 2018.

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.

GARCIA, L. R., DIAS, G. S., MORALES, S. A. V., XAVIER, A. C. M., SILVA, E. S., MAIORANO, A. E., TARDIOLI, W. P., PERNA, R. F. Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Brazilian Journal Chemical Engineering**. v. 38, p. 273-285, 2021.

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.

HUSAIN, Q., ANSARI, S. A., ALAM, F. AZAM, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **Internacional Journal Biological Macromolecules**, v. 49, n^o1, p. 37-43. 2011.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**. v. 20, p. 801-821, 2014.

KHANVILKAR, S. S.; ARYA, S. S. Fructooligosaccharides: Applications and Health benefits- a review. **Agro Food Industry Hi Tech**. V. 26, nº. 6, 2015.

KHOSHNEVISAN, K. *et al.*, Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. **Chemical Engineering Journal**. v. 171. p. 669-673, 2011.

KUMAR, P. ; DUBEY, K. K. Applied Microbiology and Bioengineering: **An Interdisciplinary Approach**. cap. 10, p. 185-202, 2019.

KUMAR, C. G. *et al.*, **Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals**. Handbook of Food Bioengineering, cap. 14, p. 451-503, 2018.

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.

LIU, S. *et al.*, Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 190, nº 1, p. 396-408, 2021.

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

MENDES A. A. *et al.*, Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.

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

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.

MOHAMAD, N. R. *et al.*, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. v. 29, nº 2, p. 205-220, 2015.

MUTANDA, T.; MOKOENA, M. P.; OLANIRAN, A. O.; WILHELMI, B. Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recente advances and current perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p.893–906, 2014.

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

OLIVEIRA, R. L. *et al.*, Fructo-oligosaccharides production by an *Aspergillus aculeatus* commercial enzyme preparation with fructosyltransferase activity covalently immobilized on Fe₃O₄-chitosan-magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 1, nº 150, P. 922-929, 2020.

OJWACH, J., KUMAR, A., MOKARATIRWA S., MUTANDA, T. Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase enzyme from *Aspergillus niger* sp. XOBP48: implication in fructooligosaccharide production. **Biotech**. nº. 10, v. 10, p. 459, 2020.

ÖZGÜ, Ü. *et al.*, A comprehensive review of ZnO materials and devices. **Journal of Applied Physics**. V. 98, nº 4, p. 1-105, 2005.

PASSOS, L. M. N; PARK, Y. K. Fructooligosaccharídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v.33, n.2, 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.

REPORTS AND DATA. **Fructooligosaccharides (FOS) market size, share and industry analysis by source (sucrose, inulin), by form (solid, liquid), application (infant formulation, food & beverages, animal feed, dietary supplements, pharmaceuticals) and region, segment forecasts to 2027**. Reports and data. Disponível em: <https://www.reportsanddata.com/report>. Acesso em 11 fevereiro de 2023.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 717-723, 1987.

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

SANTOS, A. M. P.; **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. 2002. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SHAH, E., MAHAPATRA, P., BEDEKAR, A. V., SONI, H. P. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on ZnO nanoparticles: mimicking the interfacial environment. **RSC Advances**. v. 5, nº 33, p. 26291–26300, 2015.

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

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

SILVA, M. B. P. O., ABDAL, D., PRADO, J. P. Z., DIAS, G. S., MORALES, S. A. V., XAVIER, M. C. A., ALEMIDA, A. F., SILVA, E. S., MAIORANO, A. E., PERNA, R. F. Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 24: p. 1-11, 2021.

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

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.

SRIVASTAVA, V. GUSAIN, D. SHARMA, Y. C. Synthesis, characterization and application of zinc oxide nanoparticles (n-ZnO). **Ceramics International**. V. 39, nº 1, p.9803–9808, 2013.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R. Immobilization of Lipases – A Review Part I: Enzyme Immobilization. **ChemBioEng Reviews**. V. 6, nº. 5, p. 157-166, 2019.

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.

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

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

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

ZDARTA, J. *et al.*, A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. **Catalysts**. v.8, p. 1-27, 2018.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. **Molecules**. V. 19, p. 14139-14194, 2014.