

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

ALINE DE CARVALHO CORRÊA

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE
Aspergillus oryzae IPT-301 EM COMPÓSITO DE POLI ÁCIDO LÁTICO E ARGILA
PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

**POÇOS DE CALDAS – MG
2023**

ALINE DE CARVALHO CORRÊA

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE
Aspergillus oryzae IPT-301 EM COMPÓSITO DE POLI ÁCIDO LÁTICO E ARGILA
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

Corrêa, Aline de Carvalho.

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE
EXTRACELULAR DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM COMPÓSITO DE POLI
ÁCIDO LÁTICO E ARGILA PARA PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS / Aline de Carvalho Corrêa. - Poços de Caldas,
MG, 2023.

89 f. : il. -

Orientador(a): Melina Savioli Lopes.

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

Bibliografia.

1. Imobilização . 2. Argila. 3. Póli(ácido lático). 4. Biocatalisador. 5.
Enzima. I. Lopes, Melina Savioli, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

ALINE DE CARVALHO CORREA

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM COMPÓSITO DE PÓLI ÁCIDO LÁTICO E ARGILA PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 17 de agosto de 2023.

Profa. Dra. Melina Savioli Lopes
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

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

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



Documento assinado eletronicamente por Melina Savioli Lopes, Professor do Magistério Superior, em 21/08/2023, às 06:39, 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 1063784 e o código CRC DB278FD1.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gratidão a Deus, pois sem ele nada seria possível e é por meio Dele que tudo acontece. Agradeço a Ele pela saúde, força e resiliência que me foi concebido durante toda a caminhada. Agradeço a mãe Nossa Senhora Aparecida, por interceder por mim e nunca me desamparar.

Agradeço infinitamente aos meus pais Arildo e Nelma e meu irmão Alex, que sempre são por mim e é onde eu busco refúgio e colo. Agradeço aos meus familiares mais próximos que me ouviram, apoiaram e se interessaram pela minha pesquisa, minhas primas e irmãs, Dani, Day, Débora e Tayná, minhas tias Gleice e Lena, meus padrinhos Tula e Cecília e meus avós Joana, Sebastiana e José Dito, minhas sogras Inês e Jania.

Um agradecimento mais que especial a quem foi e é para mim motivo de inspiração e força, que me apoia em absolutamente todas as situações e não me deixa desanimar, meu noivo Marcelo.

Agradeço imensamente a minha orientadora e amiga Melina, por toda a humildade, tranquilidade e calma na transferência do conhecimento necessário. Agradeço enormemente ao Prof. Dr. Rafael Perna, coorientador e idealizador da pesquisa, ao grupo de pesquisa que me acolheu e colaborou com a disponibilização do laboratório e cada vidraria utilizada, com cada reunião de apresentações parciais e com cada troca que tive com cada um, professores, técnicos, mestrandos e alunos de iniciação, em especial ao aluno de IC Gabriel, que sempre me ajudou nas atividades práticas.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP), em especial ao Dr. Alfredo Eduardo Maiorano e à Msc. Elda Sabino da Silva, pelo auxílio com a realização das análises laboratoriais. Agradeço também o prof. Dr. Juliano Marini, do DEMa/UFSCar e à Togni Refratários S/A pelo fornecimento do PLA e da argila refratária, respectivamente.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UNIFAL-MG que contribuíram para o meu desenvolvimento em diversos conhecimentos. E, finalmente, aos técnicos da UNIFAL e em especial à Ju da limpeza que sempre me ouviu e solícitamente me atendeu em cada chamado.

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 conhecidos como “açúcares não convencionais”, são alimentos funcionais e prebióticos benéficos à saúde humana. Eles são compostos por uma unidade de sacarose alongada por unidades frutossil ligadas entre si por ligações do tipo β (2 \rightarrow 1). Os FOS podem ter ocorrência natural em diversos tipos de vegetais ou serem produzidos por diferentes vias. Dentre as formas de produção comercial, a reação de transfrutossilacção da sacarose realizada pela enzima frutossiltransferase (FTase) possui destaque. A cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 se destaca por produzir frutossiltransferase (FTase) com elevada atividade de transfrutossilacção (*At*). A utilização da enzima livre em escala comercial é um processo difícil devido a sua alta instabilidade e a necessidade de grande controle das variáveis de processo. A imobilização enzimática é uma técnica voltada para a fixação das enzimas em suportes orgânicos ou inorgânicos visando conferir maior estabilidade e facilidade de operação para bioprocessos. Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar o processo de imobilização da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em suporte de poli (ácido láctico) enriquecido com 10% de argila refratária (PLA – 10AR). Para tanto, realizou-se testes de imobilização da FTase extracelular em PLA – 10AR na temperatura de 35 °C, durante 8 horas, com agitação de 175 rpm na proporção 10:1 de caldo proveniente do cultivo celular em pH 5,5 para suporte. Atingiu-se uma atividade de transfrutossilacção recuperada de $17,23 \pm 0,87$ %. Fez-se um planejamento de experimentos do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) por meio do *software* Protmiza® com o objetivo de avaliar as influências da temperatura e do pH sobre *At* e obter as condições ótimas para a reação, que foram atingidas em 50°C e pH 5,5. Para estudos de caracterização do biocatalisador imobilizado, foram realizados ensaios de avaliação da influência da concentração de substrato na reação enzimática, de estabilidade frente ao pH de incubação e ensaios de estabilidade armazenamento. O estudo dos efeitos de concentração mostrou que as maiores atividades foram atingidas para concentrações entre 400 g.L⁻¹ e 600 g.L⁻¹ de sacarose, com valores superiores a 85% e que o modelo cinético de Hill fornece melhor ajuste dos dados apresentados pelo biocatalisador. Ademais, a estabilidade frente ao pH de incubação fornece atividades relativas superiores a 76% para uma faixa de pH entre 5,0 e 6,5. A avaliação da estabilidade térmica para as temperaturas entre 30 e 60°C por 24h apontou que não houve ganho de estabilidade do biocatalisador heterogêneo frente a enzima solúvel. Sobre a estabilidade operacional, o biocatalisador mostrou-se com comportamento constante e estável entre os ciclos 4 e 7, decaindo no ciclo 8 pelo rompimento das ligações entre enzima e suporte. Ressalta-se a inovação tecnológica presente neste estudo de imobilização da FTase extracelular em suporte elaborado a partir de compósito de poli (ácido láctico) com 10% argila para a produção de FOS.

Palavras-chave: Imobilização; Argila; poli(ácido láctico); Biocatalisador; Enzima.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are known as “unconventional sugars”. They are functional foods and prebiotics beneficial to human health. They are composed of a sucrose unit elongated by fructosyl units linked together by β -type bonds (2 \rightarrow 1). FOS can occur naturally in different types of plants or be produced by different ways. Among the forms of commercial production, the transfructosylation reaction of sucrose, which is carried out by the enzyme fructosyltransferase (FTase) stands out. Among the microorganisms that produce these enzymes, *Aspergillus oryzae* IPT-301 stands out because it produces fructosyltransferase (FTase) with high transfructosylation activity (*At*). The use of free enzyme on a commercial scale is a difficult process due to its high instability and the need for great control of process variables. Enzymatic immobilization consists of a technique aimed at fixing enzymes on organic or inorganic supports in order to provide greater stability and ease of operation for bioprocesses. In this context, this work aims to evaluate the process of immobilization of extracellular FTase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in poly (lactic acid) support enriched with 10% of refractory clay (PLA – 10AR). For that, tests of immobilization of extracellular FTase in PLA - 10AR were carried out at a temperature of 35 °C, for 8 hours, with agitation at 175 rpm in a 10:1 proportion of broth from cell culture at pH 5.5 for support and a recovered transfructosylation activity of $17.23 \pm 0.87\%$. A central rotational composite design (DCCR) design was carried out in order to evaluate the influences of temperature and pH on *At* and to obtain the optimal conditions for the reaction that were achieved at 50°C and pH 5.5. For characterization studies of the immobilized biocatalyst, tests were carried out to evaluate the influence of substrate concentration on the enzymatic reaction, stability against incubation pH and storage stability tests. The study of concentration effects showed that the highest activities were achieved for concentrations between 400 g.L⁻¹ and 600 g.L⁻¹ of sucrose, with values higher than 85% and that the Hill kinetic model provides a better fit of the data presented by the biocatalyst. Furthermore, stability against incubation pH provides relative activities above 76% for a pH range between 5.0 and 6.5. In view of the evaluation of the thermal stability for temperatures between 30 and 60°C for 24 hours, it was pointed out that there was no gain in stability of the heterogeneous biocatalyst against the soluble enzyme. Regarding the operational stability, the biocatalyst showed a constant and stable behavior between cycles 4 and 7, decaying in cycle 8 due to the rupture of the bonds between enzyme and support. Also noteworthy is the technological innovation present in this study of immobilization of extracellular FTase in support made from a PLA nanocomposite with 10% clay for the production of FOS.

Keywords: Immobilization; Clay; poly(lactic acid); Biocatalyst; Enzyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação das moléculas de sacarose, kestose, nistose e 1-frutossilnistose. .21
Figura 2 -	Representação esquemática reação de transfrutossilacção da Sacarose em FOS, catalisada por FTase com formação de kestose (GF2) e Glicose (G)26
Figura 3 -	Esquema dos principais tipos de imobilização29
Figura 4 -	Estrutura do PLA e representação das formas quirais do ácido láctico.....34
Figura 5 -	Suportes de poli(ácido láctico) com adição de 10% argila no tamanho final para serem utilizados44
Figura 6 -	Resultado físico final do cultivo celular submerso46
Figura 7 -	Fluxograma da produção de Ftase47
Figura 8 -	Erlenmeyer de 50ml contendo suporte e caldo proveniente do cultivo celular ...47
Figura 9 -	Tubos Falcon 15ml contendo amostra diluída e solução DNS em banho maria .53
Figura 10 -	Tubos Falcon 15ml contendo solução reagente do kit enzimático e amostra diluída após seguimento da reação em banho à 37°C por 5 min55
Figura 11 -	Perfil cinético de imobilização de FTase extracelular em PLA – 10AR, em função do tempo: monitoramento da atividade de transfrutossilacção no sobrenadante. Condições reacionais: (temperatura: 35 °C, velocidade de agitação: 175 rpm, 10:1 caldo de cultura/ g de suporte). A atividade máxima de transfrutossilacção ($21,08 \pm 0,5$ U ml ⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa..... 56
Figura 12 -	Diagrama de Pareto para as variáveis pH e temperatura (°C) na atividade de transfrutossilacção da FTase imobilizada em PLA – 10AR..... 61
Figura 13 -	(a) Superfície de resposta da atividade de transfrutossilacção para a FTase imobilizada em PLA – 10AR. em função do pH e da temperatura; (b) Curva de contorno da atividade de transfrutossilacção para a FTase imobilizada em PLA – 10AR. em função do pH e da temperatura64
Figura 14 -	Efeito da concentração de substrato na atividade relativa da FTase imobilizada em PLA-10AR65
Figura 15 -	Modelos de Michalis-Menten e de Hill para a FTase imobilizada em PLA – 10AR66
Figura 16 -	Estabilidade frente ao pH da FTase extracelular imobilizada em PLA-10AR. ..68
Figura 17 -	Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> 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 transfrutossilacção foi definida como 100% da atividade relativa 70

Figura 18 - Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PLA – 10AR ao decorrer de 24 horas para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). A reacção 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 transfrutossilacção foi definida como 100% da atividade relativa..... 71

Figura 19 - Estabilidade de armazenamento da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PLA – 10AR..... 74

Figura 20 - Estabilidade operacional da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PLA – 10AR avaliada durante ciclos reacionais consecutivos em batelada. A reacção enzimática ocorreu em meio reacional constituído por 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. As atividades máximas de transfrutossilacção para o derivado foram $0,934 \pm 0,04$ U.g-1 e definidas como 100 % da atividade relativa..... 75

Figura 21– A) Suporte PLA – 10AR antes do processo de imobilização; B) Complexo suporte PLA – 10AR com enzima proveniente do caldo fermentado..... 77

Figura 22- Espectro de infravermelho por transformada de Fourier das amostras de Suporte (PLA – 10AR) e Enzima + Suporte (PLA – 10AR com a enzima FTase)..... 78

Figura 23 - Curva analítica obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicífico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR)..... 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas segundo a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB).....	25
Tabela 2 - Classificação dos suportes conforme composição.	32
Tabela 3 - Análise Química argila utilizada para elaboração do suporte.	37
Tabela 4 - Composição meio sólido para a repicagem.....	45
Tabela 5 - Composição Meio de Cultivo A. Oryzae IPT301	45
Tabela 6 - Matriz do Delineamento.....	49
Tabela 7 - Parâmetros de imobilização para PLA – 10 AR após 8 horas de imobilização. .	57
Tabela 8 - Valores dos parâmetros de imobilização enzimática em diferentes suportes.	58
Tabela 9 - Matriz do Delineamento e Respostas.	60
Tabela 10 - Coeficientes do modelo, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos da temperatura e do pH na atividade de transfrutossilagem da FTase extracelular imobilizada em PLA – 10AR.....	61
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH sobre a atividade de transfrutossilagem da FTase extracelular imobilizada em PLA – 10AR	63
Tabela 12 - Parâmetros cinéticos para a FTase imobilizada em PLA – 10AR.	67
Tabela 13- Parâmetros termodinâmicos para a FTase extracelular solúvel (S) e imobilizada em PLA – 10AR, obtidos para diferentes temperaturas de incubação.	72

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVO	19
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1.	FOS.....	20
3.1.1.	FOS: definição, ocorrência e obtenção.....	20
3.1.2.	FOS: importância para a saúde humana e aplicações.....	22
3.2.	ENZIMAS E FTASE.....	23
3.2.1	Atividade de Transfrutossilacção.....	27
3.3.	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	27
3.3.1	Métodos de Imobilização.....	29
3.3.2	Imobilização da FTase extracelular.....	31
3.4.	TIPOS DE SUPORTES.....	31
3.5.	POLI(ÁCIDO LÁTICO)	33
3.6.	ARGILA	36
3.7	POLI (ÁCIDO LÁTICO) ENRIQUECIDO COM ARGILA.....	37
3.8.	CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	38
3.8.1	Aspectos Gerais	38
3.8.2	Efeito da concentração de substrato na cinética enzimática.....	39
3.8.3	Efeitos do pH na cinética enzimática	40
3.8.4	Efeitos da Temperatura na Cinética Enzimática.....	41
3.8.5	Estabilidade Térmica	41
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1.	PREPARO DO SUPORTE.....	44
4.2.	PRODUÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR MICROBIANA	44
4.2.1.	Preparo do Inóculo: microrganismo e condições de cultivo.....	44

4.2.2. Cultivo Celular Submerso: Meio de Cultura e Produção de FTase extracelular.....	45
4.3. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA FTASE EXTRACELULAR	47
4.3.1. Parâmetros de Imobilização Enzimática.....	48
4.4. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA FTASE EXTRACELULAR IMOBILIZADA EM POLI(ÁCIDO LÁTICO) COM 10% DE ARGILA	48
4.4.1. Avaliação dos efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática	48
4.4.2. Avaliação do efeito da concentração de substrato na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos.....	49
4.4.3. Ensaio de Estabilidade frente ao pH	50
4.4.4. Ensaio de Estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos.....	50
4.4.5. Ensaio de Estabilidade de armazenagem	50
4.4.6. Ensaio de Estabilidade Operacional.....	51
4.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO BIOCATALISADOR	51
4.6. ENSAIOS ANALÍTICOS	51
4.6.1. Atividade Enzimática	51
4.6.2. Quantificação dos Açúcares	52
4.6.2.1. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores (AR).....	53
4.6.2.2. Determinação da Concentração de Glicose (G)	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
5.1. PERFIL CINÉTICO DE IMOBILIZAÇÃO DA FTASE EXTRACELULAR EM PLA ENRIQUECIDO COM 10% DE ARGILA	56
5.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA	59
5.2.1 Planejamento de experimentos: efeitos de pH e temperatura na atividade de transfrutossilação da FTase imobilizada PLA – 10AR.	59
5.2.2. Efeito da concentração de substrato e obtenção dos parâmetros cinéticos	64
5.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOCATALISADOR.....	68
5.3.1 Estabilidade frente ao pH	68
5.3.2 Estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos	70

5.3.3	Estabilidade de armazenagem	74
5.3.4	Estabilidade Operacional.....	75
5.4.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO BIOCATALISADOR	76
6.	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS.....	81
	APENDICE A - CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR	89

1. INTRODUÇÃO

No cenário atual, observa-se uma grande preocupação ao redor do mundo com a qualidade de vida e saúde. É cada vez mais nítido o aumento no cuidado com a alimentação. Assim, surgem demandas cada vez maiores por alimentos com baixo valor calórico e mais saudáveis (JITONNOM; KETUDAT-CAIRNS; HANNONGBUA, 2018; PASSOS; PARK, 2003; WELTI-CHANES et al., 2020).

Neste sentido, os frutoligossacarídeos (FOS), tem recebido cada vez mais atenção por parte de pesquisadores e indústrias principalmente farmacêuticas e alimentícias. Os FOS são oligossacarídeos, constituídos de uma molécula de sacarose alongada por uma cadeia de unidades frutossil, conectadas por meio de ligações glicosídicas do tipo β -(2,1), com um formato genérico do tipo GF_n (em que G se refere à molécula de glicose, F de frutose e n ao número de unidades do grupo frutossil) (ROBERFROID, 2007; YUN, 1996).

As ligações presentes na cadeia de FOS não são metabolizadas pelo sistema gastrointestinal humano; assim, as moléculas chegam ao intestino grosso e podem exercer suas propriedades funcionais estimulando o crescimento de microbiota benéfica. Por esta função, os FOS são denominados ingredientes prebióticos (AGUIAR, 2007; GIBSON et al., 2004). Além disso, os FOS, possuem sabor semelhante ao da sacarose, baixa caloria e são comprovadamente não cariogênicos (MUTANDA et al., 2014; YUN, 1996). Ademais, o consumo de FOS é considerado uma ferramenta nutricional valiosa pois: são seguros para diabéticos, auxiliam no controle do colesterol e na prevenção da anemia, obesidade, osteoporose, hipertensão, intolerância à lactose, insuficiência renal e câncer gastrointestinais (CUNHA, 2017; DRABINSKA; KRUPA-KOZAK; JAROCKA-CYRTA, 2020; MUTANDA et al., 2014; RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2019).

Os FOS podem ocorrer naturalmente, na forma de traços em uma vasta quantidade de vegetais, mas nem todos são viáveis para fins alimentícios, as fontes mais conhecidas são: cebola, alho, aspargos, banana, alcachofra, tomate, banana, chicória etc. (AGUIAR, 2007; FLAMM et al., 2001; TANRISEVEN; ASLAN, 2005). Comercialmente, os compostos FOS podem ser sintetizados por meio de processos, físicos, químicos ou enzimático; em escala industrial, os métodos enzimáticos são os mais utilizados para a síntese de FOS.

Em 2019, a produção mundial de FOS foi em torno de 167 mil toneladas, com valor equivalente a 390 milhões de euros, (BEDZO; MANDEGARI; GÖRGENS, 2019). Além disso, o mercado mundial de FOS apresenta notório crescimento e espera-se uma

taxa de 6,6% entre 2021 e 2027, com expectativa de atingir um valor de US\$ 4,88 bilhões ao final deste período (MAXIMIZE MARKET RESEARCH, 2020).

A produção de FOS por meio de enzimas microbianas tem se destacado, uma vez do ciclo de vida curto dos microrganismos e ausência de sazonalidade (HERNALSTEENS, 2006). Em âmbito geral, enzimas são proteínas e tem, por característica funcional, a capacidade de catalisar reações. Estes catalisadores biológicos apresentam uma alta especificidade pela reação que catalisam e operam em condições reacionais amenas (ASGHER et al., 2014; FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010). Estima-se que o mercado global de enzimas, no período de 2019 a 2026 obtenha uma taxa anual de crescimento de 6,75%, passando de U\$ 8,8 bilhões em 2018 para U\$ 13,79 bilhões até 2026 (RIGO et al., 2021; SILVA et al., 2020).

As enzimas frutossiltransferases (FTases), são uma das enzimas responsáveis pela produção de FOS. A FTase catalisa a reação de transfrutossilacção da sacarose por meio do rompimento da ligação entre os grupos frutossil e glicosil presentes na molécula da sacarose. Ela se liga na posição β (2 \rightarrow 1) do grupo frutossil e como resultado, este grupo é transferido a uma outra molécula de sacarose ou de FOS, tendo como produtos FOS e glicose. (MAIORANO et al., 2008; PASSOS; PARK, 2003; VAŇKOVÁ et al., 2008).

A síntese das FTases é realizada, predominantemente, por fungos dos gêneros *Aureobasidium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (ANTOSOVÁ et al., 2008; CASTRO et al., 2017). A cepa de *Aspergillus oryzae* IPT-301 tem se destacado como fonte potencialmente produtora de FTase extracelular (enzima solúvel excretada para o meio de cultura), pois as mesmas apresentam elevada atividade de transfrutossilacção quando comparada a outras dezessete linhagens de fungos filamentosos (CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007). Todavia, existe grande dificuldade ao se trabalhar com enzimas, pois elas possuem elevada instabilidade operacional, principalmente enzimas em estado solúvel. Além disso, enzimas podem ser facilmente desnaturadas, exigindo um alto controle de pH, temperatura e agitação, e não podem ser reutilizadas, já que são rapidamente dissolvidas no meio reacional. Esses obstáculos dificultam sua utilização comercial em processos contínuos, resultando em um alto custo de produção (GONÇALVES et al., 2020; MAIORANO et al., 2008; RISSO et al., 2012).

A imobilização enzimática é uma forma de conferir a enzima, possibilidade de reuso em processos contínuos ou bateladas, facilita ou elimina a necessidade de separação entre enzima e produto e pode ainda aumentar, consideravelmente, a estabilidade enzimática quanto à estocagem em relação a enzima solúvel. Tais características

permitem uma grande vantagem operacional quando comparado ao uso de enzimas solúveis (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; SHELDON, 2007; ZANIN; MORAES, 2004).

Existem diversas técnicas e inúmeros materiais utilizados para a realização de imobilização de enzimas; no entanto, a literatura exhibe poucos trabalhos envolvendo a imobilização de FTases extracelular em suportes orgânicos e inorgânicos para a produção de FOS em pequena ou larga escala. Não obstante, o Brasil ainda carece de processos biotecnológicos de produção adequados e prontos para a aplicação industrial. Com isso, tem-se a oportunidade de desenvolver processos capazes de intensificar a produção de FOS por meio da imobilização da FTase. A técnica de imobilização envolve a fixação da enzima de interesse em um suporte para que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente, visando protegê-la contra condições adversas do meio (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

Na atualidade, a imobilização é uma técnica cada vez mais convertida do ambiente laboratorial para o industrial, permitindo a automação da produção com um melhor controle da qualidade e redução de espaço físico necessário (AGUIAR, 2007; GONÇALVES, 2013). Para o sucesso do desenvolvimento de biocatalisadores com enzimas imobilizadas (EI), é preciso ter em mente o sistema onde a enzima imobilizada será utilizada no momento da escolha do método de imobilização, uma vez que cada método traz em si limitações que precisam ser consideradas e que não existem técnicas universais ou totalmente eficientes, mas sim uma gama de possibilidades, parâmetros e aplicações (AGUIAR, 2007; FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010).

Em meio aos numerosos métodos e suportes disponíveis, este trabalho propôs utilizar um suporte inovador composto por poli(ácido láctico) enriquecido com 10% de argila refratária (compósito polímero-cerâmica). O interesse pela síntese de novos polímeros, geralmente, tem como principal objetivo desenvolver um material com propriedades mecânicas, de barreira, térmicas e processamento otimizadas para satisfazer as condições específicas de sua aplicação. Neste contexto, o desenvolvimento de blendas poliméricas, biocompósitos, nano e compósitos a partir de biopolímeros, cargas e nanocargas têm se mostrado uma alternativa bastante atraente no melhoramento de algumas propriedades físico-químicas dos materiais.

A mistura de biopolímero, especialmente o poli (ácido láctico) - PLA, com cargas compostas por partículas, seja em escala micrométrica ou nanométrica, pode produzir uma nova classe de materiais híbridos, conhecidos como biocompósitos, onde as cargas

em concentrações diversas estão dispersas em partículas dentro da matriz de PLA. A adição de argilas em matriz biopolimérica permite desenvolver biocompósitos “verdes” que apresentem várias propriedades iguais e até superiores aos compósitos convencionais (RAY, 2012). Pós cerâmicos com elevada área de superfície específica (como ocorre comumente com as argilas) podem melhorar as propriedades (com destaque para as resistências mecânica e à inflamabilidade) de forma significativa em comparação com o PLA puro.

De modo geral, visando o aumento e otimização na produção de FOS, principalmente no mercado interno, para atender a sua crescente demanda comercial, este estudo propõe-se a desenvolver um biocatalisador heterogêneo inédito para a produção de FOS, por meio da imobilização da enzima FTase extracelular em PLA enriquecido com 10% de argila. A escolha do percentual de argila adicionada ao PLA foi feita a partir de estudo anterior, no qual avaliou-se o efeito da adição de diversos teores de argila em PLA (RABELO et al, 2022). Busca-se avaliar o desempenho do biocatalisador com relação à atividade, seletividade e especificidade, além de suas estabilidades principais, tidas como térmica, operacional, frente ao pH e de armazenagem, de modo a possibilitar o uso do mesmo em diferentes configurações de reatores para a síntese de FOS nos modos batelada e contínuo. Por bem, ressalta-se que estes são os primeiros resultados alcançados para a FTase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 adsorvida em um compósito e, portanto, representa o início de uma sequência de estudos relacionados a aplicação desta enzima imobilizada em processos biotecnológicos.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar o desempenho de uma matriz de poli (ácido lático) enriquecido com 10% de argila, como suporte para imobilização da enzima frutossiltransferase (FTase) extracelular de *A. Oryzae* IPT-301, para a produção de frutooligossacarídeos (FOS).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (a) Caracterizar o material de suporte, poli (ácido lático) enriquecido com 10% de argila (PLA – 10AR), para a imobilização de FTase extracelular por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).
- (b) Imobilizar a enzima FTase extracelular, produzida por meio do cultivo celular submerso em PLA – 10AR., visando obter um biocatalisador heterogêneo com elevada atividade de transfrutossililação.
- (c) Determinar os parâmetros de imobilização: rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR) para a enzima adsorvida em PLA – 10AR.
- (d) Analisar a influência do pH e da temperatura na atividade de transfrutossililação da FTase imobilizada em PLA – 10AR. por planejamento de experimentos;
- (e) Avaliar a influência da concentração de substrato (sacarose) na atividade de transfrutossililação e obter os parâmetros cinéticos da enzima imobilizada;
- (f) Determinar as estabilidades térmica, de armazenamento e frente ao pH do biocatalisador heterogêneo e obter os parâmetros termodinâmicos.
- (g) Controlar o desempenho do biocatalisador imobilizado em ciclos batelada consecutivos para avaliação da sua estabilidade operacional.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FOS

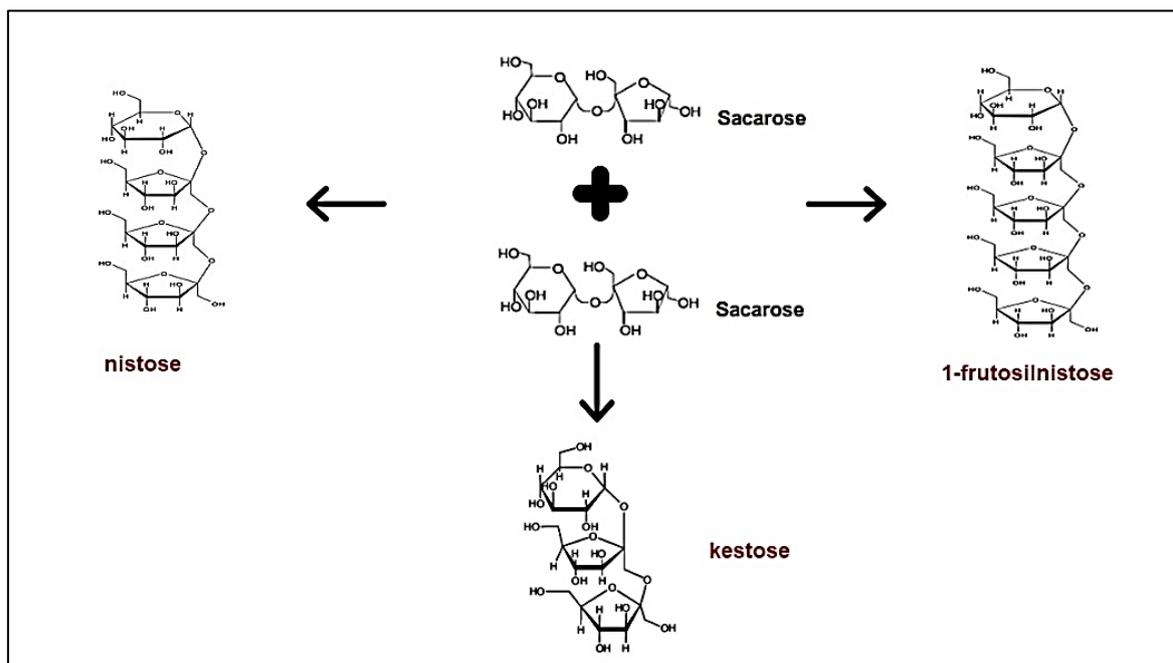
3.1.1. FOS: definição, ocorrência e obtenção

Na natureza existem diversos tipos de frutanos, os quais consistem em polímeros formados a partir da repetição de resíduos de frutose finalizados por uma unidade de sacarose. Existem diferentes classificações para os frutanos, distinguidas com base em critérios como: tipo de ligação presente na cadeia, comprimentos de cadeia e posição da fração de sacarose (PEUKERT et al., 2016). No geral, as principais classes de frutanos são: as inulinas que podem formar polímeros (com um grau de polimerização (GP) igual ou superior a 10) e os chamados frutooligossacarídeos (FOS) ou oligofrutose, que consistem em oligômeros (com GP entre 3 e 9) (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; GÄNZLE; FOLLADOR, 2012; PEUKERT et al., 2016).

Segundo Roberfroid (2007) e Saad (2006), oligofrutoses e FOS são termos sinônimos. No entanto, o termo oligofrutose na literatura é comumente utilizado para descrever inulinas de cadeia curta enquanto FOS é majoritariamente empregado para denominar frutanos de cadeia curta obtidos através de moléculas de sacarose (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; HUANG et al., 2016). As cadeias de FOS são constituídas de uma molécula de sacarose alongada por uma cadeia de unidades frutossil, conectadas por meio de ligações glicosídicas do tipo β -(2,1), possuindo um formato genérico do tipo GF_n (em que G se refere à molécula de glicose, F de frutose e n ao número de unidades do grupo frutossil). (ROBERFROID, 2007; YUN, 1996). Os principais compostos dos FOS são: kestose, nistose e 1-frutossilnistose representados na Figura 1.

Os FOS podem ocorrer naturalmente em uma grande quantidade de vegetais, mas nem todos são viáveis para fins alimentícios, as fontes mais conhecidas são: cebola, alho, aspargos, banana, alcachofra, tomate, banana, chicória, etc. (AGUIAR, 2007; FLAMM et al., 2001; TANRISEVEN; ASLAN, 2005). Comercialmente os compostos FOS podem ser obtidos sintetizados por meio de processos físicos, químicos ou enzimáticos. Em escala industrial, os métodos enzimáticos são os mais utilizados para a síntese de FOS, sendo as três principais vias: a hidrólise da inulina realizada pelas enzimas inulinasas; pela reação de trasfrutossilacção da sacarose realizada pela enzima frutossiltransferase (FTase); ou pela ação de enzimas β -frutofuranosidasas (FFase) que hidrolisam o terminal não-redutor da sacarose (FARIA, 2019; MUTANDA et al., 2014).

Figura 1 - Representação das moléculas de sacarose, kestose, nistose e 1-frutossilnistose.



Fonte: do Autor.

Os FOS obtidos por meio das duas últimas vias são produzidos e comercializados no Japão como Neosugar®, Meioligo®, Profeed® (Meiji Seika Ltda), na Europa como Actilight® pela Béghin Meiji Industries, nos Estados Unidos como Nutraflora® e no Brasil como F.O. S® pela Nutramed Produtos Funcionais. As principais características dos FOS comercializados são: baixo valor energético (1,5kcal/g), com poder edulcorante de 0,4 a 0,6 vezes ao da sacarose e não apresentam diferenças dos FOS encontrados naturalmente nos alimentos (KHUENPET et al., 2015; PASSOS; PARK, 2003; SANTOS-MORIANO et al., 2015).

Devido à escassez da ocorrência natural destes produtos e pela forma de produção dos compostos FOS, os mesmos apresentam-se no mercado com preços expressivamente elevados. Em 2008, o valor de mercado dos FOS foi de cerca de 4 €.kg⁻¹. Já em 2019, este valor saltou para aproximadamente 150 €.kg⁻¹. A produção mundial de FOS também em 2019 foi em torno de 167 mil toneladas, com valor equivalente a 390 milhões de euros (BEDZO; MANDEGARI; GÖRGENS, 2019). Além disso, o mercado mundial de FOS apresenta notório crescimento e espera-se uma taxa de 6,6% entre 2021 e 2027, com expectativa de atingir um valor de US\$ 4,88 bilhões ao final deste período (MAXIMIZE MARKET RESEARCH, 2020).

3.1.2. FOS: importância para a saúde humana e aplicações

A preocupação com a qualidade de vida e saúde, e o aumento no cuidado com a alimentação geram demandas cada vez maiores por alimentos mais saudáveis e com baixo valor calórico (JITONNOM; KETUDAT-CAIRNS; HANNONGBUA, 2018; PASSOS; PARK, 2003; WELTI-CHANES et al., 2020). A legislação brasileira define alimentos funcionais como “... aqueles que desempenham papel metabólico ou fisiológico no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção ou outras funções normais do organismo ...”(BRASIL., 1999). Desse modo, produtos funcionais oferecem benefícios à saúde, além de suas funções nutricionais básicas e podem, se consumidos de maneira regular, promover melhoria de qualidade de vida ao auxiliar no tratamento de determinadas disfunções (MATUMOTO-PINTRO; SILVA, 2015).

A natureza dos compostos FOS os tornam incapazes de serem metabolizados pelo sistema gastrointestinal humano; assim, eles chegam ao intestino grosso e podem exercer suas propriedades funcionais estimulando o crescimento de microbiota benéfica, a este fato está associada a classificação dos FOS como ingredientes prebióticos (AGUIAR, 2007; GIBSON et al., 2004). Os prebióticos são ingredientes alimentares, resistentes a acidez gástrica, não digeríveis e que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias benéficas do cólon (*Bifidobacterias sp.*, *Lactobacilus sp.*, etc.), inibindo conseqüentemente populações de *Clostridium sp.* que fazem parte da microbiota denominada putrefativa e indesejável (PASSOS; PARK, 2003; RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2019; SERBAN, 2014).

Além de serem ingredientes funcionais e prebióticos, os FOS apresentam baixa caloria, pois não são usados como fontes de energia no corpo humano. Possuem ainda boas características físico-químicas e sabor semelhante ao da sacarose, o que os torna candidatos ideais para a substituição deste açúcar convencional em diversas classes de alimentos, o consumo de FOS ainda é considerado uma ferramenta nutricional valiosa pois: são ingredientes seguros para diabéticos, auxiliam no controle do colesterol e na prevenção da anemia, obesidade, osteoporose, hipertensão, intolerância à lactose, insuficiência renal e câncer gastrointestinais (CUNHA, 2017; DRABI ´ NSKA; KRUPA-KOZAK; JAROCKA-CYRTA, 2020; MUTANDA et al., 2014; RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2019). Existem ainda estudos que comprovam que os FOS, não são cariogênicos, ou seja, não são usados pelo *Streptococcus mutans* para formar ácidos e β -glucanos insolúveis que estão implicados na formação de cáries dentárias (MUTANDA et al., 2014; YUN, 1996).

Fortes e Muniz (2010) apontam que o consumo per capita de FOS seja de 2 a 12 g/dia na Holanda, 7 a 12 g/dia na Espanha, 5 a 8 g/dia na Bélgica, 1 a 4 g/dia nos Estados Unidos, sendo o Japão o maior consumidor de FOS, com consumo médio de 13,7 g/(kg.dia). Este consumo de FOS pode se dar pela utilização dos compostos como complemento alimentar ou pela utilização dos mesmos como ingredientes de alimentos.

Na literatura é possível verificar que, os FOS são estáveis em pH entre 4,0 e 7,0 e, também, sua viscosidade em solução e estabilidade térmica são superiores as da sacarose, nas mesmas proporções. Por exemplo, a 25°C e concentração de 20%, a viscosidade da solução de FOS é cerca de 6 vezes maior que a viscosidade da solução de sacarose (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996). Estas características, unidas aos benefícios para a saúde mencionados geram grande interesse em pesquisadores para desenvolvimento de produtos que façam uso dos compostos FOS em diversas classes como: produtos lácteos (KARIYAWASAM; LEE; PAIK, 2021), sucos de frutas (BERNAL-CASTRO; DÍAZ-MORENO; GUTIÉRREZ-CORTÉS, 2019), biscoitos (AGGARWAL; SABIKHI; SATHISH KUMAR, 2016), produtos de panificação (DE SOUZA; SCHMIELE, 2021), produtos cárneos (VESPU et al., 2019), entre outros. Há ainda a possibilidade de serem empregados em alimentação animal, com as mesmas funcionalidades, conforme citação de Passos; Park (2003) e Tanriseven; Aslan (2005), ou em uso cosmético e farmacêutico (MUTANDA et al., 2014).

3.2. ENZIMAS E FTASE

Por definição, enzimas são proteínas que tem, por característica funcional, a capacidade de catalisar reações. Estes catalisadores biológicos apresentam uma alta especificidade pela reação que catalisam. Tal característica, aliada ao fato de que enzimas operam em condições de reação amenas e específicas, ditas como pH neutro, pressão atmosférica, temperaturas próximas à do ambiente, e de serem biodegradáveis e atóxicas, desde longa data atraíram a atenção de pesquisadores e indústrias para o desenvolvimento de processos com esses catalisadores naturais (ASGHER et al., 2014; FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010).

Enzimas podem ter origem animal, vegetal ou microbiana. A aplicação industrial de enzimas tornou-se possível devido aos esforços iniciais de Jokichi Takamine (1894, 1914) que cultivaram enzimas de fungos, e de Boidin; Effront (1917) que cultivaram enzimas de bactérias, ambos em escala industrial. Essas fontes são economicamente favoráveis, pois o seu cultivo simples não envolve quaisquer restrições relacionadas com tempo e espaço em comparação com outras fontes e ainda há uma maior facilidade de

ampliação e manipulação em larga escala. Essa prevalência de enzimas de origem microbiana é demonstrada em números. Em 2017 estimou-se que cerca de 70% da quota de mercado de enzimas era produzida por microrganismos. Atualmente mais da metade das enzimas industriais são produzidas por leveduras e fungos filamentosos e cerca de 30% por bactérias. Apenas 8% são produzidos por animais e 4% por plantas. (PAPADAKI et al., 2020; PUNEKAR, 2018; RIGO et al., 2021).

Tendo em vista o mercado global de enzimas, espera-se no período de 2019 a 2026 uma taxa anual de crescimento de 6,75%, passando de U\$ 8,8 bilhões em 2018 para U\$ 13,79 bilhões até 2026. Este crescimento acelerado de aproximadamente 68% no período descrito é dado devido ao uso extensivo das enzimas em diversos setores da indústria, tais como, processamento de alimentos, papel, biocombustíveis, detergentes biológicos, setores de biologia molecular, entre outros (RIGO et al., 2021; SILVA et al., 2020).

Advindo da alta diversidade das fontes enzimáticas, suas reações e mecanismos, no século XX uma Comissão de Nomenclatura de Enzimas (ECN, sigla em inglês) foi apontada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, sigla em inglês), para nomear e classificar as enzimas. Assim, as enzimas foram classificadas em: oxidorreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (NC-IUBMB, 2022; PAPADAKI et al., 2020; PEREIRA, 2021). As principais reações catalisadas por cada classe, assim como os tipos de enzimas presentes em cada uma estão dispostas na Tabela 1.

De acordo com essa classificação (Tabela 1), a enzima FTase, estudada nesse trabalho, é classificada como uma transferase. Transferases são responsáveis por catalisarem a transferência de grupos químicos entre duas moléculas; no entanto, não liberam água ou oxigênio, que são características de uma reação de hidrólise ou oxidação (CUNHA et al., 2019; FARIA, 2019).

Tabela 1- Classificação das enzimas segundo a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)

Classe	Nome	Reação Catalisada	Enzimas
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons híbridos ou átomos de H).	Oxidases, peroxidases e hidrogenases
2	Transferases	Reações de transferência de grupos funcionais (grupos aldeído, acila, glicosil, fosfato).	Aminotransferases; Acetiltransferase; Cinases; Fosforilases; Frutossiltransferase
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para moléculas de água). Atuam sobre ligações éster, glicosídicas, peptídicas e C-N.	Lipases; Proteases; Amilases; Pectinases
4	Liases	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.	Descarboxilases; Aldolases
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula, produzindo formas isoméricas.	glicose-isomerase
6	Ligase	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou outros cofatores.	Piruvato carboxilase

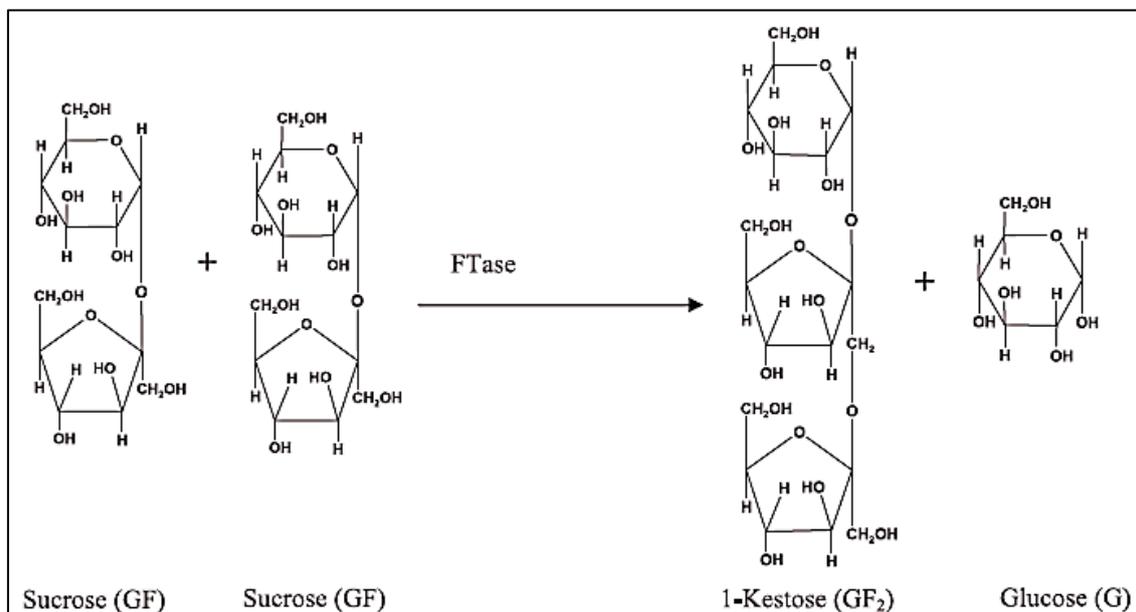
Fonte: (FRAGA; MENDES, 2021; NC-IUBMB, 2022).

Enzimas com atividade de transfrutossilacção estão presentes em diversas plantas superiores dos gêneros: *Agave*, *Asparagus*, *Allium*, *Cichorium*, *Crinum*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Lycoris*, *Polymia*, *Taraxacum*, porém as quantidades são mínimas e limitadas pelos períodos de sazonalidade (GOTO et al., 1995; YUN, 1996). Além das fontes vegetais, na literatura estão listados variados fungos e bactérias que atraem maior interesse pela ausência de sazonalidade (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; CUNHA, 2017).

Para a reação de produção de FOS catalisada pela FTase, demonstrada na Figura 2, a enzima se liga na posição β (2 \rightarrow 1) da frutose contida na sacarose, rompendo a ligação e liberando a molécula de glicose no meio reacional. Em seguida, a FTase transfere o grupo frutossil a uma outra molécula de sacarose, formando assim FOS. Além disso, a FTase pode conectar o grupo frutossil a uma outra molécula de FOS com cadeia curta,

resultando em FOS com cadeias maiores (CUNHA, 2017; GUAN et al., 2017; PEREIRA, 2021).

Figura 2 - Representação esquemática reação de transfrutoseilação da Sacarose em FOS, catalisada por FTase com formação de kestose (GF₂) e Glicose (G)



Fonte: Adaptado de (GANAIE; GUPTA; KANGO, 2013).

A FTase é produzida intra e extracelularmente por vários microrganismos incluindo bactérias e fungos (SINGH; SINGH, 2010). Na literatura, estão listados por diversos autores que os gêneros fúngicos: *Aureobasidium*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Claviceps*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Lactobacillus*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Scopulariopsis*, *Sporotrichum*, *Streptococcus*, *Xanthophyllomyces* e *Zymomonas* que possuem espécies e cepas capazes produzir FTase (CUNHA et al., 2019; GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014; GUAN et al., 2017; MUTANDA et al., 2014). Diante da comparação entre treze cepas de fungos produtores de FTase com atividade de transfrutoseilação, Fernandez et al. (2007) indicaram que o fungo *A. oryzae* IPT-301 produziu enzimas extracelulares com a maior atividade de transfrutoseilação, 17 U.ml⁻¹.

O efeito da composição do meio, temperatura, pH, umidade conteúdo, concentração de inóculo e porosidade do substrato são de importância essencial para o desenvolvimento de bioprocessos. Em um sentido geral, o aumento da produtividade está relacionado à otimização do meio (RIGO et al., 2009).

O método mais utilizado para a produção de FTase é o cultivo celular submerso, na qual os esporos do micro-organismo (no caso da utilização de fungos) são adicionados

a um meio de cultura líquido. Após o tempo de cultivo submerso, a enzima pode ser encontrada livre (extracelular) ou em sua forma micelial (intracelular) (AHMAD et al., 2010; BRAR; DHILLON; SOCCOL, 2014; PEREIRA, 2021). Em seu estudo, Ottoni et al. (2012) otimizou a composição do meio de cultura da cepa de *A. oryzae* IPT-301 visando a produção de enzimas com elevada atividade de transfrutossilagem. Neste estudo, foi constatado que a sacarose é a melhor, dentre as fontes de carbono analisadas, e que sua concentração tem influência direta na produção de biomassa e na atividade da enzima.

3.2.1 Atividade de Transfrutossilagem

Pela literatura, a atividade de transfrutossilagem (At) é definida como a quantidade de enzima (FTase) capaz de produzir 1 μmol de FOS por minuto (unidade representada por U), sendo FOS composto por 1-kestose, nistose e 1-frutofuranosil nistose (FERNANDEZ et al., 2007; OTTONI et al., 2012).

Entendendo que a produção de FOS ocorre pela transformação de sacarose em glicose e FOS, e que a hidrólise da molécula de sacarose produz frutose e glicose, é possível, por meio de um balanço de massa calcular as concentrações destes açúcares (CUNHA et al., 2019; FARIA et al., 2021):

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

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

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

Nas Equações 1, 2 e 3, $[AR]$ representa a concentração dos açúcares redutores ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), $[F]$ a concentração de frutose ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), $[G]$ a concentração de glicose ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) e $[F_T]$ a concentração de frutose transfrutossilada ($\mu\text{mol.l}^{-1}$).

Com o valor de $[F_T]$, é possível calcular a atividade de transfrutossilagem (At , dada em U.ml^{-1}) (CUNHA et al., 2019; FARIA et al., 2021):

$$At = \frac{[F_T] \cdot Vr}{t_r \cdot Ve} \quad (4)$$

Na Equação 4, Vr é o volume do meio reacional (L), t_r é o tempo de reação (min) e Ve é o volume de caldo fermentado utilizado na reação enzimática (ml).

3.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Na atualidade existe registro de mais de 2000 enzimas que, apesar da excelente propriedade catalítica que apresentam, pouco mais de 400 são exploradas; destas, a maioria são enzimas extracelulares e de origem microbiana (SILVA; POLIZELI, 2009).

Durante o decorrer evolutivo, as enzimas foram otimizadas em função do papel fisiológico que desempenham nos organismos e não em função das necessidades das indústrias. Com isso, muitas enzimas não apresentam-se estáveis às condições de reações desejadas, tais como a agitação mecânica, os dissolventes, as altas temperaturas, pH extremos, a necessidade de cofatores assim como sua inibição por elevadas concentrações de substratos e produtos (KLIBANOV, 2001).

Atualmente o ramo de tecnologia enzimática é composto por diferentes áreas, dentre essas, a imobilização de enzimas. Uma das definições mais abrangentes de enzimas imobilizadas (EI) é a que considera imobilizadas “enzimas que estão fisicamente confinadas, ou localizadas em certa região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente” (CHIBATA, 1979).

O objetivo principal de se aplicar técnicas de imobilização de enzimática é promover vantagens no uso das mesmas em contraposição às desvantagens inerentes das enzimas livres. Um fator relevante para a aplicação de EI é que possibilita um maior controle sobre o processo, uma vez que se torna possível parar a reação quando necessário alterando algum parâmetro de reação ou fechando-se a vazão do biorreator, por exemplo, onde não haveria qualquer contaminação do meio com as moléculas (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010).

Além disso, emprego de enzima livre implica em dificuldades como baixa estabilidade em soluções aquosas, uma vez que a água facilita degradações físicas e/ou químicas. Ocorre ainda a inevitável presença de enzimas como parte integrante do meio (se não houver uma etapa de separação da enzima) o que em muitos casos pode gerar alteração de sabor e ainda gerar a necessidade de uma nova batelada de biocatalisador, como no caso de Sangeetha; Ramesh; Prapulla, (2005). Estudos ainda indicam que traços de enzima no produto final (alimentos e medicamentos), podem ser um fator de risco, ao desencadear reações alérgicas em seus usuários finais (AGUIAR, 2007).

De acordo com Fernandes; Lima; Lopes, (2010) o primeiro relato sobre a imobilização de enzimas foi de Nelson e Griffin que, em 1916, constataram que invertase adsorvida em carvão ativado mantinha sua atividade e não era retirada com as lavagens. Na década de 50, houve uma notável difusão da técnica, mais foi apenas na década de 70, que houve um maior avanço com grande número de artigos publicados e patentes registradas abordando EI (ROSEVEAR, 1984). Na atualidade, a imobilização é uma técnica que vem sendo cada vez mais convertida do ambiente laboratorial para o

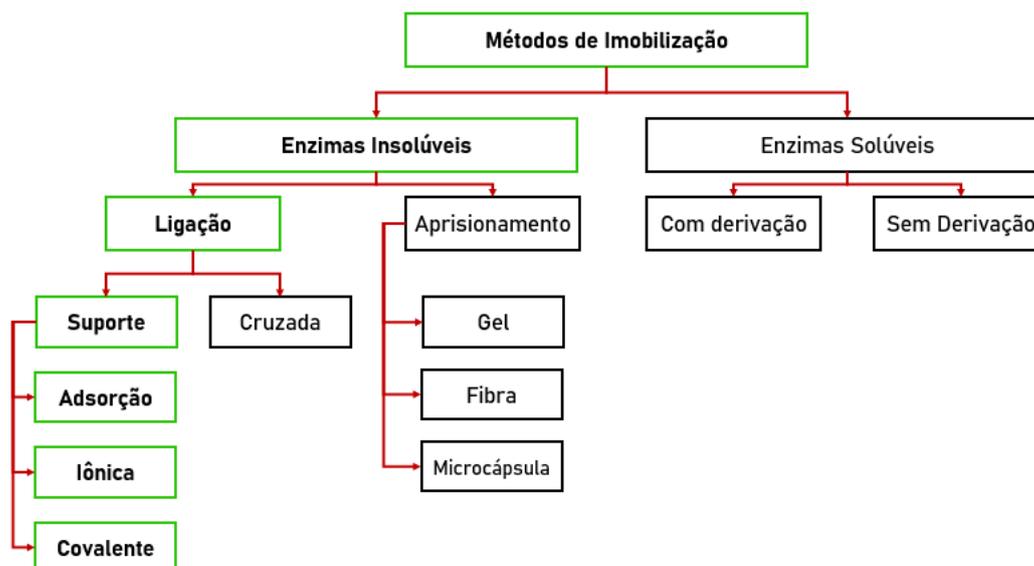
industrial, permitindo a automação da produção com um melhor controle da qualidade e redução de espaço físico necessário (AGUIAR, 2007; GONÇALVES, 2013).

Para o sucesso do desenvolvimento de biocatalisadores com EI, é preciso ter em mente o sistema onde a enzima imobilizada será utilizada no momento da escolha do método de imobilização, uma vez que cada método traz em si limitações que precisam ser consideradas e que não existem técnicas universais ou totalmente eficientes, mas sim uma gama de possibilidades, parâmetros e aplicações (AGUIAR, 2007; FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010).

3.3.1 Métodos de Imobilização

A ligação de enzimas a suportes insolúveis é o método mais antigo e mais utilizado para imobilização (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010). Os distintos métodos de imobilização são classificados de acordo com a interação físico-química usada na união entre o suporte e a enzima: o termo enzimas solúvel designa os métodos em que a enzima permanece na mesma fase em que estão os substratos (reagentes) e os produtos da reação; já enzimas insolúveis designa aquelas que, após imobilização em material sólido, passam a constituir fase diferente do meio de reação que geralmente é líquido. Neste texto, serão explorados os métodos relacionados às enzimas insolúveis que fazem algum tipo de ligação com o suporte. A Figura 3 exibe um esquema geral com os principais tipos de imobilização.

Figura 3 - Esquema dos principais tipos de imobilização



Fonte: Adaptado de (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010).

A adsorção física compreende o método mais simples e amplamente utilizado, no qual a enzima é imobilizada em um suporte que seja inerte no meio reacional, através de ligações mais fracas, como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e atrações eletrostáticas ou dipolares (força de Van der Waals). Entretanto, as ligações formadas são abundantes o suficiente para gerar uma união estável entre enzima e suporte. Este método de imobilização é muito apreciado em processos industriais em que o suporte representa um valor importante no custo total do catalisador, pois a reversibilidade das ligações entre suporte e proteína permite a recuperação do suporte para posterior imobilização com nova enzima (SILVA; POLIZELI, 2009).

Além de ser um método facilmente aplicável, a adsorção física conserva boa parte da atividade enzimática, por não danificar sua conformidade. Entretanto existe a possibilidade de o suporte bloquear o sítio ativo da enzima. Ademais, os parâmetros operacionais do meio reacional, tais como temperatura, pH e agitação, devem ser restritamente controlados para que a imobilização seja mantida (AGUIAR, 2007; MENDES et al., 2011a; PEREIRA, 2021).

No método de imobilização por força iônica, o suporte possui grupos funcionais ionizáveis característicos, os quais irão interagir especificamente com grupos da enzima. A atenção neste tipo de imobilização recai principalmente na escolha da solução iônica com propriedades tamponantes que será o meio para a enzima a ser ligada, de forma que seja compatível com o suporte e permita a substituição dos íons deste pelos grupos ionizados da enzima (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010). Alguns autores tratam as imobilizações por adsorção e iônica como uma única técnica, pois a depender dos grupos disponíveis no suporte e na enzima podem ocorrer ambos os tipos de ligações ao mesmo tempo (SILVA; POLIZELI, 2009).

A imobilização de enzimas por meio da formação de ligações covalentes entre um grupo ligante da enzima e o suporte insolúvel é um dos métodos mais largamente utilizados e investigados (CHEN; GU, 2008). A natureza das ligações formadas entre suporte e enzima é mais forte e estável quando comparada a técnica de adsorção física. Esta imobilização pode ser unipontual (na qual a enzima e o suporte são ligados por apenas um ponto) ou multipontual (apresentando vários pontos de ligação) (KUDDUS, 2018; OLIVEIRA, 2007). Cuidado especial deve ser tomado para que grupos importantes para o desempenho da atividade catalítica não sejam envolvidos na formação da ligação covalente entre enzima e suporte, o que teria como consequência uma enzima retida desprovida de atividade.

As técnicas por adsorção, força iônica e ligação covalente são as mais disponíveis e empregadas em um maior número de processos industriais (SILVA; POLIZELI, 2009).

3.3.2 Imobilização da FTase extracelular

Em um breve histórico de estudos publicados sobre a imobilização da FTase extracelular tem-se: Yun e Song, (1996), que imobilizaram FTase de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10542 em resina com alta porosidade denominada Diaioa HPA 25®. Ao final do processo, obteve-se um biocatalisador mais resistente a variações de pH, com possibilidade de reutilização por até 30 dias. Além do mais, os valores de temperatura e pH ótimos para a reação de síntese de FOS foram inalterados com a imobilização.

Bons resultados de atividades operacional e termoestabilidade foram relatados por Ghazi *et al.* (2006) que imobilizaram Pectinex Ultra SP-L e Rapidase TF em suportes à base de polimetacrilato e Oliveira *et al.* (2020) que imobilizaram por ligação covalente Pectinex Ultra SP-L de *Aspergillus aculeatus* em nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄-quitosana.

Aguiar; Oliveira; Maugeri (2010), investigaram a imobilização da FTase extracelular de *Rhodotorula sp.*, pelo método da adsorção, em minério de nióbio, de modo a produzir um biocatalisador com alta estabilidade, em que foi obtida uma conversão semelhante à da enzima solúvel e tempo de meia vida de 24 dias a 50 °C, além de uma boa estabilidade térmica a 50 °C.

Faria *et al.* (2021), imobilizaram a FTase oriunda de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel, e obtiveram condições ótimas de pH 5,5 e temperaturas entre 40 °C e 60 °C. Além disso, a concentração ótima de sacarose foi de 470 g l⁻¹. E o biocatalisador obtido no processo teve capacidade de reutilização por seis ciclos consecutivos, com pH e estabilidade térmica maiores do que para a enzima solúvel.

3.4. TIPOS DE SUPORTES

O desempenho de um biocatalisador heterogêneo é diretamente relacionado com as características do suporte utilizado para composição do mesmo. Alguns dos principais pontos a serem observados na seleção de um suporte para determinada aplicação são: ser inerte, apresentar boa área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo, dentre outros (MENDES *et al.*, 2011; PEREIRA, 2021; BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Ademais, a afinidade entre a enzima e o suporte é fundamental para que a imobilização seja

eficiente, pois uma baixa afinidade no sistema enzima-suporte permite a dispersão da enzima no meio reacional, enquanto uma afinidade muito alta é prejudicial a conversão do substrato (LASKIN, 1985).

Existem diversas formas utilizadas para classificações e subclassificações dos suportes. Com base na composição os suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos. A Tabela 2 traz a disposição das subclasses e exemplos de suportes segundo esta classificação (AGUIAR, 2007; ARAÚJO, 2021). Em geral suportes orgânicos são mais empregados pois apresentam como vantagens: baixo custo, fácil manuseio, boa reprodutibilidade e variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos”, entretanto apresentam como maior desvantagem decréscimo de sua estabilidade mecânica com o tempo de uso (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2010). Os suportes sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, além disso permitem maior variação de parâmetros de processo em virtude de sua maior resistência, química, física, térmica e microbiológica. O ponto negativo vinculado aos suportes inorgânicos são os custos elevados (BEZERRA, 2012; MENDES *et al.*, 2011).

Tabela 2 - Classificação dos suportes conforme composição

	Polímeros Naturais	celulose, amido, dextrans
Suportes Orgânicos	Proteínas	poliestireno, poliacrilatos
	Polímeros Sintéticos	colágeno, albumina, gelatina
Suportes Inorgânicos	Minerais	areia e celite
	Outros	óxidos metálicos, cerâmicas e géis de sílica

Fonte: do Autor.

Os suportes podem ainda ser classificados morfologicamente como porosos, não porosos e de estrutura de gel. Dentre as vantagens de materiais porosos é possível citar como principais: a grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, onde a mesma fica protegida dos efeitos de turbulência externa. Contudo, deve-se atentar para que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato, uma vez que a maior parte da área disponível para a imobilização está na estrutura interna (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Os materiais não porosos eliminam a resistência de massa interna, porém

possuem baixa área superficial disponível à ligação da enzima. Este problema pode ser parcialmente superado pela utilização de partículas finas ou fibras, porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam partículas muito finas, como por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores contínuos (MENDES, 2009). Já os géis, embora de uso simples, são úteis apenas nos casos em que a grade formada seja uma malha com características tais quais retenham a enzima sem implicar em restrições difusionais sérias para o substrato (BEZERRA, 2012; MENDES *et al.*, 2011).

Uma vez que não existem suportes e métodos de imobilização ideais, é necessária criteriosa avaliação das características particulares de suportes e enzimas. Nesse trabalho, foi averiguado o comportamento de suportes formulados a partir de uma matriz de poli(ácido láctico) (PLA) enriquecido com 10% de argila.

3.5. POLI(ÁCIDO LÁCTICO)

Atualmente, há uma forte tendência de crescimento dinâmico e contínuo da indústria global de bioplásticos. Segundo François de Bie, presidente da European Bioplastics (EUBP), o mercado global de bioplásticos deve crescer 36% entre 2020 e 2025. Além disso, a capacidade mundial de produção de bioplásticos deve aumentar de cerca de 2,1 milhões de toneladas (em 2020) para 2,8 milhões de toneladas (em 2025). A produção de (PLA) continuará crescendo devido aos novos investimentos em unidades de produção em países como a China e Estados Unidos, e no continente europeu (BIOPLASTICS, 2020).

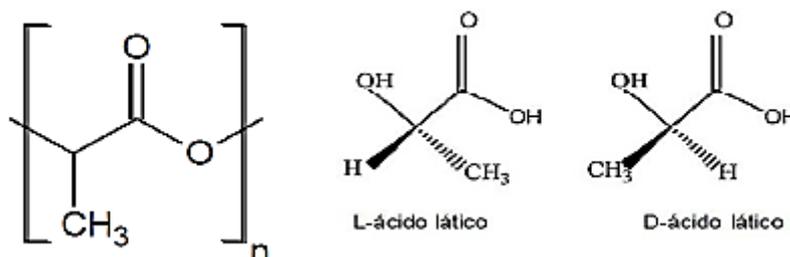
O poli (ácido láctico), ou ácido 2-hidroxi-propanóico, ou polilactídeo é um biopolímero, poliéster alifático biodegradável e renovável mais amplamente pesquisado, utilizado e com maior importância comercial. O PLA tem um potencial comprovado para substituir os polímeros convencionais de base petroquímica para aplicações em indústrias de bens de consumo, embalagens e fibras ou como um biomaterial líder para inúmeras aplicações na medicina. Além disso, o PLA também é reconhecido como um material promissor para reduzir o problema de descarte de resíduos sólidos da sociedade pois possui potencial de biodegradabilidade (FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016; NGUYEN *et al.*, 2022).

O PLA é um termoplástico que possui estrutura química polar, podendo apresentar-se como semicristalino ou amorfo, biodegradável e biocompatível. Sua temperatura de transição vítrea (T_g) é próxima a 55°C e a de fusão (T_m) a 160°C . Além disso, é o primeiro polímero “commodity”, sintetizado a partir do ácido láctico proveniente de fontes renováveis e não-tóxicas que contêm amido ou açúcar, como milho, trigo, cana-

de-açúcar, beterraba, batata, dentre outros (CAVALCANTI, 2016; FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016).

A estrutura do PLA possui uma unidade constituinte intitulada ácido láctico que é uma molécula quiral e existe como dois enantiômeros, ácido L- e D-láctico. Na Figura 4 está representada a estrutura do PLA e suas formas quirais. Assim, o PLA possui estereoisômeros, intitulados poli (L- lactida) (PLLA), poli(D-lactida) (PDLA) e a mistura racêmica gera o poli (D, L-lactídeo) (PDLLA). PDLA e PLLA (dextrógiro e levógiro) são imagens especulares um do outro, ambos opticamente puros e semicristalinos, enquanto o PDLLA é amorfo e opticamente inativo (DI et al., 2005). Atualmente, existe uma grande variedade de PLA de baixa e alta massa molar com diferentes composições químicas disponíveis comercialmente, pois a estrutura estereoquímica do PLA pode ser facilmente modificada pela polimerização de uma mistura controlada dos isômeros D(dextrógiro) ou L(levógiro) (CAVALCANTI, 2016; RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010).

Figura 4 - Estrutura do PLA e representação das formas quirais do ácido láctico



Fonte: (CAVALCANTI, 2016, p 08).

A síntese de PLA requer um controle rigoroso das condições (temperatura, pressão e pH), o uso de catalisadores e longos tempos de polimerização (LASPRILLA et al., 2012). A preparação do PLA pode ocorrer por diferentes processos de polimerização do ácido láctico incluindo: policondensação, polimerização por abertura de anel e por métodos diretos como desidratação azeotópica e polimerização enzimática (GARLOTTA, 2019). A conformação do PLA pode se dar por injeção, extrusão de filme, sopro, termoformagem, fiação e formação de filme (CAVALCANTI, 2016).

Tendo em vista os processos de preparação do PLA mencionados, é possível citar outras vantagens deste biopolímero como: sua processabilidade térmica é melhor em comparação com poli (hidroxil alcanoato) (PHA), poli(etilenoglicol) (PEG), poli(γ -caprolactona) (PCL) etc. É facilmente processável em equipamentos padrão para produzir

peças moldadas, filmes ou fibras (GARLOTTA, 2019; MCKEEN, 2014); além disso, seu processamento requer 25-55% menos energia para produzir do que polímeros à base de petróleo e as estimativas mostram que isso pode ser reduzido para menos de 10% no futuro (CONG, 2007). O menor uso de energia torna a produção de PLA potencialmente vantajosa em relação ao custo.

Apesar várias vantagens apresentadas acerca do PLA, ele possui algumas características que podem limitar seu uso em determinadas aplicações como: 1) Baixa tenacidade, embora sua resistência à tração e módulo de elasticidade sejam comparáveis ao poli(tereftalato de etileno) (PET) (AURAS; HARTE; SELKE, 2004), a baixa tenacidade limita seu uso nas aplicações que necessitam de deformação plástica em níveis de tensão mais elevados. 2) Taxa de degradação lenta - PLA degrada através da hidrólise de grupos éster de cadeia principal e a taxa de degradação depende da cristalinidade do PLA, sua distribuição, morfologia, taxa de difusão de água no polímero e conteúdo estereoisomérico (RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010). 3) Hidrofobicidade - O PLA é relativamente hidrofóbico. 4) Falta de grupos de cadeia lateral reativos - PLA é quimicamente inerte sem grupos de cadeia lateral reativos tornando sua superfície e modificações em massa uma tarefa desafiadora (FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016).

Para superar tais desvantagens, são estudados métodos de combinar as características do PLA com outros materiais por meio da adição de aditivos, outros polímeros e cargas, a fim de permitir sua utilização em um maior número de aplicações (BRITO et al., 2011). Essa versatilidade de combinação do PLA tem permitido grandes avanços em sua aplicação. O PLA é modificado principalmente para melhorar a dureza e a taxa de degradação, enquanto a modificação da superfície foi tentada para controlar a hidrofobicidade, rugosidade e introduzir grupos reativos. A melhoria da tenacidade é uma necessidade crucial para muitas aplicações de consumo, enquanto as melhorias na hidrofobicidade e a introdução de grupos reativos são benéficas para aplicações biomédicas. Melhorias na taxa de degradação também podem ser importantes em aplicações de consumo e biomédicas (CAVALCANTI, 2016; FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016; RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010).

Na literatura é possível encontrar como mencionado anteriormente uma ampla gama de aplicações para o PLA, porém pouco se encontra no que diz respeito de sua aplicação em engenharia de bioprocessos, especialmente acerca de imobilização enzimática. No entanto, atributos de alguns polímeros naturais como ser inerte e

biocompatível permitem a aplicação direta como suportes na imobilização de enzimas (FANG et al., 2011).

Izidoro; Paula (2019) otimizaram condições para a imobilização por ligação covalente de lipase de *Rhizopus Oryzae* em suportes feitos de PLA impressos em impressoras 3D. Eles realizaram otimização das condições imobilização por ligação covalente através de reações de aminólise com parâmetros controlados e verificaram a incorporação dos grupamentos amina na superfície do PLA, obtendo maior atividade obtida foi para o PLA triturado e ativado com 1% de glutaraldeído. Garcia *et al.*, (2012) aplicou em seu estudo a elaboração de suportes contento PLA e quitosana em diferentes concentrações em comparação com PLA puro para a imobilização de lipases e mostra em seus resultados que a adição de quitosana não aumentou a quantidade de enzima imobilizada, provavelmente devido a morfologia das nanofibras de PLA puro que apresentaram poros maiores, que seriam capazes que imobilizar a lipase por aprisionamento. Song et al., (2017) desenvolveu um biocatalisador a partir da imobilização por ligação covalente da tripsina em tecido poli (ácido láctico). Para isso ele modificou o suporte por meio de tratamento com plasma à base de amônia para incorporar grupos amina em sua superfície. Ao final do estudo ele constatou que a modificação com plasma aumentou de 0,66% para 5,92% a presença de grupamentos amina no tecido nas condições ótimas. Também nessas condições, a quantidade de tripsina ligada em PLA tecido foi observado como aproximadamente 0,28 mg/mg e a atividade específica foi de 3,763 U/mg.

3.6. ARGILA

A definição clássica designa argila como um material natural, terroso, de granulação fina e que quando umedecida com água apresenta plasticidade. Argilas são matérias-primas formadas pela alteração de silicatos componentes de rochas, constituídas por aluminossilicatos hidratados (argilominerais), com resquícios de feldspato e quartzo. Estes silicatos hidratados possuem estrutura em camadas constituídas por folhas contínuas formadas por tetraedros de silício e/ou alumínio e oxigênios e, octaedros de alumínio ou magnésio ou mesmo ferro, oxigênios e hidroxilas (SANTOS; SANTOS, 1989).

Existem na natureza, diversos tipos de argilas com distinções em propriedades físico-químicas; capacidade de troca catiônica, área superficial específica, proporcionando diversas aplicações. Os principais fatores que controlam as propriedades das argilas são a composição mineralógica dos argilominerais e dos não-argilominerais e

as distribuições granulométricas das suas partículas, teor em eletrólitos dos cátions trocáveis e sais solúveis, natureza e teor de componentes orgânicos e características texturais da argila (ALMEIDA, 2010; ARAÚJO et al., 2014).

A argila utilizada na formulação do suporte foi caracterizada por Maestrelli et al., (2013) e sua composição encontra-se na Tabela 3. O alto teor de alumina (51,78%) e o baixo teor de álcalis indicam uma refratariedade elevada; além disso a quantidade de sílica presente indica uma baixa plasticidade da mesma, o que foi comprovado a partir do ensaio de IP (índice de Plasticidade), obtendo-se valor de 5,6. Possui ainda uma área superficial específica de 37,32 m²/g.

Tabela 3 - Análise Química argila utilizada para elaboração do suporte

Perda ao fogo	Al₂O₃	SiO₂	TiO₂	Fe₂O₃	CaO	MgO	Na₂O	K₂O	P₂O₅	Cr₂O₃
26,56	51,78	14,8	5,1	1,41	0,05	0,05	0,06	NE	0,02	0,12

Fonte: (MAESTRELLI et al., 2013, p 03).

3.7. POLI (ÁCIDO LÁTICO) ENRIQUECIDO COM ARGILA

O interesse pela síntese de novos polímeros, geralmente, tem como principal objetivo desenvolver um material com propriedades mecânicas, térmicas e de processamento otimizadas para satisfazer as condições específicas de sua aplicação. Neste contexto, o desenvolvimento de blendas poliméricas, biocompósitos e nanocompósitos a partir de biopolímeros, cargas e nanocargas têm se mostrado uma alternativa bastante atraente no melhoramento de algumas propriedades físico-químicas dos materiais, podendo este em alguns casos ser atribuído à dispersão e às interações interfaciais biopolímero – partícula. Contudo, deve-se salientar que existem situações que este processo é demorado e de alto custo o que, pode torna-lo economicamente inviável (CAVALCANTI, 2016).

Os suportes utilizados neste trabalho são classificados como compósitos. Nos compósitos tradicionais, um dos componentes serve de matriz (neste caso o PLA pois está presente em maior quantidade), na qual as partículas do segundo material (argila refratária 10% p/p) se encontram dispersas. As partículas com elevada área superficial podem melhorar as propriedades de forma significativa em comparação com o PLA puro.

Não foram encontrados na literatura estudos que relatassem o uso de suportes confeccionados com PLA e argila para a imobilização de enzima, o que evidencia o pioneirismo deste trabalho. Ademais, acredita-se que a combinação entre PLA e argila

forneça um suporte com características físicas e mecânicas ideais para elaboração de um biocatalisador estável e com alta durabilidade. Ressalta-se que a argila utilizada da formulação dos suportes trata-se de um passivo ambiental proveniente do processo de mineração.

3.8. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Qualquer processo metabólico é entendido como uma reação química, sendo que a grande maioria é catalisado por enzimas. Independentemente se a reação é catalisada ou não, uma reação química é melhor compreendida por meio dos princípios fundamentais da cinética química. Para uma dada reação genérica onde um reagente forma produtos ($A \rightarrow \text{Produtos}$), o exato ponto de localização com o tempo que a reação está é determinado por considerações termodinâmicas e cinéticas. Para a reação, os conceitos termodinâmicos vão indicar o quão longe e o quão rápido uma determinada reação pode ser levada e os conceitos cinéticos descreverão as taxas das reações químicas e os mecanismos pelos quais ela ocorre (PUNEKAR, 2018).

A cinética enzimática é estudada visando avaliar como diferentes condições de processo tais como: temperatura de reação, o pH, a concentração de reagentes e de enzimas entre outras, influenciam a velocidade das reações catalisadas por enzimas (ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010).

3.8.1 Aspectos Gerais

Para um grande número de reações enzimáticas, a cinética é descrita pelo modelo matemático de Michaelis-Menten, o qual prediz que a formação do complexo enzima-substrato ([ES]) é de primeira ordem em relação à enzima e em relação ao substrato. Para este modelo, são feitas algumas considerações como: a) a reação enzimática é irreversível; b) a formação e dissociação do [ES] é extremamente rápida, esta consideração é feita afim de desprezar a ocupação dos sítios ativos pelo complexo [ES] (ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010; PUNEKAR, 2018; SHULER; KARGI, 1992)

A Equação 5 exhibe o modelo de Michaelis-Menten, onde v é a velocidade de reação, $[S]$ é a concentração de substrato, $v_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de reação e KM é a constante de Michaelis, que denota a afinidade entre a enzima e o substrato (representando a concentração de substrato no qual a velocidade de reação é a metade da velocidade máxima) (AGUIAR, 2007; FARIA, 2019; PEREIRA, 2021).

$$v = \frac{V_{\text{máx.}}[S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

Ao linearizar esta Equação 5, é possível encontrar os valores de K_M e $V_{\text{máx.}}$ para a maioria das reações enzimáticas, como proposto por Lineweaver-Burk, Eadie-Hanes e Hofstee.

A maioria das reações enzimáticas são descritas com êxito pelo modelo de Michaelis-Menten, isso se liga diretamente ao ajuste hiperbólico do modelo. Para as demais reações que não são bem representadas por este modelo, seja por apresentarem múltiplos sítios ativos ou múltiplas subunidades (enzimas alostéricas), faz-se necessário adaptações na equação cinética, de modo a considerar a presença de inibidores ou cooperatividade entre sítio ativo e o substrato (ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010; PUNEKAR, 2018; SHULER; KARGI, 1992; WEISS, 1997). Para tais reações que se apresentam em curvas sigmóides, as ligações cooperativas das enzimas alostéricas podem ser: positivas quando a primeira ligação enzima-substrato aumenta a afinidade da enzima com relação à concentração de substratos presente no meio reacional; ou negativas quando reduzem essa mesma afinidade (WEISS, 1997).

O modelo de Hill, que considera a cooperatividade está demonstrado pela Equação 6:

$$v = \frac{V_{\text{máx.}}[S]^n}{K_{0,5}^n + [S]^n} \quad (6)$$

Na Equação 6, $K_{0,5}$ é a constante de Hill (análoga à K_M) e n é o coeficiente de Hill. Quando $n=1$, o modelo cinético de Michaelis-Menten é representado. Se $n \neq 1$, há ligações cooperativas na reação enzimática, podendo estas cooperatividades serem positivas ($n > 1$) ou negativas ($n < 1$) (FERREIRA; TRINCA; FERREIRA, 2014; WEISS, 1997).

3.8.2 Efeito da concentração de substrato na cinética enzimática

A influência da concentração de substrato na cinética enzimática é medida fixando-se as demais condições de ensaio e analisando o comportamento da atividade enzimática. Observa-se que a baixas concentrações de substrato, a velocidade de reação será igualmente baixa. Ao aumentar da concentração de substrato, tem-se melhora da velocidade de reação. Todavia, quando a concentração de substrato é relativamente alta, a velocidade da reação não aumenta mais e a enzima pode estar saturada de substrato (PUNEKAR, 2018).

3.8.3 Efeitos do pH na cinética enzimática

Variações no pH do meio reacional refletem diretamente na atividade enzimática, pois elas resultam em mudanças na forma iônica da enzima que possuem grupos iônicos (básicos ou ácidos) específicos nos sítios ativos. Tais mudanças podem inclusive interferir na conformação tridimensional da enzima ou em sua afinidade pelo substrato. Assim sendo, existe uma zona de máxima estabilidade, contendo um valor de pH caracterizado como o ótimo para atividade enzimática (SHULER; KARGI, 1992).

O estudo da dependência do pH é de grande importância, pois pode deduzir a natureza química dos grupos enzimáticos que participam da cinética. No entanto, muitos autores alertam para a interpretação dos dados de pH e sua influência na cinética, uma vez que os pontos de ionização podem ser deslocados dependendo das características do meio ou do suporte. Portanto, para a definição desta faixa de pH, deve-se levar em consideração as características da enzima e do substrato (geralmente, de forma empírica) (AGUIAR, 2007; CHAPLIN; BUCKE, 1990; PEREIRA, 2021; SHULER; KARGI, 1992).

Na literatura existem estudos que mostram as diferenças de pH ótimo para as diversas enzimas livres e após processos de imobilização em suportes com diferentes características. Sanjay; Sugunan, (2006), exibem uma discussão sobre a alteração do pH ótimo de enzimas imobilizadas em matrizes carregadas negativamente. Nestes casos os autores discorrem que normalmente ocorre o deslocamento do pH ótimo para valores mais básicos e o perfil de pH é estendido ou ampliado devido as interações de cargas do suporte e da enzima. Porém, também foi observado que a enzima imobilizada por ligações covalentes apresentou pH ótimo numa faixa mais ácida do que a da enzima livre, provavelmente devido as fortes ligações covalentes formadas. A intensidade da força de ligação interfere nas interações intramoleculares da enzima modificando sua conformação. Porém, um valor mais ácido para o pH ótimo apresentou o inconveniente de uma baixa estabilidade enzimática.

Tanriseven; Aslan, (2005) observaram que a imobilização de um preparado enzimático de Pectinex Ultra SP-L, contendo atividade de transfrutossilação, em um suporte acrílico ativado modificou a curva de pH ótimo da enzima. A enzima livre apresentou maior atividade na faixa de pH entre 5,5 e 6,5 já a enzima imobilizada apresentou uma faixa mais abrangente, de 4,5 a 7,0.

Faria et al., (2021) em seu estudo utilizando a enzima FTase de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 livre e imobilizada em sílica gel, demonstrou para ambas uma região de maior

estabilidade frente ao pH entre 4,5 e 6, porém uma melhor atividade de transfrutossilção relativa para a enzima imobilizada indicando que o processo de imobilização foi eficiente para conferir maior estabilidade frente ao pH.

3.8.4 Efeitos da Temperatura na Cinética Enzimática

A taxa de reação enzimática é diretamente afetada pela temperatura, de modo que, em temperaturas baixas, enzimas e substrato movimentam-se de forma demasiadamente lenta, prejudicando a catálise. Com o aumento da temperatura até certo ponto, tem-se um incremento na energia cinética das moléculas que compõem o sistema, aumentando a mobilidade entre elas e, conseqüentemente a frequência de colisões entre substratos e os sítios ativos das enzimas, o que gera uma maior taxa reacional. Porém o aumento demasiado da temperatura gera o rompimento na estrutura tridimensional da enzima (desnaturação), impossibilitando o encaixe entre enzima e substrato. Desse modo, para cada enzima (livre ou imobilizada) há uma temperatura ótima, na qual se dá a máxima taxa reacional (FIELDS, 2001; PUNEKAR, 2018).

A Equação de Arrhenius, mostrada nas Equações 7 e 8, descreve respectivamente a ativação térmica e a desativação térmica da enzima:

$$k_A = A_A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (7)$$

$$k_D = A_D \cdot e^{\frac{-E_D}{RT}} \quad (8)$$

em que R representa a constante universal dos gases e T a temperatura absoluta, k_A e k_D são respectivamente as constantes de ativação e desativação térmicas, A_A e A_D são as constantes de Arrhenius, E_A é a energia requerida para promover a ativação térmica e E_D a energia necessária à desativação térmica. Para E_D , são desejados valores altos, por sugerirem maior termo estabilidade para a enzima (CATANA et al., 2007; MATTE et al., 2014).

3.8.5 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica das enzimas é um parâmetro de extrema importância para a aplicação em reatores, pois uma vez que ela determina os limites para a utilização da enzima, há implicações diretamente nos custos do processo (AGUIAR, 2007). Os estudos de estabilidade elucidam o mecanismo de desativação enzimática, cujo entendimento é necessário para facilitar a compreensão da estrutura e função das enzimas (SADANA; HENLEY, 1987). Muitas vezes, a cinética de desativação/desnaturação pode ser tão ou mais importante que a cinética da reação em si (AGUIAR, 2007; DORAN, 2002)

Sadana e Henley, (1987) propuseram o modelo exibido na Equação 9, ele dispõe um ajuste exponencial não-linear capaz de estimar os parâmetros de inativação térmica, através da realização de ajuste aos dados experimentais de atividade residual pelo tempo de incubação.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1) \exp(-k_D t) + \alpha_1 \quad (9)$$

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}) e t , o tempo de incubação (min).

Para se avaliar a estabilidade térmica, é necessário levar em consideração outros fatores como o tempo de meia-vida enzimático ($t_{1/2}$) e do fator de estabilidade (FE). O tempo de meia-vida enzimático (Equação 10) é o tempo necessário para reduzir a atividade enzimática à metade do seu valor inicial, sendo inversamente proporcional à constante de desnaturação térmica (k_D) (KUMAR et al., 2013; PERNA et al., 2017; SAQIB et al., 2010). Já o fator de estabilidade (Equação 11) é utilizado para determinar a eficiência de imobilização e leva em consideração tempo de meia vida da enzima antes e após um processo de imobilização.

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k_D} \quad (10)$$

$$FE = \frac{t_{\frac{1}{2}}^{\text{imobilizada}}}{t_{\frac{1}{2}}^{\text{solúvel}}} \quad (11)$$

Na Equação 11, $t_{\frac{1}{2}}^{\text{imobilizada}}$ e $t_{\frac{1}{2}}^{\text{solúvel}}$ indicam os tempos de meia vida da enzima imobilizada e solúvel, respectivamente (DE LA NUEZ VEULENS; RODRÍGUEZ, 2009; FARIA et al., 2021; GONÇALVES et al., 2020).

Os parâmetros termodinâmicos revelam informações pertinentes para se avaliar a estabilidade das enzimas solúveis ou imobilizadas, pois diante de variações de entalpia (ΔH), entropia (ΔS), e energia de Gibbs (ΔG), é possível mensurar a preservação da conformação inicial da enzima, e o estágio do processo de desnaturação no qual ela se encontra (ARAÚJO, 2021; KORETSKY, 2007).

A desnaturação térmica da enzima acontece quando há uma transição de um estado de menor energia para um estado de maior energia. Essa transição se dá, de modo irreversível, através do fornecimento da energia de ativação para a desnaturação (ED) à enzima, em forma de calor. A Equação 12 indica a variação de entalpia de ativação da

desnaturação (ΔHD), onde altos valores de entalpia apontam para uma maior termo estabilidade enzimática. (CAVALCANTE; DA SILVA, 2015; FARIA et al., 2021; KUMAR et al., 2013; SAQIB et al., 2010).

$$\Delta HD = ED - RT \quad (12)$$

O indicador mais confiável para estimar a estabilidade enzimática é a energia de Gibbs de ativação da desnaturação (ΔGD), explicitado pela Equação 13, pois engloba entalpia e entropia para determinar a espontaneidade da perda de estabilidade da enzima. Valores menores para energia de Gibbs indicam maior tendência a desativação, enquanto maiores acusam maior estabilidade térmica da enzima (KUMAR et al., 2013; SAQIB et al., 2010).

$$\Delta GD = -RT \ln\left(\frac{k_D h}{k_b T}\right) \quad (13)$$

Na Equação 13, T corresponde aos valores experimentais para a temperatura (K), R é a constante universal dos gases ideais ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), h é a constante de Planck ($11,04 \cdot 10^{-36} \text{ J} \cdot \text{min}^{-1}$) e k_b é a constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) (KUMAR et al., 2013; SAQIB et al., 2010).

A entropia de ativação da desnaturação térmica da enzima (ΔSD) pode ser encontrada através da Equação 14. Tal medida relaciona-se com a aleatoriedade do processo de desnaturação da enzima, de modo que, quanto maior a aleatoriedade, maior e positivo será o valor da entropia de desnaturação térmica da enzima (FARIA et al., 2021; GARCIA et al., 2021; GONÇALVES et al., 2020; KUMAR et al., 2013; SOUZA et al., 2015).

$$\Delta SD = \frac{\Delta HD - \Delta GD}{T} \quad (14)$$

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PREPARO DO SUPORTE

Os suportes de poli(ácido láctico) enriquecido com 10% de argila térmica (PLA – 10AR) foram obtidos conforme descrito por Rabelo et al (2022). Esses compósitos foram fornecidos em formato de barras com dimensão de 16,5 x 2 x 0,2 cm e, para serem utilizados, foram cortados manualmente com auxílio de um alicate, no formato de cubos de tamanho aproximado 0,2 cm³, como mostra a Figura 5. Já no tamanho final, eles foram levados a estufa à 60°C por 24h e por fim armazenados em local protegido da umidade.

Figura 5 - Suportes de poli(ácido láctico) com adição de 10% argila no tamanho final para serem utilizados



Fonte: do Autor.

1.2. PRODUÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR MICROBIANA

4.2.1. Preparo do Inóculo: microrganismo e condições de cultivo

A linhagem do fungo *A. oryzae* IPT-301, utilizado para a produção da FTase extracelular foi fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). O fungo foi recebido em um pellet contendo 5 g de esporos liofilizados do microrganismo, necessitando de repicagem.

A repicagem foi realizada preparando-se um meio sólido cuja composição está descrita na Tabela 4. O mesmo foi disposto em placas de Petri. O pellet foi suspenso em 10 ml de água destilada estéril, homogeneizado, e em seguida, alíquotas de 70 µl foram inoculadas ao meio. Procedeu-se com a incubação por 7 dias à 30 °C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371).

Tabela 4 - Composição meio sólido para a repicagem

Reagente	% (massa. volume⁻¹)
Ágar batata dextrose (KASVI®)	2,0
Glicerina (Isofar®)	2,5
Extrato de levedura (Synth®)	0,5
Glicose (Dinâmica®)	2,5

Fonte: (CUNHA, 2017).

Após o período de incubação, os esporos produzidos foram coletados por meio de raspagem com alça de Drigalski, e 10 ml de solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95 % (m/v) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1 % (v/v). A suspensão foi então homogeneizada com solução de glicerina 20 % (m. v⁻¹), variando o volume de tal modo que a concentração final de esporos fosse de 1×10^7 esporos. ml⁻¹ (quantificação feita com câmara de Neubauer). Por fim, foi realizado o armazenamento sob refrigeração a -12 °C (CUNHA, 2017; FARIA, 2019).

4.2.2. Cultivo Celular Submerso: Meio de Cultura e Produção de FTase extracelular

Para o cultivo celular do microrganismo e produção da enzima frutossiltransferase (FTase) extracelular, preparou-se um meio de cultura sintético conforme protocolo experimental proposto por (FERNANDEZ et al., 2007) e ajustou-se o pH para 5,5. A composição do meio de cultura está disposta na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição Meio de Cultivo *A. Oryzae* IPT301

Reagente	% (massa. volume⁻¹)
sacarose (Synth®)	15,0
extrato de levedura (Synth®)	0,5
NaNO ₃ (Dinâmica®)	0,5
KH ₂ PO ₄ (Synth®)	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O (Dinâmica®)	0,05
MnCl ₂ .4H ₂ O (Synth®)	0,03
FeSO ₄ .7H ₂ O (Synth®)	0,001

Fonte: (FERNANDEZ et al., 2007; PEREIRA, 2021).

Após o preparo, foi distribuído 50 ml do meio em frascos Erlenmeyer de 250 ml. Em seguida, os frascos contendo o meio foram devidamente fechados com algodão, gaze e papel autoclavável e levados para a esterilização em autoclave (Phoenix, modelo AV-

75). A esterilização ocorreu por um período de 20 min., à temperatura de 120°C e pressão de 1,08 atm. Para conclusão do processo de esterilização, o material foi levado para capela (Pachane, modelo PCR2) previamente esterilizada e submetidos a luz UV por 15 minutos. Ao final do processo de esterilização, com o auxílio de micropipeta e ponteiros, esterilizados juntamente com o meio foi inoculado, 0,5 ml de esporos foi colocado em cada frasco.

Os Erlenmeyers com meio inoculado foram dispostos em incubadora (Tecnal, modelo TE-4200) e mantidos a 30°C e 200 rpm por 64h consecutivas para crescimento celular e produção da enzima FTase (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; FERNANDEZ et al., 2007; PEREIRA, 2021). A Figura 6 mostra os frascos contendo o micro-organismo após 64 h de cultivo celular submerso, sendo que: a enzima extracelular encontra-se dispersa no caldo (fase líquida); a enzima intracelular (ou micelial) encontra-se na biomassa (fase sólida).

Figura 6 - Resultado físico final do cultivo celular submerso

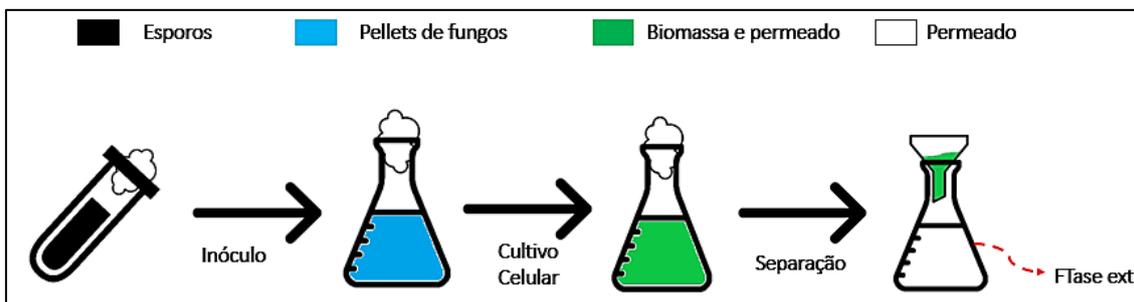


Fonte: do Autor.

Ao final do cultivo celular, o conteúdo dos frascos foi filtrado à vácuo com papel filtro qualitativo número 1 e o permeado obtido (caldo contendo a enzima extracelular), foi utilizado logo em seguida para a atividade enzimática e imobilização (FARIA, 2019).

A Figura 7, exibe um fluxograma simplificado dos Tópicos 4.2.1. Preparo do Inóculo: microrganismo e condições de cultivo e 4.2.2. Cultivo Celular Submerso: Meio de Cultura e Produção de FTase extracelular que englobam a obtenção da enzima Ftase a partir dos esporos.

Figura 7 - Fluxograma da produção de Ftase



Fonte: do Autor.

4.2. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA FTASE EXTRACELULAR

Os ensaios de imobilização da FTase extracelular no suporte de poli(ácido lático) com 10% de argila foram realizados conforme método adaptado de (FARIA et al., 2021). Um volume de 5 ml de caldo contendo a enzima FTase foi adicionado em frasco Erlenmeyer de 50 ml contendo 0,5 g do suporte. A imobilização foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) por um período de 8 h, à 35 °C, pH 5,5 e sob agitação controlada de 175 rpm. Durante o período de imobilização, foram retiradas alíquotas de 0,1 ml do sobrenadante em intervalos de tempo (0h, 3h, 5h e 8 h) visando monitorar a atividade enzimática. A Figura 8 mostra os recipientes contendo o suporte com o caldo enzimático.

Figura 8 - Erlenmeyer de 50ml contendo suporte e caldo proveniente do cultivo celular



Fonte: do Autor.

Ao final do processo de imobilização enzimática, o conteúdo de cada recipiente foi filtrado a vácuo separadamente (utilizando papel de filtro qualitativo número 1). Após a filtração, a torta retida no filtro foi submetida a atividade enzimática padrão conforme procedimento descrito no Tópico 4.6.1 a fim de realizar o cálculo dos parâmetros de imobilização e estudos de caracterização das propriedades bioquímicas do biocatalisador heterogêneo (tópico 4.5). Ao final dos ensaios de atividade enzimática, o biocatalisador heterogêneo foi lavado abundantemente com água destilada, filtrado à vácuo e armazenado em estufa à 60 °C por 48 horas para a determinação da sua massa seca.

Os ensaios de imobilização foram realizados em triplicata e a fim de se monitorar a atividade da FTase extracelular ao decorrer do processo também foi colocado no agitador uma amostra controle contendo apenas o caldo com a enzima (isento de suporte).

4.3.1. Parâmetros de Imobilização Enzimática

Para avaliar o desempenho da imobilização, foram obtidos alguns parâmetros, previamente descritos por (MENDES *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2015). O rendimento de imobilização (RI), que quantifica o percentual de enzima imobilizada, calculado pela Equação 15. Onde mede-se atividade de transfrutoseilação no sobrenadante antes (Ati) e após (Atf) os ensaios de imobilização (em U ml⁻¹).

$$RI = \frac{Ati - Atf}{Ati} * 100 \quad (15)$$

A atividade desaparecida por sua vez está definida na Equação 16.

$$AD = Ati - Atf \quad (16)$$

Por fim foi obtido o parâmetro de atividade recuperada (AR), que indica quanto da atividade inicial foi aproveitada pelo suporte, indicado pelo Equação 17.

$$AR = \frac{Atd}{AD} * 100 \quad (17)$$

em que Atd é a atividade de transfrutoseilação (em U) do biocatalisador.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA FTASE EXTRACELULAR IMOBILIZADA EM POLI(ÁCIDO LÁTICO) COM 10% DE ARGILA

4.4.1. Avaliação dos efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática

A fim de avaliar o efeito das variáveis pH e temperatura do meio reacional no transcorrer da atividade de transfrutoseilação do derivado (biocatalisador heterogêneo), fez-se uso da técnica de planejamento de experimentos, mais especificamente, foi

utilizado um planejamento experimental fatorial padrão do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2²), contendo 3 repetições genuínas no ponto central e 4 pontos axiais. Baseado nos valores ótimos obtidos por Cunha et al., (2019) e Faria et al., (2021), adotou-se para a temperatura o intervalo de 43 – 57 °C e para o pH, o intervalo de 4,8 – 6,2. A matriz de experimentos está representada na

Tabela 6.

Tabela 6 - Matriz do Delineamento

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais		Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais	
	T	pH	T	pH		T	pH	T	pH
1	-1	-1	43	4,8	7	0	-1,41	50	4,5
2	1	-1	57	4,8	8	0	1,41	50	6,5
3	-1	1	43	6,2	9	0	0	50	5,5
4	1	1	57	6,2	10	0	0	50	5,5
5	-1,41	0	40	5,5	11	0	0	50	5,5
6	1,41	0	60	5,5					

Fonte: do Autor.

Os experimentos de atividade enzimática foram realizados conforme descrito no Tópico 4.6.1, variando a temperatura e o pH do tampão, conforme o planejamento experimental. Os resultados foram analisados com o auxílio do software Protimiza®.

A superfície de resposta foi ajustada para uma variável resposta: atividade do transfrutossilação de biocatalisador heterogêneo (Y, em %). O modelo de segunda ordem para os fatores estudados está expresso pela Equação 18, em que x1 e x2 representam os fatores temperatura (°C) e pH, respectivamente, e β representa os coeficientes estimados pelo modelo estatístico em questão.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_{11} \cdot x_{12} + \beta_{22} \cdot x_{22} + \beta_{12} x_1 x_2. \quad (18)$$

Pela grande variabilidade de bioprocessos que envolvem enzimas e microrganismos, os parâmetros foram considerados significativos os parâmetros com p-valores inferiores a 10% (p < 10%) (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

4.4.2. Avaliação do efeito da concentração de substrato na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos

Com o intuito de avaliar os efeitos gerados pela concentração de substrato na reação de atividade enzimática do derivado (suporte contendo as enzimas imobilizadas),

realizou-se o procedimento de atividade enzimática descrito no Tópico 4.6.1, utilizando-se diferentes concentrações finais de sacarose no meio reacional, ajustadas para: 200 g.l⁻¹, 300 g.l⁻¹, 400 g.l⁻¹, 470 g.l⁻¹, 500 g.l⁻¹ e 600 g.l⁻¹. Em seguida, fez-se a quantificações das concentrações de açúcares para a análise dos resultados e aplicação dos modelos de Michaelis-Menten e o de Hill utilizando ferramenta computacional.

4.4.3. Ensaio de Estabilidade frente ao pH

Para avaliar o efeito do pH na estabilidade enzimática, após o processo de imobilização da FTase extracelular em poli ácido lático enriquecido com 10% de argila, conforme procedimentos descritos no Tópico 4.3, as amostras foram incubadas, na ausência de substrato, em solução tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ com diferentes valores de pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5) por 24 h sob refrigeração de 4 °C. Ao final do período de incubação, realizou-se a atividade enzimática conforme Tópico 4.6.1, utilizando tris-acetato com os valores de pH iguais aos utilizados no armazenamento. Para cada pH diferente os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.5.4. Ensaio de Estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos

A avaliação da estabilidade térmica do biocatalisador heterogêneo foi realizada para as temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. Para isso, imobilizou-se a Ftase em PLA com 10% de argila, conforme Tópico 4.3. Em seguida, o complexo foi incubado em solução tampão tris-acetato 0,2 mol.l⁻¹ e pH 5,5 em banho termostatizado nas temperaturas especificadas, pelos períodos de 1, 2, 4, 6 e 24 h. Ao término da incubação, se realizou-se a atividade enzimática conforme o Tópico 4.6.1. Por fim, quantificaram-se os açúcares para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos utilizando ferramenta computacional.

4.4.5. Ensaio de Estabilidade de armazenagem

Foram realizados ensaios a partir da enzima imobilizada em PLA com 10% de argila, conforme Tópico 4.3, para diferentes tempos de armazenagem (24h, 48h, 72h, 96h e 120h). Nestes ensaios, foram feitas triplicatas para os diferentes tempos. As mesmas foram armazenadas em solução tampão tris acetato 0,2 mol.l⁻¹, pH 5,5, na ausência de substrato, sob refrigeração a 4 °C. Ao transcorrer os tempos mencionados de armazenagem, as atividades de transfrutoseilação foram monitoradas sob as condições experimentais padrão (Tópico 4.6.1).

4.4.6. Ensaios de Estabilidade Operacional

Para estudar a estabilidade operacional, após o processo de imobilização enzimática (Tópico 4.3), foi realizada a atividade enzimática do biocatalisador heterogêneo conforme o Tópico 4.6.1. Entretanto ao final dos 60 min, a amostra foi filtrada à vácuo, sendo o permeado separado e quantificado, já o biocatalisador retido no filtro foi colocado em um novo meio reacional para a realização de uma nova atividade enzimática (reciclo). O processo foi repetido por 8 vezes até que a atividade de transfrutoseilação (*At*) do complexo seja significativamente baixa.

4.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO BIOCATALISADOR

A morfologia das partículas de poli(ácido lático) enriquecido com 10% de argila foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT-SP, 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. O processo de recobrimento teve duração de 3 minutos.

Para a caracterização das ligações químicas e estrutura do suporte, na presença e ausência da enzima imobilizada, foi realizada análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) usando Espectrômetro (Agilent Technologies Cary 630, Estados Unidos) operado para uma faixa de 650 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas pelo Laboratório de Engenharia de Materiais da UNIFAL-MG.

4.5. ENSAIOS ANALÍTICOS

4.6.1. Atividade Enzimática

As atividades enzimáticas de transfrutoseilação da FTase extracelular foram realizadas seguindo os procedimentos utilizados por (CUNHA et al., 2019; FARIA et al., 2021; GARCIA et al., 2021; GONÇALVES et al., 2019), assim, adicionou-se 0,1 ml da enzima solúvel – para a atividade inicial, utilizou-se o caldo do enzimático logo após a filtração do cultivo celular (permeado) e para os demais pontos foram utilizadas alíquotas do sobrenadante do processo de imobilização – em um meio previamente ambientado à temperatura de 50°C, preparado em tubo tipo Falcon de 50 ml contendo 3,7 ml de sacarose comercial (63,6% m.v^{-1}) e 1,2 ml de tampão tris-acetato (0,2M e pH 5,5).

Para a atividade enzimática do biocatalisador heterogêneo (derivado), manteve-se o mesmo processo, de preparo do meio e ambientação do mesmo à 50°C, porém usando-se 1,9 ml de sacarose comercial (63,6% m.v⁻¹) e 0,6 ml de tampão tris-acetato (0,2M e pH 5,5), adicionando-se 0,5 g de derivado.

O meio contendo a enzima solúvel ou o biocatalisador foi mantida em agitação constante de 190 rpm com temperatura controlada de 50 °C por exatamente 60 min. Transcorrido o tempo, a fim de se interromper a reação entre enzima e meio, através da inativação da enzima, a amostra foi levada ao banho com água fervente por 10 min, seguido por resfriamento em banho de gelo por, ao menos, 5 min.

Em seguida, o meio reacional com biocatalisador foi filtrado. A parte sólida foi lavada e novamente filtrada para retirada de possíveis quantidades de açúcares retidas no mesmo, em seguida a mesma foi alocada em estufa à 60°C por 24h, após este período foi feita a aferição da massa seca. A parte líquida e os demais meios reacionais que continham a enzima solúvel foram utilizados para quantificação de açúcares conforme procedimentos descritos nos Tópicos 4.6.2 e 4.6.3.

As atividades de transfrutoseilação da enzima solúvel ($A_t^{\text{solúvel}}$) e imobilizada (A_t^{derivado}) foram calculadas pelas Equações 19 e 20, respectivamente.

$$A_t^{\text{solúvel}} = \frac{[F_t]V_R}{V_E t_R} \quad (19)$$

$$A_t^{\text{derivado}} = \frac{[F_t]V_R}{m t_R} \quad (20)$$

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

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

4.6.2. Quantificação dos Açúcares

Inicialmente, fez-se a diluição das amostras conforme a necessidade para que fosse obedecida a lei de Lambert-Beer. Então, as concentrações de açúcares redutores (AR) e de glicose (G) foram quantificados pelos métodos colorimétricos DNS (ácido 3,5

dinitrosalicílico) e GOD/PAP® (kit enzimático glicose-oxidase), respectivamente. As concentrações de frutose liberada (F) e frutose transfrutossilada (transferida) (F_T) no meio reacional foram determinadas pelas Equações 21 e 22 (CHEN; LIU, 1996; CUNHA et al., 2019; FARIA et al., 2021; GARCIA et al., 2021; GONÇALVES et al., 2019).

$$[F]=[AR]-[G] \quad (21)$$

$$[FT]=[G]-[F] \quad (22)$$

4.6.2.1. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores (AR)

A determinação de açúcares redutores (AR) no meio reacional foi feita a partir do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), adaptado de Miller (1959), conforme descrito por (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Inicialmente foi preparada solução de DNS. Para isso, fez-se duas soluções iniciais em paralelo, a primeira, a partir da dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$) (Dinâmica®) em 200,0 ml de solução 2 mol. l^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®). A segunda, foi preparada por de 500 ml de uma solução aquosa constituída por 600 g. l^{-1} de tartarato duplo de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) (Dinâmica®). Após a dissolução dos reagentes em ambas, as soluções foram misturadas e o volume final da mistura aferido para 1,0 l em balão volumétrico. Foi elaborada uma curva analítica de açúcar redutor apresentada no Apêndice A. A solução foi armazenada em local protegido da luz num frasco âmbar, envolvido com papel alumínio atendendo ao prazo de validade descrito por (MALDONADE; CARVALHO; FERREIRA, 2013, VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Para a quantificação dos AR, em um tubo do tipo Falcon de 15 ml, foi adicionado 0,5 ml da amostra diluída, oriunda da reação enzimática, em 0,5 ml da solução preparada de DNS, o conteúdo foi homogeneizado e submetido a banho maria em ebulição por 15 min, para desenvolvimento da reação (Figura 9). Transcorrido o tempo, os tubos foram imediatamente submetidos a banho e gelo por ao menos 5 min para cessar a reação. Por fim, adicionou-se 4,0 ml de água destilada e prosseguiu-se com a aferição da absorbância com auxílio de espectrofotômetro (Edutec ®, modelo EEQ901A-B) a 540 nm. A partir da absorbância e da curva analítica de açúcar redutor (Apêndice A), foi possível obter a concentração de AR.

Figura 9 - Tubos Falcon 15ml contendo amostra diluída e solução DNS em banho maria



Fonte: do Autor.

O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco, porém substituiu-se a amostra por água destilada.

4.6.2.2. Determinação da Concentração de Glicose (G)

A quantificação da concentração de glicose (G), presente no meio reacional, foi determinada pelo método GOD-PAP® (CUNHA et al., 2019; FARIA et al., 2021; GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014; GARCIA et al., 2021; GONÇALVES et al., 2019). Utilizou-se um kit enzimático (Laborlab®) que é composto por glicose-oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato. Com a oxidação da glicose pela glicose-oxidase tem-se a produção do peróxido de hidrogênio, oxidado através da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem coloração rosácea ou vermelha (WONG; WONG; CHEN, 2008).

A quantificação da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em tubo do tipo Falcon de 15 ml, de 35 µl da amostra previamente diluída, oriunda da reação enzimática, em 3,5 ml de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 minutos. A coloração final (Figura 10) foi analisada com auxílio de espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) a 505 nm, para obtenção dos valores de absorbância e, determinação das concentrações de glicose de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante do kit enzimático. O branco foi obtido pela realização do mesmo procedimento com o reagente do kit enzimático sem a adição de amostra.

Figura 10 - Tubos Falcon 15ml contendo solução reagente do kit enzimático e amostra diluída após seguimento da reação em banho à 37°C por 5 min



Fonte: do Autor.

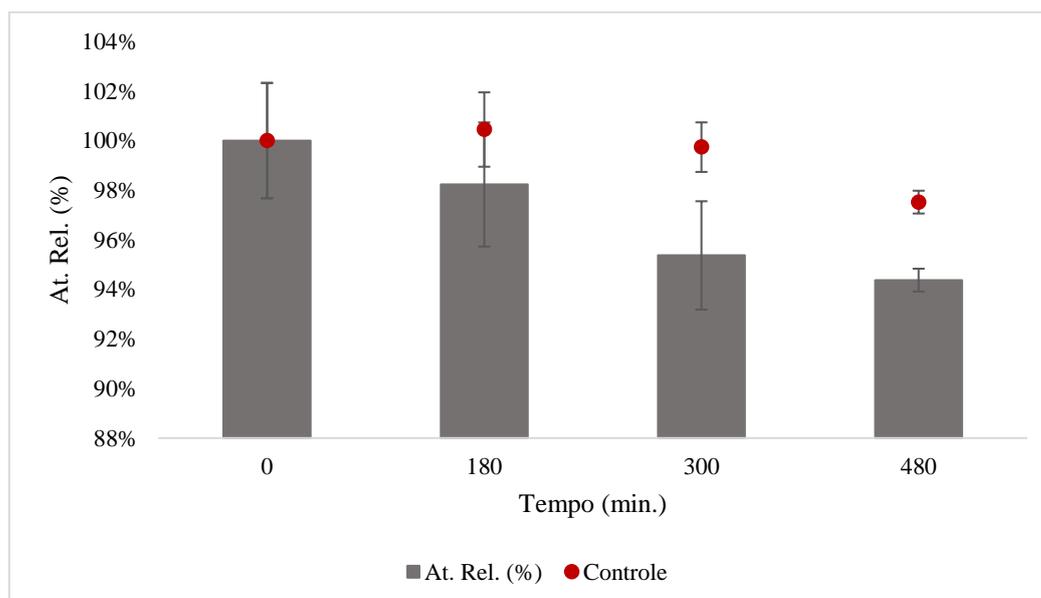
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. PERFIL CINÉTICO DE IMOBILIZAÇÃO DA FTASE EXTRACELULAR EM PLA ENRIQUECIDO COM 10% DE ARGILA

Para se estudar a imobilização da enzima FTase extracelular em PLA – 10AR foram realizados ensaios laboratoriais conforme descrito no Tópico IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA FTASE EXTRACELULAR da sessão de materiais e métodos. Paralelamente, a partir do estudo do trabalho de Faria et al., (2021) e Pereira, (2021) que obtiveram comportamentos cinéticos similares para a FTase extracelular de *A. Oryzae* IPT 301 imobilizada em sílica gel e sabugo de milho respectivamente, foram pré-estabelecidas as condições de imobilização usadas neste trabalho. A temperatura de 35°C foi indicada por ambos os autores como a mais adequada para o processo de adsorção física.

Os ensaios de imobilização foram executados para entender o comportamento da FTase extracelular imobilizada em PLA – 10AR. Na Figura 11, está disposto o perfil cinético de imobilização obtido para a temperatura de 35 °C, o qual mostra o comportamento da atividade de transfrutoseilação (At) da enzima solúvel presente no sobrenadante durante 8 horas de imobilização.

Figura 11 - Perfil cinético de imobilização de FTase extracelular em PLA – 10AR, em função do tempo: monitoramento da atividade de transfrutoseilação no sobrenadante. Condições reacionais: (temperatura: 35 °C, velocidade de agitação: 175 rpm, 10:1 caldo de cultura/ g de suporte). A atividade máxima de transfrutoseilação ($21,08 \pm 0,5$ U ml⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: do Autor.

Na Figura 11 pode-se observar que a atividade de transfrutoseilação (At) do sobrenadante, teve queda significativa no decorrer das 8h de imobilização da FTase extracelular em PLA – 10AR, comportamento este que difere da amostra controle, que por sua vez, apresenta tendência constante para a atividade na maior parte do tempo, com uma leve queda no final das 8h (480 min.). Tal queda pode estar relacionada à instabilidade apresentada por enzimas solúveis quando extraídas do meio natural, ou pelo fato de que enzimas extracelulares estejam desprotegidas do micélio e ainda a simples desnaturação da enzima livre com o passar do tempo (CHAPLIN; BUCKE, 1990; FARIA, 2019; SCHÜÜRMAN et al., 2014). O comportamento apresentado pela At do sobrenadante indica que houve a interação entre a enzima e o suporte e a ocorrência da almejada imobilização.

Os ensaios realizados também possibilitaram a determinação dos parâmetros de imobilização enzimática, como: o rendimento de imobilização (RI) e a atividade recuperada (AR). Para os cálculos de RI foram consideradas a atividade de transfrutoseilação inicial (caldo fermentado) e final (sobrenadante) e, para a obtenção de AR, utilizou-se além destas, a atividade de transfrutoseilação presente no biocatalisador heterogêneo (derivado enzima-suporte). Os resultados estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros de imobilização para PLA – 10 AR após 8 horas de imobilização

Suporte	Rendimento de Imobilização – RI (%)	Atividade Recuperada – AR (%)
PLA - 10AR.	5,6 ± 1,87	17,23 ± 0,87

*ensaios de imobilização foram conduzidos a 35 °C, 175 rpm, na proporção 1:10 (massa de suporte: volume de caldo de cultura).

Fonte: do Autor.

De acordo com Faria *et al.*, (2021) e Garcia et al., (2022), o parâmetro de atividade recuperada é de extrema importância ao se estudar imobilização de enzimas, pois ela indica o quanto da atividade inicial oferecida foi realmente aproveitada pelo suporte. Já o rendimento de imobilização calcula a quantidade de enzima que foi retirada da atividade oferecida, porém neste caso, não se calcula apenas as enzimas ativas, as inativas também.

Na literatura, é possível encontrar estudos envolvendo a imobilização de FTase extracelular de *A. Oryzae* IPT 301 em diversas matrizes nas mesmas condições utilizadas neste estudo. Assim, para fins de análise e comparação a

Tabela 8 exibe um compilado dos estudos encontrados.

Tabela 8 - Valores dos parâmetros de imobilização enzimática em diferentes suportes

Referência	Suporte	RI (%)	AR (%)
(ARAÚJO, 2021)	polihidroxibutirato (PHB)	41 ± 6	17 ± 3
(PEREIRA, 2021)	sabugo de milho <i>in natura</i>	74,26 ± 5,61	2,33 ± 0,23
(PRADO, 2021)	Sílica-gel pura	12,33 ± 1,15	9,67 ± 0,57

Fonte: do Autor.

Tendo em vista que cada biocatalisador possui propriedades e comportamentos individuais e particulares advindas das iterações existentes entre enzima e suporte e além disso, o fato de que cada suporte possui características diferentes, foram feitas comparações em termos gerais. Ao comparar os valores de RI da Tabela 7 com os valores da

Tabela 8, nota-se que o rendimento de imobilização obtido para PLA – 10AR é significativamente inferior aos demais, enquanto a AR é superior a maioria.

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

Dada a inovação do suporte utilizado para imobilização neste estudo, não foram encontrados na literatura outros estudos mesmo que com outras enzimas para fins de comparações gerais. Ao considerar os componentes do suporte separadamente, Garcia et al., (2012) avaliou a imobilização de lipases em nanofibras poliméricas elaborados com PLA puro ou combinado com diferentes proporções de quitosana e demonstrou maior quantidade de enzimas imobilizadas em PLA puro. Izidoro; Paula, (2019) verificaram maior atividade para a lipase imobilizada por ligação covalente em PLA triturado ativado com 1% de glutaraldeído em comparação com PLA triturado e impressos em impressoras

3D, ativados com 1 e 10% de glutaraldeído. (REMONATTO et al., 2021) realizou a imobilização por adsorção física de lipases de *Aspergillus japonicus* em suportes de diferentes tipos de argila e concluiu que dentre os suportes estudados o mais promissor foi utilizando montmorilonita KSF (MKSF), que apresentou 69,47% de rendimento de imobilização. Contudo, tais estudos apresentados bastam-se apenas para ilustrar exemplos de utilização dos elementos componentes do suporte deste trabalho aplicados na área de imobilização de enzimas, uma vez que por se tratar de enzimas diferentes e que possuem, portanto, diferentes estruturas físicas e químicas, além de distintas finalidades não podem ser utilizadas como parâmetros.

Ao considerar a enzima FTase extracelular, enzima de interesse neste trabalho, tem-se a ocorrência em suportes inorgânicos, como o trabalho de Aguiar, (2007), que obteve resultados relevantes ao imobilizar a FTase extracelular de *Rhodotorula sp.*, por adsorção, em suporte sólido ácido inorgânico composto por nióbio e grafite, atingindo rendimento de imobilização de 97,76 %. Nesse estudo, também foram avaliados outros suportes, sendo um deles a sílica enxertada com zircônio. Primeiramente, foi utilizado o método de adsorção com rendimento de 80 %; entretanto, após 72 horas, sob refrigeração, a atividade caiu para 5 % da atividade inicial. Ao realizar a imobilização por ligação covalente, alcançou-se rendimento de 70 %, porém, quando submetido a 72 h de refrigeração, a atividade caiu para 35 % do valor inicial.

Assim, levando-se em consideração os resultados obtidos, e considerando uma análise conjunta dos parâmetros de imobilização, bem como de fatores operacionais, definiu-se as condições de imobilização da FTase microbiana a 35 °C, 175 rpm e 8 h de processo para os biocatalisadores suportados em PLA – 10AR. Após os ensaios de imobilização, o biocatalisador heterogêneo foi submetido aos estudos de caracterização física, bioquímicas e ensaios de estabilidades.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

5.2.1 Planejamento de experimentos: efeitos de pH e temperatura na atividade de transfrutoseilação da FTase imobilizada PLA – 10AR.

A partir da utilização da técnica de planejamento de experimentos, realizou-se um planejamento fatorial completo, do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), para duas variáveis independentes com dois níveis de análise (2^2). O delineamento foi elaborado com 3 repetições genuínas no ponto central e com adição de 4 pontos axiais para elaboração de um modelo de segunda ordem. Conforme mencionado

anteriormente (Tópico 4.4.1. Avaliação dos efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática), as variáveis independentes (fatores) consideradas foram a temperatura (°C) e o pH e a resposta utilizada foi atividade de transfrutoseilação relativa (*Atr*, em %). Os resultados obtidos estão dispostos na

Tabela 9.

A partir das respostas obtidas, primeiramente, com o auxílio do *software* Past 4, realizou-se o teste de normalidade de Shapiro; Wilk, (1965) para verificar se o conjunto de dados independentes segue a distribuição normal. O resultado obtido para o p-valor no teste de Shapiro Wilk foi de 0,5342 e é maior que o nível de significância que será considerado de 10% (0,1); sendo assim, concluiu-se que os dados provêm de uma população normal e deu-se seguimento nas análises estatísticas.

Tabela 9 - Matriz do Delineamento e Respostas

Ensaio	valores codificados		valores reais		Resposta	Ensaio	valores codificados		valores reais		Resposta
	T	pH	T °C	pH	At. Rel. (%)		T	pH	T °C	pH	At. Rel. (%)
1	-1	-1	43	4,8	69,54	7	0	-	50	4,5	40,23
								1,4			
								1			
2	1	-1	57	4,8	22,99	8	0	1,4	50	6,5	88,51
								1			
3	-1	1	43	6,2	68,39	9	0	0	50	5,5	100,00
4	1	1	57	6,2	55,17	10	0	0	50	5,5	98,85
5	-1,41	0	40	5,5	71,84	11	0	0	50	5,5	94,83
6	1,41	0	60	5,5	56,90						

A atividade de transfrutoseilação relativa (At. Rel.) (%) foi calculada a partir da atividade de transfrutoseilação máxima do derivado foi de 1,74 U.g-1

Fonte: do Autor.

Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o *software* Protimiza Experimental Design®. Foram considerados estatisticamente significativos os fatores com nível de significância inferior a 10% (p-valor $\leq 0,10$), isto posto pois, conforme Rodrigues e Iemma (2009), bioprocessos que envolvem enzimas e microrganismos apresentam grande variabilidade e, portanto, recomenda-se aplicar níveis de significância mais elevados. Assim, obteve-se a tabela de regressão (Tabela 10), o diagrama de Pareto (Figura 12), a

análise de variância (Tabela 11), a superfície de resposta (Figura 13 (a)) e a curva de contorno (Figura 13 (b)).

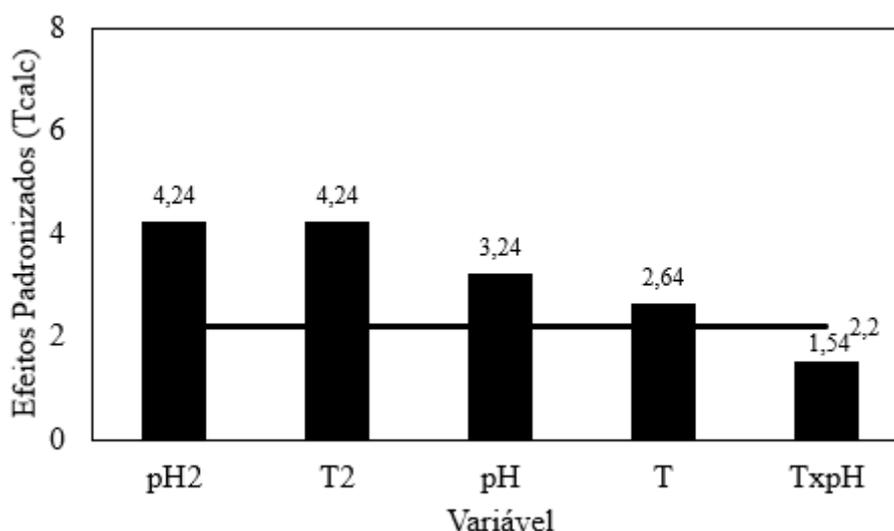
De acordo com a Tabela 10 e a Figura 12 identifica-se que o parâmetro de iteração entre pH e temperatura é o único não significativo, pois apresenta p-valor de 0,1853, superior ao valor considerado de 0,1. Sendo assim, o mesmo foi desconsiderado na elaboração do modelo de segunda ordem.

Tabela 10 - Coeficientes do modelo, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos da temperatura e do pH na atividade de transfrutossilção da FTase extracelular imobilizada em PLA – 10AR

Nome	Coefficiente	Erro Padrão	t calc.	p-valor
Média	97,89	6,27	15,62	0,0000
T (x₁)	-10,11	3,84	-2,64	0,0462
T² (x₁²)	-19,35	4,57	-4,24	0,0082
pH (x₂)	12,41	3,84	3,24	0,0231
ph² (x₂²)	-19,35	4,57	-4,24	0,0082
T. pH (x₁ · x₂)	8,33	5,43	1,54	0,1853

Fonte: do Autor.

Figura 12 - Diagrama de Pareto para as variáveis pH e temperatura (°C) na atividade de transfrutossilção da FTase imobilizada em PLA – 10AR



Fonte: do Autor.

Diferentemente do que foi relatado por Cunha et al., (2019) e Faria et al., (2021) que constataram que apenas o pH era um fator estatisticamente significativo, para o caso da FTase imobilizada em PLA-10AR, a temperatura também é um parâmetro que gera

influência na atividade de transfrutossilagem do derivado, isso pode ser visto também na matriz do delineamento (

Tabela 9), onde alterações no valor de temperatura geraram mudanças na resposta obtida. As relações entre enzima de suporte são únicas para cada sistema e dependem de fatores como a composição de ambos. Isso faz com que haja comportamentos diferentes e individuais para cada biocatalisador.

A influência do pH se deve ao fato de que variações no pH podem causar alterações na conformação da enzima, o que implica em alterações nos sítios ativos. Além disso, mudanças no valor de pH tem influência sobre o equilíbrio de ionização de grupos ácidos e básicos, afetando a distribuição de cargas das enzimas presentes na superfície do suporte, e conseqüentemente, as interações eletrostáticas existentes entre os mesmos (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993; PEREIRA et al., 2015). A temperatura por sua vez causa mudanças na energia cinética das moléculas, gerando movimentações nas mesmas, o que ocasiona uma maior taxa reacional. Porém o aumento demasiado da temperatura gera o rompimento na estrutura tridimensional da enzima (desnaturação), impossibilitando o encaixe entre enzima e substrato. Desse modo, para cada enzima (livre ou imobilizada) há uma temperatura ótima, na qual se dá a máxima taxa reacional (FIELDS, 2001; PUNEKAR, 2018).

Para elaboração do modelo estatístico, segundo Rodrigues; Iemma, (2009), há na literatura, certa divergência de opiniões sobre o fato de retirar do modelo ou não os parâmetros inerentes a uma iteração não significativa, segundo os autores, cada caso deve ser estudado isoladamente. Após análise do comportamento obtido e afim de se obter um modelo mais simples de ser aplicado, considerou-se para este estudo um modelo que não leva em consideração os parâmetros não significativos, pois os efeitos principais foram altamente significativos e os graus de liberdade não seriam comprometidos. A Equação 23 contempla o modelo estatístico para a atividade de transfrutossilagem.

$$At. = 97,89 - 10,11 T - 19,35 T^2 + 12,41 pH - 19,35 pH^2 \quad (23)$$

Para avaliar o ajuste do modelo aos dados experimentais, tem-se o coeficiente de determinação de erro (R^2), que neste caso indicou que o modelo (Equação 23) é capaz de descrever 85,99% das variabilidades das respostas sobre as amostras. Por se tratar de bioprocessos, este valor pode ser explicado pela existência de variações nos processos de cultivo e produção enzimática. Ainda assim, por meio da

Tabela 9 é possível verificar que os pontos centrais possuíram resultados relativamente próximos, apontando para uma boa reprodutibilidade do processo.

Em seguida, realizou-se a Análise de Variância (ANOVA) do modelo proposto, e também o teste-F, com a finalidade de ser verificado se o modelo proposto justifica apropriadamente os dados experimentais obtidos. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 11. A Equação do Teste F está disposta na Equação 24 e tem a finalidade de verificar se o modelo explica uma quantidade significativa de variação dos dados experimentais (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

$$\text{Teste F} = \frac{\text{Quadrados Médios da Regressão}}{\text{Quadrados Médios dos Resíduos}} \quad (24)$$

Na Tabela 11 é possível verificar que o p-valor do modelo de 0,009858, é consideravelmente inferior a 0,10, assim, o modelo representa bem os dados experimentais com significância de 10 %. Com relação ao teste F, a Tabela 11 exhibe os valores de F calculado (F calc.), obtido por meio da Equação 24 e de F tabelado (F tab.) obtido em uma distribuição de frequência de referência (com base nos: graus de liberdade do modelo, graus de liberdade do desvio e no nível de significância). Mais uma vez, o modelo é considerado válido, já que o F tab. (3,18) é inferior ao Fcalc. (9,2) (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

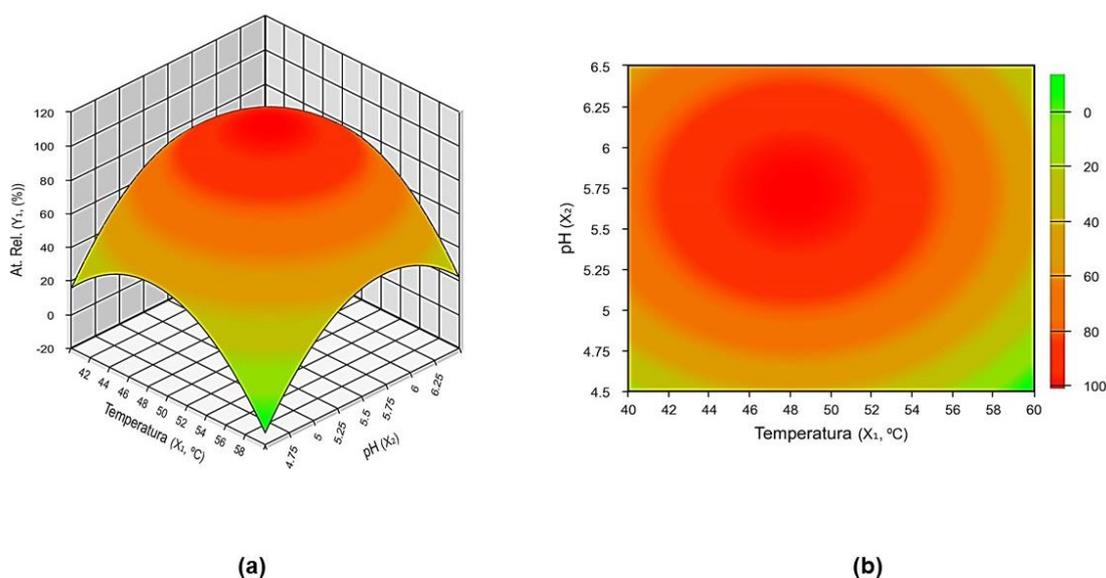
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH sobre a atividade de transfrutossilção da FTase extracelular imobilizada em PLA – 10AR

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc.	p-valor
Regressão	5318,0	4	1329,5	9,2	0,00985
Resíduos	866,7	6	144,4		
Falta de Ajuste	851,9	4	213,0	28,9	0,03372
Erro Puro	14,7	2	7,4		
Total	6184,7	10			
R²	85,99%				
F tab.	3,18				

Fonte: do Autor.

Após verificar a validade do modelo obtido, plotou-se a curva de contorno e a superfície de resposta, sendo estas apresentadas pela Figura 13 (a) e (b), por meio das mesmas é possível verificar as melhores condições de pH e temperatura para At , sendo ao redor de 5,5 e 50 °C. Com a análise dos resultados obtidos acerca de pH e temperatura é possível validar que apesar deste derivado demonstrar influência de ambos os fatores, diferentemente de outros autores que destacaram a significância apenas do pH, as condições ideais foram as mesmas, significando que a imobilização da FTase não modifica os efeitos de pH e temperatura sobre a atividade de transfrutossilacção (CUNHA et al., 2019; FARIA et al., 2021; OTTONI et al., 2012; PEREIRA, 2021).

Figura 13 - (a) Superfície de resposta da atividade de transfrutossilacção para a FTase imobilizada em PLA – 10AR. em função do pH e da temperatura; (b) Curva de contorno da atividade de transfrutossilacção para a FTase imobilizada em PLA – 10AR. em função do pH e da temperatura

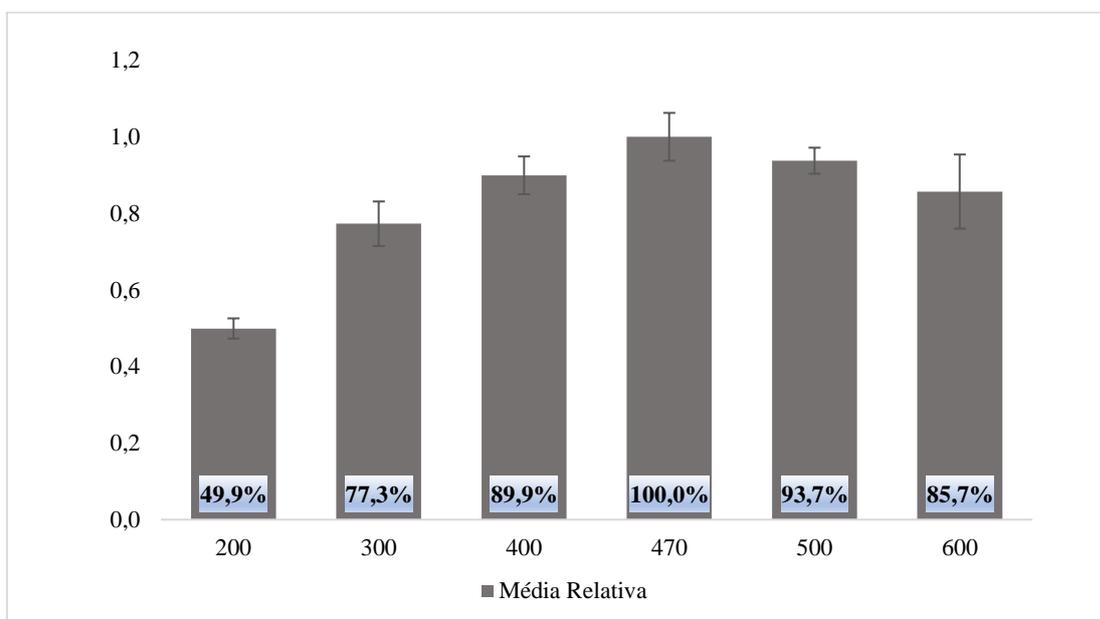


Fonte: do Autor.

5.2.2. Efeito da concentração de substrato e obtenção dos parâmetros cinéticos

A fim de investigar o efeito da concentração de substrato nas reações enzimáticas com o biocatalisador estudado, fez-se necessário variar as concentrações. Os ensaios foram realizados conforme procedimentos descritos no Tópico 4.4.2. Avaliação do efeito da concentração de substrato na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos. Os resultados encontram-se na , em que 100 % da atividade relativa se refere a $1,775 \pm 0,116 \text{ U.g}^{-1}$ de atividade absoluta.

Figura 14 - Efeito da concentração de substrato na atividade relativa da FTase imobilizada em PLA-10AR



Fonte: do Autor.

É possível notar que a concentração final do meio de 470 g.L⁻¹ (referente a 63,6 % m.v⁻¹ de solução de sacarose) gerou a maior atividade. Cunha et al., (2019), também obteve a melhor atividade nesta concentração de substrato para o biocatalisador solúvel.

Para as concentrações entre 400 g.L⁻¹ a 600 g.L⁻¹, as atividades relativas apresentaram valores superiores a 80%, porém a partir de 500 g.L⁻¹, a atividade de transfrutossilção apresenta comportamento decrescente, o que indica a possibilidade de saturação dos sítios ativos do biocatalisador e inibição pelo substrato. Para a concentração de 200 g.L⁻¹ a atividade apresentou valores inferiores a 50%; a baixa atividade justifica-se pela possibilidade não ter acontecido a saturação dos sítios ativos disponíveis,

impossibilitando que a reação ocorresse de maneira satisfatória. Ademais, o comportamento das atividades () é semelhante ao comportamento obtido Faria et al., (2021) e Pereira, (2021) que imobilizaram a FTase extracelular proveniente do mesmo microrganismo em sílica gel e sabugo de milho respectivamente.

Na literatura, Hidaka et al. (1988) e Jung et al. (1989) que estudaram a FTase de *Aspergillus niger*, indicam que a formação de FOS é favorecida em altas concentrações de sacarose, ao redor de 50 % (m/v), porém, em baixas concentrações de sacarose a ação hidrolítica é predominante.

Para estudar a cinética enzimática do biocatalisador heterogêneo, com o auxílio de uma ferramenta computacional, ajustou-se os dados do ensaio de concentração aos modelos de Michalis-Menten e de Hill. O resultado está disponível na

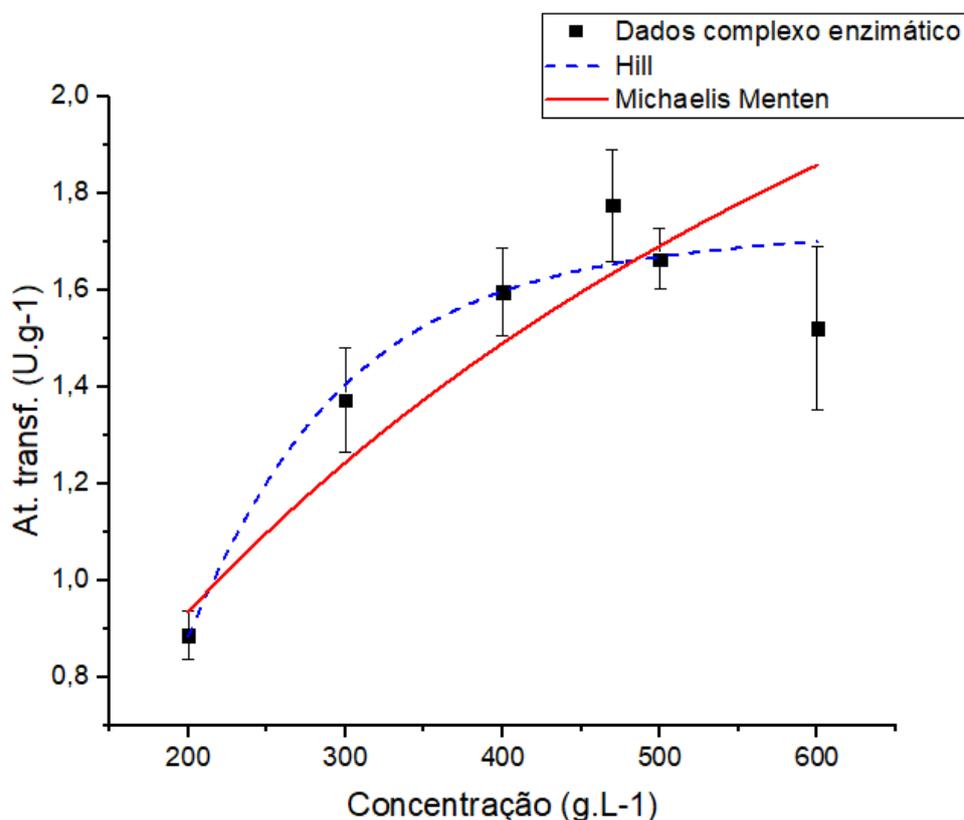
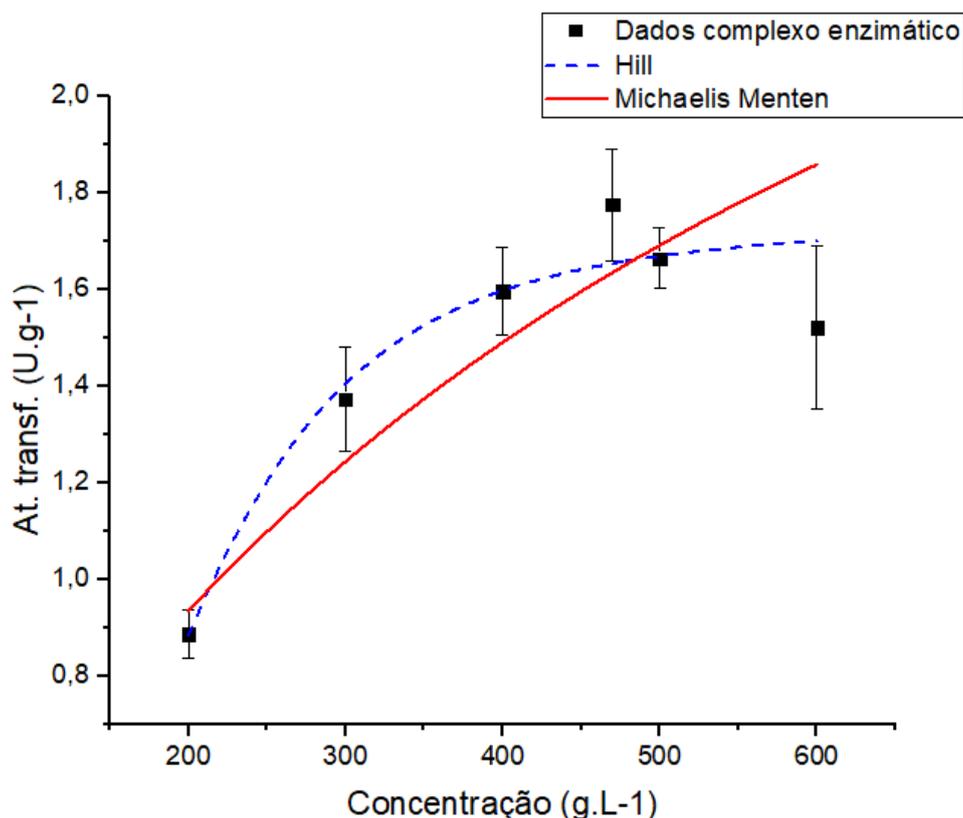


Figura 15 - Modelos de Michalis-Menten e de Hill para a FTase imobilizada em PLA – 10AR



Fonte: do Autor.

A Tabela 12 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados aos modelos, para a FTase imobilizada em PLA – 10AR, o Modelo de Hill foi o modelo que melhor se ajustou aos dados, possuindo um coeficiente de determinação de 97 %. Além disso, o coeficiente de Hill (n) apresentou valor superior a 1,0, indicando que há ligações cooperativas positivas na reação enzimática, o que é consequência de a enzima ser alostérica, conforme explicado no Tópico 0. Assim sendo, confirma-se que o modelo Michaelis-Menten não é adequado para o estudo da cinética de enzimas alostéricas, isto pode ser ainda verificado pelo coeficiente de determinação atingido de 92%, inferior ao de Hill.

Ghazi et al. (2007) relatam que o modelo de Hill normalmente apresenta um bom ajuste aos dados provenientes de estudos com enzimas que transferem grupos frutossil. Assim, um bom ajuste do Modelo de Hill era esperado, pois conforme apontado por Aguiar-Oliveira; Maugeri (2011), as enzimas frutossiltransferases são majoritariamente encontradas na forma dimérica.

Tabela 12 - Parâmetros cinéticos para a FTase imobilizada em PLA – 10AR

Michaelis-Menten	Hill
------------------	------

v máx. (U.g⁻¹)	3,68 ± 0,94	1,74 ± 0,11
K_{0,5} (g.l⁻¹)	587,22 ± 248,81	197,84 ± 8,07
n	-	3,47 ± 1,16
R²	0,92	0,97

Fonte: do Autor.

Ao levar em consideração $K_{0,5}$, que representa a concentração de substrato para que seja atingida a metade da atividade enzimática máxima, o valor obtido foi de $197,84 \pm 8,07 \text{ g.l}^{-1}$ para o Modelo de Hill. Considerando o desvio padrão, coincidiu com o valor de 200 g.l^{-1} que retornou 49,9% da atividade relativa (). Araújo, (2021) obteve $K_{0,5}$ igual a $221,14 \pm 13,00 \text{ g.l}^{-1}$ para a FTase de *A. Oryzae* IPT 301 imobilizada em phb; Faria et al., (2021) obtiveram $K_{0,5}$ igual a 233 g.l^{-1} para a FTase de *A. Oryzae* IPT 301 imobilizada em sílica gel ambos com as mesmas condições adotadas neste trabalho. Assim, observa-se um comportamento análogo em diferentes biocatalisadores desenvolvidos com a FTase extracelular de *A. Oryzae* IPT 301.

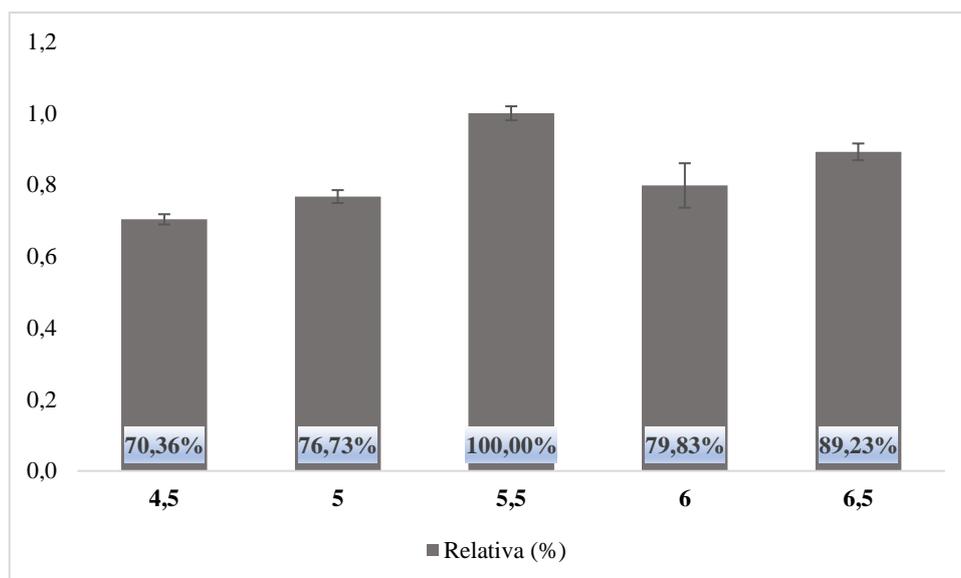
5.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOCATALISADOR

5.3.1 Estabilidade frente ao pH

O efeito do pH na estabilidade do biocatalisador heterogêneo foi avaliado segundo os procedimentos mencionados no Tópico 4.4.3. Ensaios de Estabilidade frente ao pH para as atividades de transfrutossilacção a uma faixa de pH de 4,5 a 6,5. A Figura 16 exibe os resultados obtidos, sendo que a atividade relativa máxima (100 %) se refere a atividade de transfrutossilacção absoluta de $1,1 \pm 0,02 \text{ U.g}^{-1}$.

Por meio da análise da Figura 16, é possível verificar que a enzima imobilizada apresentou atividades relativas superiores a 70% na faixa de pH avaliada, sendo que a menor atividade ocorreu em pH 4,5, o que mostra a estabilidade do biocatalisador imobilizado nessa faixa. Tal resultado é atrativo, uma vez que enzimas estáveis a uma ampla faixa de pH têm como vantagens a redução de custo com estocagem e são viáveis para aplicação industrial (XU et al., 2015).

Figura 16 - Estabilidade frente ao pH da FTase extracelular imobilizada em PLA-10AR.



Fonte: do Autor.

A estabilidade frente ao pH, conferida pela imobilização do complexo (FTase imobilizada em PLA-10AR), é demonstrada ainda quando comparada com os estudos prévios de caracterização das propriedades bioquímicas da FTase extracelular solúvel, produzidas pelo mesmo microrganismo, realizado por Cunha et al., (2019), que reportaram um faixa menor de estabilidade da enzima, entre 5 e 6,5 com a atividade relativa superior a 70%, e máxima atividade em pH 6. Portanto, o processo de imobilização conferiu maior estabilidade da FTase extracelular frente ao pH de incubação, o que era esperado, visto que enzimas quando expostas a determinadas condições de pH podem ser desnaturadas, sendo a imobilização uma maneira eficaz de aumentar a estabilidade enzimática (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015). Ademais, o processo de imobilização protege os grupos reativos da estrutura da proteína dos efeitos do pH (VERMA et al., 2019). Portanto, enzimas imobilizadas são mais robustas, estáveis e resistentes a mudanças do meio reacional (BRADY; JORDAN, 2009; MENDES et al. 2011).

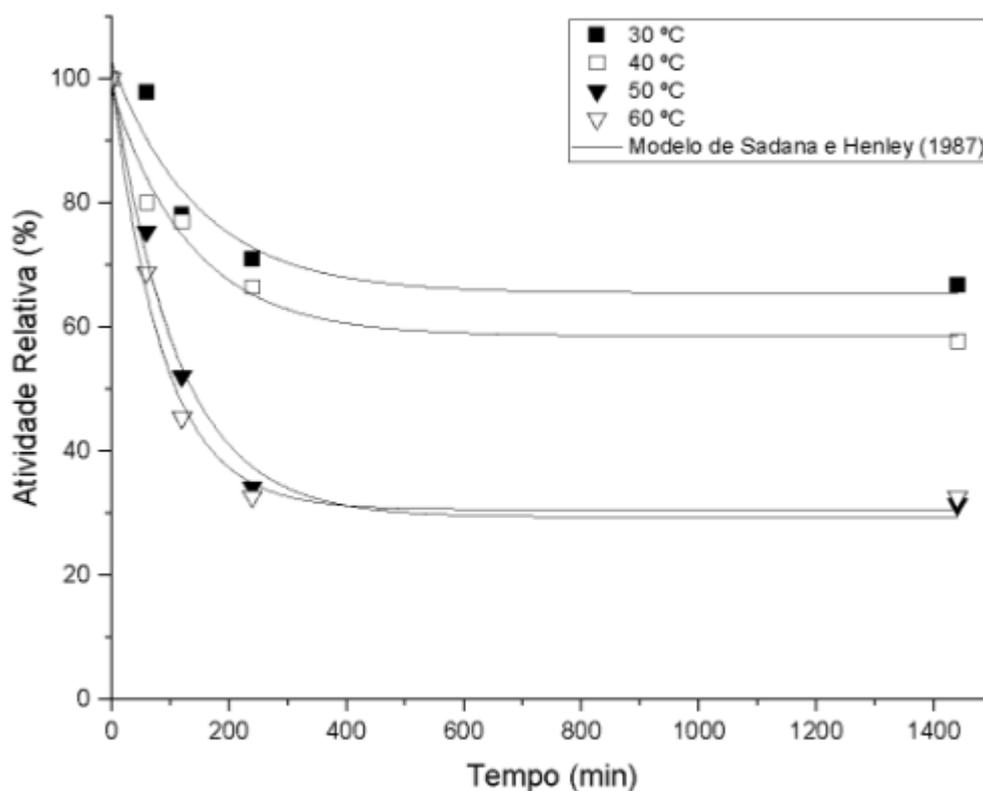
Outros estudos acerca da estabilidade frente ao pH da FTase extracelular foram observados na literatura: Faria et al., (2021) reportaram maior estabilidade da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301, imobilizada em sílica gel para uma faixa de pH compreendida entre 4,5 e 6,5, com atividade relativa superior a 80 %. Silva et al., (2021) avaliaram a estabilidade da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 para valores de pH inseridos no intervalo de 3,5 a 8,5 e obtiveram maior estabilidade em pH 5,5, com atividade relativa de 100%. Nos estudos de Anwar et al., (2008), a FTase produzida por *Lactobacillus johnsonii*, foi estável na faixa de pH de 4,5 a 6,0, com atividades relativas

acima de 85 %. Aguiar-oliveira e Maugeri, (2010) reportaram que a FTase extracelular de *Rhodotorula sp.*, após ser submetida ao processo de imobilização por adsorção em minério de nióbio, apresentou alta atividade e estabilidade para valores de pH de 4,5 e 6,0.

5.3.2 Estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos

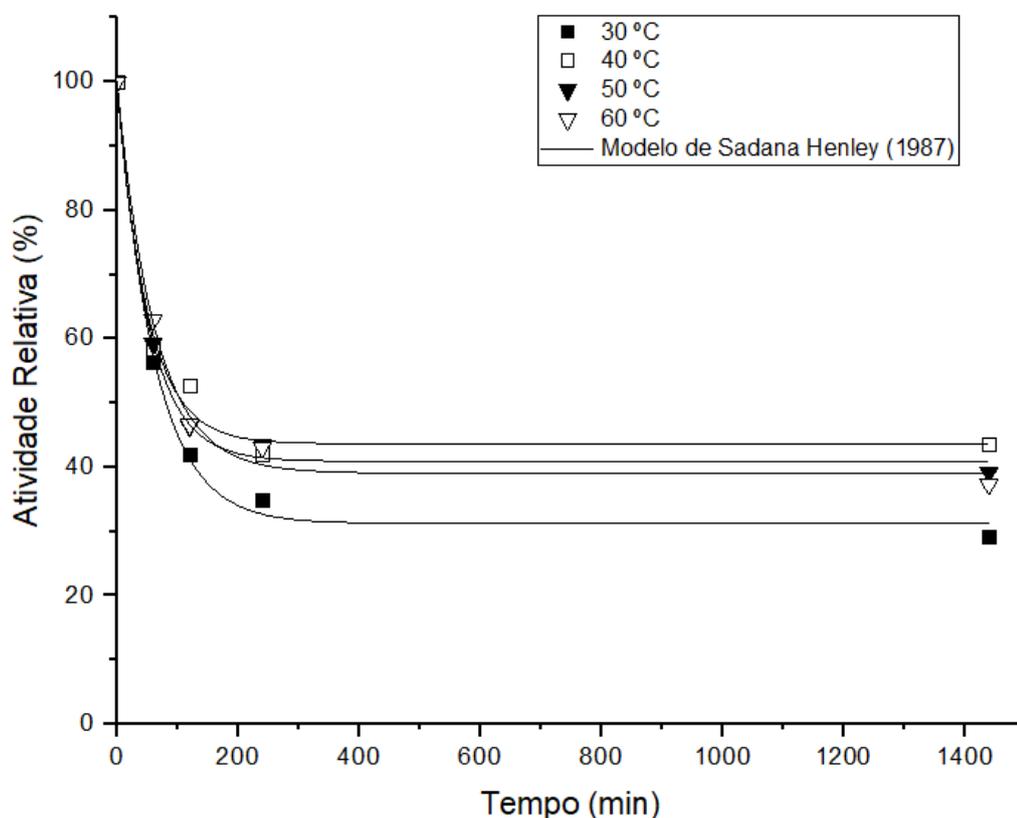
As estabilidades térmicas da FTase solúvel e imobilizada foram determinadas para as temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C e 60°C, durante intervalos de tempo definidos por um período total de 24 horas. As Figura 17 e Figura 18 demonstram a atividade relativa durante a incubação da enzima solúvel e imobilizada, respectivamente.

Figura 17 - 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 transfrutossilação foi definida como 100% da atividade relativa



Fonte: Do autor

Figura 18 - Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PLA – 10AR 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 transfrutossilação foi definida como 100% da atividade relativa



Fonte: Do autor.

A FTase imobilizada demonstrou retenção de atividades relativas menores que à FTase solúvel diante de todos os testes de incubação. A atividade de transfrutossilação (At) com maior retenção foi observada para as enzimas incubadas à 40°C. Na temperatura de incubação de 40°C a FTase mostrou atividade relativa de 66% e 43,8% depois de 24 horas de incubação para as enzimas solúvel e imobilizada, respectivamente. Nas temperaturas de incubação de 50°C e 60°C, pode-se observar comportamentos semelhantes entre ambas com de valores próximos de atividades relativas, sendo, 34,2% e 37,3% de retenção para a FTase imobilizada e 31,44% e 32,65% para a FTase imobilizada, ambas depois de 24 horas. O que demonstra um potencial de incubação para a enzima imobilizada em temperaturas maiores superior a enzima solúvel.

Os parâmetros termodinâmicos da FTase imobilizada e solúvel foram calculados a partir das Figuras 17 e 18. Os parâmetros de constante de desnaturação térmica (kD) e

energia de desativação térmica (ED) foram obtidos a partir da linearização da Equação 9, além disso, os parâmetros de $t_{1/2}$, FE, ΔH_D , ΔG_D e ΔS_D , estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13- Parâmetros termodinâmicos para a FTase extracelular solúvel (S) e imobilizada em PLA – 10AR, 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	0,97	0,99	0,99
k_D (min ⁻¹)	S	$6,78 \times 10^{-3}$	$7,45 \times 10^{-3}$	$9,11 \times 10^{-3}$	$11,70 \times 10^{-3}$
	I	$1,63 \times 10^{-3}$	$1,92 \times 10^{-3}$	$1,93 \times 10^{-3}$	$1,98 \times 10^{-3}$
$t_{1/2}$ (min)	S	102,23	93,04	76,09	59,24
	I	425,24	361,01	359,14	350,07
Fator de estabilidade (FE)		4,16	3,88	4,72	5,9
E_D (kJ mol ⁻¹)	S	15,38			
	I	5,73			
ΔH_D (kJ mol ⁻¹)	S	12,86	12,78	12,69	12,61
	I	3,22	3,13	3,05	2,97
ΔG_D (kJ mol ⁻¹)	S	97,19	100,24	102,98	105,56
	I	100,78	103,77	107,15	110,48
ΔS_D (kJ mol ⁻¹)	S	-0,278	-0,279	-0,279	-0,279
	I	-0,322	-0,321	-0,322	-0,323

Fonte: Do autor.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é definido como o tempo requerido 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 (OLIVEIRA et al. 2020; SAQIB et al. 2010;). Os resultados da Tabela 13 demonstram que o $t_{1/2}$ apresenta um decréscimo progressivo com o aumento da temperatura. O fator de estabilidade (FE) da FTase imobilizada à 60°C foi de 5,9 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 apresentou perda significativa na termoestabilidade enzimática em comparação à enzima solúvel. A energia de ativação de denaturação térmica foi de 15,38 kJ. mol⁻¹ para o biocatalisador solúvel para 5,73 kJ. mol⁻¹ para o biocatalisador heterogêneo. Portanto, o processo de imobilização não favoreceu a termoestabilidade do biocatalisador, uma vez que E_D para a enzima imobilizada foi inferior a solúvel, isto indica a necessidade de aplicação de outras técnicas que corroborem para o aumento de ED, como por exemplo uma funcionalização do suporte utilizado.

Assim como a E_D , a variação de entalpia de ativação para a denaturação térmica (ΔH_D), é um importante parâmetro termodinâmico associado ao total de energia requerida para denaturação enzimática (MARANGONI, 2003). Valores elevados e positivos de ambos os parâmetros indicam elevada estabilidade térmica da enzima (FARIA et al., 2021; FERREIRA et al., 2018; SOUZA et al., 2015). De acordo com a Tabela 4, o biocatalisador heterogêneo não demonstrou ganho frente a enzima na forma solúvel.

A variação de energia de Gibbs de ativação para a denaturação térmica (ΔG_D), por descrever as contribuições das energias entálpica e entrópica, pode ser considerado como o parâmetro termodinâmico mais preciso e confiável para estudos de termoestabilidade enzimática (SAQIB et al., 2010; SOUZA et al., 2015). De acordo com Marangoni (2003), Damodaran (2005) e Aguiar-Oliveira; Maugeri (2011) os maiores valores de ΔG_D indicam maior resistência da enzima à denaturação, uma estrutura conformacional mais estável e uma menor tendência de desdobramento da estrutura proteica, conforme valores do parâmetro apresentados para a FTase imobilizada (Tabela 4), indicando que o processo de imobilização gerou para a enzima ganho de estabilidade estrutural quando comparado a enzima solúvel.

Em seu estudo, Silva (2021) avaliou a termoestabilidade enzimática da FTase solúvel obtida através do cultivo celular submerso com o fungo *A. 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) por sua vez, estudou a estabilidade térmica da FTase de *A. oryzae* IPT-301 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

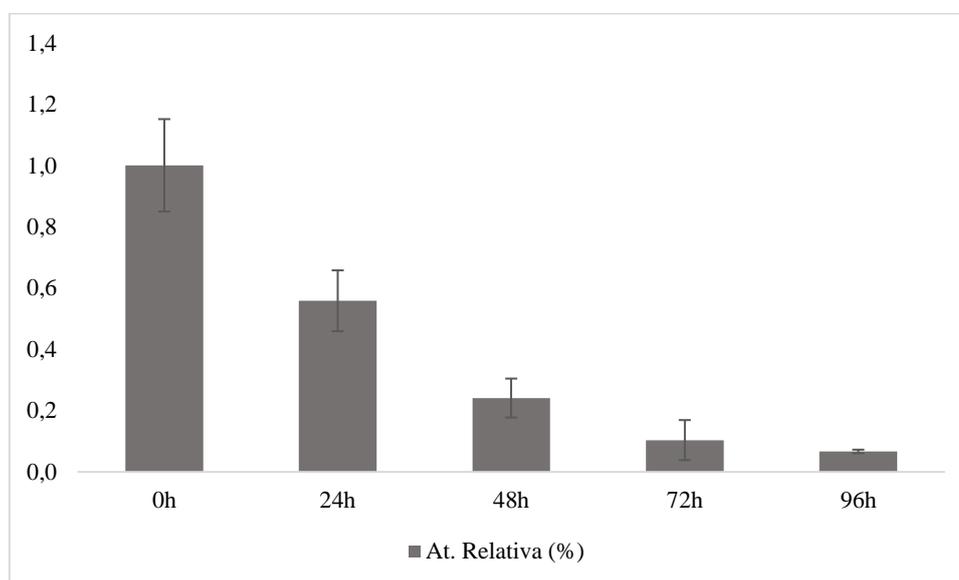
imobilização aumentou a estabilidade da enzima, apresentando maiores valores de tempo de meia vida ($t_{1/2}$), de energia de denaturação térmica (E_D) e de energia livre de Gibbs (ΔG_D).

5.3.3 Estabilidade de armazenagem

Horn et al. (2006), apontam que a capacidade de armazenamento do complexo (enzima-suporte) é um dos fatores principais para avaliação de uso da enzima em um processo. Assim, biocatalisadores que apresentam altos valores de estabilidade de armazenamento permitem a viabilização de uso e minimização de custos operacionais, quando aplicados em processos de larga escala.

Para avaliar a estabilidade de armazenagem, foi estudado o comportamento da FTase extracelular imobilizada em PLA – 10AR após a incubação a 4 °C, na ausência de substrato, conforme procedimentos descritos no Tópico 4.4.5. Ensaio de Estabilidade de armazenagem. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 19, em que 100 % da atividade relativa se refere a $2,664 \pm 0,402$ U.g⁻¹ de atividade absoluta.

Figura 19 - Estabilidade de armazenagem da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PLA – 10AR



Fonte: do Autor.

Na Figura 19, observa-se uma queda brusca na atividade relativa após 24h de armazenagem, onde o valor atinge $55,84 \pm 9,92\%$ do valor inicial. Acredita-se que a queda seja pelo rompimento da ligação entre a enzima e o suporte, pois as mesmas advêm de ligações fracas, considerando o tipo de imobilização realizado. O decaimento no valor da

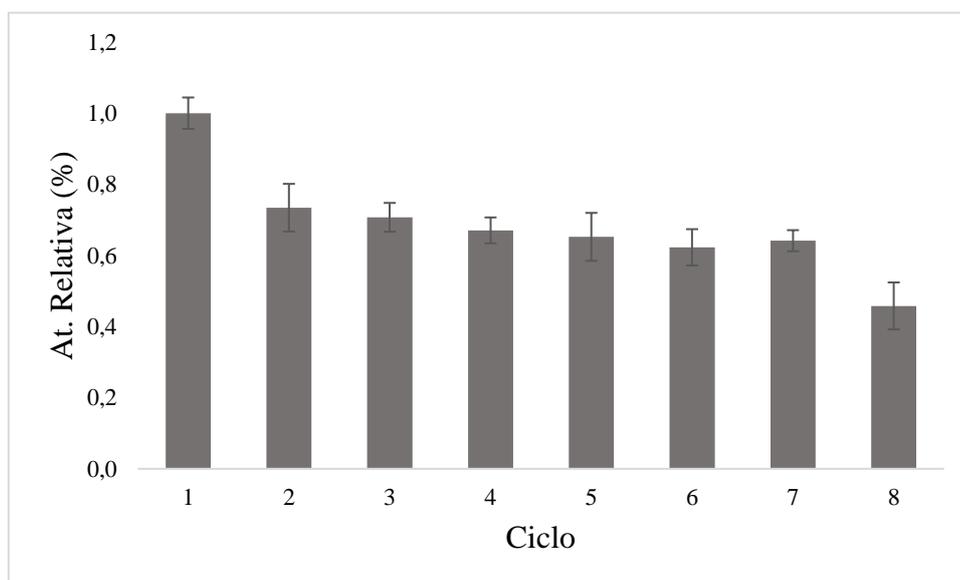
atividade relativa foi progressivo com o passar dos dias, atingindo o valor mínimo de 6,68 \pm 0,59% no quarto dia.

Silva et al., (2021), também estudaram o armazenamento da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301, sob as mesmas condições experimentais, e demonstraram que a atividade de transfrutossilção da enzima solúvel reduziu em até 45% o valor da atividade inicial em apenas 9 horas sob refrigeração, indicando a importância de se imobilizar a enzima para obter maiores estabilidades.

5.3.4 Estabilidade Operacional

Avaliou-se a estabilidade operacional do biocatalisador mediante o reuso do mesmo em 8 ciclos batelada. O comportamento apresentado encontra-se retratado na Figura 20.

Figura 20 - Estabilidade operacional da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PLA – 10AR avaliada durante ciclos reacionais consecutivos em batelada. A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por 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. As atividades máximas de transfrutossilção para o derivado foram 0,934 \pm 0,04 U.g⁻¹ e definidas como 100 % da atividade relativa



Fonte: do Autor.

Pode-se notar na Figura 20 que a atividade de transfrutossilção do derivado apresentou comportamento decrescente com o passar dos ciclos, no segundo ciclo a atividade de transfrutossilção relativa (Atr) atingiu o valor de 73% da inicial, porém nota-se que o mesmo adquiriu estabilidade entre os ciclos 4 e 7 com Atr em torno de 65% da inicial. No oitavo ciclo notou-se uma queda abrupta da Atr para 46% da atividade inicial,

acredita-se que este decaimento possa ter ocorrido pelo rompimento de parte das ligações entre enzima e suporte neste ciclo.

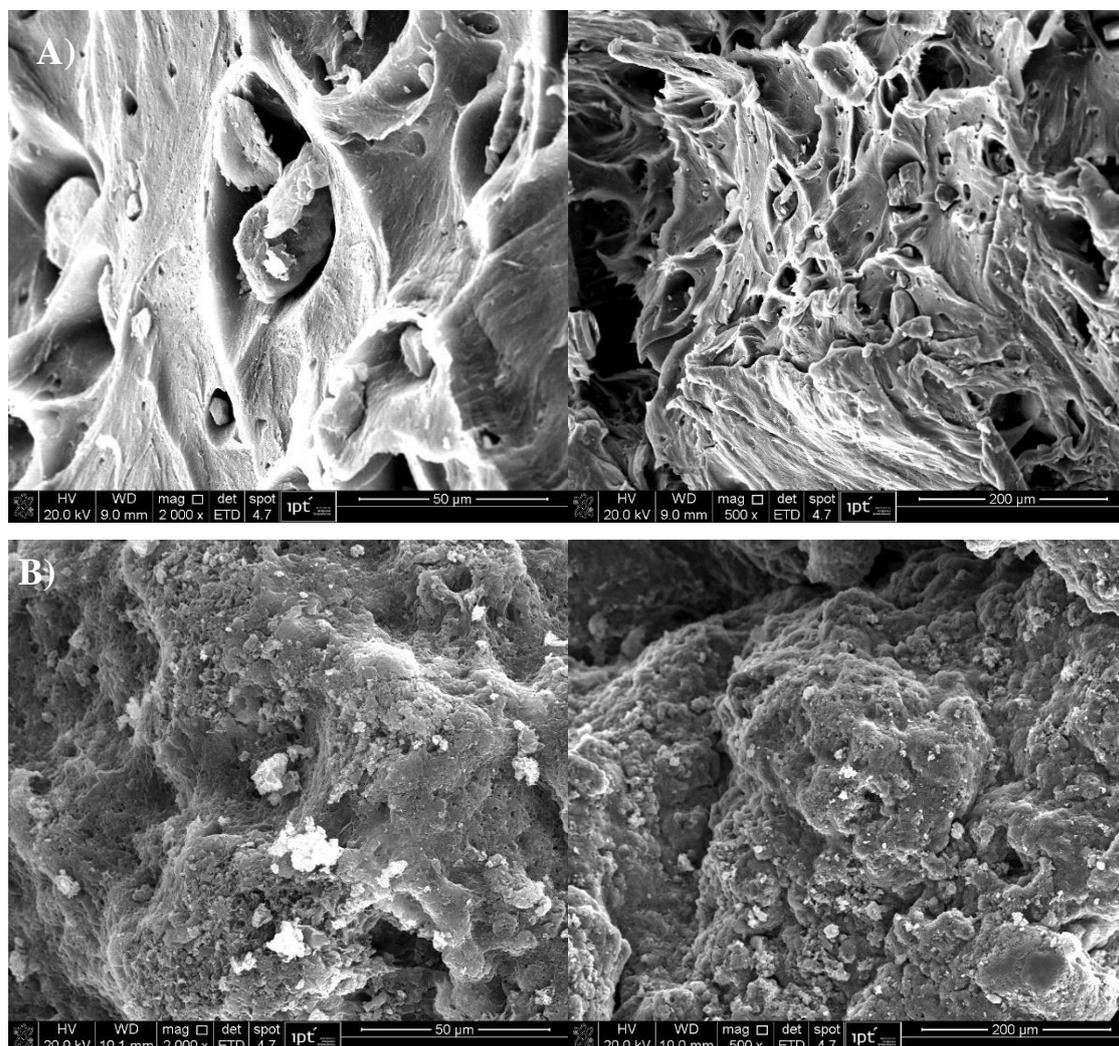
Faria et al., (2021) que realizou a imobilização enzima FTase de *A. Oryzae* IPT-301 em sílica gel por meio da técnica de adsorção física e reportaram em seu teste operacional queda da atividade relativa de transfrutossilacção da enzima para 45% já no terceiro ciclo, onde permaneceu constante até o sexto ciclo, que apresentou 33% da Atr. A queda foi atribuída a possível arraste da enzima do suporte pelo processo de filtração. Além disso, apontaram que o arraste das enzimas é a principal limitação da imobilização por adsorção física pois as ligações fracas promovidas neste tipo de imobilização como ligações de Van der Waals e pontes de hidrogênio são facilmente rompidas pelos processos de manuseio realizados.

Apesar das perdas de atividade ocorridas no processo, o catalisador desenvolvido neste estudo demonstrou a viabilidade de produção de FOS em durante vários ciclos de reação e operação. Cita-se ainda vantagens na utilização do mesmo pela baixa complexidade de produção e baixo custo (LÓPEZ-GALLEGO; GUIÁN; BETANCOR, 2013).

5.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO BIOCATALISADOR

As imagens de MEV referentes à morfologia de amostras de partículas do suporte PLA – 10AR antes e após o processo de imobilização, estão apresentadas na Figura 21-A e 21-B, respectivamente. Pode-se observar com base na morfologia exibida pela Figura 21-A que a amostra apresentou a argila bem distribuída e fixada em toda a extensão da matriz polimérica. Apesar da similaridade entre as micrografias, a amostra representada pela Figura 21-B possui maior aglomeração das partículas, o que se acredita que seja proveniente do contato da amostra com o caldo fermentado rico em enzimas do processo de imobilização.

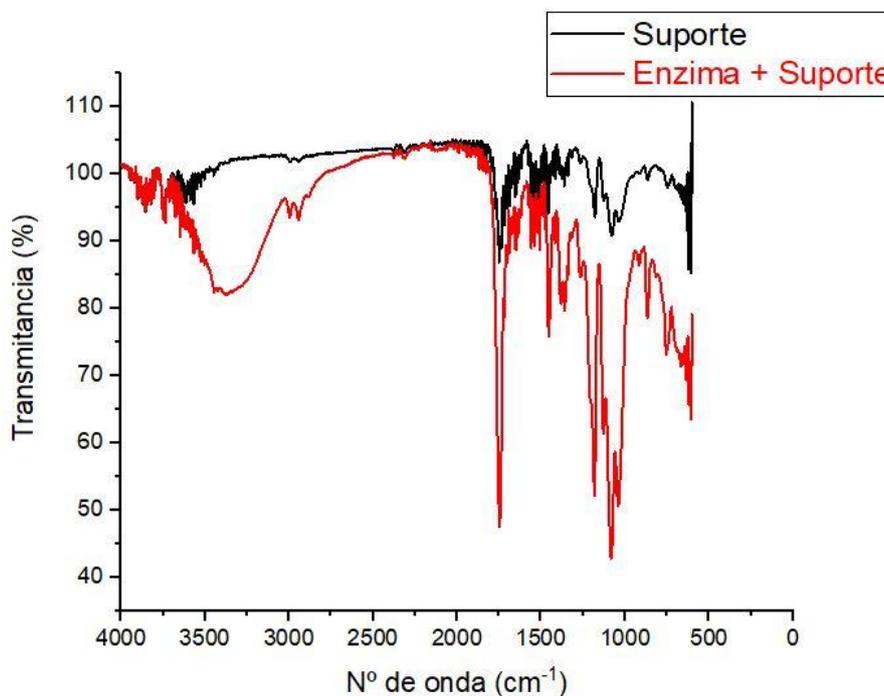
Figura 21– A) Suporte PLA – 10AR antes do processo de imobilização; B) Complexo suporte PLA – 10AR com enzima proveniente do caldo fermentado



Fonte: do Autor.

A partir da análise de FTIR, foram obtidos os espectros de infravermelho para o PLA – 10AR e para o PLA – 10AR contendo a enzima, representados na Figura 22.

Figura 22- Espectro de infravermelho por transformada de Fourier das amostras de Suporte (PLA – 10AR) e Enzima + Suporte (PLA – 10AR com a enzima FTase)



Fonte: do Autor.

Observa-se bandas visíveis em ambos os espectros referentes aos grupos funcionais característicos do PLA: ligação C=O (1757 cm^{-1}), C-H alongamento de -CH_3 em (2996.37 cm^{-1} e 2945.82 cm^{-1}) e a absorção mais característica ao estiramento do éster das ligações C-O (1187.45 cm^{-1}) (SINGLA et al., 2012). Por sua vez, na amostra de PLA – 10AR com enzima, o espectro apresentou uma banda acentuada que não estava presente na amostra sem enzima na região de 3300 cm^{-1} , o que pode corresponder ao estiramento de grupos N-H (aminas) da enzima. A banda na região de 3300 cm^{-1} alarga-se desde 3700 cm^{-1} a aproximadamente 3000 cm^{-1} , A intensificação da banda correspondente ao estiramento NH(aminas) pode estar associada à uma sobreposição de bandas, incluindo estiramento O-H em aproximadamente 3270 cm^{-1} , causado pela presença de água nas amostras (SILVERSTEIN, 2005).

6. CONCLUSÃO

Em vista dos resultados e discussões apresentados é possível concluir, que a FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 foi devidamente imobilizada no suporte de PLA – 10AR e exibiu atividade de transfrutossilacção recuperada de $17,23 \pm 0,87$ %. A partir da avaliação do perfil cinético de imobilização da FTase em PLA – 10AR, padronizou-se um tempo de 8 horas para a imobilização da enzima.

Com relação aos estudos sobre os efeitos de pH e de temperatura sobre a atividade de transfrutossilacção do complexo, a análise do planejamento de experimentos tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) realizado apontou as condições ótimas em 50 °C e pH 5,5.

Nos ensaios de avaliação do efeito da concentração de substrato capaz de promover maior valor de atividade de transfrutossilacção, observou-se que a concentração de 470 g.L⁻¹ exibe o melhor valor e que concentrações entre 400 g.L⁻¹ e 600 g.L⁻¹ de sacarose retornam atividades relativas superiores a 85%. Ademais, o modelo cinético de Hill fornece melhor ajuste dos dados apresentados pelo biocatalisador em questão.

A investigação realizada acerca da estabilidade frente ao pH de incubação da FTase extracelular imobilizada em PLA – 10AR demonstrou que uma faixa de valores entre 5,0 e 6,5 apresentam atividades relativas superiores a 76 %.

Sobre a estabilidade térmica, o biocatalisador heterogêneo apresentou ED e Δ HD significativamente inferiores ao da enzima solúvel o que indica a necessidade de utilização de outras técnicas de imobilização para melhoria dos parâmetros, uma vez que a Δ GD que indica maior resistência da enzima à denaturação demonstrou um comportamento consideravelmente positivo.

Nos testes de armazenamento para o biocatalisador heterogêneo após o período de 24h uma queda brusca na atividade relativa de $55,84 \pm 9,92\%$ do valor inicial.

Para a estabilidade operacional a atividade de transfrutossilacção relativa atingiu o valor de 73% da inicial e notou-se que o mesmo apresentou estabilidade entre os ciclos 4 e 7 com Atr em torno de 65% da inicial.

Conclui-se acerca deste trabalho que o material inovador utilizado neste trabalho (PLA – 10AR) detém características positivas e interessantes que possibilitam sua utilização como suporte para a imobilização da enzima FTase.

Referências

- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Characterization of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 3, 2010.
- AHMAD, Z. et al. Nonlinear process modeling of fructosyltransferase (FTase) using bootstrap re-sampling neural network model. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 5, p. 599–606, 2010.
- 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.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.
- ANWAR, M. A. et al. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 11, p. 3426–3433, 2008.
- ARAÚJO, A. P. M. et al. **Bionanocomposite obtained from poly (lactic acid)/ biopolyethylene blend and clay**. Macromolecular Symposia. **Anais...**2014.
- ASGHER, M. et al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56–66, 2014.
- AURAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 9, p. 835–864, 2004.
- BEDZO, O. K. K.; MANDEGARI, M.; GÖRGENS, J. F. Comparison of immobilized and free enzyme systems in industrial production of short-chain fructooligosaccharides from sucrose using a techno-economic approach. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 5, p. 1274–1288, 2019.
- BEZERRA, C. S. **Imobilização De B-Galactosidase De *Kluyveromyces lactis* Em Diferentes Suportes E Protocolos De Ativação**. [s.l.: s.n.].
- BIOPLASTICS, E. Crescimento do mercado global de bioplásticos. Disponível em: <<https://www.arandanet.com.br/revista/pi/noticia/1380-Crescimento-do-mercado-global-de-bioplásticos.html>>. Acesso em: 8 ago. 2022.
- BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: A literature survey. **Methods in Molecular Biology**, v. 1051, p. 15–31, 2013.
- BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011.
- CATANA, R. et al. Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 260–266, 2007.

- CAVALCANTE, R. S.; DA SILVA, C. E. M. Effects of sucrose reduction on the structural characteristics of sponge cake. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 46, n. 4, p. 718–723, 2015.
- CHAPLIN, M.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- CHEN, C. C.; GU, Y. Enhancing the sensitivity and stability of HRP/PANI/Pt electrode by implanted bovine serum albumin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 6, p. 765–770, 2008.
- CHEN, W. C.; LIU, C. H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 2, p. 153–160, 1996.
- CHIBATA, I. July 1979 vol 7 no 3 Immobilized Enzymes Research and Development. v. 7, n. 3, p. 1979, 1979.
- CLARK, D. S.; BLANCH, H. W. **Biochemical Engineering**. 2nd. ed. [s.l.] CRC Press, 1997.
- CONG, S. Properties of polylactic acid fiber based polymers and their correlation with composition. **Proceedings of 2007 International Conference on Advanced Fibers and Polymer Materials, ICAFP 2007**, v. 1, p. 8–11, 2007.
- CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, n. 11, p. 353–361, 1996.
- CUNHA, J. **Produção E Caracterização Da Enzima Frutossiltransferase De *Aspergillus oryzae* IPT-301 Visando A Obtenção De Frutooligossacarídeos**. p. 13–14, 2017.
- CUNHA, J. S. et al. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *aspergillus oryzae* ipt-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 657–668, 2019.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.
- DE LA NUEZ VEULENS, A.; RODRÍGUEZ, R. Biotecnología aplicada. **Biotecnología Aplicada**, v. 26, n. 1, p. 24–33, 2009.
- DE 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. 150, p. 922–929, 2020.
- DI, Y. et al. Reactively modified poly (lactic acid): Properties and foam processing. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 290, n. 11, p. 1083–1090, 2005.
- DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. New York: [s.n.].

DRABINSKA, N.; KRUPA-KOZAK, U.; JAROCKA-CYRTA, E. Intestinal Permeability in Children with Celiac Disease after the Administration of Oligofructose-Enriched Inulin into a Gluten-Free Diet—Results of a Randomized, Placebo-Controlled, Pilot Trial. **Nutrients**, v. 12, n. 1736, 2020.

FANG, Y. F. et al. Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors. **BMB Reports**, v. 44, n. 2, p. 87–95, 2011.

FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 367–392, 2016.

FARIA, L. L. **Imobilização Da Enzima Frutossiltransferase Extracelular De Aspergillus oryzae IPT-301 Em Sílica-Gel Para Produção De Frutooligosacarídeos**. 2019.

FARIA, L. L. et al. Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, v. 43, n. 1, p. 43–59, 2021.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. **Processos Químicos**, p. 53–58, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 7, p. 546–550, 1993.

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

FERREIRA, I. E. P.; TRINCA, L. A.; FERREIRA, C. P. Delineamentos experimentais eficientes para estudos de cinética química. **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 589–596, 2014.

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

FLAMM, G. et al. Inulin and oligofructose as dietary fiber: A review of the evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 5, p. 353–362, 2001.

FORTES, R. C.; MUNIZ, L. B. Efeitos da suplementação dietética com frutooligosacarídeos e inulina no organismo humano : estudo baseado em evidências. **Ciência Saúde**, v. 20, n. 3, p. 241–252, 2010.

FRAGA, T. P.; MENDES, T. D. **Guia prático para caracterização de enzimas**. Embrapa, p. 58, 2021.

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

GANAI, 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, K. C. et al. Nanofibras poliméricas produzidas através do processo de eletrofição para imobilização de enzimas. Formação, Conhecimento e Inovação - UFRGS2012. **Anais...**2012.

GARCIA, L. A. et al. Synthesis and characterization of a novel silica-niobia support for the immobilization of microbial fructosyltransferase aiming at fructooligosaccharides production. **Materials Today Communications**, v. 31, n. December 2021, 2022.

GARCIA, R. L. et al. Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 2, p. 273–285, 2021.

GARLOTTA, D. A Literature Review of Poly (Lactic Acid) A Literature Review of Poly (Lactic Acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, n. 2, p. 63–84, 2019.

GHAZI, I. et al. Beet sugar syrup and molasses as low-cost feedstock for the enzymatic production of fructo-oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2964–2968, 2006.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 259–275, 2004.

GONÇALVES, H. 'Beta'-D-frutofuranosidases de *Fusarium graminearum*: produção, purificação, imobilização e determinação das propriedades bioquímicas de enzimas solúveis e secas em Spray dryer. **Anais ...** 2013.

GONÇALVES, M. C. P. et al. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, v. 76, n. October 2018, p. 95–110, 2019.

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

GOTO, K. et al. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 12, p. 2346–2347, 1995.

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

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

IZIDORO, B. F.; PAULA, A. V. DE. Modificação De Suportes De Poli (Ácido Láctico) Obtidos Por Impressora 3D Para Imobilização De Lipase De *Rhizopus Oryzae*. COBEQ-2019. **Anais...**2019.

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

KHUENPET, K. et al. Effect of pretreatments on quality of Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber powder and inulin extraction. **Transactions of the ASABE**, v. 58, n. 6, p. 1873–1884, 2015.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 241–246, 2001.

KORETSKY, M. D. **Termodinâmica para Engenharia**. [s.l: s.n.].

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.

LASKIN, A. I. **Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology**. THE BENJAM ed. California: [s.n.].

LASPRILLA, A. J. R. et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 321–328, 2012.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; GUISÁN, J. M.; BETANCOR, L. **Glutaraldehyde-mediated protein immobilization**. [s.l: s.n.]. v. 1051

MAESTRELLI, S. C. et al. **Estudo de caracterização de argilas não plásticas da região de Poços de Caldas , MG (Study of the characterization of non-plastic clays from. Cerâmica. Anais...**2013.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS.** , 2013.

MATTE, C. R. et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by different techniques on Immobead 150 support: Characterization and applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2507–2520, 2014.

MATUMOTO-PINTRO, P. T.; SILVA, D. F. Alimentos funcionais. **Ciências Agrárias: Tecnologias e Perspectivas**, p. 257–271, 2015.

MAXIMIZE MARKET RESEARCH. **Fructo-Oligosaccharides (FOS) Market: Industry Analysis and Forecast (2021-2027) by Source, Form, Application, and Region**. Disponível em: <<https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/fructo-oligosaccharides-fos-market/123240/>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

MCKEEN, L. W. **Plastics Used in Medical Devices**. [S.l.] Elsevier Inc., 2014.

- MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011a.
- MENDES, A. A. et al. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: Influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055–1066, 2011b.
- MUTANDA, T. et al. Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: Recent advances and current perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 893–906, 2014.
- NC-IUBMB. **Enzyme Nomenclature - Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse**. Disponível em: <<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- NGUYEN, H. L. et al. Characterisation of enzyme catalysed hydrolysis stage of poly(lactic acid) fibre surface by nanoscale thermal analysis: New mechanistic insight. **Materials & Design**, v. 219, p. 110810, 2022.
- OTTONI, C. A. et al. Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 49–59, 2012.
- PAPADAKI, E. et al. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. **Bioresource Technology**, v. 309, n. April, p. 123317, 2020.
- PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385–390, 2003.
- PEREIRA, M. G. et al. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 561–570, 2015.
- PEREIRA, R. S. Mestrado em Imobilização Da Enzima Frutossiltransferase Extracelular De *Aspergillus oryzae* IPT-301 Em Sabugo De Milho Para A Produção De Fruto-Oligossacarídeos. 2021.
- 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, n. 1, p. 66–76, 2017.
- PRADO, J. P.. Imobilização Da Enzima Frutossiltransferase Extracelular De *Aspergillus oryzae* IPT-301 Em Sílica Gel Pura E Funcionalizada Para Produção De Frutooligosacarídeos. [s.l: s.n.].
- PUNEKAR, N. S. **ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms**. [s.l: s.n.].

RABELO, L.H. et al. Development and Characterization of PLA Composites with High Clay Contents of a Brazilian Refractory Clay and Improved Fire Performance. **Materials Research**, v.25, 10.1590/1980-5373-mr-2021-0444.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. Functional Oligosaccharides: Production and Action. **ACS Symposium Series**, v. 1329, p. 155–180, 2019.

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

RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly(lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 35, n. 3, p. 338–356, 2010.

REMONATTO, D. et al. Utilization of clay materials as support for *aspergillus japonicus* lipase: An eco-friendly approach. **Catalysts**, v. 11, n. 10, p. 1–17, 2021.

RIGO, D. et al. Produção Microbiológica De Enzimas: Uma Revisão/Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9232–9254, 2021.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, 2007.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3^a Edição ed. [s.l: s.n.].

ROSEVEAR, A. Immobilised Biocatalysts - a Critical Review. **Journal of chemical technology and biotechnology. Biotechnology**, v. 34 B, n. 3, p. 127–150, 1984.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 6, p. 717–723, 1987.

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

SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 573–579, 2006.

SANTOS-MORIANO, P. et al. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 119, p. 18–25, 2015.

SANTOS, P. S.; SANTOS, H. S. Ciência e tecnologia de argilas. **E. Blucher**, v. 1, 1989.

- 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, n. 5, p. 641–646, 2010.
- SCHÜÜRMAN, J. et al. Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 19, p. 8031–8046, 2014.
- SERBAN, D. E. Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. **Cancer Letters**, v. 345, n. 2, p. 258–270, 2014.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591, 1965.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. [s.l: s.n.]. v. 22
- SILVA, M. B. P. DE O. et al. Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p. 1–11, 2021.
- SILVA, M. C. T. S. et al. **Coatings Used In Magnetic Nanoparticles For Enzyme Immobilization: A Revision**. Ciagro2020. **Anais...2020**.
- SILVA, T.; POLIZELI, M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. , 2009.
- SILVERSTEIN, R. M. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th ed. ed. New York: [s.n.].
- SINGH, R. S.; SINGH, R. P. Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 435–450, 2010.
- SINGLA, P. et al. Microwave assisted synthesis of poly(lactic acid) and its characterization using size exclusion chromatography. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 963–970, 2012.
- SONG, J. E. et al. Covalent immobilization of enzyme on aminated woven poly (lactic acid) via ammonia plasma: evaluation of the optimum immobilization conditions. **Textile Research Journal**, v. 87, n. 10, p. 1177–1191, 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.
- TANRISEVEN, A.; ASLAN, Y. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 550–554, 2005.
- VASCONCELOS, N. M. DE; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. DE S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos.

Boletim de Pesquisa Número 88 - Embrapa, p. 1–16, 2013.

WEISS, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **The FASEB Journal**, v. 7, n. C, p. 135–149, 1997.

WELTI-CHANES, J. et al. Enzymatic Processes of Dietary Fibers. In: **Science and Technology of Fibers in Food Systems. Food Engineering Series**. © Springer ed. [s.l: s.n.]. p. 301–327.

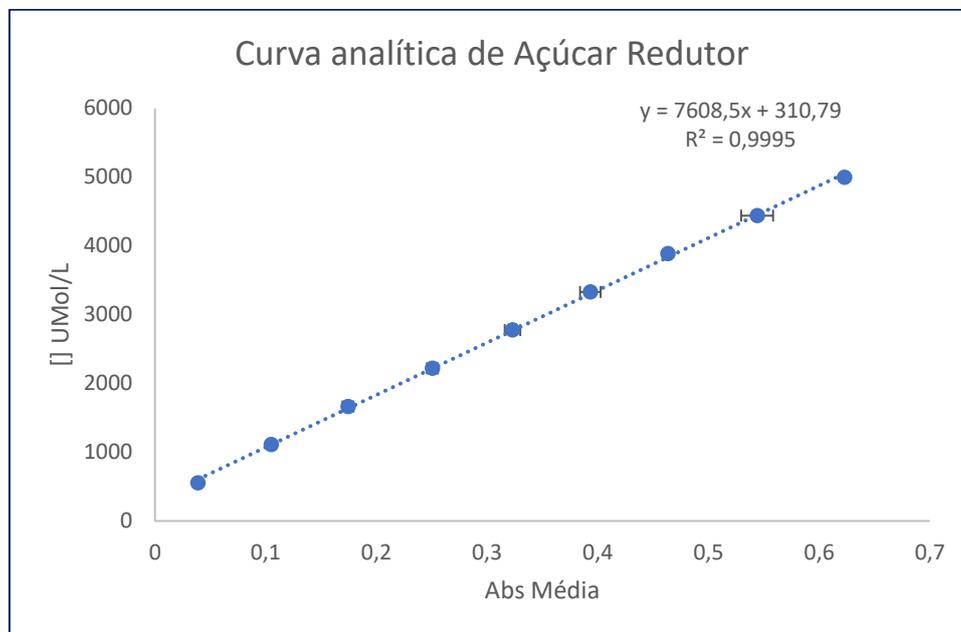
WONG, C. M.; WONG, K. H.; CHEN, X. D. Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 927–938, 2008.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 2, p. 107–117, 1996.

YUN, J. W.; SONG, S. K. Continuous production of fructooligosaccharides using fructosyltransferase immobilized on ion exchange resin. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 1996.

APENDICE A - Curva Analítica para Determinação de Açúcar Redutor

Figura 23 - Curva analítica obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicífico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR).



Fonte: do Autor.