

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MARIANA FERREIRA MARTINS CARDOSO**

**IMPLEMENTAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO EMPACOTADO COM  
CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT - 301 IMOBILIZADAS EM ESPONJA DE  
POLIURETANO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE FRUTO-  
OLIGOSSACARÍDEOS**

**POÇOS DE CALDAS/MG**

**2023**

**MARIANA FERREIRA MARTINS CARDOSO**

**IMPLEMENTAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO EMPACOTADO COM  
CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT - 301 IMOBILIZADAS EM ESPONJA DE  
POLIURETANO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE FRUTO-  
OLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Engenharia  
Química pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna  
Coorientador: Prof. Dr. Sergio A.V. Morales

**POÇOS DE CALDAS/MG**

**2023**

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

Cardoso, Mariana Ferreira Martins .

Implementação de reator de leito fixo empacotado com células de *Aspergillus oryzae* IPT - 301 imobilizadas em esponja de poliuretano para a produção enzimática de fruto-oligossacarídeos / Mariana Ferreira Martins Cardoso. - Poços de Caldas, MG, 2023.

65 f. : il. -

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.

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

Bibliografia.

1. Prebióticos. 2. Células imobilizadas. 3. Esponja de poliuretano. 4. Reator de leito fixo. I. Perna, Rafael Firmani, orient. II. Título.

MARIANA FERREIRA MARTINS CARDOSO

**IMPLEMENTAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO EMPACOTADO COM CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae*  
IPT-301 IMOBILIZADAS EM ESPONJA DE POLIURETANO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE  
FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

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

Aprovada em: 15/12/2023

Prof. Dr. Rafael Firmani Perna  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

Dra. Sara Isabel da Cruz Silvério  
Instituição: Universidade do Minho

Profa. Dra. Michelle da Cunha Abreu Xavier  
Instituição: Universidade Federal do Tocantins



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior**, em 15/12/2023, às 12:59, 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.unifalmg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifalmg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1154355** e o código CRC **415D8F50**. Folha de Aprovecao 1154355 SEI 23087.022021/2023-73 / pg. 1

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à espiritualidade que me rege por me conceder saúde e resiliência para seguir a caminhada.

À minha mãe, Luzia Ferreira, meu irmão, Walter Cardoso, meu companheiro Guilherme Azevedo e meu filho Francisco Ferreira pelo incentivo e apoio.

Ao meu pai Luiz Eduardo e minha avó Derci *in memoriam*.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, pela oportunidade concedida, pela sabedoria compartilhada, pela paciência e por todo o conhecimento transmitido.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales, pelas orientações, apoios e sabedoria.

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

Aos amigos e parceiros de pesquisa, em especial a Nathália, Jardel, Guilherme, Giancarlo e Leandro, que sempre me apoiaram, auxiliaram e trocaram experiências e pela amizade e companheirismo que surgiram no decorrer desta trajetória.

Às alunas de Iniciação Científica, Paula e Eva, por todo o auxílio prestado na realização dos experimentos.

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

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

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

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

## RESUMO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) possuem uma ampla gama de aplicações na indústria alimentícia devido às suas propriedades fisiológicas e funcionais. Sua produção ocorre por reação de transfrutoseilação em moléculas de sacarose catalisadas por enzimas frutotransferases (FTase, E.C.2.4.1.9) aderidas às células microbianas. A imobilização de células em materiais de suporte permite obter biocatalisadores heterogêneos robustos e resistentes às condições adversas do meio reacional. Esponjas de poliuretano (EPU) são suportes indicados para a imobilização por apresentarem estabilidades térmica e mecânica, além de tamanho e distribuição de poros que possibilitam a difusão gasosa e de substrato, essenciais para o crescimento microbiano. Atualmente, a produção de FOS é conduzida em biorreatores batelada, um processo lento e oneroso. Portanto, torna-se necessário a implementação de sistemas reacionais contínuos, em reatores de leito fixo (PBR) que aumentem o volume de produção de FOS e diminuam seus custos operacionais. Diante disso, este trabalho propôs implementar um sistema reacional contínuo para a produção de FOS em reator PBR a partir de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU, utilizando sacarose comercial como substrato, com fluxo de alimentação ascendente. Para isso, o reator foi empacotado com as células microbianas cultivadas e concomitantemente imobilizadas, por processo batelada, em matrizes cúbicas de EPU utilizando meio de cultura sintético, pH 5,5, 200 rpm, 30 °C por 32 h. Para o processo contínuo, foram avaliados a influência da vazão volumétrica (1,0 mL.min<sup>-1</sup> a 10,0 mL.min<sup>-1</sup>), concentração de substrato (200 g.L<sup>-1</sup> a 600 g.L<sup>-1</sup>), temperatura do meio reacional (30 °C a 60 °C) e massa do leito biocatalítico nos perfis de atividade de transfrutoseilação ( $A_T$ ). Por fim, foram realizados estudos de estabilidade operacional com e sem reciclo no reator PBR por 12 h de reação. A condição operacional que proporcionou os maiores valores de  $A_T$  utilizando a concentração de sacarose de 400 g.L<sup>-1</sup>, para a reação enzimática conduzida a 50 °C, pH 5,5 com o reator empacotado com 0,8 g de células microbianas imobilizadas. Contudo, a mesma apresentou sobrecarga operacional, sendo escolhida a vazão de 1mL.min<sup>-1</sup> para os ensaios subsequentes. Os resultados de estabilidade operacional mostraram valores de  $A_T$  elevados e estáveis ao decorrer da reação, alcançando-se produtividades de FOS iguais a 115,0 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 5,0 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> no reator operado com e sem corrente de reciclo, respectivamente. Os resultados mostraram que a implementação de um sistema reacional contínuo pode se tornar promissor para a síntese enzimática de FOS.

Palavras-chave: prebióticos; células imobilizadas; esponja de poliuretano; reator de leito fixo.

## ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) have a wide range of applications in the food industry due to their physiological and functional properties. Its production occurs through a transfructosylation reaction in sucrose molecules catalyzed by fructosyltransferase enzymes (FTase, E.C.2.4.1.9) adhered to microbial cells. The immobilization of cells on support materials allows obtaining heterogeneous biocatalysts that are robust and resistant to adverse conditions in the reaction medium. Polyurethane sponges (EPU) are supports recommended for immobilization as they have thermal and mechanical stability, in addition to the size and distribution of pores that enable gaseous and substrate diffusion, essential for microbial growth. Currently, FOS production is conducted in batch bioreactors, a slow and costly process. Therefore, it is necessary to implement continuous reaction systems in fixed bed reactors (PBR) that increase the FOS production volume and reduce operating costs. Therefore, this work proposed to implement a continuous reaction system to produce FOS in a PBR reactor from *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells immobilized in EPU, using commercial sucrose as substrate, with an upward feed flow. For this, the reactor was packed with the microbial cells cultivated and concomitantly immobilized, by batch process, in cubic EPU matrices using synthetic culture medium, pH 5.5, 200 rpm, 30 °C for 32 h. For the continuous process, the influence of volumetric flow rate (1.0 mL.min<sup>-1</sup> to 10.0 mL.min<sup>-1</sup>), substrate concentration (200 g.L<sup>-1</sup> to 600 g.L<sup>-1</sup>), medium temperature was evaluated. reaction (30 °C to 60 °C) and biocatalytic bed mass in the transfructosylation (TA) activity profiles. Finally, operational stability studies were carried out with and without recycle in the PBR reactor for 12 h of reaction. The operating condition that provided the highest AT values used a sucrose concentration of 400 g.L<sup>-1</sup>, flow rate of 10 mL.min<sup>-1</sup> for the enzymatic reaction conducted at 50 °C, pH 5.5 with the reactor packed with 0.8 g of immobilized microbial cells. The operational stability results showed high and stable AT values throughout the reaction, reaching FOS productivities equal to 115.0 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and 5.0 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in the reactor operated with and without recycle current, respectively. The results showed that the implementation of a continuous reaction system can be promising for the enzymatic synthesis of FOS.

Keywords: prebiotics; immobilized cells; polyurethane sponge; packed bed reactor.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Moléculas de sacarose, kestose, nistose e $\beta$ -frutofuranosilnistose.....	16
Figura 2 – Técnicas de imobilização celular.....	21
Figura 3 – Reator PBR com fluxo ascendente.....	24
Figura 4 – Primeira etapa da metodologia experimental – obtenção do biocatalisador heterogêneo por cultivo celular submerso.....	29
Figura 5 – Avaliação dos efeitos biocatalíticos nos perfis de atividade do biocatalisador heterogêneo em reator de leito fixo.....	30
Figura 6 – Produto e processo de corte das esponjas para utilização no reator de leito fixo.....	31
Figura 7 – Cubos de EPU contendo células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas durante o cultivo celular. Condições experimentais: o cultivo e a imobilização celular foram realizados concomitantemente em meio de cultura sintético pH 5,5, 200 rpm, 30 °C por 32 horas.....	33
Figura 8 – Reator enzimático e suas dimensões.....	34
Figura 9 – Aparato experimental do sistema reacional contínuo.....	35
Figura 10 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura da esponja de poliuretano antes e depois do cultivo celular.....	41
Figura 11 – Atividade de transfrutossilção em função da vazão volumétrica de alimentação de substrato no reator PBR. ( $\square$ ) 1 mL.min <sup>-1</sup> , ( $\bullet$ ) 4 mL.min <sup>-1</sup> , ( $\Delta$ ) 07 mL.min <sup>-1</sup> , ( $\blacktriangledown$ ) 10 mL.min <sup>-1</sup> . Condições operacionais: reator PBR alimentado com solução de sacarose.....	42
Figura 12 – Atividade de transfrutossilção em função da concentração de sacarose. Concentrações ( $\blacksquare$ ) 200g/L, ( $\bullet$ ) 300 g/L, ( $\blacktriangle$ ) 400 g/L, ( $\blacktriangledown$ ) 480 g/L e ( $\blacktriangleright$ )600 g/L. Condições operacionais: reator PBR alimentado com solução de sacarose, pH 5,5, a uma vazão volumétrica de 1 mL.min <sup>-1</sup> e temperatura de 50°C por 60 minutos de reação.....	45
Figura 13 – Perfis de atividade de transfrutossilção em função da temperatura do meio reacional. Temperaturas: ( $\blacksquare$ ) 30°C, ( $\bullet$ ) 40°C, ( $\blacktriangle$ ) 50°C e ( $\blacktriangledown$ )	



	60°C. Condições operacionais: reator PBR alimentado com solução de sacarose 400 g L <sup>-1</sup> , pH 5,5, a uma vazão volumétrica de 1 mL.min <sup>-1</sup> durante 60 min de reação.....	47
Figura 14 –	Influência da massa do leito biocatalítico na atividade de transfrutossilação. 60 min (barra tracejada) e 120 min (barra linha contínua), ambos no estado estacionário.....	48
Figura 15 –	Ensaio de estabilidade operacional sem reciclo. Perfil de atividade de transfrutossilação (◀) e quantificação de fruto-oligossacarídeos (barra sem preenchimento) e glicose (barra cinza) .....	50
Figura 16 –	Ensaio de estabilidade operacional com reciclo de substrato. Perfil de atividade de transfrutossilação (▶) e quantificação de fruto-oligossacarídeos (barra sem preenchimento) e glicose (barra cinza).	51
Figura 17 –	Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR).....	65

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS).....	15
<b>3.1.1</b>	<b>Estrutura química e classificação.....</b>	<b>15</b>
3.2	SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSARÍDEOS.....	16
3.3	ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE (FTASE).....	17
3.4	ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO .....	18
3.5	IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS E DE ENZIMAS FRUTOSILTRANSFERASES PARA A PRODUÇÃO DE FOS.....	19
3.6	IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS E CARACTERÍSTICAS DOS MATERIAS DE SUPORTE.....	21
3.7	ESPONJA DE POLIURETANO.....	22
3.8	REATORES DE LEITO FIXO .....	23
3.9	REATORES DE LEITO FIXO PARA PRODUÇÃO DE FOS .....	24
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
4.1	PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO .....	30
<b>4.1.1</b>	<b>Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Pré-tratamento do material de suporte .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Preparo do meio de cultura .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Produção e imobilização das células microbianas.....</b>	<b>32</b>
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO BIOCATALISADOR .....	33
4.3	APLICAÇÃO DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO EM REATOR DE LEITO FIXO.....	34
<b>4.3.1</b>	<b>Especificação do reator PBR e montagem do aparato experimental .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Ensaio de atividade enzimática em reator PBR .....</b>	<b>35</b>
4.3.2.1	Influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutosilação.....	35
4.3.2.2	Influência da concentração de substrato na atividade de transfrutosilação .....	36
4.3.2.3	Influência da temperatura do meio reacional na atividade de transfrutosilação.....	36
4.3.2.4	Influência da massa do leito biocatalítico na atividade enzimática.....	36

4.3.2.5	Ensaio de estabilidade operacional .....	36
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	37
<b>4.4.1</b>	<b>Determinação das atividades enzimáticas de transfrutose</b> .....	<b>37</b>
4.4.1.1	Determinação da concentração de açúcares redutores .....	38
4.4.1.2	Determinação da concentração de glicose .....	38
<b>4.4.2</b>	<b>Determinação da massa seca das células microbianas imobilizadas</b> .....	<b>39</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Quantificação de açúcares e fruto-oligosacarídeos</b> .....	<b>39</b>
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV .....	41
5.2	INFLUÊNCIA DA VAZÃO VOLUMÉTRICA DE ALIMENTAÇÃO NOS PERFIS DE ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO .....	42
5.3	INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO .....	44
5.4	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA REACIONAL NOS PERFIS DE ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO .....	46
5.5	INFLUÊNCIA DA MASSA DO LEITO CATALÍTICO NA ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO .....	48
5.6	ENSAIOS DE ESTABILIDADE OPERACIONAL .....	49
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
	<b>APÊNDICE A - CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PELO MÉTODO DNS</b>	<b>63</b>
	<b>APÊNDICE B - IMAGENS DOS TESTES DE TUKEY RETIRADOS DO SOFTWARE PAST4PROJECT</b> .....	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os prebióticos são ingredientes alimentares utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros conferindo um benefício à saúde (Gibson *et al.*, 2017). Diante da expoente demanda por prebióticos-oligossacarídeos (PO) dietéticos, para produção de alimentos funcionais, os fruto-oligossacarídeos (FOS) têm representado bem essa classe de açúcares nutracêuticos e, portanto, mostrado maior relevância industrial para a saúde e nutrição humana e animal (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Gonçalves *et al.*, 2020).

Os FOS são oligômeros de frutose constituídos, principalmente, por kestose, nistose e  $\beta$ -frutofuranosilnistose (Correa *et al.*, 2024; Maiorano *et al.*, 2020). Esses açúcares, de baixa caloria, têm se destacado como um ingrediente alimentar promissor (Correa *et al.*, 2024; Maiorano *et al.*, 2020), estimulando a proliferação de bactérias probióticas no intestino humano, ampliando a resposta imune, favorecendo a absorção de cálcio e magnésio, auxiliando a redução dos níveis de colesterol, além de apresentar propriedades como baixa caloria e não cariogenicidade. (Correa *et al.*, 2024; Cunha *et al.*, 2019; Jitonnom; Ketudat-Cairns; Hannongbua, 2018; Li *et al.*, 2017).

Para atender à crescente demanda do mercado global por FOS, a indústria necessita atingir sua produção em larga escala e a baixo custo (Li *et al.*, 2021). No entanto, as estratégias atuais para melhorar a produção de FOS ainda dependem do desenvolvimento e aperfeiçoamento do processo produtivo. Por mais de 30 anos, a biossíntese industrial de FOS tem sido um processo de produção de grande interesse como observado a partir de mais de 3.000 estudos de pesquisa e das mais de 965 patentes depositadas na PATENTSCOPE®, portal mantido pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI) (Sánchez-Martínez, 2020).

A principal rota de produção comercial de FOS ocorre por meio da reação de transfrutossilacção de moléculas de sacarose, catalisadas por enzimas de origem microbiana como as frutossiltransferases (FTase, EC 2.4.1.9), as quais exibem elevada atividade (Dias *et al.*, 2022; Flores-Maltos *et al.*, 2014; Perna *et al.*, 2018; Ribeiro, 2023). As FTases são sintetizadas, majoritariamente, por fungos podendo ser secretadas para o meio de cultura (FTase extracelular) e/ou aderidas na parede celular do microrganismo (FTase micelial). Especificamente, o *Aspergillus oryzae* IPT-301 tem sido reportado como fonte potencialmente produtora de ambas as FTases, com elevada atividade de transfrutossilacção, dentre diversas linhagens de fungos filamentosos avaliadas (Cuervo-Fernandez *et al.*, 2007).

A abundância de matéria-prima, o alto valor agregado ao produto de interesse (FOS), comercializado a € 150/kg e, principalmente, o potencial de mercado mundial de FOS, estimado em U\$ 344 milhões com perspectiva de crescimento de 13,1 % entre os anos de 2020 e 2024, tornam a produção industrial atrativa para essa classe de açúcares com propriedades nutracêuticas (Choukade; Kango, 2021; Mordor Intelligence, 2017). No entanto, a produção de FOS a partir de FTases extracelulares pode gerar altos custos de síntese, purificação e recuperação da enzima, instabilidade da sua estrutura tridimensional e contaminação do produto desejado (Souza *et al.*, 2017). FTase na produção comercial o reaproveitamento é escasso e o custo de produção da enzima é alto, tornando a produção de FOS economicamente inviável. (Gonçalves *et al.*, 2020).

Diante disso, a aplicação de células microbianas imobilizadas e com atividade biocatalítica tem sido considerada a técnica mais promissora para tornar competitiva a aplicação de enzimas no setor industrial (Souza *et al.*, 2017). A imobilização consiste em confinar/aderir, física ou quimicamente, a célula microbiana a um suporte sólido insolúvel e inerte em meio aquoso ou solvente orgânico, obtendo-se um biocatalisador heterogêneo com elevada atividade, especificidade, seletividade, estabilidade e com potencial aplicação para implementar e conduzir processos nos modos batelada e contínuo (Gonçalves *et al.*, 2020; Lorenzoni *et al.*, 2015; Ribeiro, 2023; Zambelli *et al.*, 2016).

Entre os diversos suportes reportados na literatura, a esponja de poliuretano (EPU) tem sido identificada como suporte orgânico promissor no processo de imobilização de células microbianas (Castro; Sato, 2014; Martinez *et al.*, 2015; Varesche *et al.*, 2021). As EPUs apresentam baixo custo, elevada área específica com interstícios para o crescimento celular, porosidade uniforme que possibilita a difusão gasosa, o fluxo de substrato e produtos metabólicos, boas estabilidades mecânica, térmica e biológica e resistência à degradação enzimática (Soares, 2012).

As células microbianas, especificamente de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em EPU, podem ser utilizadas para a implementação de um sistema de produção contínua de FOS, principalmente em reatores de leito fixo (PBR), os quais proporcionam maior contato efetivo entre o substrato e o biocatalisador, assim como um sistema de escoamento mais facilmente controlável em comparação a biorreatores de leito fluidizado (Fogler, 2012). Entretanto, o biorreator PBR deve ser operado de modo a diminuir as limitações difusionais e a presença de caminhos preferenciais e/ou volumes mortos, visando a maximizar a produção de FOS. Ao reduzir as limitações difusionais no leito biocatalítico, garante-se que o acesso das moléculas de sacarose até as FTases miceliais, aderidas às células microbianas imobilizadas, seja rápido e

eficiente, maximizando a atividade enzimática de transfrutossilacão. Também, ao eliminar caminhos preferenciais ou volumes mortos, evitam-se desperdícios do volume útil do PBR causados pelo escoamento não ideal, no qual os volumes de fluido alimentados permaneçam durante diferentes tempos de residência no biorreator (Doran, 1995; Fogler, 2012).

Poucos são os estudos reportados na literatura voltados à produção contínua de FOS e empregando reatores PBR, sendo que os mesmos utilizam vazões volumétricas consideravelmente baixas, da ordem de  $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , resultado em tempos de residência comparáveis aos processos em batelada (Lorenzoni *et al.*, 2015). Dias *et al.* (2022) avaliaram o uso de células de *A. oryzae* IPT-301 como biocatalisadores para a reação de transfrutossilacão de sacarose em reator PBR com solução de sacarose de  $473 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5,5, a uma vazão volumétrica de  $11,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Ribeiro (2023) reportou valores máximos de atividade de transfrutossilacão para um reator PBR recheado com células de *A. oryzae* IPT-301 reticuladas com glutaraldeído. O sistema reacional contínuo foi operado a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , alimentando-se o reator, em fluxo ascendente, com solução de sacarose  $473 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5,5 a uma vazão de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Neste sentido, o presente estudo propôs implementar um sistema de reação contínua em um reator PBR empacotado com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em cubos de EPU (biocatalisador heterogêneo), visando obter elevada atividade de transfrutossilacão para a síntese de FOS.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Implementar um sistema reacional contínuo em reator de leito fixo (PBR), empacotado com células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, imobilizadas em cubos de esponja de poliuretano, visando obter elevada atividade de transfrutossilação para a síntese enzimática de FOS.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir células microbianas, com atividade catalítica, por cultivo celular submerso em meio de cultura sintético e imobilizá-las, concomitantemente, em estruturas cúbicas de esponja de poliuretano (EPU) a partir de condições experimentais estabelecidas;
- b) Caracterizar o suporte de EPU, na ausência e presença de células microbianas imobilizadas, por microscopia eletrônica de varredura.
- c) Avaliar a influência dos parâmetros operacionais, (i) vazão volumétrica de alimentação; concentração de substrato, (ii) temperatura do meio reacional e (iii) massa do leito biocatalítico nos perfis de atividade de transfrutossilação para o sistema reacional contínuo;
- d) Avaliar a estabilidade operacional do sistema reacional contínuo, com e sem reciclo, por meio do monitoramento dos perfis de atividade de transfrutossilação.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose com grau de polimerização variando entre 2 e 10, ou seja, oligossacarídeos de cadeia curta, que consistem em uma molécula de sacarose alongada por uma cadeia de unidades de frutossil, conectadas por meio de ligações glicosídicas, possuindo a estrutura genérica  $GF_n$  (em que G se refere à molécula de glicose, F de frutose e  $n$  ao número de unidades do grupo frutossil), cujo comprimento da cadeia, a presença da ligação do tipo  $\beta$  e as possíveis ramificações tornam estes compostos resistentes à hidrólise por enzimas digestivas no trato intestinal superior e, conseqüentemente, são classificados como fibras solúveis (Cunha *et al.*, 2019; Niness, 1999; Yun, 1996).

Os FOS são constituídos principalmente por kestose, nistose e  $\beta$ -frutofuranosilnistose (Ganaie *et al.*, 2014). Esses açúcares, de baixa caloria, são classificados como prebióticos, não são cariogênicos, podem ser consumidos seguramente por diabéticos, aumentam a absorção de cálcio e magnésio pelo organismo humano e, por não serem hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais, promovem a seletividade bacteriana na microbiota intestinal, auxiliando na eliminação de microrganismos patogênicos e na prevenção do câncer de cólon (Jitonnom; Ketudat-Cairns; Hannongbua, 2018; Prado, 2021; Zhang *et al.*, 2017).

Os FOS são higroscópicos e possuem elevada estabilidade térmica (Flores-Maltos *et al.*, 2016). A doçura dos FOS é cerca de 40 % a 60% à da sacarose e sua viscosidade é maior quando são comparadas à mesma concentração. Essas propriedades os tornam um potencial adoçante alternativo para o mercado alimentício (Antošová; Polakovič, 2001; Dias *et al.*, 2022; Ganaie *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2016).

Novas regulamentações de alimentos que recomendam a eliminação de diferentes aditivos químicos nas preparações de alimentos despertam o interesse no uso de FOS como conservantes naturais e adoçantes de baixa caloria, com base em sua relação custo-benefício e propriedades superiores (Romano *et al.*, 2016).

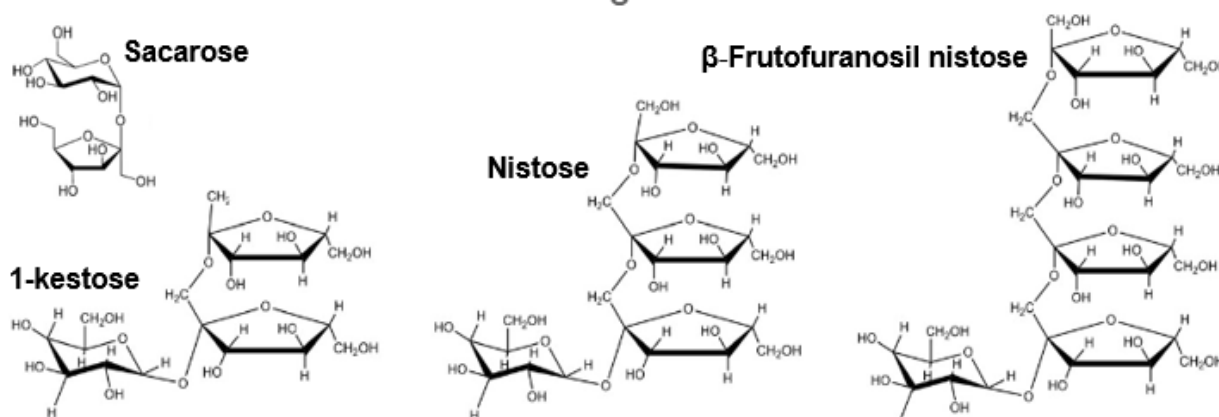
##### 3.1.1 Estrutura Química e Classificação



Os FOS são constituídos por dois a dez monômeros de sacarídeos, pertencentes ao grupo frutanos, compostos por duas a nove unidades de frutose, que estão ligadas através de ligações glicosídicas  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) e a ligação com a glicose é do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2), como ocorre na sacarose (Nascimento *et al.*, 2014).

São oligômeros de frutose, compostos por 1-kestose (GF<sub>2</sub>), nistose (GF<sub>3</sub>) e frutofuranosilnistose (GF<sub>4</sub>), cujas unidades frutose (F) são ligadas na posição  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) da molécula de sacarose, diferenciando-o assim de outros oligômeros (Flores-Maltos *et al.*, 2016), conforme apresentados na Figura 1.

**Figura 1** – Moléculas de sacarose, kestose, nistose e  $\beta$ -frutofuranosilnistose



Fonte: Adaptado de Flores-Maltos *et al.* (2016).

### 3.2 SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSARÍDEOS

Os FOS ocorrem naturalmente em diversos alimentos, nas quais se destacam a alcachofra, cebola, alho, trigo, aspargos, banana e alho-poró, beterraba, chicória, tomate, trigo e batata yacon em baixas concentrações (Maiorano *et al.*, 2008; Mutanda *et al.*, 2014; Spiegel; Rose; Karabell, 1994; Yun, 1996).

Para atender a demanda de mercado, o uso de plantas visando a produção de FOS em larga escala não é viável, pois a maioria contém somente traços desses frutanos, além de dependerem de condições sazonais. A produção de FOS em escala industrial, geralmente é realizada por enzimas solúveis em reações em batelada ou por enzimas imobilizadas em reatores contínuos de leito fixo (Chen; Liu, 1996; Dias *et al.*, 2022; Yun, 1996; ZAMBELLI *et al.*, 2016).

Estudos reportados por Mutanda *et al.* (2014) indicaram que os FOS podem ser produzidos enzimaticamente a partir do alongamento da molécula de sacarose mediante ação de enzimas com atividade de transferência dos grupos frutossil ou por meio da hidrólise enzimática da inulina por exoinulinases e endoinulinases atuando sozinhas ou sinergicamente. Em ambos os casos, quantidades de frutose e glicose são formados como subprodutos (Antošová; Polakovič, 2001).

Os FOS são produzidos pela ação das enzimas frutossiltransferases (Ftases) que atuam na sacarose clivando a ligação  $\beta(2\rightarrow1)$ , liberando glicose e, em seguida, transferindo o grupo frutossila para uma molécula aceitadora. (Blanch; Clark, 2011).

Essas enzimas podem ser produzidas por fungos *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sydowi*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium rugulosum* e *Scopulariopsis brevicaulis*, por levedura *Saccharomyces cerevisiae* e por bactéria *Bacillus macerans* (Antosová; Polakovic, 2001).

Dentre os possíveis microrganismos produtores de frutossiltransferases, o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 se destaca como o mais promissor para a produção da enzima em escala industrial (Cuervo-Fernandez *et al.*, 2007; Maiorano *et al.*, 2020; Perna *et al.*, 2018).

### 3.3 ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE (FTASE)

O uso de enzimas na produção de fruto-oligossacarídeos é frequentemente preferido devido à sua alta especificidade e ao fato de que este processo gera menos resíduos e produtos indesejados (Sánchez-Martínez *et al.*, 2020).

A síntese enzimática de FOS a partir de sacarose pode ser alcançada usando enzimas com atividade de transfrutossilção, como frutossiltransferases (FTase, EC 2.4.1.9) ou  $\beta$ -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26) sob condições específicas (Smaali *et al.*, 2012).

A atividade de transfrutossilção (At) e hidrolítica (Ah) são demonstradas pelas duas enzimas. No entanto, em alguns estudos, a FFase demonstrou atividade de transfrutossilção significativa apenas em altas concentrações de sacarose, enquanto a FTase demonstrou atividade de transfrutossilção significativa mesmo em soluções diluídas. Como afirmado por Huang *et al.*, (2016), isso ocorre devido à baixa afinidade da FTase com a água como aceptor, o que resulta em uma atividade hidrolítica reduzida (Ganaie *et al.*, t al., 2014).

Especificamente, o *Aspergillus oryzae* IPT-301 se destaca na produção da FTase, possuindo o *status* de GRAS (Generally Recognize as Safe), devido a sua baixa toxicidade na

produção de alimentos e a grande capacidade produtora de FTase, com elevada atividade de transfrutossilacção, dentre dezessete linhagens de fungos filamentosos avaliadas (Cuervo-Fernandez *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2019; Faria *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Maiorano *et al.*, 2020; Ottoni *et al.*, 2012; Perna *et al.*, 2018; Prado, 2021; Silva *et al.*, 2021).

### 3.4 ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

Segundo Ottoni *et al.* (2012) e Cuervo-Fernandez *et al.* (2007), a atividade de transfrutossilacção pode ser definida como sendo a quantidade de enzima que produz um micromol de FOS por minuto sob condições experimentais estabelecidas, considerando kestose, nistose e frutofuranosilnistose como parte integrante do FOS.

A reacção de transfrutossilacção consiste em clivar as ligações do tipo  $\beta$ - (2 $\rightarrow$ 1), que liga a grupo frutossil ao grupo glicosil da molécula de sacarose, e transferir o grupo frutossil de um doador ativado para uma molécula acceptora apropriada, que pode ser sacarose ou outras moléculas de FOS e, liberando como subproduto da reacção enzimática, uma molécula de glicose (Antošová; Polakovič, 2001; Faria *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Jung *et al.*, 2011; Prado, 2021; Yun, 1996).

Neste estudo, adotou-se a definição de Dorta *et al.* (2006), Cunha *et al.* (2019), Garcia *et al.* (2021), Gonçalves *et al.* (2020) e Dias *et al.* (2022), em que 1 unidade (1U) de atividade de transfrutossilacção corresponde à quantidade de enzima que transfere 1  $\mu$ mol de frutose por minuto sob condições experimentais estabelecidas. Dessa forma, por meio de um balanço de massa, a concentração de frutose transfrutossilada pode ser indiretamente obtida a partir das Equações (1), (2) e (3).

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

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

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

em que  $[AR]$ ,  $[G]$ ,  $[F]$  e  $[Ft]$  representam as concentrações, expressas em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , de açúcares redutores, glicose, frutose e frutose transfrutossilada, respectivamente.

A atividade de transfrutossilacção ( $At$ ) da Ftase das células microbianas pode ser calculada pela Equação (4).

$$At = \frac{[Ft].v}{m_s} \quad (4)$$

em que  $v$  representa a vazão volumétrica ( $L.s^{-1}$ ) e  $m_s$  se refere à massa de células microbianas seca (g).

### 3.5 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS E DE ENZIMAS FRUTOSILTRANSFERASES PARA A PRODUÇÃO DE FOS

Na literatura são encontrados registros de pesquisas voltados à produção de FOS por rota enzimática mediante aplicação de frutossiltransferase extracelular e de células microbianas, com atividade de transfrutossilização, imobilizadas em diferentes matrizes.

Em uma resina altamente porosa (Diaion HPA 25), Yun (1996) estudaram a produção contínua de FOS a partir de sacarose por FTase imobilizada. Para maximizar a produção de FOS, as condições ideais para uma operação da coluna Diaion HPA 25 com enzima imobilizada foram uma concentração de sacarose de  $600 \text{ g L}^{-1}$  e uma velocidade espacial superficial de  $2,7 \text{ h}^{-1}$ . Após 30 dias de operação contínua com a coluna de enzima Diaion HPA 25 a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , uma atividade inicial da FTase diminuída em aproximadamente 8%. Isso mostrou alta produtividade de  $1.174 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Chien, Lee e Lin (2001) estudam a imobilização da biomassa de *Aspergillus japonicus* envolvendo-a em glúten para a produção de FOS. Foi obtido um biocatalisador estável, que foi aplicado em um reator de leito empacotado, e foi observada uma redução na taxa de reação de produção de FOS com imobilização (a nova taxa de reação aproximou-se de 70 % da taxa de reação catalisada pelo micélio não tratado) associado a possíveis limitações na difusão do substrato impostas pelo glúten.

Vaňková *et al.* (2008) imobilizou uma FTase de *A. pullulans* usando resina de troca aniônica. Eles atingiram um rendimento de imobilização de 65% e realizaram análise econômica da implantação da tecnologia em escala industrial.

A capacidade do *Aspergillus japonicus* ATCC 20236 para colonizar diferentes materiais sintéticos durante a fase de fermentação foi explorada por Mussatto *et al.* (2009). Eles realizaram a imobilização da biomassa microbiana, tanto *in situ* quanto por adsorção, em várias substâncias, como: esponja de poliuretano ( $0,48 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ), esponja de aço inoxidável ( $1,13 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ), fibra vegetal ( $1,25 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ), pedrapomes ( $0,13 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ),

peneiras moleculares de zeólito ( $0,19 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ) e esponja de vidro (não apresentou imobilização celular). O resultado mais promissor foi a adsorção micelial na fibra vegetal, pois permitiu obter uma produção de FOS semelhante à obtida com a biomassa livre e facilitou a separação entre o biocatalisador e o meio reacional.

Grânulos de alginato de cálcio foram usados para imobilizar as enzimas de *A. pullulans* por Jung *et al.* (2011). Eles foram usados para produzir fruto-oligossacarídeos de cadeia curta, conhecidos como ScFOS continuamente dentro de um reator de leito compactado, produzindo 180 g de ScFOS por hora sob condições ideais de 770 g de sacarose por hora, alimentando-se a 200 L por hora e  $50^{\circ}\text{C}$ , e mantendo uma atividade enzimática inicial por mais de 100 dias.

Fernandez-Arrojo *et al.* (2013) também realizaram a imobilização de enzima em alginato de cálcio seco através da desidratação de esferas de gel de alginato de cálcio contendo enzimas aprisionadas de *Aspergillus aculeatus*. Esta técnica apresentou uma atividade volumétrica aproximadamente 30 vezes maior ( $300 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e rendimento (40 vezes) maior em comparação com as esferas de gel de alginato de cálcio ( $4.030 \text{ g}\cdot\text{dia. L}$  de FOS vs.  $103 \text{ g}/\text{dia L}$ ).

Ganaie *et al.* (2014) pesquisaram a possibilidade de reutilização de FTase micelial imobilizada em dois tipos de polímeros (quitosana e alginato) durante a produção contínua de FOS. Foi constatado que as esferas de FTase/alginato produzidas alcançaram uma produção de aproximadamente 63% (p:p) ao longo de um período de 7 dias, e a atividade enzimática não sofreu grandes alterações.

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

Castro e Sato (2014) estudaram a imobilização de células de *Aureobasidium pullulans* em diversos suportes (subprodutos sintéticos, agroindustriais e materiais minerais). A imobilização do micélio ocorreu in situ e, por adsorção, durante a etapa de fermentação. Em todos os suportes estudados ocorreu a adsorção da biomassa, com destaque para a esponja de poliuretano reticulado ( $1,88$  a  $2,2 \text{ g}_{\text{células}}\cdot\text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ), fibra de poliéster ( $2,30 \text{ g}_{\text{células}}\cdot\text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ), e lã de fibra de vidro ( $2,0 \text{ g}_{\text{células}}\cdot\text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ), que adsorveram as maiores quantidades de células.

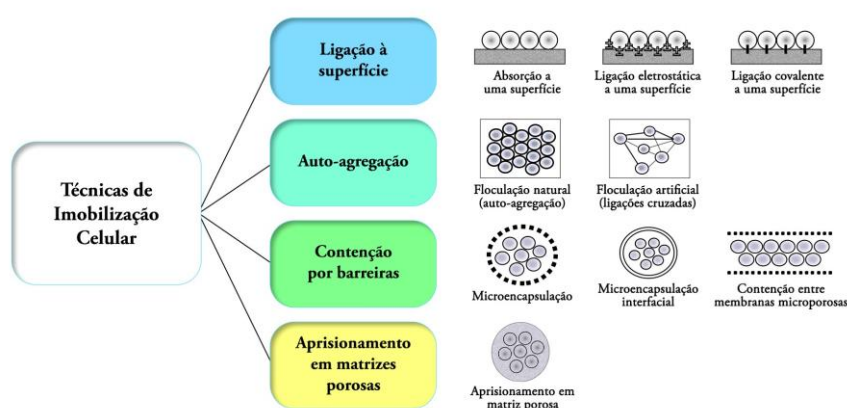
### 3.6 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS E CARACTERÍSTICAS DOS MATERIAS DE SUPORTE

A imobilização consiste em confinar e/ou aderir, física ou quimicamente, a célula microbiana a um suporte sólido insolúvel e inerte em meio aquoso ou solvente orgânico, obtendo-se um biocatalisador heterogêneo com elevada atividade, especificidade, seletividade, estabilidade e com potencial aplicação para implementar e conduzir processos nos modos batelada e contínuo (Gonçalves *et al.*, 2020; Lorenzoni *et al.*, 2015; Ribeiro 2023; Zambelli *et al.*, 2016). Os materiais de suporte devem apresentar determinadas características, tais como atoxicidade às células, resistência ao ataque químico e microbiano, resistências térmica e mecânica, elevada área específica, porosidade uniforme e possibilitar elevada difusividade de substratos e produtos (Schimidell *et al.*, 2001).

Além da redução do custo, os processos que envolvem células imobilizadas como biocatalisadores heterogêneos apresentam vantagens, como a relativa facilidade de ampliação de escala, possibilidade de reuso do biocatalisador, armazenamento das células imobilizadas por longos períodos, facilidade de manuseio e transporte, maior estabilidade operacional, e maior resistência a perturbações ambientais, além da possibilidade de utilização de resíduos ou subprodutos (Bonine, 2011; Elizei, 2014).

Diversos tipos de materiais podem ser utilizados como suporte, a exemplo de polímeros naturais, polímeros sintéticos e materiais inorgânicos. De acordo com Kourkoutas *et al.* (2004) e Souza *et al.* (2017), diversas são as técnicas de imobilização aplicadas para a imobilização de células microbianas, sendo a ligação à superfície, auto agregação, contenção por barreiras e aprisionamento em matrizes porosas as técnicas mais difundidas (Figura 2).

**Figura 2** – Técnicas de imobilização celular



Fonte: Adaptado de KOURKOUTAS *et al.* (2004).

### 3.7 ESPONJA DE POLIURETANO

Como um dos plásticos mais versáteis, os poliuretanos (PU) são amplamente utilizados na indústria e na vida cotidiana, como, por exemplo, na indústria da construção (esponja rígidas para a produção de elementos isolantes), no setor moveleiro (esponja de enchimento de móveis estofados e esponja de conforto em colchões), na indústria automotiva (esponja técnica em assentos de carro e esponja moldada em painéis), como vernizes e adesivos de poliuretano, na produção de materiais de couro (solados, retrosaria ou vestuário) e como espaçadores de embalagens (Dacewicz; Grzybowska-Pietras, 2021).

O poliuretano não tem uma fórmula empírica que represente uma macromolécula porque não apresenta unidades repetitivas (uretano) regularmente. Isso o diferencia da maioria dos polímeros, cujas unidades monoméricas são bem definidas. O poliuretano é geralmente representado por suas unidades monoméricas principais, o di-isocianato e o polioliol. No entanto, todos os tipos de ligação que podem ser parte da estrutura do polímero formado não são mostrados. A reação de adição entre um isocianato e um composto que possui hidrogênio ativo, geralmente polioliol, que é responsável pela formação de ésteres de ácido carbâmico (ligações uretano) é uma das principais reações de síntese dos EPU. Essa reação também pode ser chamada de reação de propagação da cadeia poliuretânica (Soares, 2012).

Entre os suportes adequados para a imobilização de biocatalisadores, as esponjas de poliuretano (EPU) vêm se destacando como uma matriz promissora para imobilizar não somente enzimas, mas também células microbianas que apresentam atividade enzimática (Dias *et al.*, 2022).

Pesquisas descrevem as maneiras pelas quais os microrganismos podem colonizar EPU em culturas microbianas em escala laboratorial. Normalmente, as células imobilizadas em um material de suporte vêm em duas formas diferentes, uma das quais é um biofilme espesso e denso que se desenvolve na superfície do suporte imobilizador e a outra fica presa nos poros do suporte imobilizador (Dacewicz; Grzybowska-Pietras, 2021).

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

Soares (2012) avaliaram esponjas de poliuretano como base sintéticas para imobilização de células íntegras de *Mucor circinelloides* na qual apresentou-se alta atividade

lipolítica. Romero *et al.* (2012) imobilizou *Aspergillus niger* para seletividade da lipase. Mussatto *et al.* (2009) imobilizaram *Aspergillus japonicus* em esponja de poliuretano para produzir fruto-oligossacarídeos, cuja imobilização ocorreu durante o cultivo celular.

### 3.8 REATORES DE LEITO FIXO

O reator de leito fixo (PBR) devido a sua tecnologia simples e a facilidade de operação é preferível quando comparado a outros reatores catalíticos heterogêneos. Consiste em uma pilha compacta e imóvel de biocatalisador, que se comporta como meio poroso, situada no interior de uma coluna geralmente vertical, pela qual o fluido escoar, reagindo com a superfície interna e externa do biocatalisador (Jakobsen, 2014). Esses reatores são preferidos em relação a outros tipos de reatores devido ao procedimento simplificado, alto volume de leito, facilidade de operação e aumento de escala (Hama *et al.*, 2011).

A queda de pressão ao longo do reator, a desativação do biocatalisador e um ineficiente controle de temperatura, principalmente quando a reação é exotérmica, são problemas comumente encontrados na operação de um PBR. Dessa forma, a escolha do modelo ideal de PBR é essencial para otimizar sua performance. Três modelos de PBR são mais utilizados: coluna com leito único, coluna com múltiplos leitos e coluna com múltiplos tubos (Jakobsen, 2014).

O PBR de leito único deve ser empregado para reações adiabáticas, não sendo recomendado para reações exotérmicas e endotérmicas; pois, o aumento da temperatura do meio nas reações exotérmicas, pode desfavorecer a conversão de equilíbrio, a seletividade do produto e a estabilidade do biocatalisador. Já nas reações endotérmicas, a reação pode ser interrompida antes do desejado, devido a mudança de temperatura. No caso de reações endotérmicas, recomenda-se o uso do modelo de leitos múltiplos e, para reações exotérmicas, o modelo de múltiplos tubos. O modelo de leito único está representado na Figura 3 (Jakobsen, 2014).

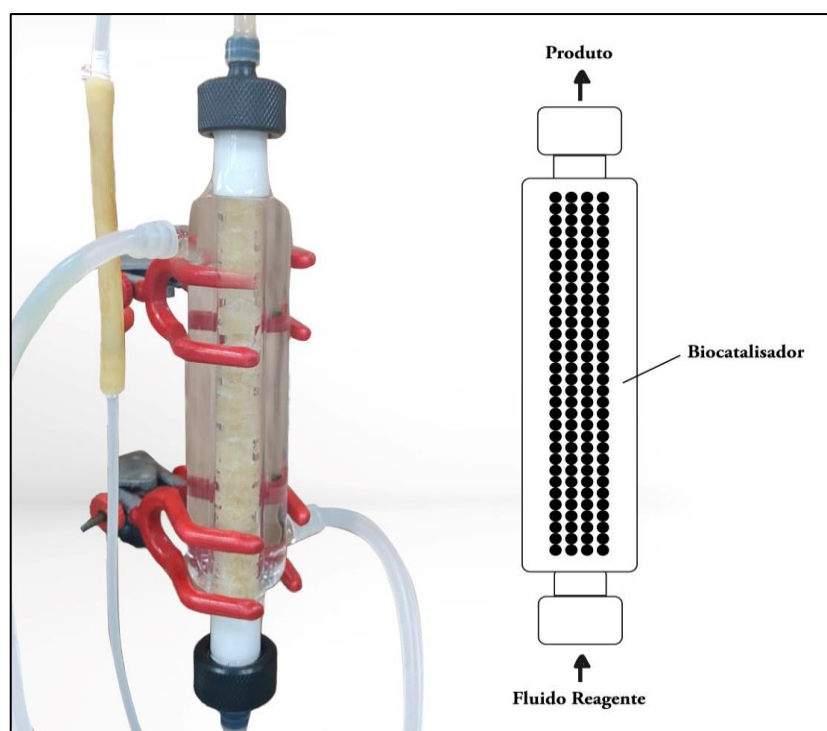
Ao observar a Figura 3, nota-se que o fluido reagente é alimentado na parte inferior do reator e flui para a parte superior, caracterizando o fluxo ascendente. Ao longo dos anos, muitos estudos em relação a hidrodinâmica e a transferência de massa em reator PBR de fluxo ascendente e descendente já foram realizados. O fluxo ascendente em reatores de leito fixo oferece diversas vantagens em processos de reações químicas e tratamento de resíduos. Essa abordagem permite uma melhor transferência de calor e massa, resultando em uma distribuição mais uniforme dos reagentes ao longo do leito do reator (Ghiaci *et al.*, 2016).



Além disso, a natureza do fluxo ascendente contribui para minimizar o risco de obstrução do leito, promovendo uma operação mais estável e evitando a formação de canais preferenciais. Isso possibilita uma maior eficiência na conversão de reagentes em produtos desejados (Smith; Jones, 2018).

Estudos como o de Ghiaci *et al.* (2016) destacam a eficácia do fluxo ascendente na maximização da transferência de massa e calor, enquanto o trabalho de Smith e Jones (2018) ressalta a melhoria na distribuição dos reagentes ao longo do leito do reator, enfatizando a importância dessa técnica para aplicações industriais.

**Figura 3** – reator PBR com fluxo ascendente



Fonte: Autoria própria (2023).

### 3.9 REATORES DE LEITO FIXO PARA PRODUÇÃO DE FOS

Estudos para produção de FOS em biorreatores de fluxo contínuo iniciaram-se na década de 1990 com a publicação do trabalho de Yun (1992) em que se reportou a imobilização de  $\beta$ -frutofuranosidase (FFase) de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10245 em alginato de sódio, comprovando a estabilidade e a possibilidade de produção de FOS por meio de um sistema reacional contínuo. Posteriormente, Chen e Liu (1996) imobilizaram FFase de *Aspergillus japonicus* em alginato de cálcio como parte de um procedimento inovador. Esta abordagem

pioneira abriu portas para aplicações práticas e avanços significativos na síntese de compostos específicos, destacando a viabilidade e eficácia dessa técnica na biotecnologia moderna. O método descrito resultou em desenvolvimento de um suporte com resistência mecânica e aumento expressivo na estabilidade enzimática.

Jung *et al.* (2011) avaliaram sistemas reacionais contínuos empregando FTase microbiana imobilizada em esferas de alginato de cálcio visando a produção de FOS em escala industrial com reatores de 4 m<sup>3</sup> e 1,6 m<sup>3</sup>, respectivamente. No primeiro trabalho, a reação foi conduzida a 50°C alimentando o reator com 770 g L<sup>-1</sup> de solução de sacarose com vazão de 200 L h<sup>-1</sup>, o que resultou em uma produtividade de 180 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de FOS.

Na literatura, poucos são os trabalhos que reportam a produção contínua de FOS em reator PBR por meio da enzima FTase, principalmente em escala laboratorial (Dias, *et al.*, 2022; Lorenzoni *et al.*, 2015; Ribeiro, 2023; Zambelli *et al.*, 2016).

Fernandez-Arrojo *et al.* (2013) não incluiu a etapa de produção da FTase, aprisionando a enzima *Pectinex Ultra SP-L*, para testar a técnica utilizando alginato seco. Houve um aumento de 40 vezes do rendimento em relação à técnica com esferas de gel, com ótima estabilidade operacional e resistência ao ataque microbiano.

Lorenzoni *et al.* (2015) compararam a produção de FOS em reatores PBR e de leito fluidizado (FBR). Os resultados mostraram que, sob as mesmas condições operacionais, a produção de FOS em PBR foi 1,1 vezes maior que no FBR, concluindo que, para o reator PBR transferir maiores quantidades de unidades de frutossil quando comparado ao FBR, este modelo é mais eficiente para a produção contínua de FOS e possui potencial para ampliação de escala. Por outro lado, Zambelli *et al.* (2016) avaliaram a produção contínua de FOS em reator PBR com a produção em modo batelada e comprovaram que, sob as mesmas condições experimentais, a produtividade de FOS no PBR foi cerca de 1,7 vezes maior que o processo batelada.

De acordo com a pesquisa de Tanaka *et al.* (2018), a imobilização do *Aspergillus oryzae* em reatores de leito fixo mostrou-se altamente eficaz na síntese de FOS a partir de diferentes fontes de sacarose. Os autores destacaram a capacidade do sistema de leito fixo em proporcionar um ambiente estável para o crescimento do fungo e produção enzimática, resultando em altos rendimentos de FOS.

Além disso, estudos de otimização conduzidos por Li *et al.* (2021) enfatizaram a importância do controle preciso das variáveis de processo, como temperatura, pH e concentração de substrato, para maximizar a produção de FOS pelo *Aspergillus oryzae* em

reatores de leito fixo. Suas descobertas destacaram a influência direta desses parâmetros na atividade enzimática e na composição dos FOS obtidos.

Oliveira *et al.* (2020) conduziram um estudo abordando a imobilização com quitosana em um sistema reacional contínuo, utilizando um reator do tipo PBR. A pesquisa concentrou-se na imobilização de uma preparação enzimática comercial de *Aspergillus aculeatus*, contendo frutossiltransferase (FTase), em esferas de quitosana. O experimento foi realizado sob condições experimentais e operacionais específicas, incluindo uma análise detalhada das variáveis como faixas de temperatura de 55 a 70 °C e 55 a 75 °C para enzima livre e imobilizada, respectivamente, durante um tempo de incubação de 180 min. Não foram observadas alterações no pH ótimo da enzima imobilizada ou da enzima livre, em que as atividades relativas mais altas foram observadas para ambos em valores de pH na faixa de 4,5 a 6,0 e 5,0. Os autores observaram que a quitosana foi satisfatoriamente imobilizada, resultando em alta capacidade de estabilização e armazenamento da enzima.

Dias *et al.* (2022) avaliaram a utilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 como biocatalisadores para a reação de transfrutossilacção de sacarose em reator PBR. A maior atividade de transfrutossilacção (660 U.g<sup>-1</sup>) das células foi obtida aos 25 min de reação, adotando-se uma temperatura de reação de 50 °C, concentração de sacarose de 470 g.L<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 15 mL.min<sup>-1</sup>. O aumento do fluxo volumétrico proporcionou um aumento na atividade de transfrutossilacção, mas também uma desativação mais rápida do biocatalisador. A cinética enzimática foi descrita utilizando o modelo de Michaelis-Menten, com V<sub>máx</sub> de 632,8 U.g<sup>-1</sup> e K<sub>m</sub> de 160,7 g.L<sup>-1</sup>. As células apresentaram atividade enzimática constante durante 12 h de reação no PBR operado com fluxo descontínuo em vazões de 5 mL.min<sup>-1</sup> e 11,5 mL.min<sup>-1</sup>, e no PBR operado com fluxo contínuo em vazão de 5 mL.min<sup>-1</sup>. A transição do regime difusional para o cinético foi observada a partir de 11,5 mL.min<sup>-1</sup>.

Ribeiro (2023) avaliou a preparação, atividade enzimática e estabilidade de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 reticuladas com glutaraldeído utilizadas como biocatalisador para reação de transfrutossilacção de sacarose em reator de leito empacotado (PBR), visando a produção de FOS. A maior atividade de transfrutossilacção (AT) foi apresentada pelo biocatalisador preparado por reticulação a 200 rpm e 45 min. Os maiores AT no PBR foram obtidos a 50°C, vazões de 3 mL.min<sup>-1</sup> a 5 mL.min<sup>-1</sup> e concentrações de sacarose de 473 g.L<sup>-1</sup> e 500 g.L<sup>-1</sup>. A cinética enzimática foi descrita utilizando o modelo de Michaelis-Menten. Por fim, o biocatalisador apresentou AT constante de aproximadamente 75 U g<sup>-1</sup> e 300 U g<sup>-1</sup> para 12 h de reação no PBR operando em fluxo contínuo e descontínuo, respectivamente.

Estes resultados demonstram um alto potencial de células IPT-301 de *A. oryzae* reticuladas com glutaraldeído como biocatalisadores heterogêneos para a produção contínua de FOS em reatores PBR.

Os artigos relacionados com a produção de FOS em biorreatores contínuos com seus respectivos microrganismos produtores de enzima e técnicas de imobilização podem ser visualizados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Artigos relacionados à produção contínua de FOS em PBR (continua)

<b>Autor</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Enzima</b>	<b>Imobilização</b>
<b>Ribeiro (2023)</b>	<i>Aspergillus oryzae</i> IPT 301	FTase	Glutaraldeído 25 % (v/v)
<b>Dias et al. (2022)</b>	<i>Aspergillus oryzae</i> IPT 301	FTase	Células microbianas <i>in natura</i> com atividade de transfrutossilagem
<b>Oliveira et al. (2020)</b>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	FTase	Quitosana
<b>Zambelli et al. (2016)</b>	<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides MUT</i> 5506	FFase	Alginato de sódio
<b>Lorenzoni et al. (2015)</b>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	FFase e FTase	Quitosana
<b>Fernandez-Arrojo et al. (2013)</b>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	FTase	Alginato de cálcio
<b>Jung et al. (2011)</b>	<i>Aureobasidium</i> <i>pullulans KFCC</i> 10245	FTase	Alginato de cálcio
<b>Vaňková et al. (2008)</b>	<i>Aspergillus pullulans</i>	FTase	Resina DOWEX MARATHON MSA

**Tabela 1** – Artigos relacionados à produção contínua de FOS em PBR (conclusão)

---

<b>Chen e Liu (1996)</b>	<i>Aspergillus japonicus</i>	FFase	Alginato de cálcio
<b>Yun (1992)</b>	<i>Aureobasidium pullulans KFCC 10245</i>	FTase	Alginato de sódio

---

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

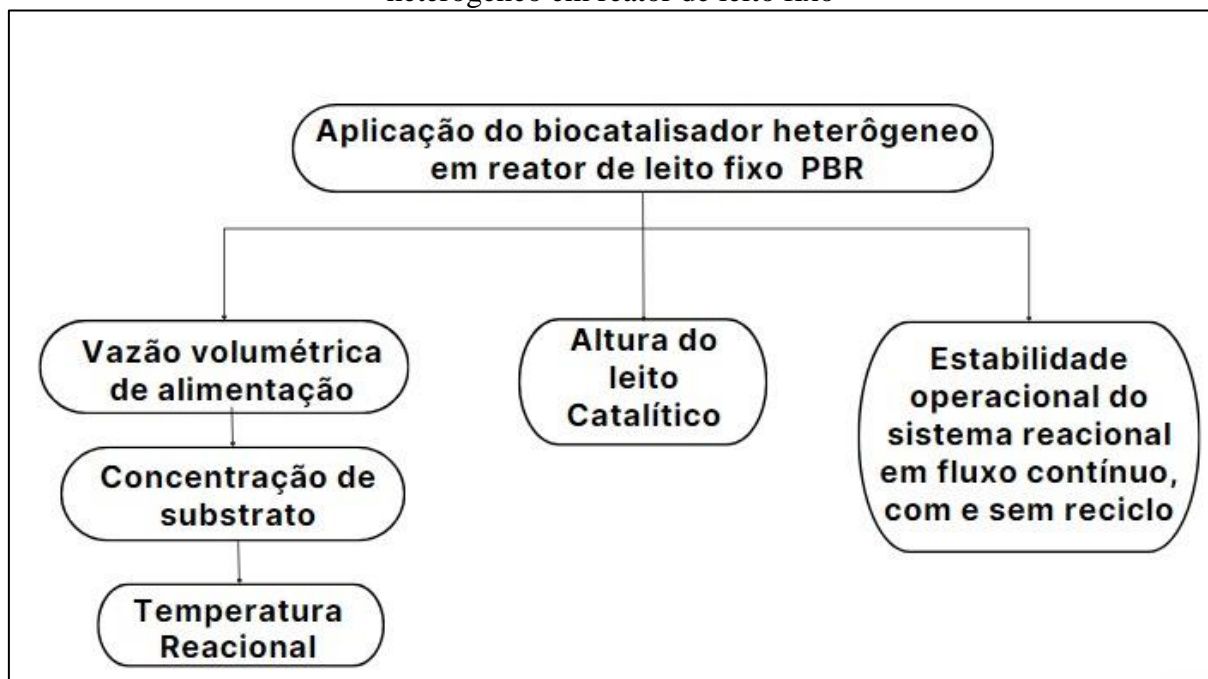
O desenvolvimento da metodologia compreende a duas etapas experimentais estritamente associadas: (i) obtenção do biocatalisador heterogêneo a partir da produção e imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, com atividade enzimática, em esponja de poliuretano (FIGURA 4), e (ii) aplicação do biocatalisador heterogêneo em reator de leito fixo (PBR) para avaliação dos efeitos biocatalíticos nos perfis de atividade enzimática e na síntese de FOS por processo operado em modo contínuo (FIGURA 5).

**Figura 4** – Primeira etapa da metodologia experimental – obtenção do biocatalisador heterogêneo por cultivo celular submerso



Fonte: Autoria própria (2023).

**Figura 5** – Avaliação dos efeitos biocatalíticos nos perfis de atividade do biocatalisador heterogêneo em reator de leito fixo



Fonte: autoria própria (2023).

## 4.1 PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO

### 4.1.1 Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo

Para a produção das células microbianas, contendo a enzima FTase, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP).

Os esporos liofilizados do microrganismo foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 70  $\mu\text{L}$  foram inoculadas em meio sólido, preparado em placa de Petri (16 x 60 mm), contendo (em %,  $\text{m v}^{-1}$ ): ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0, glicerina (Isolar®) 2,5, extrato de levedura (Synth®) 0,5 e glicose (Dinâmica®) 2,5. Após incubação por 7 dias a 30 °C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371), os esporos produzidos foram coletados por meio de raspagem utilizando alça de Drigalski, em 10 mL de solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95 % ( $\text{m v}^{-1}$ ) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1 % ( $\text{v v}^{-1}$ ).

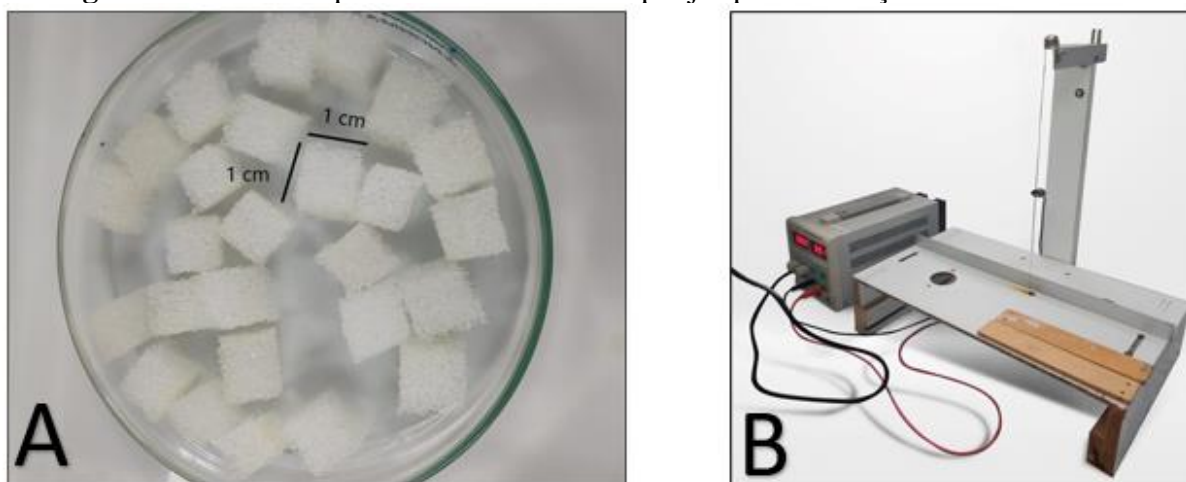
A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isolar®) 20,0 % ( $\text{m v}^{-1}$ ), cujo volume foi variável, de modo a ajustar a concentração de esporos para, aproximadamente,  $1 \times 10^7$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , quantificado com auxílio de uma câmara de Neubauer

(Newoptics®), seguido de armazenamento sob refrigeração a  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Cunha *et al.*, 2019; Cunha, 2017; Faria *et al.*, 2021; Garcia, 2021).

#### 4.1.2 Pré-tratamento do material de suporte

O material de suporte, utilizado para a imobilização das células microbianas, foram esponjas de poliuretano (EPU) adquiridas comercialmente. As esponjas foram cortadas para formar cubos de 1,0 cm de aresta (Figura 6-A), mediante auxílio de um cortador elétrico de 30V e 220 W (Figura 6-B). Posteriormente, as esponjas foram adicionadas ao meio de cultivo e esterilizadas em autoclave, conforme condições descritas no tópico 4.1.4.

**Figura 6** – Produto e processo de corte das esponjas para utilização no reator de leito fixo.



Fonte: Autoria própria (2023).

Legenda: (A) Esponjas de poliuretano comercial previamente cortadas a cubos de 1,0 cm de aresta para a imobilização de células de *A. oryzae* IPT-301 com atividade enzimática.

(B) Cortador elétrico desenvolvido pelo corpo técnico da UNIFAL-MG/ Campus Poços de Caldas para corte das esponjas.

#### 4.1.3 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura sintético, utilizado para o cultivo celular e produção das células microbianas com atividade biocatalítica, foi constituído por (em %,  $\text{m v}^{-1}$ ): sacarose (Synth®) 15,0, extrato de levedura (Synth®) 0,5,  $\text{NaNO}_3$  (Dinâmica®) 0,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Synth®) 0,2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Dinâmica®) 0,05,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Synth®) 0,03 e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Synth®) 0,001. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,5 com solução de NaOH (Synth®)  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Foram distribuídos 50 mL deste meio de cultura, juntamente com 20 esponjas



de EPU com arestas de 1,0 cm, em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, vedados com algodão e esterilizados em autoclave (Phoenix/Luferco AV 225 l) a 120 °C e 2,022 atm por 20 minutos (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2021; Ottoni *et al.*, 2012; Ribeiro, 2023).

#### 4.1.4 Produção e imobilização das células microbianas

A produção e a imobilização concomitante das células de *A. oryzae* IPT-301 em EPU foram realizadas de acordo com a metodologia adaptada de Ottoni *et al.* (2012), Cunha *et al.* (2019), Dias *et al.* (2022) e Ribeiro (2023). O cultivo celular submerso foi conduzido em agitador orbital do tipo Shaker (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm ao decorrer de 32 h de processo, inoculando-se 500 µL de suspensão de esporos, com concentração de  $1 \times 10^7$  esporos mL<sup>-1</sup>, em meio de cultura estéril.

O conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi filtrado à vácuo com o auxílio de uma bomba TE-058 (Tecnal®), utilizando papel filtro Whatman nº1 com diâmetro de 90 mm. As células imobilizadas em EPU e retidas em papel filtro foram abundantemente lavadas com água destilada para remoção do meio de cultura e armazenadas em solução tampão tris-acetato 0,2 mol. L<sup>-1</sup>, pH 5,5, sob refrigeração a 4 °C para ensaios no reator de leito fixo (PBR).

A massa de células microbianas imobilizadas foi obtida por meio da diferença entre a massa celular seca e a massa de suporte contido no meio de cultivo ( $\text{g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ). A massa seca foi obtida após os ensaios de atividade enzimática (tópico 4.3.2) mediante secagem das células em estufa sem circulação de ar forçada (ProLab®) por 24 h a 60 °C.

**Figura 7** – Cubos de EPU contendo células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas durante o cultivo celular



Fonte: Aatoria própria (2023).

Nota: Condições experimentais: o cultivo e a imobilização celular foram realizados concomitantemente em meio de cultura sintético pH 5,5, 200 rpm, 30 °C por 32 horas

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO BIOCATALISADOR

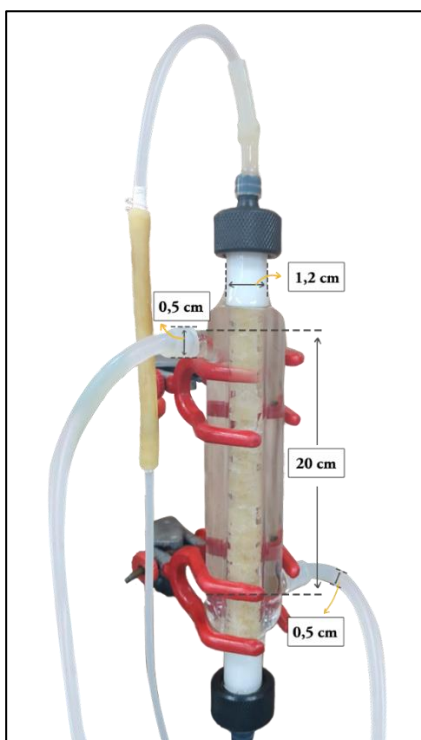
A morfologia das células imobilizadas em EPU e do material de suporte (EPU) foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando microscópio eletrônico (Zeiss EVO MA-10, Alemanha), com tensão de aceleração de 20 kV e distâncias de 10 mm e 21 mm. As amostras do material de suporte foram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

### 4.3 APLICAÇÃO DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO EM REATOR DE LEITO FIXO

#### 4.3.1 Especificação do reator PBR e montagem do aparato experimental

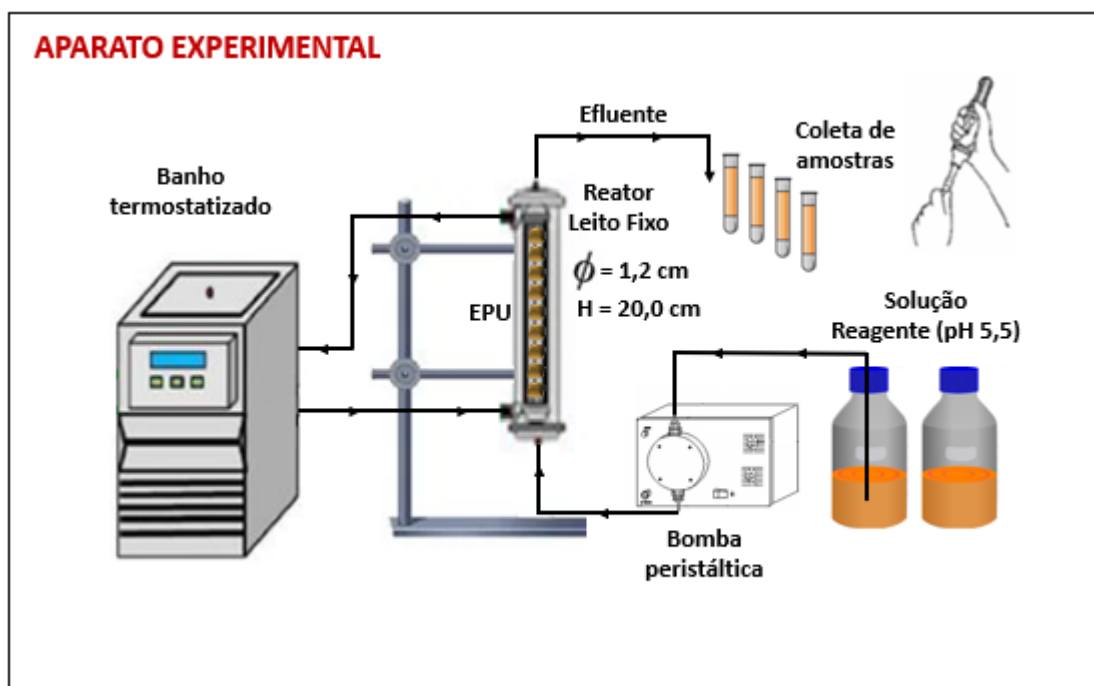
O reator enzimático e suas dimensões estão representados na Figura 8. O reator foi construído em vidro de borossilicato com diâmetro e comprimento nominais de 1,2 e 20 cm, respectivamente, cujas células de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em cubos de EPU, constituíram o seu leito biocatalítico para ensaios de atividade enzimática. O reator foi constituído por uma jaqueta térmica para controle de temperatura por meio da recirculação de água oriunda de um banho termostatzado (Tecnal®, modelo TE-2005) a 50°C. A bomba peristáltica (MS TecnoPON®, modelo LAP-101-3) foi responsável pelo escoamento da solução reagente (substrato - solução de sacarose) e alimentação do reator. Durante a realização dos ensaios, o substrato foi mantido imerso na temperatura de reação, em banho maria digital com circulação interna de água (Tecnal®, TE-054-MAG). A conexão entre a bomba e o reator, constituída por uma tubulação de silicone com 0,5 cm de diâmetro, proporcionou o fluxo ascendente da solução reagente. O aparato experimental descrito está disposto na Figura 9.

**Figura 8** – Reator enzimático e suas dimensões



Fonte: Autoria própria (2023).

**Figura 9** – Aparato experimental do sistema reacional contínuo



Fonte: Autoria própria (2023).

#### 4.3.2 Ensaio de atividade enzimática em reator PBR

Todos os procedimentos descritos neste tópico foram realizados utilizando, como leito biocatalítico, a condição de 50 esponjas de EPU contendo  $0,8 \pm 0,3$  g de células microbianas imobilizadas, correspondendo a uma altura de leito de 20 cm. Ressalta-se que todos os procedimentos foram realizados em triplicata com substituição do leito biocatalítico ao final de cada ensaio. Os ensaios de atividade enzimática de transfrutossilacção foram realizados conforme procedimento descrito no tópico 4.4.1 e calculados pela Equação (7).

##### 4.3.2.1 Influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutossilacção

Para se avaliar a influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutossilacção, alimentou-se o reator PBR a diferentes vazões ( $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com solução de substrato constituída por sacarose comercial (União®)  $480 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e tampão tris-acetato  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5,5. A alimentação foi realizada por uma bomba peristáltica (MS Tecnopon®, modelo LAP-101-3) e a reação enzimática foi conduzida a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  por 180 minutos.

#### 4.3.2.2 Influência da concentração de substrato na atividade de transfrutossilação

Para avaliar a influência da concentração de substrato nas atividades enzimáticas do processo contínuo, foram preparadas soluções reagentes constituídas por solução tampão tris-acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,5 e sacarose comercial (União ®) nas concentrações de  $200 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $300 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $400 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $480 \text{ g.L}^{-1}$  e  $600 \text{ g.L}^{-1}$ . A reação foi conduzida por 60 minutos à  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  no reator PBR, conforme aparato experimental descrito no Tópico 4.2.1.

#### 4.3.2.3 Influência da temperatura do meio reacional na atividade de transfrutossilação

Com intuito de se determinar a temperatura de máxima atividade enzimática do processo contínuo, foi preparada uma solução reagente constituída por solução de sacarose comercial (União ®)  $400 \text{ g L}^{-1}$  e tampão tris-acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,5. A reação foi conduzida, em triplicata, por 60 minutos nas temperaturas de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  no reator PBR, conforme aparato experimental descrito no Tópico 4.3.1. O tempo de reação (60 minutos) foi necessário para garantir o estado estacionário do processo.

#### 4.3.2.4 Influência da massa do leito biocatalítico na atividade enzimática

Os ensaios da influência da massa do leito biocatalítico na atividade de transfrutossilação foram realizados empacotando-se o reator PBR com 0,5; 0,8 e 1,1 g de células imobilizadas em cubos de EPU, o que corresponde às massas totais (células e EPU) de 0,8; 1,2 e 2,4 g respectivamente. As atividades enzimáticas foram obtidas de acordo com tópico 4.4.1 para os tempos de 60 e 120 min no reator operado em estado estacionário. Os experimentos foram realizados em triplicata e em condições estabelecidas (temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 5,5, vazão  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$  e concentração de substrato de  $400 \text{ g.L}^{-1}$ ) com substituição do leito biocatalítico ao término de cada ensaio.

#### 4.3.2.5 Ensaio de estabilidade operacional

Os estudos de estabilidade operacional foram realizados em sistema reacional com e sem reciclo. Para isso, o reator PBR foi recheado com as células microbianas imobilizadas em EPU e a reação enzimática foi conduzida a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , alimentando a solução reagente com vazões volumétricas de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$  por meio de uma bomba peristáltica (LAP-101-3 / Tecnopon®). A solução reagente foi constituída por sacarose comercial (União ®)  $400 \text{ g.L}^{-1}$

<sup>1</sup> e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup> pH 5,5. Para realizar o reciclo, a montagem do aparato experimental foi configurada de modo que toda a corrente do efluente do reator fosse reintroduzida como corrente de alimentação, caracterizando um reciclo total.

As amostras foram coletadas por 15 segundos (tempo necessário para obter amostra suficiente para análise) e os ensaios de estabilidade foram conduzidos por um período de 12 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata, com substituição do leito biocatalítico ao final de cada ensaio.

#### 4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 4.4.1 Determinação das atividades enzimáticas de transfrutoseilação

Ao se coletar amostras na saída do reator PBR em intervalos de tempo predefinidos, as amostras foram imersas em banho de água em ebulição durante 10 minutos, seguido por banho de água e gelo por 5 minutos para interrupção da reação enzimática (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Ottoni *et al.*, 2012; Ribeiro, 2023).

As amostras foram utilizadas para a quantificação das concentrações de açúcares redutores (AR) e glicose (G) pelos métodos colorimétricos do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e glicose-oxidase (GOD-PAP®), respectivamente (Miller, 1959; Vasconcelos; Pinto; Aragão, 2013) (TÓPICO 4.3.2) e GOD-PAP® (Cunha, 2019; Ganaie *et al.*, 2014; Oliveira, 2007; Vega; Zúniga-Hansen, 2011), (TÓPICO 4.3.3).

As concentrações de frutose liberada (F) e transfrutoseilada (transferida) (F<sub>T</sub>) no meio reacional foram determinadas pelas Equações (5) e (6) (Chen; Liu, 1996, Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.* 2022; Faria *et al.* 2021; Garcia *et al.* 2021; Gonçalves *et al.* 2020; Silva *et al.* 2021).

$$[F] = [AR] - [G] \quad (5)$$

$$[F_T] = [G] - [F] = 2 [G] - [AR] \quad (6)$$

Empregando as concentrações obtidas de frutose transfrutoseilada (EQUAÇÃO 6), determinou-se a atividade enzimática de transfrutoseilação (A<sub>T</sub>) do biocatalisador heterogêneo (EQUAÇÃO 7).

$$A_T = \frac{[F_T] v}{m_s} \quad (7)$$

em que  $[F_T]$  é a concentração molar de frutose transfrutossilada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $v$  é a vazão volumétrica de alimentação do reator ( $\text{L min}^{-1}$ ) e  $m_s$  é massa seca (g) de células microbianas imobilizadas em EPU.

Uma unidade (1U) de atividade enzimática de transfrutossilação foi definida como a quantidade de enzima que transfere um micromol (1  $\mu\text{mol}$ ) de frutose por minuto sob as condições experimentais estabelecidas (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Ribeiro, 2023).

#### 4.4.1.1 Determinação da concentração de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores (AR), presentes no meio reacional, foi determinada pelo método DNS, adaptado de Miller (1959), conforme descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013). A solução DNS foi preparada pela dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$ ) (Dinâmica®) em 200,0 mL de solução 2 mol  $\text{L}^{-1}$  de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®) (Reagente A). Paralelamente, sob aquecimento e agitação, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (Reagente B) constituída por 600 g  $\text{L}^{-1}$  de tartarato duplo de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Dinâmica®). Após a dissolução, ambos os reagentes (A e B) foram misturados e o volume final da mistura aferido para 1,0 L em balão volumétrico. A quantificação dos AR foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 0,5 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 0,5 mL da solução preparada. A reação foi conduzida em banho maria a 100 °C por 10 minutos e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 minutos, seguido pela adição de 4,0 mL de água destilada.

Posteriormente, triplicatas de alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Bel Photonics ®, modelo UV-M51) a 540 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos AR mediante auxílio da curva de calibração obtida para o método (Apêndice 1, Figura 17).

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

#### 4.4.1.2 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose (G), presente no meio reacional, foi determinada pelo método GOD-PAP®, conforme utilizado nos trabalhos de Cunha *et al.* (2019), Gonçalves *et al.* (2020), Garcia *et al.* (2021), Dias *et al.* (2022) e Ribeiro (2023). O método consiste em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato.

A oxidação da glicose pela glicose oxidase produz peróxido de hidrogênio, oxidado por meio da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem coloração rosácea ou vermelha (Bobbio; Bobbio, 2005; Wong; Wong; Chen, 2008). O kit enzimático utilizado no presente trabalho foi da marca Laborlab®.

A quantificação, em triplicata, da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 35 µL da amostra, oriunda da reação enzimática, em 3,5 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho maria (Tecnal®, TE-054-MAG) a 37 °C por 5 minutos.

A coloração final foi analisada com auxílio de espectrofotômetro (Bel Photonics®, modelo UV-M51) a 505 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações de glicose conforme procedimento reportado pelo fabricante.

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

#### **4.4.2 Determinação da massa seca das células microbianas imobilizadas**

Ao término dos ensaios de reação enzimática, as células imobilizadas úmidas (leito biocatalítico) foram removidas do interior do reator PBR e lavadas abundantemente com água destilada a fim de remover todo resíduo de sacarose aderido a elas e, em seguida, filtrada à vácuo, utilizando a bomba à vácuo (Tecnal® TE-058). Por sua vez, as células imobilizadas em EPU foram retidas em papel de filtro (Whatman nº1 com diâmetro de 90 mm) e mantidas em estufa de secagem (ProLab®) por 24 h a 60 °C para obtenção da massa seca das células ( $m_s$ ). O valor da  $m_s$  obtido para cada reação enzimática foi aplicado na Equação (7) para a determinação das atividades enzimáticas de transfrutossilação do leito biocatalítico.

#### **4.4.3 Quantificação de açúcares e fruto-oligossacarídeos**

As concentrações dos carboidratos sacarose, glicose e FOS (1-kestose, nistose e 1-β-frutofuranosilnistose) obtidas para o sistema reacional contínuo foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando duas colunas cromatográficas



acopladas em série (Shodex SC 1011, 300 x 7,8 mm) acondicionadas a 72 °C. Foi utilizado um sistema CLAE Waters (EUA) constituído por uma bomba isocrática W515, por um detector de índice de refração W2414, por um injetor automático W2707 e por software de controle e tratamento de dados Empower 2.0. As amostras foram eluidas com solução de EDTACa(Na)<sub>2</sub> 5 x 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> a uma vazão de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> e os componentes foram identificados por comparação de tempos de retenção com padrões analíticos dos mesmos analitos (Fuji Wako Chemicals, Japão).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

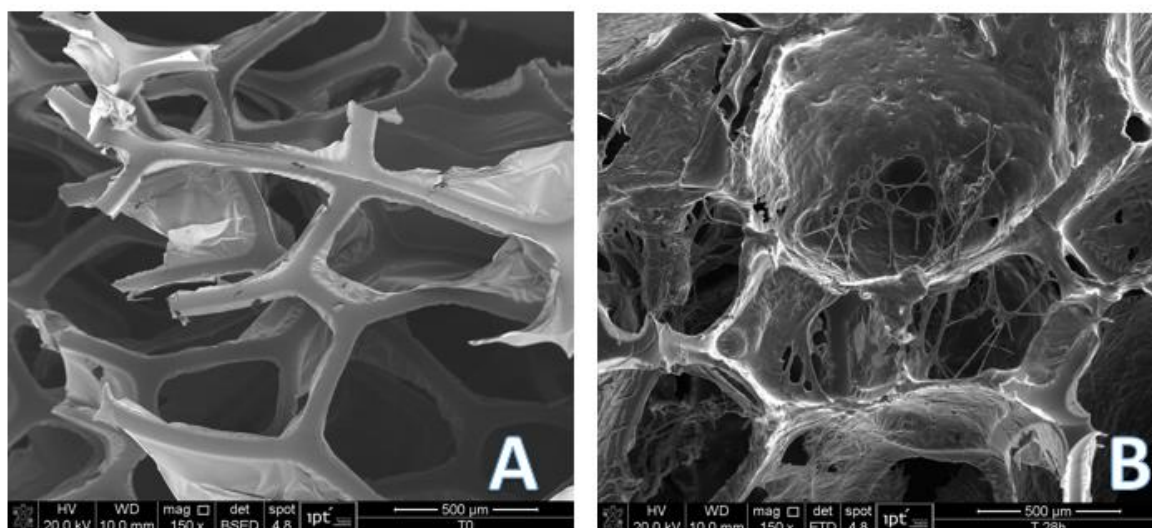
Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o tratamento dos dados experimentais foi submetido ao *Teste de Tukey* pela metodologia envolvendo análise de variância (ANOVA), pelo software *Past4Project*, a um nível de significância de 5%. O *Teste de Tukey* avaliou a diferença significativa entre os dados experimentais, comparando-os um a um.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

O biocatalisador obtido por meio do cultivo celular submerso (TÓPICO 4.1.4) foi submetido às análises de MEV para caracterização física. A imagem da estrutura da esponja de poliuretano *in natura*, na ausência de células imobilizadas, está disposta na Figura 10 (A) em que foi possível observar os poros e ranhuras da estrutura do material de suporte. A porosidade uniforme das EPU favorece a difusão gasosa, de substrato e de produtos metabólicos, o que as tonam materiais de suporte promissores para a imobilização de células microbianas (Martinez *et al.*, 2015). A Figura 10 (B) fornece evidências de crescimento do fungo *A. oryzae* IPT-301 ao longo dos filamentos dos cubos de EPU devido ao surgimento de hifas do fungo, na qual as células do microrganismo foram imobilizadas ao longo do cultivo celular submerso.

**Figura 10** – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura da esponja de poliuretano antes e depois do cultivo celular.



Fonte: autoria própria (2023).

Legenda: (A) esponja de poliuretano antes do cultivo celular  
(B) após imobilização das células microbianas.

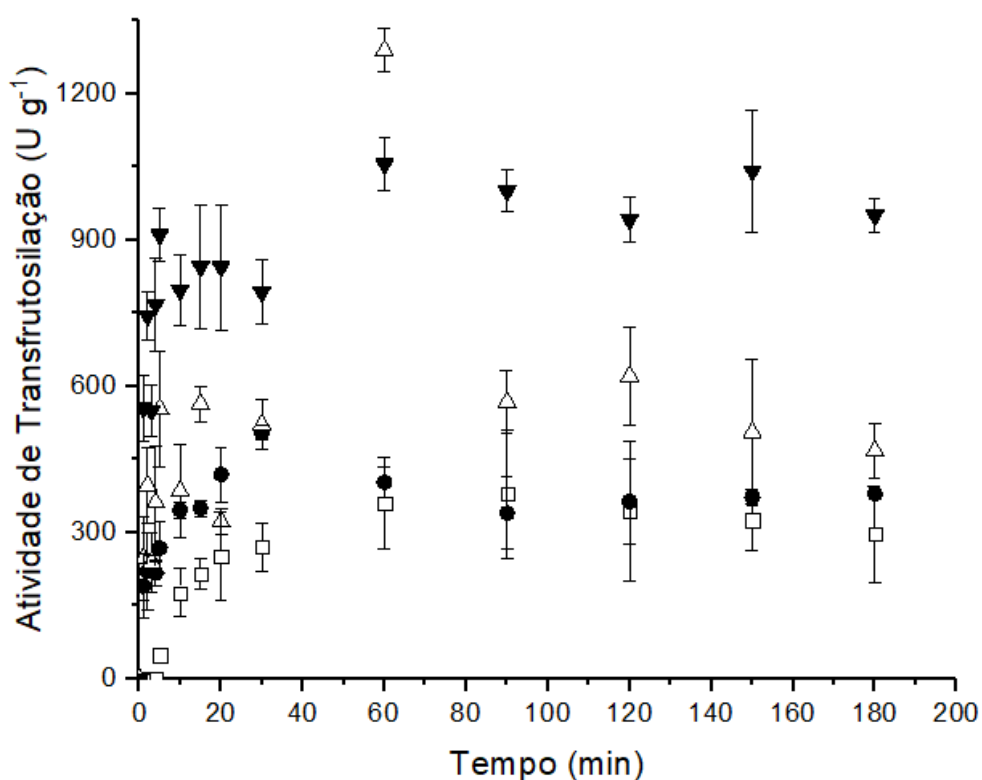
Nota: As imagens apresentam aumento de 150x. Condições experimentais: cultivadas em meio de cultura sintético, pH 5,5, 200 rpm por 28 h.

Elizei (2014) e Soares (2012) classificam o gênero *Aspergillus sp* como um fungo filamentosos. As hifas são encontradas em fungos filamentosos e seu desenvolvimento ocorre em quatro estágios: germinação de esporos, crescimento de hifa, ramificação e diferenciação fúngica. De acordo com a Figura 10 (B), cuja imagem de MEV mostra o último estágio de formação do fungo, há a formação de hifas não septadas, sem a presença de corpos de frutificação, sem a presença de esporos e um micélio homogêneo, que é uma característica de crescimento micelial de um fungo filamentosos do gênero *Aspergillus sp*. Tais características podem ser relacionadas com as condições de crescimento empregadas, tais como tempo de crescimento, meio de cultura e outros elementos inerentes ao procedimento empregado.

## 5.2 INFLUÊNCIA DA VAZÃO VOLUMÉTRICA DE ALIMENTAÇÃO NOS PERFIS DE ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

O efeito da vazão volumétrica de alimentação de substrato na atividade de transfrutossilação foi avaliado mediante procedimento experimental descrito pelo Tópico 4.2.2.1. A Figura 11 ilustra os perfis de atividade enzimática obtidos para o biocatalisador heterogêneo em reator PBR.

**Figura 11** – Atividade de transfrutossilação em função da vazão volumétrica de alimentação de substrato no reator PBR



Fonte: Autoria própria (2023).

Legenda: (□) 1 mL.min<sup>-1</sup>, (●) 4 mL.min<sup>-1</sup>, (Δ) 07 mL.min<sup>-1</sup>, (▼) 10 mL.min<sup>-1</sup>

Na Figura 11 pode ser observado que o reator apresenta estado estacionário entre os 60 min e 180 min de reação, nota-se que a vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> foi a que apresentou menor atividade de transfrutossilacção, com intervalo de  $296 \pm 98$  a  $379 \pm 131$  U.g<sup>-1</sup>. A vazão de 4,0 mL.min<sup>-1</sup> teve um intervalo de atividade de transfrutossilacção entre  $374 \pm 15$  a  $433 \pm 31$  U.g<sup>-1</sup>, muito próximos dos valores de atividade enzimática obtidos para a vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. A atividade de transfrutossilacção na vazão de 7,0 mL, foi a que apresentou a maior atividade de transfrutossilacção, exibiu um intervalo de atividade entre  $467 \pm 56$  e  $1288 \pm 44$  U.g<sup>-1</sup>. A vazão de 10,0 mL.min<sup>-1</sup>, apresentou valores entre  $941 \pm 45$  e  $1054 \pm 53$  U.g<sup>-1</sup>. Entretanto, o PBR operado com vazão de 10,0 mL.min<sup>-1</sup> apresentou deformação (compressão) do leito catalítico pela ação do fluxo devido às características de Compressividade do material PU, ocasionando queda de pressão no sistema e alto risco de vazamentos, motivo esse que não permitiu a avaliação em vazões superiores a 10,0 mL.min<sup>-1</sup>.

Baixas vazões volumétricas contribuem para a formação de uma camada limite difusional (presente no entorno da partícula de biocatalisador) de maior espessura, fazendo com que o processo seja limitado pela transferência de massa externa. À medida que se aumenta a vazão volumétrica, a espessura da camada limite diminui, favorecendo a transferência de massa externa (Fogler, 2012; Levenspiel, 2011).

Dessa forma, os menores valores de atividade de transfrutossilacção (1,0 e 4,0 mL.min<sup>-1</sup>), podem estar atribuídos à formação, no entorno da partícula de biocatalisador, de uma camada limite difusional espessa, tornando a reação limitada pela transferência de massa externa. Isso corrobora com o aumento da Atividade de transfrutossilacção para maiores vazões, pois a camada limite difusional no entorno da partícula de biocatalisador tem sua espessura reduzida e os efeitos da transferência de massa externa tornam-se desprezíveis. Posto isso, acredita-se que, para as vazões entre 7,0 mL.min<sup>-1</sup> e 10,0 mL.min<sup>-1</sup>, a reação não é mais limitada pela transferência de massa externa, prevalecendo os efeitos de escoamento e da reação.

Dias *et al.* (2022), avaliou a influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutossilacção em reator PBR a diferentes vazões (5 mL.min<sup>-1</sup>, 7,5 mL.min<sup>-1</sup>, 11,5 mL.min<sup>-1</sup>, 15 mL.min<sup>-1</sup> e 20,0 mL.min<sup>-1</sup>) com solução reagente constituída por sacarose comercial (União ®) 473 g.L<sup>-1</sup> e tampão tris-acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,5 e células integras de *Aspergillus oryzae* IPT301 livres. Foi observado por este estudo que o aumento do fluxo volumétrico até 15 mL.min<sup>-1</sup> causou um aumento na Atividade de Transfrutossilacção, enquanto o fluxo de 20 mL.min<sup>-1</sup>

produziu uma redução na Atividade de Transfrutossilação. Os fluxos intermediários (7,5; 11,5 e 15,0 mL.min<sup>-1</sup>) apresentaram valores de Atividade de Transfrutossilação próximos, sendo o menor valor de Atividade de Transfrutossilação obtido para o menor fluxo volumétrico (5 mL min<sup>-1</sup>). Nesta pesquisa a variação de atividade de transfrutossilação ficou entre 350 e 650 U.g<sup>-1</sup> aproximadamente.

Em comparação com o estudo de Dias *et al.* (2022) utilizando células integras livres de *Aspergillus oryzae* IPT301, o presente estudo ao avaliar a influência de vazão volumétrica na atividade de transfrutossilação em reator PBR obteve até três vezes mais atividade de transfrutossilação ao imobilizar as células de *Aspergillus oryzae* IPT301 em esponja de poliuretano, ratificando a eficácia da esponja como suporte imobilizador.

Ribeiro (2023), imobilizou por reticulação com glutaraldeído, células de *A. oryzae* IPT-301 e avaliou seus efeitos biocatalíticos quando empacotadas em reator de leito fixo (PBR), visando obter elevada atividade enzimática para a produção de FOS. Neste estudo, ao se avaliar a influência da vazão volumétrica nos perfis de atividade enzimática, o reator PBR foi alimentado à 1 mL.min<sup>-1</sup>, 2 mL.min<sup>-1</sup>, 3 mL.min<sup>-1</sup>, 4 mL.min<sup>-1</sup> e 5 mL.min<sup>-1</sup> com solução de sacarose comercial 473 g.L<sup>-1</sup>, pH 5,5. A reação foi conduzida à 50 °C por 150 min em reator PBR com altura de leito catalítico de 20 cm. Através deste ensaio, Ribeiro (2023) afirmou que a vazão adequada para se trabalhar nestas condições se deu pela vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>, o qual, tem-se um maior contato enzimático do substrato na reação, devido ao maior tempo de residência, diminuindo a possibilidade de arraste do biocatalisador, o que, possibilita a realização da reação de transfrutossilação.

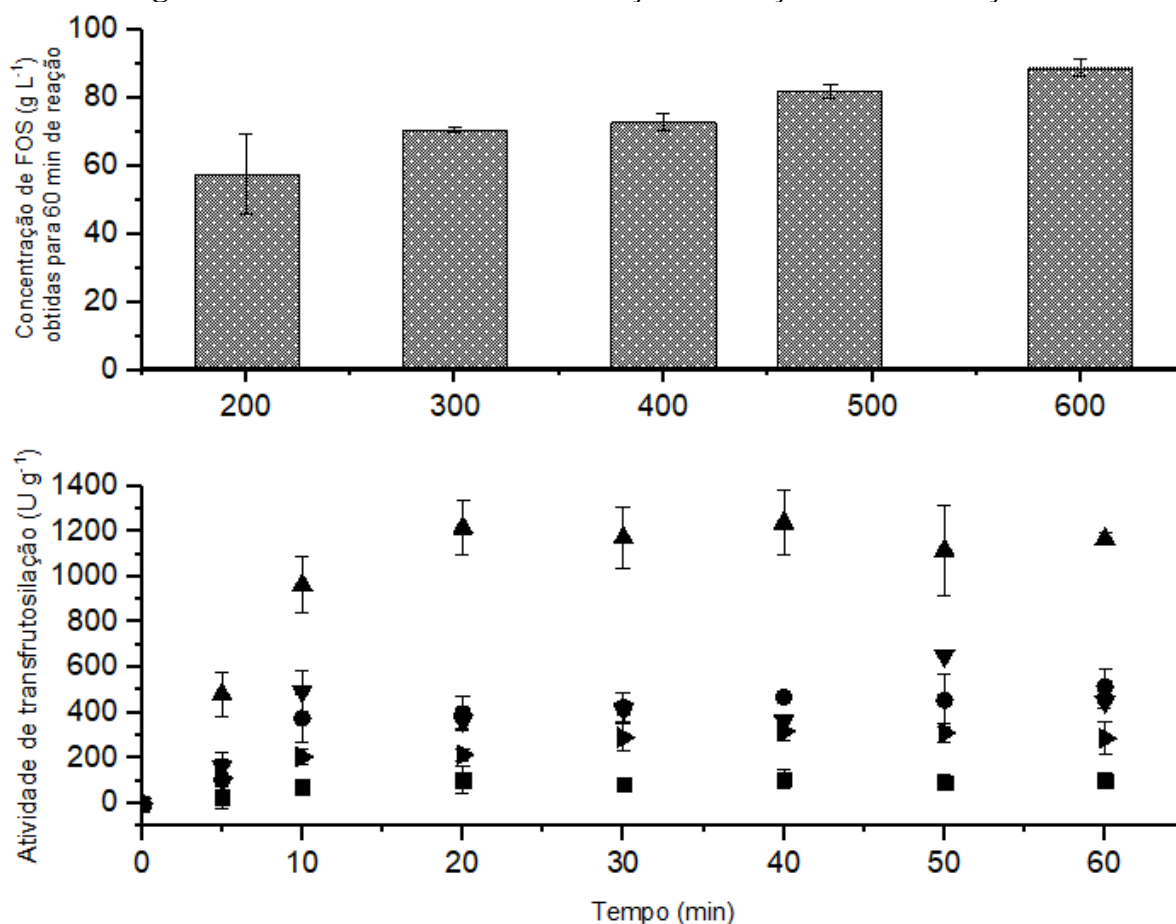
### 5.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DE TRANSEFRUTOSILAÇÃO

O efeito da concentração do substrato (solução reagente) na atividade de transfrutossilação foi avaliado mediante procedimento experimental descrito pelo Tópico 4.2.2.2. A Figura 12 mostra os perfis de atividade enzimática obtidos para a biocatalisador heterogêneo em função da concentração de substrato durante 60 minutos de reação.

De acordo com a Figura 12, observou-se que o aumento da concentração de substrato (sacarose) alimentada no reator, até o limite de 400 g.L<sup>-1</sup>, levou ao aumento da atividade de transfrutossilação, obtendo nesta condição, a atividade máxima de transfrutossilação (1236 ± 143 U g<sup>-1</sup>) aos 40 min de reação. Porém, para a concentração de 480 g L<sup>-1</sup> e 600 g L<sup>-1</sup> verificou-se

um decréscimo da atividade enzimática de transfrutossiliação, confirmando, então, a concentração de 400 g.L<sup>-1</sup> como a concentração de substrato que resulta na maior atividade de transfrutossiliação para o processo contínuo.

**Figura 12** – Atividade de transfrutossiliação em função da concentração de sacarose



Fonte: Autoria própria (2023).

Legenda: Concentrações (■) 200g/L, (●) 300 g/L, (▲) 400 g/L, (▼) 480 g/L e (►)600 g/L.

Nota: Condições operacionais: reator PBR alimentado com solução de sacarose, pH 5,5, a uma vazão volumétrica de 1 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura de 50°C por 60 minutos de reação.

A figura 12 mostra que concentrações de FOS entre 55 g L<sup>-1</sup> e 85 g L<sup>-1</sup> foram obtidas aos 60 min de reação no PBR e que esta concentração aumentou como o aumento de concentração inicial de substrato. O estudo desenvolvido por Garcia (2021) em reator batelada, para o mesmo microrganismo, pH e temperatura avaliou as concentrações de sacarose de 75,5 g.L<sup>-1</sup> a 604 g.L<sup>-1</sup>. Nessas condições, a atividade máxima de transfrutossiliação (aproximadamente 600 U g<sup>-1</sup>) se deu em 480,2 g L<sup>-1</sup> de sacarose, que também diminuiu quando a reação foi conduzida com acréscimo de concentração de 600 g L<sup>-1</sup> para, aproximadamente, 550 U g<sup>-1</sup>. Dessa maneira, nota-se que o comportamento obtido pelo processo contínuo em PBR assemelha-se aos estudos em batelada, com valores muito aproximados de concentração de

substrato que resulta na maior atividade de transfrutossilação, assim como o decréscimo para concentrações mais elevadas.

De acordo com Antošová e Polakovič (2001), tal decréscimo pode estar relacionado à inibição pelo substrato ou por algum dos produtos formados. Sendo assim, a inibição, observada na reação contínua para elevadas concentrações de sacarose ( $>400 \text{ g L}^{-1}$ ), pode ter ocorrido pelo acúmulo de substrato.

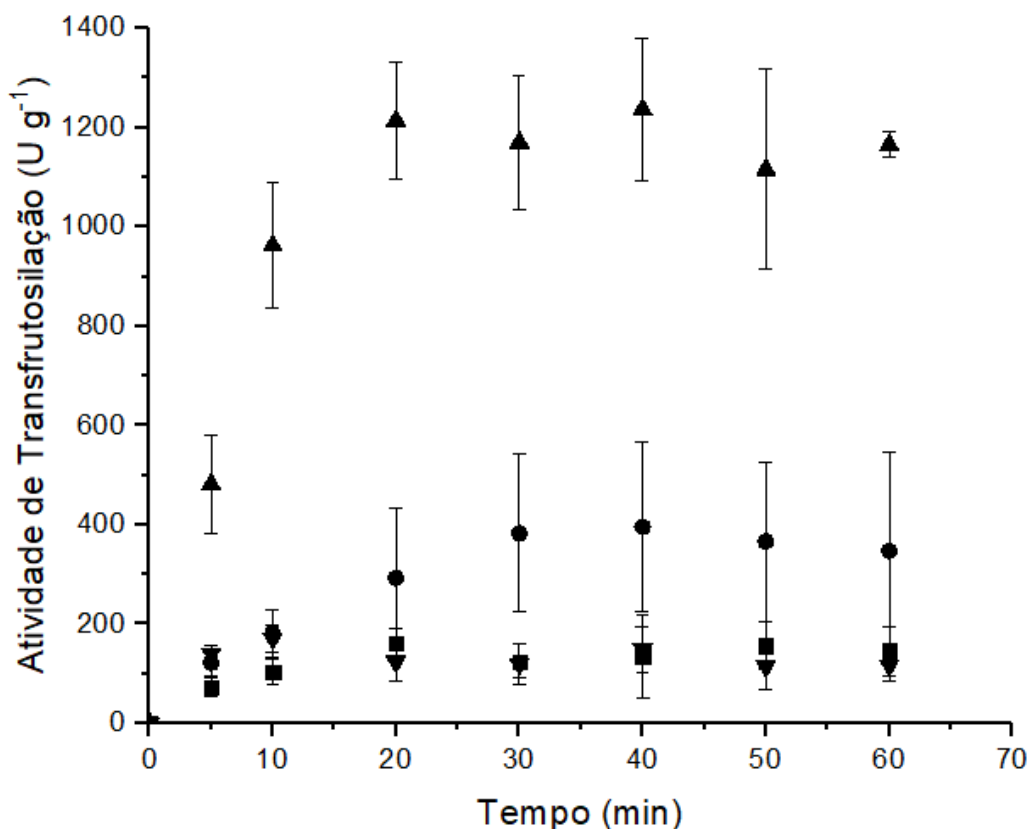
Para Dias *et al.* (2022), a maior atividade de transfrutossilação, para a concentração de  $470 \text{ g.L}^{-1}$ , foi de  $526,6 \pm 68,2 \text{ U g}^{-1}$ , valor próximo ao obtido por Garcia (2021). Para uma concentração similar aos estudos de Dias *et al.* (2022) e Garcia (2021), o presente estudo apresentou na concentração de  $480 \text{ g.L}^{-1}$ , atividade de transfrutossilação de  $651,71 \pm 7,82 \text{ U.g}^{-1}$ . Para a condição de  $400 \text{ g L}^{-1}$ , no qual alcançou-se os maiores valores de atividade, aos 40 min de reação, obteve-se a atividade de transfrutossilação de  $1236,56 \pm 143,92 \text{ U g}^{-1}$ , valor significativamente superior aos estudos anteriores com reatores contínuos, demonstrando a eficiência do leito catalítico de células de *A. oryzae* imobilizadas em esponjas de poliuretano.

#### 5.4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA REACIONAL NOS PERFIS DE ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

A influência da temperatura do meio reacional na atividade de transfrutossilação de células íntegras de *A. oryzae IPT-301* imobilizadas em esponja de poliuretano está apresentada na Figura 13.

A velocidade das reações catalisadas por enzimas cresce com a temperatura até um certo limite. Acima de uma determinada temperatura, a atividade enzimática diminui com o aumento da temperatura devido à desnaturação do biocatalisador (Shuler; Kargi, 2002). Tal afirmação fica evidenciada ao observar o comportamento das atividades de transfrutossilação da *A. oryzae IPT-301* (Figura 13), cujo aumento da atividade enzimática ocorre até  $50^\circ\text{C}$ , condição ótima de operação experimental, e com o incremento da temperatura inicia-se a redução da atividade de transfrutossilação. Registrou-se que os maiores valores de atividade enzimática, na temperatura de  $50^\circ\text{C}$ , foram para o tempo de 20 minutos  $1214,13 \pm 119,02 \text{ U.g}^{-1}$  e 40 minutos com  $1236,56 \pm 143,92 \text{ U.g}^{-1}$ .

**Figura 13** – Perfis de atividade de transfrutossilção em função da temperatura do meio reacional



Fonte: Autoria própria (2023).

Legendas: Temperaturas: (■) 30°C, (●) 40°C, (▲) 50°C e (▼) 60°C.

Nota: Condições operacionais: reator PBR alimentado com solução de sacarose 400 g L<sup>-1</sup>, pH 5,5, a uma vazão volumétrica de 1 mL.min<sup>-1</sup> durante 60 min de reação

Dias *et al.* (2022) obteve para a mesma temperatura de 50°C de reação os valores de atividade enzimática, iguais a  $491 \pm 69$  U.g<sup>-1</sup> e  $500 \pm 43,14$  U.g<sup>-1</sup>, para as células íntegras livres. O comparativo entre os estudos demonstra a eficiência promovida pela imobilização das células íntegras em esponja de poliuretano em detrimento da utilização das células íntegras livres diretamente no reator contínuo.

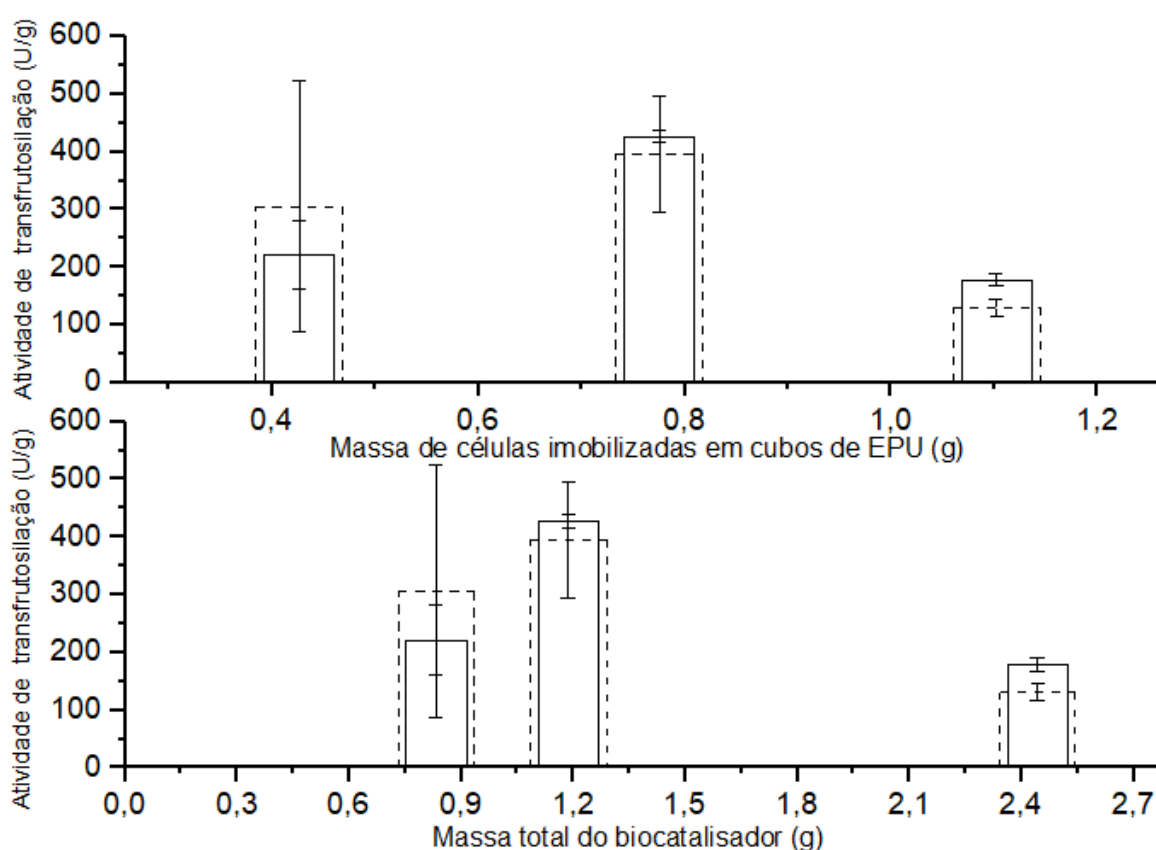
Observou-se que o perfil obtido para a temperatura de 60 °C apresentou um decréscimo da atividade de transfrutossilção ao decorrer da reação. A redução pode estar relacionada à baixa estabilidade da enzima à 60 °C (Schuurmann *et al.* 2014). Além disso, a desativação enzimática da FTase também é um fator que resulta na redução da Atividade de Transfrutossilção ao longo do tempo, conforme sugere Silva (2009).



## 5.5 INFLUÊNCIA DA MASSA DO LEITO CATALÍTICO NA ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

A Figura 14 apresenta a atividade de transfrutoseilação das células imobilizadas em esponja de poliuretano em reator PBR em função da massa do leito catalítico (Tópico 4.3.2.4).

**Figura 14** – Influência da massa do leito biocatalítico na atividade de transfrutoseilação



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Legenda: 60 min (barra tracejada) e 120 min (barra linha contínua), ambos no estado estacionário.

Inicialmente, acrescentou-se massa de biocatalisador suficiente para preencher 50% do leito do reator. Posteriormente adicionou-se massa para preencher 100% do leito do reator, de modo que as esponjas estivessem dispostas sem haver qualquer compactação do leito. E posteriormente, foi realizada uma tentativa de colocar mais massa de

biocatalisador, agora com a compactação máxima de esponjas, a fim de colocar mais massa possível dentro do reator. Observou-se um rápido aumento da Atividade de Transfrutossilção ao se completar o leito do reator com o biocatalisador (até aproximadamente 100%), tanto no tempo de 60 min quanto no tempo de 120 min. A diferença entre os valores de Atividade de transfrutossilção para as massas de 0,4 e 0,8g pode ser atribuído ao surgimento de caminhos preferenciais ou volumes mortos no reator com menor massa de biocatalisador.

Apesar do alto desvio padrão da primeira massa de esponjas de 0,4g, possivelmente devido a movimentação do leito por conta dos espaços vazios, ao se realizar o *Teste de Tukey* para as diferentes massas de biocatalisador, observou-se que não há diferenças significativas entre elas.

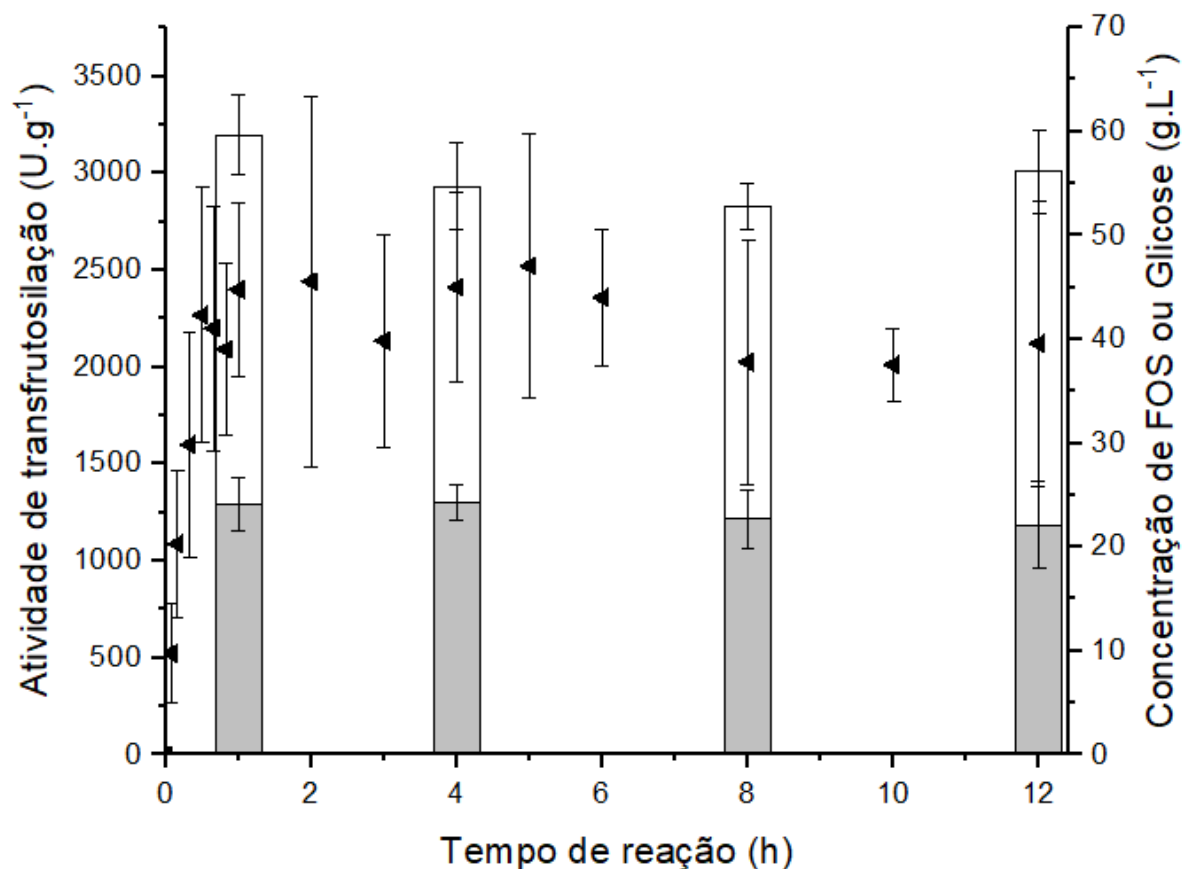
Contudo, ao preencher o leito com mais biomassa, aproximadamente 1,1g de biocatalisador, houve uma redução da Atividade de Transfrutossilção, possivelmente devido a deformação do leito e diminuição dos espaços vazios.

Com relação a massa total do leito catalítico, ressalta-se que a variação de massa se dá por conta dos diferentes cultivos celulares submersos para a realização do ensaio, variando a concentração de biomassa entre os cultivos.

## 5.6 ENSAIOS DE ESTABILIDADE OPERACIONAL

A estabilidade operacional foi avaliada conforme o procedimento experimental descrito pelo Tópico 4.3.2.5 e a Figuras 15 e 16 mostram os perfis de atividade de transfrutossilção obtidos sem e com reciclo.

**Figura 15** – Ensaio de estabilidade operacional sem reciclo.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

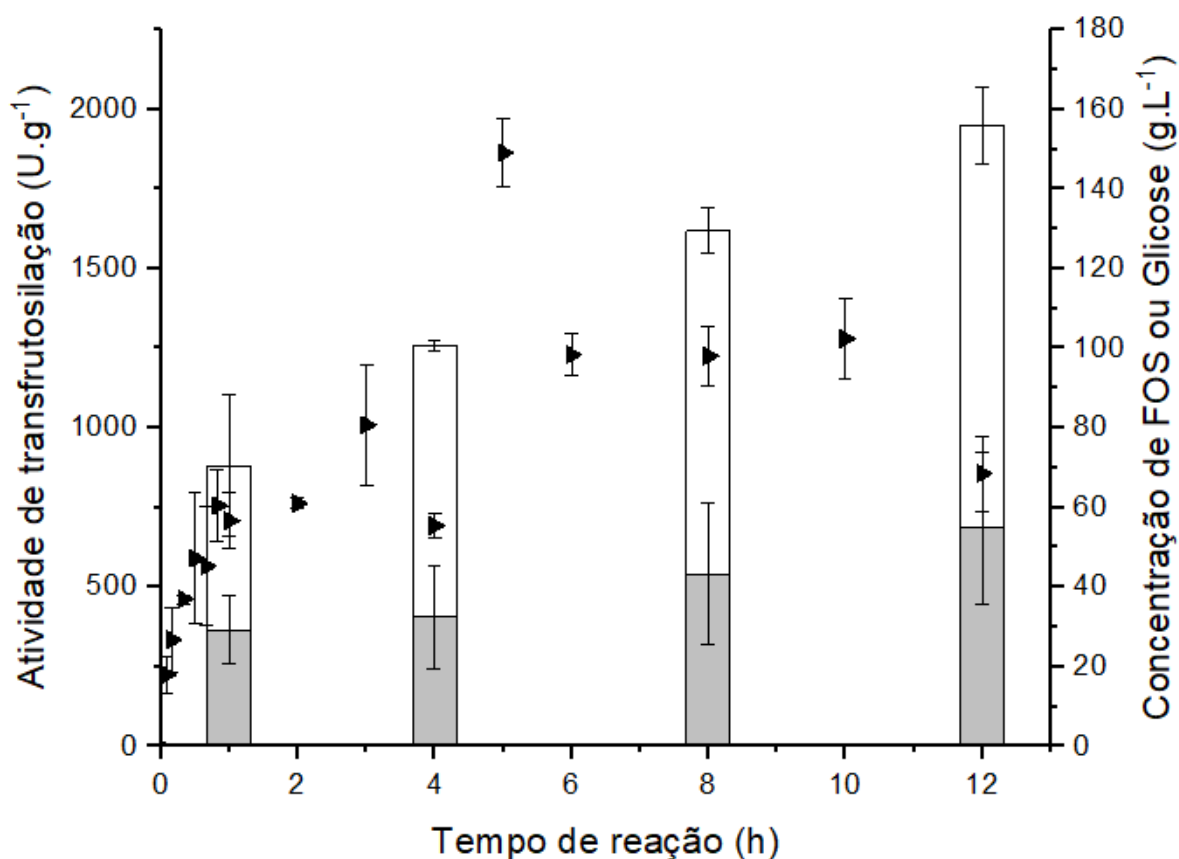
Legenda: Perfil de atividade de transfrutose (◄) e quantificação de fruto-oligossacarídeos (barra sem preenchimento) e glicose (barra cinza)

A Figura 15 apresenta o comportamento da atividade de transfrutose sem reciclo para a vazão de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , durante 12 horas. Nesta, foi possível observar que a reação sem reciclo apresentou atividade de transfrutose máxima às 5 h de  $2521 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ , mantendo constante a partir de 30 min, sem o declínio da atividade no decorrer do tempo. A produção de fruto-oligossacarídeos variou de 52 a  $59 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  no estado estacionário. A concentração de glicose variou de 22 a  $24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Observa-se um comportamento constante tanto da produção de FOS quanto da conservação da Atividade de Transfrutose durante o tempo de 12 horas. Pelo teste de Tukey do tempo de 30 min até 720 min, as amostras são estatisticamente iguais.

A Figura 16 apresenta o comportamento da Atividade de Transfrutose com reciclo de substrato para a vazão de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , durante 12 horas.

**Figura 16** – Ensaio de estabilidade operacional com reciclo de substrato



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Legenda: Perfil de atividade de transfrutoseilação (►) e quantificação de fruto-oligossacarídeos (barra sem preenchimento) e glicose (barra cinza)

Neste ensaio, é possível observar o início do estado estacionário aos 60 min de reação, com uma da Atividade de Transfrutoseilação máxima de 1862 U.g<sup>-1</sup> às 5 h, com um decréscimo nas Atividades de Transfrutoseilação subsequentes. Contudo, há um incremento na produção de fruto-oligossacarídeos ao decorrer do tempo, alcançando em torno de 155 g.L<sup>-1</sup> no tempo de 12 h.

No experimento, como todo efluente retorna para operação no reator PBR, há um reciclo total de substrato, constatado pelas concentrações de glicose e o FOS que se acumulam com o tempo. O decréscimo da Atividade de Transfrutoseilação no decorrer do tempo pode ser dado devido à presença e acúmulo da glicose no sistema, inibindo a atividade enzimática, pois à medida que se aumenta a concentração de glicose, diminui a quantidade de frutose transfrutoseilada, justificando o declínio da Atividade de Transfrutoseilação.

Por fim, pode-se afirmar que o processo contínuo, utilizando biomassa imobilizada em EPU como recheio do reator PBR, foi capaz de gerar, perfis expressivos de atividade enzimática de transfrutoseilação, assim como constante estabilidade operacional, revelando-se um potencial para produção futura de frutooligossacarídeos (FOS).

## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho implementou um sistema reacional contínuo em reator de leito fixo (PBR), empacotado com células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, imobilizadas em cubos de esponja de poliuretano, visando obter elevada atividade de transfrutossilacção para a síntese enzimática de FOS

Foram produzidas células microbianas, com atividade catalítica, por cultivo celular submerso em meio de cultura sintético e imobilizadas, concomitantemente, em estruturas cúbicas de esponja de poliuretano (EPU).

A massa de células microbianas imobilizadas foi obtida por meio da diferença entre a massa celular seca e a massa de suporte contido no meio de cultivo ( $\text{g}_{\text{célula}} \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ). A massa seca foi obtida após os ensaios de atividade enzimática mediante secagem das células em estufa por 24 h a 60 °C.

A caracterização do material suporte de EPU, por microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar os poros e ranhuras da estrutura da esponja, bem como as evidências de crescimento ao longo dos filamentos e fios da esponja, na qual as células de *A. oryzae* IPT-301 se fixaram ao longo do cultivo celular.

Nos estudos dos perfis de atividade enzimática no reator PBR, avaliaram-se a influência da vazão da solução reagente (substrato), a influência da temperatura na atividade de transfrutossilacção, a influência da concentração de substrato e massa do leito catalítico, posteriormente, esses estudos mostraram que a temperatura de 50 °C e a concentração de 400 g L<sup>-1</sup> de substrato proporcionaram as maiores atividades enzimáticas relativas. A vazão de substrato de 10 mL min<sup>-1</sup> foi a mais vantajosa dentre as avaliadas, entretanto ocasionou uma sobrecarga no aparato experimental, sendo atribuída a vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> para utilização dos ensaios subsequentes. A massa do leito catalítico que se melhor adequou ao processo foi a massa de células imobilizadas de 0,77 g, que preencheu todo o leito do reator (100%).

Com a estabilidade operacional sem reciclo, foi possível observar que a reação apresentou atividade de transfrutossilacção máxima de 2521 U.g<sup>-1</sup> em 5 h de reação. A produção de fruto-oligossacarídeos variou de 52 a 59 g.L<sup>-1</sup> no estado estacionário. A concentração de glicose variou de 22 a 24 g.L<sup>-1</sup>. Observou-se um comportamento constante tanto da produção de FOS quanto da conservação da Atividade de Transfrutossilacção durante o tempo de 12 horas. Pelo teste de Tukey do tempo de 30 min até 720 min, as amostras são estatisticamente iguais.

Para o ensaio de estabilidade operacional com reciclo, foi obtido Atividade de Transfrutossilacão máxima de  $1862 \text{ U.g}^{-1}$  em 5 h de reação, com um decréscimo nas Atividades de Transfrutossilacão subsequentes. Contudo, há um incremento na produção de fruto-oligossacarídeos ao decorrer do tempo, chegando a em torno de  $155 \text{ g.L}^{-1}$  no tempo de 12 h.

No ensaio de estabilidade operacional com reciclo o decréscimo da Atividade de Transfrutossilacão no decorrer do tempo pode ser dado devido à presença e acúmulo da glicose no sistema, inibindo a atividade enzimática, pois à medida que se aumenta a concentração de glicose, diminui a quantidade de frutose transfrutossilada, justificando o declínio da Atividade de Transfrutossilacão.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade desse trabalho, são propostas as seguintes sugestões:

- Desenvolvimento de ensaios para avaliação dos parâmetros cinéticos, termodinâmicos, de transferência de massa e de desempenho do processo.
- Realizar estudos de modelagem matemática e simulação do reator a fim de prever a conversão teórica de sacarose e a formação de produto (FOS);
- Aumentar o tempo reacional durante ensaios de estabilidade operacional com o intuito de quantificar a perda da atividade enzimática ao longo do processo contínuo;
- Estudar os efeitos de inibição enzimática em processos contínuos durante a produção de FOS.



## REFERÊNCIAS

- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. 2nd ed. New York: CRC Press, 1997.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.
- BONINE, B.M. **Produção de lipase pelo fungo *Myceliophthora* sp. f 2.1.4, caracterização e imobilização da solução enzimática bruta**. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista. 2011. 84p. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia).
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H.H. Protease from *Aspergillus oryzae* : Biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolases with antioxidant activities. **Journal of Food Processing**, v. 2014, 2014.
- CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 153-160, 1996.
- CHIEN, C. S.; LEE, W. C.; LIN, T. J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4–5, p. 252–257, 2001.
- CHOUKADE, R., KANGO, N. Production, properties, and applications of fructosyltransferase: a current appraisal, **Critical Reviews in Biotechnology**, (2021).
- CORREA, A. C.; LOPES, M. S.; PERNA, R. F.; SILVA, E. K. ructan-type prebiotic dietary fibers: Clinical studies reporting health impacts and recent advances in their technological application in bakery, dairy, meat products and beverages. **Carbohydrate Polymers**, Volume 323, 2024.
- CUERVO-FERNÁNDEZ, R.; OTTONI, C. A. ; DA SILVA, E. S.; MATSUBARA, R. M.; CARTER, J. M.; MAGOSSO, L. R.; WADA, M. A. A.; DE ANDRADE RODRIGUES, M. F.; MARESMAS, B. G.; MAIORANO, A. E. Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 87, 2007.
- CUNHA, J. S.; OTTONI, C. A.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E. S. *et al.* Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *aspergillus oryzae* ipt-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 36, n. 2, p. 657-668, 2019.
- DACEWICZ E, GRZYBOWSKA-PIETRAS J. Polyurethane foams for domestic sewage treatment. **Materials**. 2021; 14(4):933.
- DIAS, G. S., SANTOS, E. D., XAVIER, M. C.A., ALMEIDA, A. F., SILVA, E. S., MAIORANO, A. E., PERNA, R. F., MORALES, S. A.V. Study on the transfructosylation

activity of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells in a packed bed reactor aiming at fructooligosaccharide production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2022.

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

DORTA, C ; CRUZ, R ; OLIVA-NETO, P. DE ; MOURA, D.J.C. Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 1003–1009, 2006.

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

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

FERNANDEZ-ARROJO, L., RODRIGUEZ-COLINAS, B., GUTIERREZ-ALONSO, P., FERNANDEZ-LOBATO, M., ALCALDEA, M., BALLESTEROS, A. O., PLOUA, F. J. Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**. v.48 p. 677–682. 2013.

FLORES-MALTOS, D. A., MUSSATO, S. I., CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C., RODRÍGUEZ-HERRERA, R. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Crit Rev Biotechnol**, Early Online: 1–9. 2014.

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

GANAIE, M. A.; RAWAT, H. K.; WANI, O. A.; GUPTA, U. S. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, 49, n. 5, p. 840-844, 2014.

GARCIA, R. L.; DIAS, G. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A. *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**, 38, n. 2, p. 273-285, 2021.

GHIACI, M.; TGHIZADEH, M.; ENSAFI, Ali A.; ZANDI-ATASHBAR, Navid; REZAEI, B. "Improved mass transfer in an upflow fixed-bed reactor using a novel liquid distributor." **Chemical Engineering Research and Design**, 109, 112-120. 2016.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 14, n. 8, p. 491-502, 2017/08/01 2017.

GHIACI, M.; TAGHIZADEH, M.; ENSAFI, A. A.; ZANDI ATASHBAR, N.; REZAEI, B. Silver nanoparticles decorated anchored type ligands as new electrochemical sensors for glucose detection. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 26, 2016.

GONÇALVES, M. C. P.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 95, n. 9, p. 2473-2482, 2020

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A., TAMADANI, N., KURATANI, N., NODA, H., FUKUDA, H., KONDO, A.. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemistry Eng. J.** , 55 ( 2011 ) , pp . 66-71

HUANG, MEI-PING ; WU, MIN ; XU, QIANG-SHENG ; MO, DE-JIAO ; FENG, JIA-XUN. 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.

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

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**, 79, p. 175-184, 2018. Article.

JUNG, K. H. BANG, S. H.; OH, T. K.; PARK, H. J. Industrial production of fructooligosaccharides by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* in a packed bed reactor. **Biotechnol Lett**, v. 33, p. 1621-1624, abr. 2011.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2011.

LI, L.; PHILIP, W. D.; GREENWELL, H. C. Biodiesel Production via Trans-Esterification Using *Pseudomonas cepacia* Immobilized on Cellulosic Polyurethane. **ACS Omega**, 3, n. 6, p. 6804-6811, 2017.

LI, W.; CHEN, L.; HU, X.; WANG, X.; LIU, J. Optimization of fructooligosaccharides production from sucrose by *Aspergillus oryzae* in a packed-bed reactor. **Bioresource Technology**, 320, 2021.

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

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

MAIORANO, A. E.; DA SILVA, E. S.; PERNA, R. F.; OTTONI, C. A. Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor. **Biotechnology Letters**, 42, n. 12, p. 2619-2629, 2020/12/01 2020.

MARTINEZ, C. O.; RUIZ, S. P.; FENELON, V. C.; MORAIS, G. R.; BAESSO, L.; MATIOLI, G. M. Effective Immobilization of *Agrobacterium* sp. IFO 13140 Cells in LoofaSponge for Curdlan Biosynthesis. **Molecules**. v 20, p 7957-7973, 2015.

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

MORDOR INTELLIGENCE. Global nutraceuticals market - growth, trends and forecasts (2017 -2022). **Mordor Intelligence**. Abril de 2017.

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

MUTANDA, T.; MOKOENA, M. P.; OLANIRAN, A. O.; WILHELMI, B. S. Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 41, n. 6, p. 893-906, 2014.

NASCIMENTO, R. F. L.; VIDAL, A. C. A.; MELO, C. B.; RAULINO D. Q.; CABRAL, G. S. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014.

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

OLIVEIRA, Elizama Aguiar de. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

OLIVEIRA, R. L. de, SILVA, M. F. da, SILVA, S. P. da, FERNANDES, J. V. L. C., CONVERTI, A., PORTO, T. S. Immobilization of a commercial *Aspergillus aculeatus* enzyme preparation with fructosyltransferase activity in chitosan beads: A kinetic/thermodynamic study and fructo-oligosaccharides continuous production in enzymatic reactor. **Food and Bioproducts Processing**. v. 122, p. 169-182. 2020.

OTTONI, C. A. ; CUERVO-FERNANDEZ, R. ; PICCOLI, R. M. ; MOREIRA, R. ; GUILARTE-MARESMA, B. ; SABINO DA SILVA, E. ; RODRIGUES, M. F. A. ; MAIORANO, A. E. Media Optimization for  $\beta$ -Fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 49–59, 2012.

PERNA, R. F.; CUNHA, J. S.; GONÇALVES M.C.P.; BASSO R. C.; SILVA E. S.; MAIORANO A. E. Microbial Fructosyltransferase: Production by Submerged Fermentation and Evaluation of pH and Temperature Effects on Transfructosylation and Hydrolytic Enzymatic Activities. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 4, n. 3, p. 43-50, 2018.

PRADO, José Pedro Zanetti. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel pura e funcionalizada para produção de frutooligosacarídeos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2021.

RIBEIRO, B. M. **Imobilização de células íntegras de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 visando estudos biocatalíticos em reator de leito fixo para a produção de frutooligosacarídeos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2023.

ROMANO, N.; SANTOS, M.; MOBILI, P.; VEGA, R.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructooligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 202, p. 467, 2016.

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

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M.; SOTO-JOVER, S.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G.; LÓPEZ-GÓMEZ, A. Manufacturing of Short-Chain Fructooligosaccharides: from Laboratory to Industrial Scale. **Food Engineering Reviews**, 12, n. 2, p. 149-172, 2020.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial** - Volume 2. 1 Ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

SCHUURMANN, J.; QUEHL, P.; FESTEL, G.; JOSE, J. Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes toward industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 19, p. 8031-8046, 2014.

SHULER, M.L. and KARGI, F. **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. Prentice Hall International, Englewood Cliffs. 2002.

SILVA, Júnio Cota. **Seleção de microrganismos produtores de frutossiltransferase e estudo das propriedades bioquímicas da frutossiltransferase de *Penicillium sp.* 2009**. 58 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

SILVA, M., Abdal, D., Prado, JPZ, Dias, GS, Morales, SAV, Xavier, MCA, Alemida, AF, Silva, ES, Maiorano, AE e Perna, RF. Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, 24, n. e2020283, 2021.

SMAALI, I., JAZZAR, S., SOUSSI, A., MUZARD, M., AUBRY, N., & NEJIB MARZOUKI, M. (2012). Enzymatic synthesis of date fructooligosaccharides by products

using an immobilized crude enzyme preparation of fructofuranosidase from *Aspergillus awamori* NBRC 4033. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 17(2), 385–392.

SMITH, A., and JONES, B. Optimizing Reactant Distribution in Upflow Fixed Bed Reactors. **Research in Industrial and Engineering Chemistry**, 45(3), 289-297. 2018.

SOARES, M.S. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel** – Lorena: Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2012. 119p. (Dissertação, Mestrado em Ciências).

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

SPIEGEL, J. E., ROSE, R., KARABELL, P. Safety and benefit os fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v.1, p.85-89, 1994.

TANAKA, K., SUGIMOTO, T., MATSUO, I., SUZUKI, T., & SUEYOSHI, K. Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by *Aspergillus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 126(5), 594-599. 2018.

VAŇKOVÁ, K.; ONDERKOVA, Z.; ANTOSOVA, M.; POLAKOVIC, M. Design and economics of industrial production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 62, n. 4, p. 375-381, 2008.

VARESCHE, MB; ZAIAT, M.; VIEIRA, LGT; VAZOLLER, RF; FORESTI, E. Microbial colonization of polyurethane foam matrices in a horizontal flow immobilized sludge anaerobic reactor. **App. Microbiol. Biotechnology**. 1997, 48, 534-538.

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

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

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. Semi-batch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.24/25, p. 299–308, 1992.

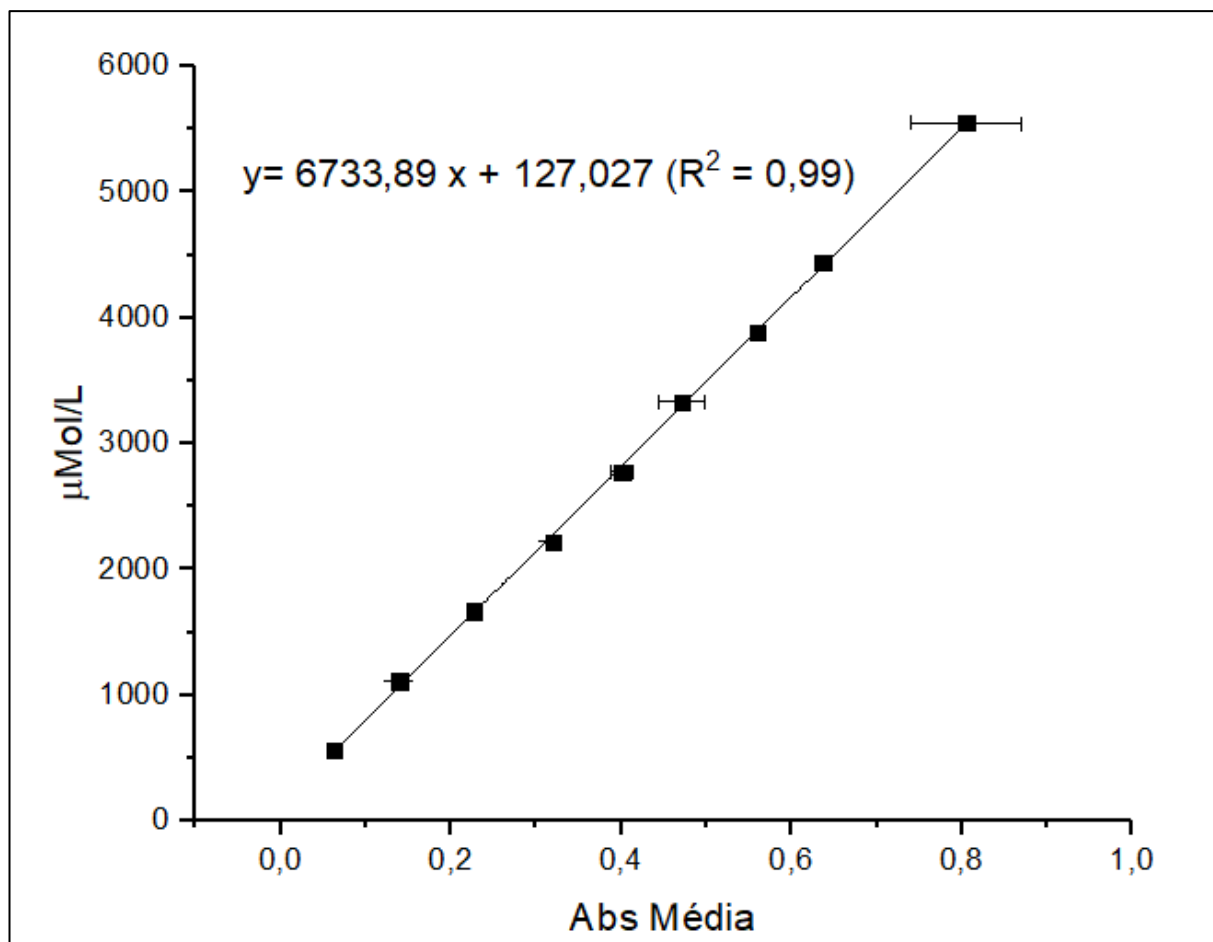
YUN, J. W. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. **Enzyme And Microbial Technology**, 19, n. 2, p. 107-117, 1996.

ZAMBELLI, P. TAMBORINI, L. CAZZAMALLI, S.; PINTO, A.; ARIOLI, S.; BALZARETTI, S.; PLOU, F. J.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; MOLINARI, F.; CONTI, P.

ROMANO, D. An efficient continuous flow process for the synthesis of a nonconventional mixture of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, p. 607–613, 2016..

ZENG, X., ZHOU, K., DONG-MEI B., CHARLES B., MARGARET Z., JIN-SONG Y. Preparation of Fructooligosaccharides using *Aspergillus niger* 6640 whole-cell as Catalyst for Bio-transformation. *LWT - Food Science and Technology*. 65. 10.1016/j.lwt.2015.09.031. *et al.* Preparation of fructooligosaccharides using *Aspergillus niger* 6640 wholecell as catalyst for bio-transformation. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 65, p.10721079, 2016.

ZHANG, J.; LIU, C.; XIE, Y.; LI, N. *et al.* Enhancing fructooligosaccharides production by genetic improvement of the industrial fungus *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Biotechnology**, 249, p. 25-33, 2017. Article.

**APÊNDICE A – Curva de calibração obtida pelo método DNS****Figura 17** – Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR)

Fonte: Elaborada pela autora (2023).



## APÊNDICE B – Imagens dos testes de Tukey retirados do software past4project

**Figura 18** – Teste de Tukey para o Ensaio de diferentes concentrações de substrato

	Concentração	0	5	10	20	30	40	50	60
1	• 200 g/L	000	23.35	89.36	80.14	80.16	123.77	82.67	89.79
2	•	000	37.67	73.17	170.48	118.31	137.74	133.96	136.68
3	•	000	30.68	56.15	58.71	57.00	61.26	65.00	69.32
4	•								
5	• 300 g/L	000	45.49	327.74	392.29	458.02	475.12	436.51	492.78
6	•	000	18.63	496.06	472.83	461.26	491.82	580.97	597.43
7	•	000	242.63	300.89	326.25	349.72	436.60	345.25	455.75
8	•								
9	• 400 g/L	000	374.45	822.55	1076.71	1209.29	1331.61	1347.22	1140.40
10	•	000	567.79	1065.15	1284.70	1020.89	1070.97	1015.92	1190.16
11	•	000	503.18	999.33	1280.98	1280.87	1307.09	983.59	1165.82
12	•								
13	• 480 g/L	000	132.38	591.06	329.43	415.25	355.36	660.68	428.86
14	•	000	197.73	487.25	361.34	438.91	373.24	646.29	482.55
15	•	000	161.36	404.47	399.71	388.11	367.71	648.16	437.16
16	•								
17	• 600 g/L	000	134.11	233.61	246.49	360.83	351.96	361.09	341.17
18	•	000	87.97	167.51	198.26	255.94	274.81	281.03	206.03
19	•	000	115.77	216.86	199.83	254.81	326.60	290.98	315.00
20	•								
21	•								

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

**Figura 19** – Teste de Tukey para o Ensaio de diferentes temperaturas

	temperatura/	0	5	10	20	30	40	50	60
1	• 30°C	000	86.84	115.00	191.07	156.05	232.35	211.90	203.55
2	•	000	51.88	72.58	132.87	130.68	94.01	118.77	119.41
3	•	000	77.94	119.87	160.70	88.13	81.51	138.93	115.21
4	•								
5	• 40°C	000	151.23	170.72	250.58	376.28	429.30	317.56	243.51
6	•	000	112.12	138.37	451.21	544.32	547.02	545.65	578.04
7	•	000	100.83	234.10	176.85	226.74	209.66	235.48	220.05
8	•								
9	• 50°C	000	374.45	822.55	1076.71	1209.29	1331.61	1347.22	1140.40
10	•	000	567.79	1065.15	1284.70	1020.89	1070.97	1015.92	1190.16
11	•	000	503.18	999.33	1280.98	1280.87	1307.09	983.59	1165.82
12	•								
13	• 60°C	000	123.68	200.62	83.22	75.43	102.54	79.30	85.17
14	•	000	159.32	164.04	157.03	159.94	194.30	163.28	150.28
15	•	000	136.90	147.10	130.89	122.92	151.41	150.28	114.57
16	•								

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

**Figura 20:** Teste de Tukey para o Ensaio de estabilidade operacional

	0	5	10	20	30	40	50	60	120	180	240	300	360	480	600	720
1	• 000	253.85	1506.82	1015.59	2598.46	2156.73	2232.30	2862.79	2165.47	2069.50	3009.84	2570.67	1457.58	2170.96	1969.28	1745.09
2	• 000	373.11	1309.06	2174.05	2797.64	2743.95	2648.13	2690.10	3418.19	2537.61	2510.08	3059.19	1751.22	2854.31	2183.01	1648.02
3	• 000	632.99	830.96	1607.09	2354.02	2569.10	1826.68	2118.79	2942.59	2547.33	2287.30	2906.22	2163.74	1625.98	2126.01	1754.93

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

**Figura 21 –** Teste de Tukey para o Ensaio de diferentes vazões volumétricas

	A	0	5	10	15	20	30	60	90	120	150	180
1	• 1 mL/min	00	60.71	231.88	246.53	177.36	220.58	323.52	276.34	437.87	378.59	264.92
2	•	00	32.30	135.61	212.98	223.68	273.45	466.58	334.47	180.03	341.27	217.91
3	•	00	53.66	161.31	186.02	353.11	319.40	291.88	527.98	417.32	257.06	407.21
4	•											
5	• 4 mL/min	00	360.38	320.64	383.36	530.30	479.05	431.32	457.03	398.38	390.43	374.88
6	•	00	445.95	345.64	350.10	419.21	504.83	403.31	339.60	363.42	372.48	379.15
7	•	00	349.65	361.74	367.36	467.63	483.43	465.25	477.97	530.86	359.49	371.34
8	•											
9	• 7 mL/min	00	476.44	349.41	590.54	349.71	497.79	1272.77	539.90	602.26	427.91	468.10
10	•	00	690.52	313.91	579.44	323.10	579.44	1338.87	641.77	729.14	676.93	411.14
11	•	00	493.88	492.72	522.50	294.87	487.19	1255.02	521.92	531.66	413.16	524.40
12	•											
13	• 10 mL/min	00	854.15	796.69	988.97	957.79	852.76	1015.03	997.10	944.56	1080.10	985.60
14	•	00	959.94	723.13	786.50	870.51	803.21	1032.97	958.89	984.29	1142.15	947.09
15	•	00	917.73	870.64	758.59	704.59	722.21	1115.89	1043.73	894.24	901.00	916.57

Fonte: Elaborada pela autora (2023).