

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**JARDEL ARTIMAN DA CRUZ**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CÉLULAS IMOBILIZADAS DE  
*Aspergillus Oryzae* IPT 301 PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS  
EM REATOR LEITO FIXO

POÇOS DE CALDAS/MG

2022

**JARDEL ARTIMAN DA CRUZ**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CÉLULAS IMOBILIZADAS DE  
*Aspergillus Oryzae* IPT 301 PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS  
EM REATOR LEITO FIXO

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. Sergio Andres  
Villalba Morales

**Coorientador:** Prof. Dr. Rafael  
Firmani Perna

POÇOS DE CALDAS/MG

2022

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

CRUZ, Jardel Artman da.

Avaliação da atividade enzimática de células imobilizadas de *Aspergillus Oryzae* IPT 301 para produção de frutooligossacarídeos em reator leito fixo/ Jardel Artiman Da Cruz. - Poços de Caldas, MG, 2022.

90 f. : il. -

Orientador(a): Sergio Andres Villalba Morales.

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

Bibliografia.

1. Biorreator de leito fixo. 2. Frutosiltransferase. 3. Imobilização. 4. Células íntegras. 5. Frutooligossacarídeos. I. Morales, Sergio Andres Villalba, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

**JARDEL ARTIMANDA CRUZ**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CÉLULAS IMOBILIZADAS DE  
*Aspergillus Oryzae* IPT 301 PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS  
EM REATOR LEITO FIXO**

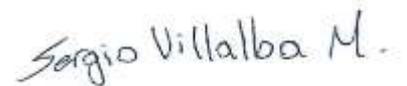
A Banca examinadora abaixo-assinada,  
aprova a Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Engenharia Química pela  
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Engenharia química.

Aprovada em: 15 de dezembro de 2022

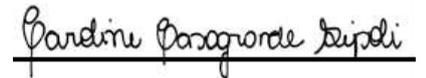
Prof. Dr. Sérgio Andres Villalba Morales  
Universidade: UNIFAL/MG

Assinatura



Prof. Dra. Caroline Casagrande Sipoli  
Universidade: UTFPR/PR

Assinatura:



Prof.<sup>a</sup> Dr. Marlus Pinheiro Rolemberg  
Universidade: UNIFAL/MG

Assinatura:



## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe, que se esforçou imensamente para que tivesse condições de chegar até aqui, sempre rezando por mim todas as noites e me ensinando a acreditar no meu potencial.

Ao meu pai, que com toda garra sempre lutou para que eu pudesse dedicar a minha vida aos estudos e sempre me aconselhou nos momentos difíceis desta caminhada.

A minha namorada Jakeline por todo amor e por me apoiar durante toda a jornada me ajudando incondicionalmente, não importa o que aconteça.

A minha irmã Carem e meu cunhado Leandro, que foram meus modelos para seguir uma vida de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales, que sempre esteve presente e que com muita paciência me guiou tanto nas disciplinas quanto na pesquisa. Muito obrigado pelo conhecimento e boa vontade em ensinar.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Rafael Firmani Perna por todas as lições, incentivo, pela enorme dedicação ao grupo de pesquisa e por estar sempre disposto a proporcionar o melhor ambiente para realização dos trabalhos.

Aos alunos de IC Laura, Bruna e Leandro por toda ajuda durante a pesquisa, sem vocês seria impossível concluir esta etapa.

Aos meus amigos Richard, Beatriz e Mariana por todo auxílio, companhia e risadas.

A todos meus colegas do grupo de pesquisa.

Aos funcionários da UNIFAL, em especial a Ju, pela disponibilidade para ajudar sempre que foi necessário.

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

## RESUMO

Fructooligossacarídeos são açúcares funcionais de baixo teor calórico com vários benefícios para a saúde humana. Sua produção industrial é realizada principalmente em reatores do tipo batelada através da reação de transfrutossilacção da sacarose, utilizando enzimas microbianas solúveis como biocatalisadores. Dentre estas enzimas, a FTase produzida pelo microrganismo *Aspergillus Oryzae* IPT-301 mostrou grande potencial para produção de FOS, principalmente com a utilização de suas células íntegras. O processo atual de produção de FOS em batelada é lento e possui alto custo operacional, principalmente por conta da impossibilidade de recuperação das enzimas solúveis no fim do processo. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de biocatalisadores estáveis com alta atividade enzimática que catalisam a reação de transfrutossilacção da sacarose para a produção de FOS em reatores de leito fixo (PBR). Sendo assim, este trabalho propôs a produção de biocatalisadores heterogêneos constituídos pelas células íntegras de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 imobilizadas com glutaraldeído e encapsuladas em gel de alginato de cálcio e a avaliação de sua atividade enzimática em reator PBR. Foram avaliados os efeitos do fluxo volumétrico, concentração do substrato e temperatura de reação sobre a atividade enzimática. As maiores atividades enzimáticas foram obtidas com um fluxo de  $10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , temperatura de  $60^\circ\text{C}$  e concentração de sacarose de  $400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Os parâmetros cinéticos, de transferência de massa externa e a estabilidade operacional do processo também foram avaliados. O modelo de Hill foi o mais adequado para os dados experimentais, indicando a cooperação entre os sítios ativos do complexo enzimático. O valor obtido para o coeficiente de transferência de massa externa ( $K_c = 1,84 \times 10^{-11} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) indica limitação da reação pelo TME. Após 10 horas de reação, o sistema reacional exibiu boa estabilidade operacional com atividade enzimática de  $836 \pm 455 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  para reação sem reciclo e  $2000 \pm 400 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  para reação com reciclo. Sendo assim, implementação do reator PBR preenchido com FTase reticulada com glutaraldeído e encapsulada com gel de alginato de cálcio se mostrou promissora para a produção de fructooligossacarídeos.

**Palavras-chave:** Biorreator de leito fixo; Imobilização; Células íntegras; Frutossiltransferase; Fructooligossacarídeos.

## ABSTRACT

Fructooligosaccharides are low-caloric functional sugars with numerous benefits for human health. Their industrial synthesis primarily occurs in batch-mode reactors, utilizing microbial enzymes in solution to catalyze the transfructosylation reaction, with sucrose as the substrate. Of the enzymes that produce FOS, the FTase produced by the microorganism *Aspergillus Oryzae* IPT-301 stands out, exhibiting high enzymatic potential. However, the current batch process is slow and costly due to the inefficiency of enzyme recovery. Hence, the utilization of immobilized enzymes offers an advantage in biocatalyst reuse during the reaction process. This study proposes the continuous production of FOS in a continuous packed bed reactor (PBR) filled with the catalytic biomass of *Aspergillus Oryzae* IPT-301 immobilized with glutaraldehyde and encapsulated in calcium alginate gel for optimal enzymatic activity. The effect of volume flow rate, substrate concentration, and reaction temperature on enzymatic activity was evaluated, as well as the external mass transfer parameters, kinetic parameters, and operational stability of the biocatalyst in systems with and without recycle. The maximum enzymatic activity was achieved at a volumetric flow rate of 10 ml.min<sup>-1</sup>, temperature of 60°C, and substrate concentration of 400 g.L<sup>-1</sup>. The experimental data was best fitted to Hill's model, implying cooperation among the enzyme complex's active sites. The value of the external mass transfer coefficient ( $K_c = 1.84 \times 10^{-11} \text{ m.s}^{-1}$ ) indicates a low influence of mass transport on reaction development. After 10 hours of reaction, the system without recycle exhibited 100% enzymatic activity, while the system with recycle displayed a maximum activity of 300% of the activity without recycle. The implementation of the PBR reactor filled with glutaraldehyde cross-linked FTase encapsulated with calcium alginate gel demonstrated promising results for the production of fructooligosaccharides.

**Keywords:** Packed bed bioreactor; immobilization; whole-cells; Fructosyltransferase; Fructooligosaccharides.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das moléculas de FOS 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuronosil nistose (C). .....	16
Figura 2 - Representação da reação de transfrutossilacção catalisado por enzimas FTase e FFase, formando 1-kestose (GF2) e glicose (G).....	19
Figura 3 - Adição de um grupo frutossil a uma molécula de 1-kestose, gerando nistose e glicose como produtos. ....	20
Figura 4 - Comportamento hiperbólico da equação (6) de Michaelis-Menten.	29
Figura 5 - Análise das regiões de limitação da reação pela transferência de massa ou pela reação química. ....	36
Figura 6 - Células íntegras reticuladas com glutaraldeído. ....	39
Figura 7- Sistema de gotejamento da solução contendo as células íntegras reticuladas com glutaraldeído e com gel de alginato de sódio. ....	41
Figura 8 - Fluxograma do procedimento de encapsulação .....	42
Figura 9 - Bico gotejador de Teflon com saída de 1,5 mm de diâmetro .....	43
Figura 10 - Esferas de alginato de cálcio em solução reticulante .....	44
Figura 11 - Esferas de alginato de cálcio em solução reticulante. ....	44
Figura 12 - Reator PBR empacotado com esferas de alginato de cálcio .....	45
Figura 13 - Reator PBR e sistema reacional auxiliar.....	45
Figura 14 - Reator PBR recheado com esferas de alginato e esferas de vidro..	52
Figura 15 - Deformação do leito catalítico com a passagem de fluxo. ....	53
Figura 16 - Perfil de atividade enzimática para vazão volumétrica de 1 ml.min <sup>-1</sup> a 50°C, concentração de substrato de 470 g.L <sup>-1</sup> e pH de 5,5. ....	54
Figura 17 - Perfil de atividade enzimática para vazão volumétrica de 4 ml.min <sup>-1</sup> a 50°C concentração de substrato de 470 g.L <sup>-1</sup> e pH de 5,5.....	52
Figura 18 - Perfil de atividade enzimática para vazão volumétrica de 7 ml.min <sup>-1</sup> a 50°C, concentração de substrato de 470 g.L <sup>-1</sup> e pH de 5,5.....	57
Figura 19 - Perfil de atividade enzimática para vazão volumétrica de 10 ml.min <sup>-1</sup> a 50°C, concentração de substrato de 470 g.L <sup>-1</sup> e pH de 5,5. ....	57

Figura 20-	Atividades enzimáticas obtidas aos 20 minutos para vazões volumétricas de 1,4,7 e 10 ml.min <sup>-1</sup> .....	58
Figura 21 -	Perfil de atividade enzimática obtida para concentrações de 200 e 300 g.L <sup>-1</sup> .....	60
Figura 22 -	Perfil de atividade enzimática obtido para vazões de 400 e 600 g.L.....	61
Figura 23 -	Variação da atividade enzimática em função da concentração de substrato aos 30 minutos de reação. ....	62
Figura 24 -	Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para obtenção dos dados cinéticos.....	63
Figura 25 -	Ajuste do modelo de Hill para obtenção dos dados cinéticos. ....	65
Figura 26 -	Perfis cinéticos da atividade de transfrutossilação em função da temperatura.....	67
Figura 27 -	Perfil de atividade de transfrutossilação ao longo de 10 horas de reação.....	69
Figura 28 -	Atividade enzimática em função da variação da velocidade do fluido e tamanho da partícula catalítica. ....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição final da solução contendo as células íntegras reticuladas com glutaraldeído e alginato de sódio. ....	40
Tabela 2 - Nova proporção para solução contendo alginato de sódio .	51
Tabela 3 - Dados cinéticos obtidos pelo modelo de Michaelis-Menten	64
Tabela 4 - Dados cinéticos obtidos pelo modelo de Hill.....	66
Tabela 5- Parâmetros físico-químicos para solvente água líquida e solução de sacarose 50 % m.m <sup>-1</sup> , a 50°C.....	71
Tabela 6 - Números adimensionais de Reynolds, Schmidt, Sherwood e difusividade.....	71
Tabela A 1 - p valor obtido com teste tukey para vazão de 1ml.min <sup>-1</sup> ....	85
Tabela A 2 - p valor obtido com teste tukey para vazão de 3 ml.min <sup>-1</sup> ...	85
Tabela A 3 - p valor obtido com teste tukey para vazão de 7 ml.min <sup>-1</sup> ...	85
Tabela A 4 - p valor obtido com teste tukey para vazão de 7 ml.min <sup>-1</sup> ...	86

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
3.1	FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS).....	16
3.2	PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE FOS .....	18
3.3	REAÇÃO DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DA SACAROSE .....	19
3.3.1	<b>Frutosiltransferase</b> .....	20
3.3.2	<b>Atividade de transfrutosilação (AT)</b> .....	22
3.4	IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE PRODUZIDA POR <i>ASPERGILLUS ORYZAE IPT-301</i> .....	23
3.4.1	<b>Reticulação enzimática com glutaraldeído</b> .....	24
3.4.2	<b>Encapsulação de enzimas</b> .....	25
3.5	CINÉTICA ENZIMÁTICA .....	27
3.5.1	<b>Efeitos da temperatura na cinética enzimática</b> .....	27
3.5.2	<b>Efeitos do pH na cinética enzimática</b> .....	28
3.5.3	<b>Efeitos da concentração na cinética enzimática</b> .....	28
3.6	REATORES ENZIMÁTICOS COM LEITO FIXO.....	30
3.7	REAÇÃO DE TRANSFRUTOSILAÇÃO EM REATOR PBR .	32
3.8	OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO COEFICIENTE DETRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA.....	33
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	PRODUÇÃO SUBMERSA DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS DE <i>ASPERGILLUS ORYZAE IPT-301</i> .....	37
4.1.1	<b>Condições de cultivo</b> .....	37

4.1.2	<b>Cultivo celular submerso de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301</b> .....	37
4.2	RETICULAÇÃO DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS COM GLUTARALDEÍDO.....	39
4.3	APRISIONAMENTO DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS EM ALGINATO DE CÁLCIO .....	39
4.3.1	<b>Preparo da suspensão contendo as células íntegras reticuladas com glutaraldeído e alginato de sódio.....</b>	39
4.3.2	<b>Obtenção das esferas de alginato.....</b>	40
4.2	REATOR PBR E MONTAGEM DO SISTEMA OPERACIONAL .....	45
4.3	ENSAIOS DE OBTENÇÃO DE PARÂMETROS REACIONAIS EM REATOR PBR .....	46
4.3.1	<b>Análise da influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutossilagem.....</b>	46
4.3.2	<b>Análise da influência da concentração na atividade de transfrutossilagem e obtenção dos parâmetros cinéticos.</b>	47
4.3.3	<b>Análise da influência da temperatura na atividade de transfrutossilagem.....</b>	47
4.3.4	<b>Análise da estabilidade operacional do processo .....</b>	48
4.4	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	48
4.4.1	<b>Determinação de açúcares redutores (AR).....</b>	48
4.4.2	<b>Determinação da concentração de glicose [G] .....</b>	49
4.5	OBTENÇÃO DE MASSA SECA DO BIOCATALISADOR.....	50
4.6	OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA .....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5.1.	REFORMULAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO BIOCATALISADOR .....	51

5.1.1	<b>Configuração do leito catalítico</b> .....	52
5.1.2	<b>Formação de caminhos preferenciais e volumes mortos</b> .	52
5.2	ANÁLISE DOS EFEITOS DA VAZÃO VOLUMÉTRICA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA. ....	54
5.2.1	<b>Análise dos efeitos da vazão volumétrica de 1 ml.min<sup>-1</sup> na atividade enzimática</b> .....	54
5.2.2	<b>Análise dos efeitos da vazão volumétrica de 4 ml. min<sup>-1</sup> na atividade enzimática</b> .....	55
5.2.3	<b>Análise dos efeitos da vazão volumétrica de 7 ml. min<sup>-1</sup> na atividade enzimática</b> .....	56
5.2.4	<b>Análise dos efeitos da vazão volumétrica de 10 ml. min<sup>-1</sup> na atividade enzimática</b> .....	57
5.2.5	<b>Comparação das atividades enzimáticas obtidas no estado estacionário</b> .....	58
5.3	ANÁLISE DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS. ....	59
5.4	OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.....	63
5.5	ANÁLISE DOS EFEITOS DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	66
5.6	ANÁLISE DA ESTABILIDADE OPERACIONAL DO PROCESSO.....	68
5.7	OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA .....	70
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	75
7	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	77
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos funcionais vem crescendo diante de tantas opções de produtos ultra processados. São considerados funcionais os alimentos que além de fornecerem valores nutricionais, também ajudam a diminuir a probabilidade do risco de doenças (AYSELI; YOUNESI, 2015). Existem diversos estudos que demonstram a eficácia de alimentos funcionais para a garantia de um envelhecimento saudável e aumento da expectativa de vida (BRUNARI; SOUZA, 2017).

Os frutooligossacarídeos (FOS) são alimentos funcionais de grande interesse industrial, pois possuem propriedades edulcorantes muito úteis para formulações industriais em produtos sem incidência de sacarose. A adição de FOS em formulações industriais como substituto da sacarose confere diversos benefícios à saúde humana, visto que frutooligossacarídeos possuem baixos níveis calóricos, não são metabolizados por microrganismos bucais (o que os tornam não cariogênicos) e sua ingestão regular ajuda na diminuição dos níveis de colesterol e lipídios. Outra característica importante dos frutooligossacarídeos é a possibilidade do consumo seguro por diabéticos, atributo que os tornam muito valiosos como matéria-prima na indústria alimentícia. (CASTRO,2017; COUNDRAY *et al.*, 2003). Estudos também apontam que FOS ajudam a regular a flora intestinal, selecionando microrganismos benéficos à saúde humana e inibem o crescimento de bactérias patogênicas como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* (GIBSON *et al.* 1995, PRATA,2021).

Em 1990, o Japão comercializou mais de 400 toneladas de FOS, enquanto, em 2017, a Europa tornou-se o maior consumidor deste tipo de açúcar, com um mercado avaliado em US\$ 344 milhões e uma estimativa de crescimento de 13% até o final de 2022 (CUNHA, 2020; MORDOR INTELLIGENCE, 2017). No entanto, o modelo de produção atual de FOS em batelada é inadequado para produção em grande escala, pois é um processo lento, instável e com elevados custos, devido à impossibilidade de reutilização das enzimas solúveis (ZAMBELLI *et al.*, 2016). Estes fatores têm um impacto negativo sobre o preço final do produto. Diante disso, é essencial a implementação de um sistema de reação contínua com boa estabilidade operacional e que permita o uso das enzimas por longos períodos. A produção contínua de FOS é vantajosa em relação à operação em batelada, já que possui maior volume de

produção e evita o acúmulo de subprodutos que atuam como inibidores enzimáticos (JUNG *et al.*, 2011; DIAS, 2021).

A principal via para produção industrial de FOS é através da reação de transfrutoseilação da sacarose, utilizando enzimas microbianas como biocatalisadores. Dentre as enzimas que catalisam a reação de transfrutoseilação, a enzima frutoseiltransferase (FTase; EC 2.4.1.9) se destaca por possuir elevada atividade de transfrutoseilação ( $A_T$ ), principalmente com a utilização de células íntegras (CUERVO *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2019).

A utilização de células íntegras é uma excelente via para produção de FOS, visto que sua imobilização não exige nenhum tipo de suporte e exibem ciclos de produção muito maiores que enzimas solúveis. Diversos estudos com o fungo *Aspergillus Oryzae* IPT-301 reportaram alta produtividade da enzima FTase, utilizando enzimas livres ou imobilizadas (CUNHA *et al.*, 2019; OTTONI *et al.*, 2012; PERNA *et al.*, 2018).

Gonçalves, (2019) utilizou as células íntegras produzidas pelo fungo *Aspergillus Oryzae* IPT-301 reticuladas com glutaraldeído e encapsuladas em gel de alginato de cálcio como biocatalisadores em modo de operação batelada visando a produção de FOS. O estudo obteve resultados promissores com altas atividades enzimáticas e excelente estabilidade operacional, o que possibilitou seis ciclos de produção de FOS com apenas 4% de perda de atividade enzimática, apresentando atividade de transfrutoseilação ( $A_T$ ) 70% maior para as células íntegras reticuladas com glutaraldeído e encapsuladas em gel de alginato em relação à atividade exibida pelas células íntegras livres.

Sendo assim, considerando a crescente demanda mundial por FOS, a necessidade da substituição do atual modelo de produção em batelada por um modelo de produção contínua e os resultados animadores obtidos por Gonçalves (2019), este trabalho propôs a implementação de um sistema contínuo de produção de FOS utilizando um reator PBR empacotado com células íntegras de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 reticuladas com glutaraldeído e encapsuladas em gel de alginato visando obter elevadas atividades enzimáticas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos parâmetros operacionais característicos de um reator contínuo de leito fixo (PBR) empacotado com células íntegras de *Aspergillus Oryzae IPT-301* reticulada com glutaraldeído e encapsulada utilizando gel de alginato de cálcio, visando a obtenção de elevadas atividades de transfrutoseilação ( $A_T$ ) e estabilidade operacional.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os parâmetros necessários para atingir os objetivos específicos são:

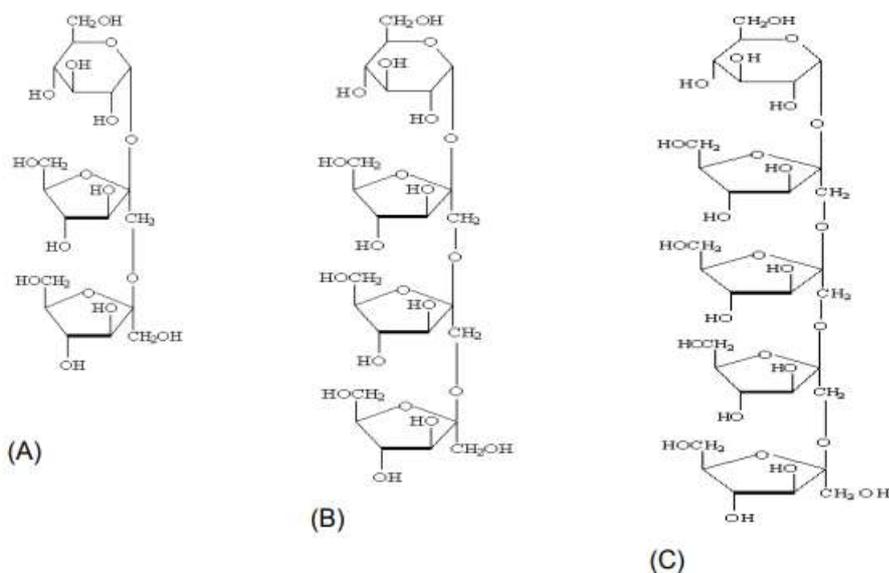
- a) Analisar a influência dos parâmetros operacionais (vazão volumétrica, temperatura de reação e concentração de substrato) na atividade enzimática das células livres e imobilizadas no reator PBR.
- b) Obtenção dos parâmetros de transferência de massa externa (TME).
- c) Determinar os regimes difusionais no reator PBR para as células íntegras imobilizadas.
- d) Determinar a cinética da reação catalisada pelas células íntegras imobilizadas por reticulação seguida por encapsulação.
- e) Avaliar a estabilidade operacional das células íntegras imobilizadas utilizando um sistema reacional com e sem reciclo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Frutooligossacarídeos são oligossacarídeos de ocorrência comum em diversos tipos de plantas monocotiledôneas, dicotiledôneas, algas verdes, sintetizados por fungos e bactérias ou produzidos por ação de enzimas de frutossiltransferase derivadas de plantas e microrganismos. FOS possuem sua estrutura molecular e peso variando conforme sua fonte e são classificados em três grupos: O grupo inulina com predominância de ligações glicosídicas frutossil-frutose (2 →1), o grupo levan com predominância de ligações frutossil-frutose (2 →6) e o grupo ramificado, que possuem ligações frutossil-frutose tanto (2 →1) quanto (2 →6) (BENKEBLIA, 2013; HARTEMINK, 1997; HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988). A estrutura das moléculas de 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuronosil nistose (C) estão representadas na figura 1 a seguir:

Figura 1 - Representação das moléculas de FOS 1-kestose, nistose e frutofuronosil nistose.



Fonte: Passos e Park (2003, p.386)

Legendas: (A) Representação da molécula de 1-kestose.

(B) Representação da molécula de nistose.

(C) Representação da molécula de frutofuronosil nistose.

A produção de cada grupo de FOS depende da enzima utilizada. Por exemplo, a frutotransferase derivada de enzimas de fungos como *Aureobasidium pullulans* e *Aspergillus niger* produzem apenas FOS de ligações 1<sup>F</sup>-, enquanto enzimas de *Claviceps purpúrea* e aspargos produzem tanto FOS com ligações 1<sup>F</sup>- quanto 6<sup>G</sup>- (YUN, 1996).

FOS tem despertado bastante interesse industrial por possuir diversas características benéficas para saúde humana. FOS são classificados como alimentos funcionais por adicionar inúmeros benefícios à saúde humana, dentre eles a função de anticariogênico, por não ser fermentado por microrganismos bucais, agir na prevenção do câncer de cólon e auxiliar na eliminação de microrganismos patogênicos. A FDA (Food and drugs administration, USA) lista os FOS como seguros para ingestão humana (DOMINGUEZ *et al.*, 2014; YUN, 1996).

Os frutooligossacarídeos apresentam características significativas para a indústria de alimentos e possuem vantagens comparativas à sacarose para utilizações industriais. Por possuir de 40% a 60% do poder adoçante da sacarose e não ser metabolizado pelo organismo, FOS podem ser ingeridos por diabéticos com segurança como substituto da sacarose e oferecem facilidades técnicas para formulação de produtos alimentícios industriais: não cristalizam, não precipitam e possuem solubilidade em água maior que a da sacarose (BORNET, 1994, PASSOS ; PARK, 2003). A fermentação de oligossacarídeos no cólon favorece o crescimento de bifidobactérias, microrganismos não patogênicos capazes de combater outros microrganismos patogênicos, aumenta a absorção de cálcio, e estimula produção de enzimas digestivas (BENKEBLIA, 2013; MEREINSTEIN, D. SALMINEN S., 2017; TOSHIKI, 1995).

Os frutooligossacarídeos (FOS) são frequentemente utilizados como substitutos da sacarose em sucos de frutas. Estudos sugerem que a substituição parcial da sacarose por FOS não afeta significativamente os parâmetros organológicos, físico-químicos e sensoriais do produto final, possibilitando a adição de FOS nas formulações sem uma modificação aparente nas características do produto (BALI, 2015).

FOS também possuem características importantes para indústria farmacêutica, dentre elas, o combate a microrganismos patogênicos através da inibição de ligações de microrganismos a tecidos hospedeiros, evita toxina bacteriana de se ligar a estrutura de carboidratos de membranas de células epiteliais expostas, possui potencial uso em

vacinas contra câncer, agem como anticorpos naturais e servem de transporte para compostos farmacêuticos até seu local de ação, devido a sua característica anfifílica que facilita interação com superfícies polares e apolares (COIMBRA, 2006; SIMON, 1996).

O uso de penicilina, cefalosporina e clindamicina tem sido associada a diarreia aguda devido à perda da microflora intestinal protetora (BEMASCONI, 1993; FEKETY; SHA, 1993). La Rosa *et al.* (2003) obteve 71% de prevenção a diarreia utilizando tratamento de FOS em conjunto com antibióticos em crianças, contra 31% de prevenção a diarreia no tratamento sem o uso de FOS no grupo de controle.

### 3.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE FOS

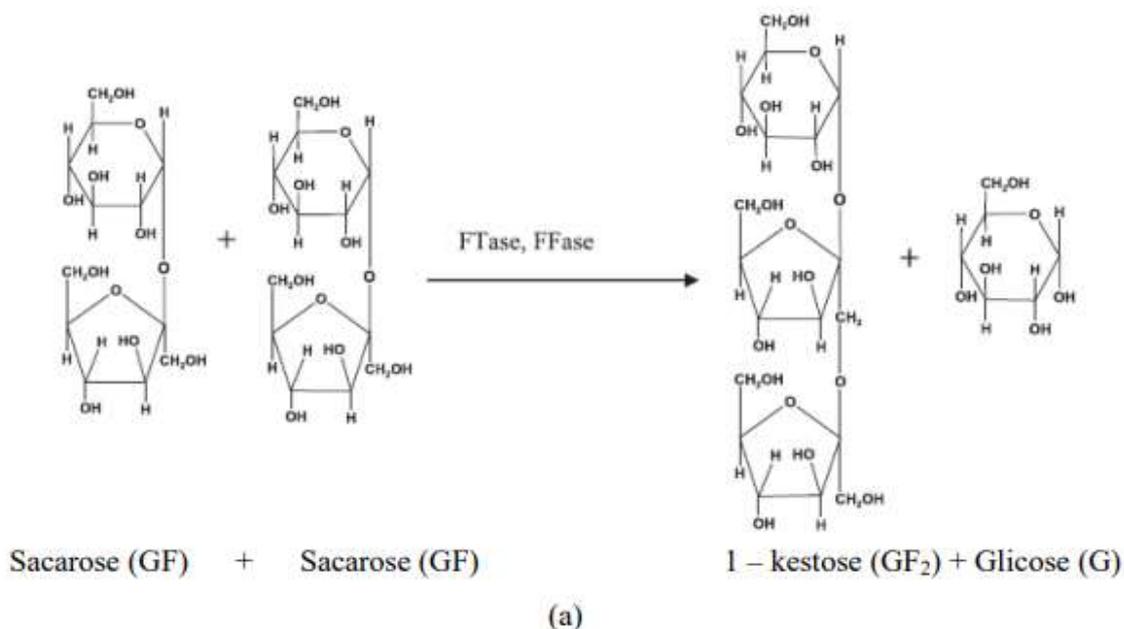
A produção industrial de FOS é realizada por via catalítica, utilizando enzimas intracelulares como biocatalisadores através da hidrólise da inulina catalisada pela enzima inulinase ou através da reação de transfrutoseilação utilizando a enzima frutoseiltransferase (FTase) ou a enzima  $\beta$ -frutofuranosidase (FFase) e sacarose como substrato. (YUN, 1996). A produção de FOS por fontes vegetais não é comum devido a dificuldades operacionais e custo alto, sendo assim, biocatalisadores tratados com enzima celular, isoladas ou imobilizadas são as melhores opções para produção de FOS. (YUN *et al.*, 1988).

Dentre os microrganismos produtores de FOS, os mais promissores são *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus niger*, mas o microrganismo *Aspergillus Oryzae* IPT-301 tem obtido bons resultados na produção da enzima FTase com altas atividades de transfrutoseilação ( $A_T$ ) (CUNHA, 2017; GONÇALVES, 2019; PRATA, 2021). O fungo *Aspergillus Oryzae* foi considerado seguro pela Food and drugs administration e vem sendo utilizado industrialmente na produção de diversas enzimas (DIAS *et al.*, 2021).

### 3.3 REAÇÃO DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DA SACAROSE

A reação de transfrutosilação (A<sub>r</sub>) acontece através do mecanismo de clivagem da ligação β-(1, 2) da sacarose, liberando glicose e transferindo o grupo frutossil para uma segunda molécula de sacarose ou para uma molécula de FOS já formada, aumentando seu grau de polimerização e gerando glicose e cadeias de FOS de diversos tamanhos como produtos finais. O tamanho da cadeia de FOS depende da quantidade de grupos frutossil recebidos pela molécula (CUNHA *et al.*, 2019; DALMASSO, 2019; GANAIE *et al.*, 2017). A figura 2 e 3 a seguir representam a reação de transfrutosilação para obtenção de 1-kestose + glicose e nistose + glicose como produtos finais:

Figura 2 - Representação da reação de transfrutosilação catalisado por enzimas FTase e FFase

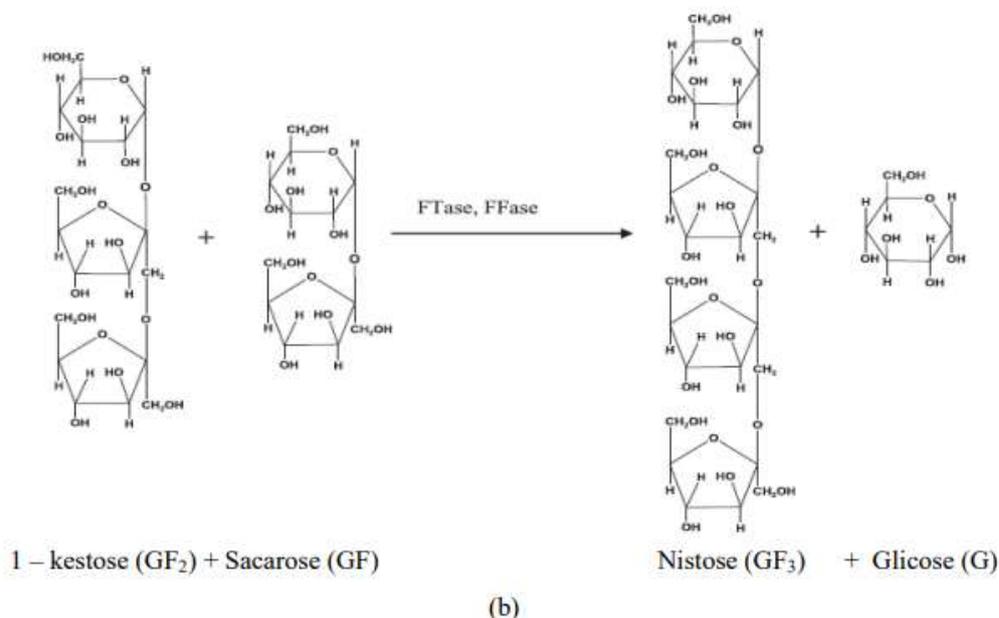


Fonte: GANAIE *et al.* (2013)

Legendas: (GF<sub>2</sub>) Representação da molécula de 1-kestose.

(G) Representação da molécula de glicose.

Figura 3 - Adição de um grupo frutossil a uma molécula de 1-kestose, gerando nistose e glicose como produtos



Fonte: GANAIE *et al.* (2013, s.p.)

Legendas: (GF<sub>2</sub>) Representação da molécula de 1-kestose.

(GF) Representação da molécula de sacarose

(GF<sub>3</sub>) Representação da molécula de Nistose.

(G) Representação da molécula de glicose.

A glicose gerada na hidrólise da sacarose e da atividade de transfrutossilção atua como inibidora da atividade de transfrutossilção ( $A_T$ ) da FTase, sendo assim, reações em batelada não são favoráveis devido ao acúmulo de glicose e constante redução da atividade de transfrutossilção pela enzima FTase (MUTANDA, 2014).

### 3.3.1 Frutossiltransferase

A frutossiltransferase é uma glicosídeo-hidrolase com atividade de transfrutossilção. A produção enzimática de FOS através da reação de transfrutossilção ocorrem pelas enzimas frutossiltransferase (FTase) e  $\beta$ -frutofuranosidase (FFase), catalisando clivagem da ligação  $\beta$ -1,2 e transferindo um grupo frutossil entre moléculas de sacarose ou FOS, gerando glicose e cadeias de FOS de diversos tamanhos como produtos finais. O tamanho da cadeia de FOS depende da quantidade de grupos frutossil recebidos pela molécula (DALMASSO, 2019).

Existem diversas fontes produtoras de enzimas Frutossiltransferase, como plantas, bactérias e fungos, que se submetidas a condições corretas de pH, temperatura, rotação, nutrientes e concentração de sacarose produzem FTase com elevada atividade de transfrutossilação ( $A_T$ ) e baixa atividade hidrolítica ( $A_H$ ), sendo uma reação paralela indesejada para produção de FOS. A seleção da reação pela transfrutossilação da sacarose em detrimento da hidrólise da sacarose depende da concentração de substrato e da capacidade da enzima de se ligar ao substrato e excluir a água. Todo o estudo de caracterização da enzima FTase para produção de FOS é centrada na otimização da atividade de transfrutossilação ( $A_T$ ) e minimização da atividade hidrolítica ( $A_H$ ). (GHAZI *et al.*, 2007; SANTOS, 2018; XU *et al.*, 2015.)

Dentre as fontes de produção de FOS pela enzima FTase, destacam-se os microrganismos fúngicos *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Fusarium* e *Penicillium*, os microrganismos bacterianos *Bacillus macerans*, *Arthrobacter* sp. K-1 e leveduras *Rhodotorula* sp, *Candida utilis*, *Xanthophyllomyces dendrorhous* (GOMES, 2019; DETOFOL *et al.*, 2015).

Kashyap; Palai; Bhattacharya (2015) e Kaenpanao *et al.*, (2016) avaliaram os parâmetros de produção de FOS da FTase de *Aspergillus aculeatus* em função da concentração inicial da sacarose, variando de 300 – 500 g. L<sup>-1</sup>, temperatura de 45 – 60 °C e pH 4 e 5, obtendo a produção máxima de FOS com concentração inicial de sacarose de 500g. L<sup>-1</sup> com índice de 60% produção de FOS e atividade enzimática de 32 U.mL<sup>-1</sup>. Houve diminuição da produção de FOS de 60% para 42% com a adição de 100 g. L<sup>-1</sup> de glicose. A temperatura ótima foi de 55 °C e pH ótimo de 4,5. O comportamento cinético adaptou-se ao modelo de Michaelis-Menten (KASHYAP; PALAI e BHATTACHARYA, 2015).

Kaenpanao *et al.* (2016) avaliaram as condições operacionais da enzima FTase produzido pela estirpe da levedura ML1, variando a concentração inicial de sacarose, extrato de levedura e rotação entre 50 – 150 g. L<sup>-1</sup>, 10 – 30 g. L<sup>-1</sup> e 75 – 300 rpm, respectivamente. Para o estudo da concentração de sacarose de 50, 100 e 150 g. L<sup>-1</sup>, os autores obtiveram uma taxa ótima de crescimento de 0,429, 0,443 e 0,27 h<sup>-1</sup>, respectivamente. A concentração de 150 g. L<sup>-1</sup> de sacarose foi a que obteve melhores resultados, com concentração final de 65 g.L<sup>-1</sup> de frutooligossacarídeos. Para a concentração de levedura não existiu nenhuma variação significativa e para variação da velocidade de agitação foi obtido a mesma produção de FOS de 65g. L<sup>-1</sup> com 150 rpm e 4 horas de agitação.

Antosova *et al.* (2004) estudou a influência dos parâmetros de cultivo e produção de FOS pela enzima FTase produzida pelo microrganismo fúngico *Aureobasidium pullulans*. O efeito da concentração inicial e tempo de cultivo foi analisado, variando de 208 a 491 g.L<sup>-1</sup> e 26 a 94 h, respectivamente. A concentração de sacarose não impactou na produção das enzimas FTase. A concentração inicial de sacarose impactou negativamente no crescimento das células íntegras, mas a atividade enzimática específica cresceu com o aumento da concentração de sacarose. O tempo de cultivo exibiu efeitos positivos na produção de enzimas FTase, mas obteve influência negativa na atividade específica enzimática.

Dhak *et al.*, (2005) caracterizaram a enzima intra e extracelular de frutossiltransferase por *Penicillium purpurogenum* para produção de FOS, com tempo de incubação de dez dias, obtendo temperatura e pH ótimos de 55 °C e 5,5, respectivamente. O autor relatou a produção máxima de frutossiltransferase intracelular em 3 dias de fermentação, enquanto a produção máxima para enzima extracelular foi em 4 dias de fermentação. Existiu ainda um aumento na produção enzimática em 1% com a restauração da solução de sacarose tanto para enzima intracelular quanto para extracelular. Dhak também testou a influência da agitação do meio a 120 rpm e 30 °C por 10 dias e diferente de outros microrganismos produtores de frutossiltransferase, a agitação do meio não mostrou efeito positivo para crescimento de *Penicillium purpurogenum*.

### 3.3.2 Atividade de transfrutossilção (AT)

Atividade de transfrutossilção é definido como a quantidade de enzimas necessárias para produzir 1 μmol de frutose por minuto (CHEN; LIU, 1996). A concentração de frutose transferida através da reação de transfrutossilção pode ser obtida com o seguinte balanço de massa, representados pelas equações 1, 2, 3 e 4 a seguir:

$$[\text{ART}] = [\text{F}] + [\text{G}] \quad (1)$$

$$[\text{F}] = [\text{ART}] - [\text{G}] \quad (2)$$

$$[\text{Ft}] = [\text{G}] - [\text{F}] = 2[\text{G}] - [\text{ART}] \quad (3)$$

$$[\text{Ft}] = [\text{G}] - [\text{F}] = 2[\text{G}] - [\text{ART}] \quad (4)$$

[ART], [F], [G] e [Ft] são as concentrações de açúcares redutores totais, frutose, glicose e frutose transfrutosilada, respectivamente (LEMOS, 2019).

Sendo assim, é possível calcular a atividade de transfrutossilagem em reator contínuo através da equação (4) a seguir:

$$A_T = \frac{[Ft] \times [Q]}{w} \quad (5)$$

Em que Q refere-se a vazão volumétrica (L.min<sup>-1</sup>) e w é a massa de biocatalisador (g).

### 3.4 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE PRODUZIDA POR *ASPERGILLUS ORYZAE* IPT-301

*Aspergillus Oryzae* é um microrganismo fúngico filamentosos, assexuado e muito utilizado na indústria de alimentos, principalmente na produção de shōyu, sake, miso e na produção de vinagre, o que torna o microrganismo muito conhecido na cultura oriental. Existem relatos de mais de 3000 anos da utilização de *Aspergillus Oryzae* mesmo sem o conhecimento de sua existência, com um cultivo em estado semi-sólido de produtos fermentados, na China. (MACHIDA, *et al.*, 2008).

Han *et al.* (2020) caracterizaram a FTase purificada produzida por *Aspergillus Oryzae* S719, estudando a temperatura e pH ótimo de produção enzimática, estabilidade operacional e cinética enzimática. A temperatura e pH ótimo foram de 55° C e 6,0, respectivamente. A FTase mostrou-se estável com no mínimo 80% da atividade enzimática inicial durante 12 horas, e manteve 90% da atividade enzimática com pH entre 4,0 e 11,0. Os parâmetros enzimáticos foram de Km 310 mmol. L<sup>-1</sup> e Kcat de 2.0 × 10<sup>3</sup>. min<sup>-1</sup>. A FTase foi ativada com 5 mmol. L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> e 10 mmol. L<sup>-1</sup> Na<sup>+</sup>, respectivamente. Aproximadamente 64% de FOS foi obtido com 500 g.L<sup>-1</sup> de solução de sacarose com 4 horas de reação, o menor tempo reacional reportado até a publicação do artigo.

Cuervo *et al.* (2007) comparou 17 microrganismos produtores de frutossiltransferase e dentre eles, *Aspergillus Oryzae* IPT-301 foi um dos microrganismos que apresentou maiores atividades enzimáticas, ultrapassando

12500 U.L<sup>-1</sup> e apresentou atividades de transfrutossilção maiores que as atividades hidrolíticas, parâmetro fundamental para produção de FOS.

Cunha (2017) cultivou FTase microbiana de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 por fermentação submersa aeróbica visando a caracterização enzimática e estudos cinéticos. Também foi estudado efeitos da temperatura e pH na atividade enzimática extracelular. Com 64 horas de fermentação obteve-se o pico de produção enzimática, incubada com pH na faixa de 4,5-6,0, temperatura de 50 °C, rotação de 200 rpm e concentração de sacarose a partir de 296 g. L<sup>-1</sup>. A FTase extracelular apresentou cinética Micheliana, com V<sub>max</sub> de 16,23 U.mL<sup>-1</sup> e K<sub>m</sub> de 50,41 g. L<sup>-1</sup>.

O estudo de Lemos (2019) investigou o processo de imobilização da enzima FTase microbiana extracelular em sílica-gel como suporte para a produção de FOS. Os dados da caracterização de Cunha (2017) foram utilizados para testar a imobilização por adsorção física em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35 °C) e pH (5,5) por um período de 6 horas, com agitação a 175 rpm.

Lemos (2019) realizou um planejamento experimental DCCR para determinar os parâmetros ótimos de reação, que foram a temperatura de 50 °C, pH de 5,5 e concentração de 400-600 g.L<sup>-1</sup> de solução de sacarose. Além disso, ensaios de estabilidade térmica, concentração do substrato e estabilidade operacional foram conduzidos. O resultado mais significativo foi o maior rendimento de imobilização de 85% observado a 35 °C. O perfil cinético foi melhor descrito pelo modelo cinético de Hill. A enzima mostrou ser estável em um pH compreendido entre 5,0 e 6,5 e os parâmetros termodinâmicos indicaram que a estabilidade térmica da enzima foi aumentada em 2,5 vezes após a imobilização em relação à enzima livre.

### 3.4.1 Reticulação enzimática com glutaraldeído

A reação de reticulação enzimática ou ligação cruzada (cross-linking) acontece com o auxílio de um agente bifuncional, que possui a função de ligar dois ou mais grupos de aminos (NH<sub>2</sub>) reativos na superfície da proteína (MATEO *et al.*, 2007).

O glutaraldeído (CHO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHO) é um dialdeído utilizado com frequência como agente desinfetante e bactericida nas indústrias de alimentos. Quioco *et al.* (1964) foram os pioneiros no estudo da reticulação enzimática, utilizando glutaraldeído como agente reticulante com objetivo de estabilizar cristais de enzimas para estudos de difração de raios-X. Ao reticular as enzima com glutaraldeído, os autores

observaram a formação de uma rede cristalina de enzimas insolúveis com alta atividade enzimática. A partir desta abordagem surgiram diversos estudos visando a obtenção de enzimas imobilizadas livres de suporte, utilizando glutaraldeído como agente reticulante (SOUZA *et al.*, 2017).

A reação de reticulação com glutaraldeído possui diversas vantagens em relação à enzima imobilizadas por adsorção. Com a reação de reticulação é possível obter enzimas imobilizadas em células íntegras microbianas, sem a necessidade de suportes, formando uma estrutura proteica insolúvel com grande resistência a lixiviação do biocatalisador e conferindo boa estabilidade operacional ao processo. O processo de reticulação com glutaraldeído também possui baixo custo e possibilita o reuso dos biocatalisadores em diversos ciclos reacionais, diminuindo consideravelmente o custo do processo (HUDSON *et al.*, 2008). No entanto, este tipo de imobilização pode causar problemas de transferência de massa entre o substrato e o complexo enzimático, tornando a reação mais lenta. O grupo aldeído presente no glutaraldeído pode reagir com a estrutura proteica das enzimas de duas maneiras. A primeira é a reação do grupo amina das proteínas sob condições ácidas ou neutras formando bases de Schiff. Em condições ácidas, as bases de Schiff não são instáveis e a reação pode acontecer no sentido inverso, gerando o grupo aldeído e amina novamente (CAO *et al.*, 2003).

Sendo assim, é necessário realizar uma redução das aminas com uma solução de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), gerando um derivado inerte. O segundo mecanismo é a adição de Michael, no qual um grupo amina ( $\text{NH}_2$ ) é adicionado a uma ligação dupla C-C produzindo uma amina secundária estável. (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1995; GONÇALVES, 2019; SOUZA *et al.*, 2017).

### **3.4.2 Encapsulação de enzimas**

O processo de encapsulamento enzimático consiste no aprisionamento da enzima em géis ou fibras, confinada em uma estrutura tridimensional no interior da estrutura. A vantagem do aprisionamento é a conservação da estrutura proteica da enzima, visto que o processo de aprisionamento não envolve reações químicas, evitando a perda da atividade enzimática devido a modificações na estrutura proteica, muito comum em outros processos de imobilização (FERNANDEZ-ARROJO *et al.*, 2013).

Dentre os géis promotores de imobilização por encapsulação, o gel de alginato é um dos agentes mais utilizados, conferindo boa resistência ao complexo enzimático e evitando a lixiviação de enzimas. O alginato é um polímero de origem natural de baixo custo, com a capacidade de formar géis termoestáveis na presença de cátions divalentes por meio de sua adição controlada. A forma salina é a mais difundida para formação de géis, sendo os sais de alginato de sódio, cálcio, potássio e amônio (DONATI *et al.*, 2005, GONÇALVES, 2019).

O processo de gelificação acontece com o contato dos grupos carboxílicos presentes no alginato com solução contendo cátions divalentes, formando uma rede tridimensional com o íon como átomo central, originando grandes cadeias de poliméricas (BRACCINI *et al.*, 2001).

A contínua ligação entre os grupos carboxílicos do alginato e os cations resultam na formação de pontos de reticulação, causando a gelificação do alginato ao longo do tempo. Os monômeros formados com a reticulação formam uma estrutura tridimensional denominada egg-box (BRACCINI; PÉREZ, 2001; CACURO, 2019).

Allen *et al.* (1963) destaca o uso do cloreto de cálcio como agente gelificante pela capacidade de formação de estruturas agregadas por ligações iônicas do íon de cálcio com a rede polimérica formada por grupos carboxílicos presentes na estrutura do alginato. O íon de cálcio se acomoda com facilidade na rede polimérica tridimensional e o cloreto de cálcio possui grande solubilidade em água, aumentando a disponibilidade de íons de cálcio no processo de gelificação do alginato. O gel resultante da reticulação da matriz polimérica de alginato com íons de cálcio é denominado gel de alginato de cálcio.

Os géis de alginato de cálcio formados são insolúveis em água, de fácil manuseio, baixo custo, com baixa permeabilidade de gases, termoestáveis a temperatura ambiente e com resistência ajustável, dependendo do grau de reticulação alcançado no polímero, concentração do alginato, íon reticulante, temperatura e pH do meio (PACHECO, 2016; SANTANA, 2020).

Kamimura *et al.* (2009) estudaram a imobilização das FTases miceliais de *Pichia pastoris* reticuladas com glutaraldeído e encapsulada em uma mistura de gel de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio e sua aplicação para produção de FOS. Foram relatadas melhorias significativas na estabilidade térmica e operacional das enzimas.

Ganaie *et al.* (2014 a) estudaram a imobilização da FTase micelial em gel de alginato e quitosana para produção de FOS. Os autores relataram melhoria nas características mecânicas dos biocatalisadores e um aumento na resistência térmica. A aplicação em gel de alginato gerou resultados mais satisfatórios quando comparado com a quitosana para melhoria da resistência térmica das enzimas.

Gonçalves (2019) estudou a reticulação das enzimas FTase micelial de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 em gel de alginato utilizando íons de cálcio e bário como agentes reticulantes e sua aplicação para produção de FOS. Foram relatadas melhorias nas propriedades mecânicas, aumento da estabilidade térmica, operacional e baixa diminuição da atividade enzimática quando comparada com as enzimas livres. As melhores propriedades foram obtidas utilizando o íon de cálcio como agente reticulante durante o processo de gelificação do alginato.

### 3.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA

O conhecimento da cinética enzimática é essencial para operação de um biorreator. A cinética enzimática descreve através de um modelo matemático como a velocidade específica de uma reação enzimática é afetada pelas variações de temperatura e concentração do substrato. Tais modelos são classificados na literatura em dois conjuntos: modelos que consideram a inibição enzimática e os que não consideram (CRUZ e JUNIOR,2012).

#### 3.5.1 Efeitos da temperatura na cinética enzimática

A temperatura está diretamente ligada a energia das moléculas reagentes, aumentando a frequência de colisões e por consequência, a velocidade de formação do produto final. No entanto, o aumento contínuo da temperatura prejudica a interação enzima-substrato devido à deformação das ligações covalentes da estrutura proteica das enzimas e provoca o decaimento da atividade enzimática (FRAGA; MENDES, 2021).

Gonçalves (2019) analisou a influência da temperatura na atividade de transfrutoseilação ( $A_T$ ) e hidrolítica ( $A_H$ ) da FTase micelial reticulada com glutaraldeído e aprisionada em gel de alginato, com substrato na concentração de 400g. L<sup>-1</sup> e pH de 5,5, obtendo atividade máxima de (1828 ± 166 U.g<sup>-1</sup>) sob a temperatura de 50 °C.

### 3.5.2 Efeitos do pH na cinética enzimática

Enzimas manifestam atividade máxima em uma faixa restrita de pH, pois os aminoácidos que compõe a estrutura enzimática podem se apresentar protonados ou desprotonados de acordo em diferentes valores de pH. Existe um valor específico de pH que favorece o arranjo dos grupos protonados e desprotonados, modificando estrutura enzimática por conta das interações iônicas e favorecendo seu desempenho catalítico. O distanciamento deste valor ótimo de pH tem como consequência a diminuição da atividade enzimática.

Gonçalves (2019) analisou a influência do pH na atividade de transfrutossilação ( $A_T$ ) e hidrolítica ( $A_H$ ) da FTase micelial de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 reticulada com glutaraldeído e aprisionada em gel de alginato, com substrato na concentração de 400g. L<sup>-1</sup> e temperatura de 50 °C, obtendo atividade máxima de  $1464 \pm 219$  U.g<sup>-1</sup> e pH de 5,5.

### 3.5.3 Efeitos da concentração na cinética enzimática

Para Mendes e Fraga (2021) a concentração de substrato é o parâmetro mais importante para análise da velocidade de uma reação enzimática. Para a maioria das enzimas a velocidade inicial da reação varia em formato de uma hipérbole, para a mesma concentração de enzimas.

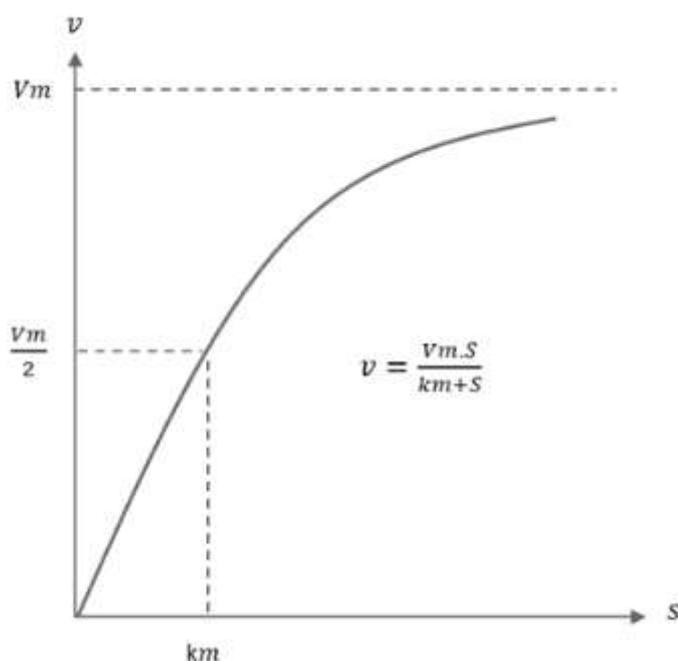
O modelo de Michaelis e Menten (1913) é muito utilizado na literatura para descrever este comportamento, descrevendo um crescimento hiperbólico da velocidade de reação em função da concentração de substrato até determinado ponto, onde todos os sítios ativos da enzima estão ocupados e a velocidade da reação é constante mesmo com mais disponibilidade de substratos disponíveis (MENDES e FRAGA, 2021).

Michaelis e Menten consideram a etapa de formação de produtos como irreversível e a velocidade de formação e dissociação do complexo enzima-substrato são iguais, obtendo um estado estacionário. Essas preposições são convenientes quando a reação está iniciando e não existem muitos produtos sendo formados (BOTTs e MORALES,1953). A equação 6 a seguir representa o modelo de Michaelis-Menten.

$$V_o = V_{\text{máx}} \times \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (6)$$

$V_o$  é a velocidade de reação enzimática e  $[S]$  a concentração de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ ).  $V_{\text{máx}}$  ( $\text{U.g}^{-1}$ ) é a velocidade máxima, obtida quando enzima está saturada.  $K_m$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) é a constante de Michaelis e é o valor que representa a metade da velocidade máxima.  $K_m$  indica a afinidade da enzima de se ligar ao substrato S, quanto menor for  $K_m$ , maior a afinidade da enzima com substrato. A figura 4 a seguir ilustra o comportamento de uma reação enzimática em função da concentração do substrato  $[S]$ , descrito pela equação (6):

Figura 4 - Comportamento hiperbólico da equação (6) de Michaelis-Menten



Fonte: FRAGA e MENDES (2021, pg.13)

No entanto, existem enzimas que exibem cinética enzimática com comportamento sigmoidal e não se ajustam ao modelo de Michaelis-Menten. Um modelo comumente utilizado na literatura para descrever estes casos é o modelo de Hill. O modelo de Hill se adapta melhor a alguns desvios do modelo de Michaelis-Menten adicionando uma variável “n”, que descreve o grau de cooperação entre enzima e o substrato. O valor  $n > 1$  sugere cooperação entre dois ou mais sítios ativos para ligação de substratos (WEISS, 1997).

A cooperação entre sítios ativos torna a velocidade de reação enzimática mais sensível positivamente a pequenas variações de substrato, obtendo maiores velocidades enzimáticas com menores variações de concentração de substrato. No entanto, o valor  $n < 1$  sugere cooperação negativa entre sítios ativos enzimáticos, fazendo com que a adição de mais substratos tenha pouca ou nenhuma mudança na velocidade de reação. Um valor de  $n = 1$  torna o modelo de Hill idêntico ao modelo de Michaelis-Menten (FERREIRA; FERREIRA C e TRINCA, 2014). A equação 7 a seguir descreve o modelo de Hill:

$$V_o = V_{\text{máx}} \times \frac{[S]^n}{[S]^n + K_{0.5}^n} \quad (7)$$

$K_{0.5}$  é a concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) necessária para obter uma velocidade enzimática igual à metade da velocidade máxima. Assim como a constante de Michaelis,  $K_{0.5}$  também representa a afinidade da enzima com substrato (WEISS, 1997).

### 3.6 REATORES ENZIMÁTICOS COM LEITO FIXO

Reatores de leito fixo (ou packed bed reactors, PBR) são reatores cilíndricos tubulares preenchidos com partículas de catalisadores (FOGLER, 2012). Reatores PBR possuem diversas vantagens em relação a reatores batelada. Por possuir fluxo contínuo, são mais fáceis de operar, possuem maior produtividade e facilitam a separação dos produtos na corrente de saída (DELBIANCO *et al.*, 2017; HONG *et al.*, 2014;).

A forma mais comum do reator de leito fixo é de um tubo cilíndrico preenchido com partículas de catalisador formando um meio poroso, com o reagente escoando entre estes poros de forma ascendente ou horizontalmente (MORAIS, 2004).

O reator leito fixo é uma alternativa muito comum para produção de diversos produtos em larga escala por apresentarem alta eficiência, baixo custo, facilidade de automação e ampliação de escala comparado com reatores do tipo batelada. Alguns processos são viáveis apenas neste tipo de reator. A produção de ciclohexano, anidrido maléico, álcool isopropílico, anilina, ciclohexanol, estireno, formaldeído,

cloreto de vinila, e acetato de vinila são exemplos de produtos obtidos em reatores de leito fixo (MORAIS, 2004; RICO, 2015).

Vários estudos estão sendo feitos em reator de leito fixo para conseguir novas rotas de produção de bioprodutos valiosos para indústria, aproveitando as facilidades operacionais do reator leito fixo em comparação ao reator batelada.

Rico (2015) imobilizou células íntegras de *Mucor circinelloides* em espuma de poliuretano para preencher um reator de leito fixo visando a produção de biodiesel etílico e conseguiu rendimento da ordem de  $86 \pm 3,53\%$  com tempo espacial de 86 horas e produtividade de  $7,57 \pm 0,31$  mg éster/g.h mg éster/g. h.

Magassy *et al.* (2017) avaliou o desempenho de um sistema de tratamento de água de esgoto utilizando bucha vegetal de curcubitácea como material suporte de um reator leito fixo, variando tempo de detenção hidráulica (TDH) de 8,6 e 4 horas, adquirindo efluentes médios para nitrogênio amoniacal foram de  $22,71$  mg N.L<sup>-1</sup>;  $27,97$  mg N.L<sup>-1</sup> e eficiência de remoção de DQO de 73,0%, 59,7% e 64,0%, respectivamente.

Bosco *et al.* (2007) estudou a remoção de benzeno em reator anaeróbico de leito fixo na presença de sulfato preenchido com espumas de poliuretano e alimentado com lodo de resíduos provenientes de abatedouros de aves e obteve remoção orgânica de DQO de 90% e degradação de benzeno de  $0,07$  mgbenzeno.mg<sup>-1</sup>SSV.d<sup>-1</sup>.

Silva *et al.* (2014) empregou lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz híbrida sílica-PVA para avaliar a síntese enzimática de biodiesel a partir do óleo de coco em reator de leito fixo com tempo espacial de 14 horas e obteve rendimentos médios de  $98,0 \pm 1,45\%$  de atividade recuperada e produtividade de  $41,1 \pm 1,5$  mg. g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e tempo de meia vida de 520 horas e o produto obtido atendeu as normas vigentes pela resolução ANP n°14/2012.

Pinheiros *et al.* (2010) utilizou cubos de poliuretano como suporte para preencher um reator de leito fixo com inóculo de suspensão de  $2 \times 10^6$  esporos. mL<sup>-1</sup> de *Aspergillus niger* mantido sob recirculação durante cinco Dias para remoção de fenol e obteve remoção média de DQO e fenol de 82% e 99%, respectivamente através da ação das enzimas fenol hi-droxilase e catecol 1,2-dioxigenases.

### 3.7 REAÇÃO DE TRANSFRUTOSILAÇÃO EM REATOR PBR

Apesar da elevada procura mundial por produtos funcionais com baixas calorias e dos múltiplos benefícios da utilização de frutooligossacarídeos (FOS) para a saúde, a produção de FOS ainda é um grande desafio, devido aos elevados custos operacionais resultantes do processo em batelada e à instabilidade dos biocatalisadores utilizados. Para contornar esses obstáculos, diversos estudos estão sendo realizados visando a utilização de reatores em leito empacotado (PBR, ou “Packed Bed Reactor”) para a produção de FOS, visando diminuir os custos operacionais, aumentar a longevidade dos biocatalisadores e melhorar a produtividade (PASSOS; PARK, 2003). Lorenzoni *et al.* (2015) realizaram uma comparação da produção de frutooligossacarídeos (FOS) utilizando enzimas FTase imobilizadas em quitosana com glutaraldeído como reticulante, em dois tipos de reatores: PBR (reator em leito empacotado) e reator de leito fluidizado. Foi observado que a produção de FOS no reator PBR atingiu 59% (g/g de açúcar na alimentação), enquanto no reator de leito fluidizado, a produção foi de 54%. Além disso, a análise mostrou que a variação na vazão volumétrica também permitiu a variação na concentração de kestose e nistose na corrente de produtos. A estabilidade operacional no reator PBR foi de 40 dias sem perda de produtividade.

Zambelli *et al.* (2016) utilizaram FTases miceliais de *Cladosporium cladosporioides* MUT 5506 encapsuladas em alginato de cálcio, preenchendo um reator PBR com concentração na alimentação de 600g.L<sup>-1</sup> e pH 6,0. O tempo de residência foi mantido em 5 horas e a temperatura variando de 25 °C a 70 °C. A maior proporção de atividade de transfrutossilação ( $A_T$ ) por atividade hidrolítica ( $A_H$ ) foi obtido a 35 °C. Também foi testado o aumento da pressão no sistema reacional, variando entre 40 e 250 psi, mas não houve nenhuma diferença significativa nas atividades enzimáticas. A produção de FOS em reator PBR foi 1,7 vezes maior que em reator batelada.

Jung *et al.* (2011) estudou a utilização das células íntegras de *Aureobasidium pullulans* imobilizadas em alginato de cálcio para produção de FOS utilizando um reator contínuo PBR. As condições ótimas de reação foram com concentração na alimentação de 770 g.L<sup>-1</sup> solução sacarose e vazão de 200 L.h<sup>-1</sup> 50 °C, com produtividade de 180 g FOS.L<sup>-1</sup>. A estabilidade operacional foi de mais de 100 Dias

sem perdas de atividade enzimática. O sistema operacional foi escalado com sucesso para um reator PBR industrial de 1,2 m<sup>3</sup>.

Vaňková *et al.* (2008) estudaram a viabilidade econômica de um processo semi-piloto para produção de 10<sup>3</sup> toneladas/ano de FOS em reator PBR de 1,6m<sup>3</sup> utilizando enzimas FTase oriundas das células miceliais de *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-94 como recheio do reator PBR, obtendo um investimento necessário de 5.031×10<sup>6</sup> € para produção de FOS em pó e 4.837 x10<sup>6</sup> € para o xarope.

### 3.8 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA

Uma reação catalítica é composta por diversas etapas consecutivas envolvendo a reação química e o transporte de massa de reagentes e produtos externamente ao biocatalisador ou no interior dos seus poros (FIGUEIREDO, 1989; FOGLER, 2002). Se houverem limitações ao transporte de massa entre o meio reacional e a superfície do biocatalisador, sejam elas internas ou externas, a velocidade de reação será limitada a taxas de reação menores (CALDAS; SILVA; ROCHA,2009).

Se a taxa de reação química for lenta, o transporte de massa conseguirá suprir toda demanda de substrato para o sítio ativo da enzima e a reação será limitada pela etapa de reação química. No entanto, se a velocidade de reação química for rápida e existirem limitações de transporte de massa no meio reacional, existirá uma escassez de substrato nos sítios ativos e o processo será limitado pela etapa de transporte de massa (DORAN, 1995).

Para modelagem matemática da transferência de massa externa, deve-se pressupor a existência de uma camada limite hidrodinâmica de espessura  $\delta$  ao redor da esfera catalítica (BAILEY *et al.*,1977). A camada limite hidrodinâmica oferece resistência ao transporte de substrato do meio catalítico até a superfície do biocatalisador e para diminuir os efeitos de resistência da camada limite, deve-se operar o reator PBR em regime turbulento (DORAN, 1995; FOGLER, 2012).

A modelagem da transferência de massa entre o substrato no meio reacional até a superfície catalítica assume o biocatalisador como uma esfera perfeita e isolada do meio catalítica. A equação 8 a seguir descreve o fluxo do substrato para a superfície de um biocatalisador:

$$N_S = K_S \times (C_{S0} - C_{SB}) \quad (7)$$

$N_S$  ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) é o fluxo do substrato em direção à superfície do biocatalisador,  $C_{S0}$  é a concentração do substrato na superfície da partícula e  $C_{SB}$  a concentração do substrato no seio do fluido expressas em  $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ .  $K_S$   $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  é o coeficiente de transporte de massa.

Fogler (2012) faz uso de correlações adimensionais, utilizando o número de Sherwood (Sh), diâmetro da partícula  $d_p$  (m) e difusividade mássica  $D_{AB}$  ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) para calcular  $K_S$ , de acordo com a equação 9 a seguir:

$$K_S = S_h \times D_{AB} \times d_p \quad (8)$$

A equação (9) é válida apenas para soluções diluídas e por isso, deve-se analisar se a solução de sacarose de alimentação pode ser considerada diluída.

Koretsky (2007) define o coeficiente de atividade termodinâmico ( $\gamma$ ) como medida da eficiência do processo de solubilização de uma solução diluída. Este coeficiente permite a análise da concentração relativa dos componentes presentes na solução e sua influência nas propriedades termodinâmicas. A solução é considerada ideal quando as forças intermoleculares entre os componentes estão equilibradas e a fração molar do solvente se aproxima de 1. Nesse caso, o comportamento da solução pode ser considerado equivalente ao de uma solução pura.

Starzake *et al.* (1997) avaliaram o coeficiente de atividade ( $\gamma$ ) da água em solução de sacarose e concluíram que para uma solução que possua teor de substância seca de sacarose (TS) entre 37% e 50%, o coeficiente de atividade ( $\gamma$ ) da água se aproxima de 1 e conseqüentemente, a solução pode ser considerada ideal, validando a equação (9). O valor de TS para solução de sacarose pode ser obtida em tabelas conforme a fração molar de sacarose na solução (DIAS, 2020; MATHLOUTH; REISER, 1995).

A equação 9 representa número de Sherwood (Sh) em função de fenômenos convectivos e difusivos:

$$Sh=2+0,6 \times Re^{0,5} \times Sc^{1/3} \quad (9)$$

Re é o número de Reynolds de partícula e Sc o número de Schmidt, que equivale à razão da viscosidade cinemática do fluido e a difusividade mássica, e estão representados nas equações 11 e 12 a seguir:

$$Re_p = \frac{U \cdot dp}{\nu} \quad (10)$$

$$Sc = \frac{\nu}{D_{AB}} \quad (11)$$

Em que U é a velocidade de escoamento do fluido reagente ( $m \cdot s^{-1}$ ), dp o diâmetro da partícula (m),  $\nu$  a viscosidade cinemática do meio reacional ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ),  $D_{AB}$  o coeficiente de difusão do soluto (A) no fluido (B).

A correlação empírica de Darken apresentada na equação 12 a seguir pode ser utilizada para calcular a difusividade do substrato em água, considerando o substrato como soluto em diluição infinita no solvente (água) (CREMASCO, 2016).

$$D_{AB} = X_A \cdot D_{0BA} + X_B \cdot D_{0AB} \quad (12)$$

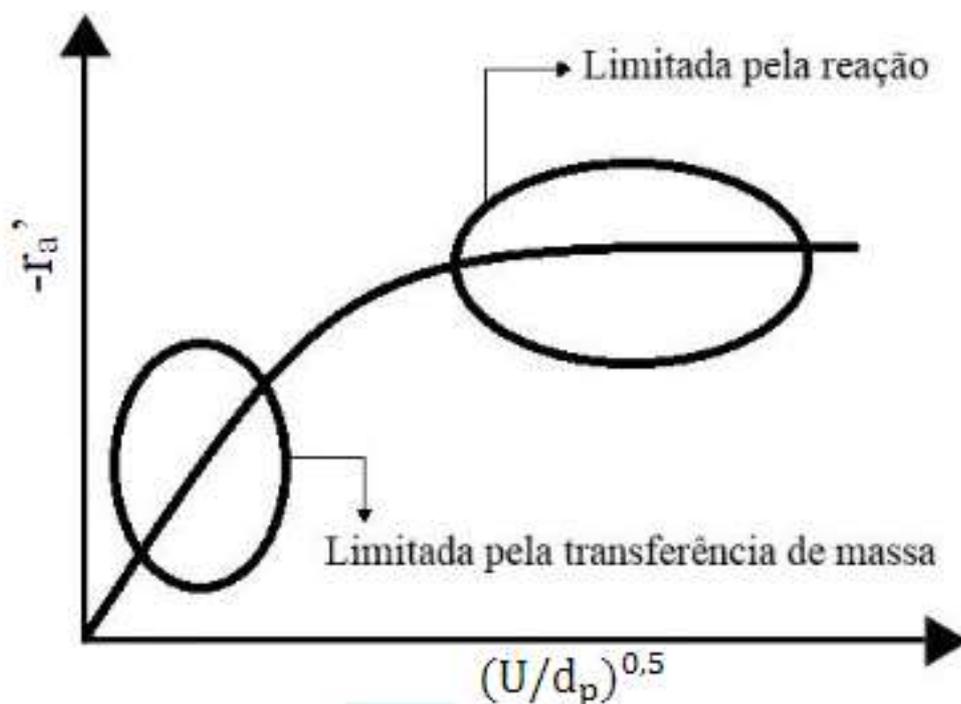
Sendo  $X_A$  e  $X_B$  as frações molares do soluto e solvente, respectivamente e  $D_{0BA}$  e  $D_{0AB}$  os coeficientes de diluição infinita do solvente no soluto e do soluto no solvente. A correlação de Geankoplis é indicada para estimar  $D_{0BA}$  e  $D_{0AB}$  em uma solução de açúcares (CREMASCO, 2016). A equação 14 a seguir descreve a correlação de Geankoplis:

$$D_{0AB} = \frac{9,40 \times 10^{11} \times T}{MMA^{1/3} \times \mu_B} \quad (13)$$

Sendo T a temperatura da solução,  $MMA$  ( $g \cdot mol^{-1}$ ) a massa molar do soluto e  $\mu_B$  a viscosidade dinâmica do solvente.

Fogler (2002) afirma que é possível verificar a existência da limitação da reação pelo transporte de massa externo (TME) verificando os efeitos do escoamento e diâmetro de partícula na velocidade de reação. A figura 5 a seguir exemplifica a análise de TME em função da variação do diâmetro de partícula e escoamento:

Figura 5 - Análise das regiões de limitação da reação pela transferência de massa ou pela reação química



Fonte: Adaptado de FOGLER (2012, p. 632) por DIAS (2020).

Com o aumento da vazão volumétrica, a camada hidrodinâmica formada no entorno das partículas catalíticas diminui e a transferência de massa do seio do fluido para a superfície do biocatalisador é favorecida. Sendo assim é favorável operar o reator PBR em regime turbulento e menores diâmetros de partícula para eliminar a limitação da reação pela transferência de massa externa. No entanto, o uso de partículas diminutas pode ocasionar o entupimento do Sistema reacional e ocasionar o aumento da pressão no reator (FOGLER, 2012).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PRODUÇÃO SUBMERSA DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *ASPERGILLUS ORYZAE IPT-301*

#### 4.1.1 Condições de cultivo

A produção das células íntegras ricas em FTase foi realizada através das cepas do fungo *Aspergillus Oryzae* IPT 301, fornecido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP), a qual foram utilizadas para repicagem dos microrganismos. 5g de um *Pellet* contendo esporos liofilizados foram suspensos em 10 mL de água destilada foram inoculadas em meio sólido contido em uma placa Petri, contendo as seguintes proporções em % m/v: ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0, glicerina (Isofar®) 2,5, extrato de levedura (Synth®) 0,5 e glicose (Dinâmica®) 2,5. Os esporos em meio sólido foram encubados a temperatura de 30 °C em uma incubadora refrigerada B.O.D (Tecnal®, modelo TE-371). Após 7 dias foram coletados os esporos utilizando uma alça de Drigalsk para raspagem, em meio contendo NaCl (Dinâmica®) 0,5% (m/v) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1% (v/v). A suspensão obtida foi homogenizada em solução glicerina 20% m/v, variando o volume utilizado de solução até que a concentração final de esporos atinja  $\times 10^7$  esporos. mL<sup>-1</sup>. Os esporos foram quantificados utilizando uma câmara de Neubauer (Newoptics®) e armazenados em tubos eppendorf 2 ml em um refrigerador (CUNHA, 2017).

#### 4.1.2 Cultivo celular submerso de *Aspergillus oryzae IPT-301*

As células íntegras de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 foram produzidas através do método de cultivo celular submerso. O meio de cultura sintético foi constituído em % (m/v) por: sacarose (União®) 15,0, extrato de levedura (Synth®) 0,5, NaNO<sub>3</sub>(Dinâmica®) 0,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(Synth®) 0,2, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Dinâmica®) 0,05, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (Synth®) 0,03 e FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Synth®) 0,001.

O pH do meio foi ajustado para 5,5 por uma adição controlada de solução NaOH (Synth®) 0,01 mol. L<sup>-1</sup>. A solução de cultivo foi fracionada em partes iguais de 50mL em frascos Erlenmeyer 250 mL e em seguida autoclavados juntamente aos

equipamentos auxiliares para inoculação a 120 °C e 1atm por 20 minutos. Os erlenmeyers contendo a solução de cultivo foram transferidos para uma capela de fluxo laminar onde foram expostos à luz ultravioleta durante 15 minutos para posterior inoculação de 0,5mL da suspensão de esporos com concentração de  $1 \times 10^7$  esporos. mL<sup>-1</sup> (GONÇALVES *et al.*, 2020).

Após a inoculação os frascos foram adicionados a um agitador orbital do tipo ShakerTE-4200 54 (Tecnal®) a 30°C e 200 rpm durante 64h. O conteúdo final contendo células íntegras ricas em FTase produzida por *Aspergillus Oryzae* IPT 301 e o caldo contendo meio de cultura foi filtrado a vácuo utilizando uma bomba TE-058 (Tecnal®) e papel filtro do tipo Whatman n.º1 com diâmetro de 90 mm para separar as células íntegras do caldo contendo meio de cultura sintético. Após a separação, as células íntegras foram pesadas e armazenadas para posterior imobilização.

#### 4.2 RETICULAÇÃO DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS COM GLUTARALDEÍDO

Para reticular as células íntegras de *Aspergillus Oryzae* IPT-301, utilizou-se um método otimizado por Ribeiro (2022) baseado em Vescovi *et al.* (2016). As células foram fracionadas em partes de 2g e adicionadas a Erlenmeyers contendo 183,2 mL de solução tris-acetato 0,2 mol. L<sup>-1</sup> e 16,8 mL de glutaraldeído, totalizando 200 mL. O meio foi agitado a 25°C e 200 RPM por 45 minutos, seguido pela adição de 2 mL de solução de NaBH<sub>4</sub> e NaOH com concentração de 100g.L<sup>-1</sup> e 0,001 mol. L<sup>-1</sup>, respectivamente, por mais 45 minutos para estabilizar as bases de Schiff formadas durante a reação. Após o processo, o meio reacional foi filtrado com papel filtro Whatman n.º1 de 90 mm de diâmetro usando a bomba TE-058 da Tecnal sob vácuo. As células filtradas foram lavadas e secas com papel toalha. A Figura 6 mostra as células íntegras obtidas por meio do cultivo celular submerso de *Aspergillus Oryzae* IPT-301.

Figura 6 - Células íntegras reticuladas com glutaraldeído



Fonte: Autor

### 4.3 APRISIONAMENTO DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS EM ALGINATO DE CÁLCIO

#### **4.3.1 Preparo da suspensão contendo as células íntegras reticuladas com glutaraldeído e alginato de sódio.**

O método de imobilização das células íntegras reticuladas com glutaraldeído foi adaptada da metodologia utilizada por Gonçalves (2019) empregando os parâmetros ótimos reportados pela autora, seguindo as proporções apontadas na tabela 1 a seguir:

Tabela 1 - Composição final da solução contendo as células íntegras reticuladas com glutaraldeído e alginato de sódio.

<b>Componentes</b>	<b>% (m/m)</b>
Células íntegras reticuladas com glutaraldeído, úmidas	23,08
Alginato	4,00
Água	72,92

Fonte: Adaptado de GONÇALVES (2019, pg. 44)

Para a execução dos experimentos foi preparada uma solução utilizando a proporção exibida na tabela 1. Inicialmente foi preparado uma solução contendo alginato e água, utilizando um agitador magnético para homogeneização da solução. Após uma hora de homogeneização, as células íntegras foram adicionadas a solução e suspensão obtida foi enviada a um Ultra Turrax® (modelo T18 basic, IKA Werke, Staufen, Alemanha) e submetida a cisalhamento constante por 10 minutos a 1000 rpm para homogeneização da solução final.

#### 4.3.2 Obtenção das esferas de alginato

O processo de encapsulação consiste no gotejamento da solução contendo as células íntegras reticuladas com glutaraldeído e alginato de sódio em uma solução reticulante de 50 mL de cloreto de cálcio  $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$ , conforme relatou Gonçalves (2019). O sistema de aprisionamento das células íntegras reticuladas em alginato de sódio é composto pela solução alginato de sódio com as células íntegras reticuladas, uma bomba peristáltica (Pump IV, BCC, Áustria) acoplada a uma mangueira de silicone de 3 mm de diâmetro interno e 5 mm de diâmetro externo, que por sua vez, possui a outra extremidade acoplada a um bico gotejador com diâmetro de 1,5 mm, uma solução  $0,2 \text{ Mol.L}^{-1}$  de cloreto de cálcio e um agitador magnético.

Durante o processo foram obtidas células íntegras reticuladas com glutaraldeído e encapsuladas com gel de alginato de cálcio com diâmetro médio de  $2,48 \pm 1,5 \text{ mm}$ . O sistema de gotejamento da solução contendo as células íntegras em alginato de sódio está representada na figura 7 a seguir:

Figura 7 - Sistema de gotejamento da solução contendo as células íntegras reticuladas com glutaraldeído e com gel de alginato de sódio



Fonte: Autor

O fluxograma da figura 8 representa o metodologia empregada na encapsulação das células íntegras reticuladas utilizando solução alginato de sódio e cloreto de cálcio como agente reticulante:

Figura 8 - Fluxograma do procedimento de encapsulação



Fonte: Autor

Para realizar o gotejamento da solução contendo as células íntegras e alginato de sódio em cloreto de cálcio  $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$  foi utilizado um bico gotejador de teflon com 40 mm de comprimento e 12 mm de diâmetro e bico gotejador com diâmetro de 1,5 mm, conforme ilustra a figura 9 a seguir:

Figura 9 - Bico gotejador de Teflon com saída de 1,5 mm de diâmetro



Fonte: Autor

A bomba peristáltica foi ajustada para uma taxa de fluxo de  $2,4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e o bico gotejador foi posicionado a 10 cm acima do nível de solução de cloreto de cálcio de concentração  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , conforme os parâmetros descritos por Gonçalves (2019). Após a formação das esferas de alginato de sódio com a solução celular, elas foram mantidas imóveis na solução reticulante de cloreto de sódio  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  por 15 minutos para solidificação.

A separação das esferas de alginato de cálcio da solução de cloreto de cálcio foi realizada por filtração a vácuo com o uso de uma bomba Tecnal TE-058 e papel filtro Whatman nº1 com diâmetro de 90 mm. As esferas foram lavadas com água destilada abundantemente, secadas com papel toalha e posteriormente utilizadas para o preenchimento de um reator PBR para o ensaio catalítico. As imagens das esferas de alginato de cálcio na solução reticulante e após o processo de secagem estão representadas nas Figuras 10 e 11.

Figura 10 - Esferas de alginato de cálcio em solução reticulante



Fonte: Autor

Figura 11- Esferas de alginato de cálcio em solução reticulante



Fonte: Autor

## 4.2 REATOR PBR E MONTAGEM DO SISTEMA OPERACIONAL

O sistema experimental consistiu em um reator tubular de borosilicato de 12mm de diâmetro interno e 15cm de altura do leito. Para garantir a estabilidade do meio catalítico, o reator foi equipado com suportes cilíndricos de teflon na parte superior e inferior e uma jaqueta de vidro para a recirculação de água como fluido de troca térmica. O fluxo ascendente foi gerado por uma bomba peristáltica (modelo LAP-101-3, da NS Tecno®) e a temperatura foi mantida constante através de um banho termostatizado (modelo TE-2000, da Tecnal®) com água destilada a 50°C.

O leito catalítico foi composto por células íntegras reticuladas e encapsuladas em gel de alginato de cálcio. As amostras foram coletadas em tubos falcon de 15 mL por meio de uma mangueira de silicone de 3 mm de diâmetro interno e 5 mm de diâmetro externo. Após a coleta, as amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos e imersas em gelo por 5 minutos para interromper a reação. As configurações experimentais estão ilustradas nas figuras 12 e 13.

Figura 12 - Reator PBR empacotado com esferas de alginato de cálcio



Fonte: Autor

Figura 13 - Reator PBR e sistema reacional auxiliar



Fonte: Autor

#### 4.3 ENSAIOS DE OBTENÇÃO DE PARÂMETROS REACIONAIS EM REATOR PBR

Os parâmetros reacionais iniciais utilizados nos ensaios de produção de atividade enzimática foram de concentração de  $473 \text{ g.L}^{-1}$ , temperatura de  $50^\circ\text{C}$ , e pH de 5,5, conforme verificado por Garcia (2018) e os ensaios foram realizado em triplicata.

A fim de preencher completamente o reator tubular PBR, a massa catalítica necessária foi determinada pela pesagem das esferas de alginato utilizadas. O leito catalítico foi preenchido com uma massa de 20 g de esferas de alginato e todos os ensaios foram realizados utilizando este valor.

##### 4.3.1 Análise da influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutossilação.

Para obtenção do perfil de atividade enzimática em função da vazão volumétrica, o reator PBR foi totalmente preenchido com 20 g de células íntegras reticuladas com glutaraldeído e aprisionadas em gel de alginato de cálcio, mantendo-se constante a alimentação de substrato em  $473 \text{ g.L}^{-1}$  e temperatura em  $50^\circ\text{C}$ .

A vazão na saída do reator foi ajustada medindo o tempo necessário para o fluxo na corrente de saída preencher 10 ml em uma proveta, ajustando a potência da

bomba conforme a vazão volumétrica obtida até alcançar a vazão desejada. Os testes foram realizados com o tempo de reação de 180 minutos, a 50 °C e pH 5,5 (ajustado utilizando solução tampão tris-acetato 0,2 mol. L<sup>-1</sup>) no reator PBR. A cada 15 minutos de reação a vazão volumétrica foi aferida novamente, para ajustar possíveis quedas de pressão no reator e manter a vazão constante. As amostras na saída do reator foram coletadas nos tempos de 5, 10,20,25,30,60,90,120,150 e 180 minutos.

#### **4.3.2 Análise da influência da concentração na atividade de transfrutossilagem e obtenção dos parâmetros cinéticos**

Para análise da influência da concentração na atividade de transfrutossilagem foram realizados ensaios catalíticos em reator PBR mantendo constantes a temperatura (50 °C), pH do substrato (mantido em 5,5, com tampão tris-acetato 0,2 mol. L<sup>-1</sup>), vazão volumétrica de 1 ml.min<sup>-1</sup> e variando a concentração da solução de sacarose, nas concentrações de 200, 300, 400, 470 e 600 g.L<sup>-1</sup>.

O leito catalítico do reator PBR foi preenchido com 20 g de células íntegras reticuladas com glutaraldeído e encapsuladas em gel de alginato de cálcio. A reação foi conduzida por 30 minutos utilizando o aparato experimental descrito no tópico 4.4. Foram tomadas 2 ml de amostras em tubos falcon de 15 ml nos tempos de 5,10,15,20 25 e 30 minutos.

Após a obtenção da atividade de transfrutossilagem ( $A_T$ ), foram estimados os parâmetros cinéticos em regime estacionário por meio de ajuste cinético (equações 6 e 7), com auxílio de software gráfico.

#### **4.3.3 Análise da influência da temperatura na atividade de transfrutossilagem.**

Os estudos de influência da temperatura em reator PBR foram realizados mantendo-se constante a vazão volumétrica em 1 ml. min<sup>-1</sup> e concentração de substrato de 473 g.L<sup>-1</sup> e pH de 5,5 mantido por solução tris-acetato 0,2 mol. L<sup>-1</sup>. A reação foi conduzida por 90 minutos nas temperaturas de 30,40,50 e 60 °C e foram tomadas 2 ml de amostras em tubos falcon 15 ml nos tempos de 5,10,15,30 60 e 90 minutos.

#### 4.3.4 Análise da estabilidade operacional do processo

A análise da estabilidade operacional foram realizados em sistemas operacionais com e sem reciclo. O reator PBR foi preenchido com as células íntegras reticuladas com glutaraldeído e aprisionadas em gel de alginato de cálcio e a reação foi conduzida a 50 °C, alimentando o reator PBR com solução reagente de sacarose na concentração de 473 g.L<sup>-1</sup> e pH mantido em 5,5 por uma solução tris-acetato 0,2 ml.L<sup>-1</sup>. Para a reação com reciclo o aparato experimental foi montado de maneira que toda corrente do efluente do reator PBR retornasse na corrente de alimentação, para formar um reciclo total.

A reação foi realizada por um período de 10 horas e amostras foram tomadas a cada uma hora.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Após a coleta de amostras foram realizadas análises colorimétricas para determinar a concentração de açúcares redutores (AR) e glicose (G) utilizando os métodos DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) para açúcares redutores (AR) e o método GOD PAP® - Merck 8443 para quantificação de glicose (G) (BOBBIO; BOBBIO, 2005; WONG; WONG; CHEN, 2008).

Para quantificação em U.g<sup>-1</sup> da atividade de transfrutoseilação ( $A_T$ ) foi realizado o balanço de massa utilizando as equações de número 1 a 5 reportadas no item 3.3.2 utilizando as equações (1), (2), (3) e (4).

##### 4.4.1 Determinação de açúcares redutores (AR)

Para utilização do método DNS foi necessário o preparo de uma solução 10g ácido 3,5-dinitrosalicílico (C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) em 200 ml de NaOH 2 mols/L (solução 1). Como segundo componente da solução, foram preparados 300g de tartarato de sódio e potássio (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O) em 500 ml de água destilada (solução 2). A solução 1 foi adicionada a solução 2 sob agitação constante até que a solução se tornasse homogênea. Após a mistura completa, a solução resultante foi transferida para um balão de 1000 ml e o volume do balão foi aferido com água destilada e armazenado em frasco âmbar fora do alcance da luz.

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada utilizando-se 0,5 ml da solução previamente preparada de DNS e 0,5 ml de amostra retirada na corrente de saída do reator PBR em um tubo de ensaio 15 ml. O tubo foi então levado a água fervente por 15 minutos e logo após mergulhado em gelo por mais 5 minutos. Ao sair do banho de gelo, foram adicionados mais 4 ml de água destilada a solução. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, apenas substituindo 0,5 ml de amostra por 0,5 ml de água destilada. A solução foi lida em um espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) utilizando comprimento de onda de 540 nm.

Para construção da curva analítica foram preparadas soluções de glicose na faixa de 0 a 1,0 g.L<sup>-1</sup> e as respectivas absorvâncias das soluções foram medidas em espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B). Um gráfico da absorvância em função da concentração de glicose foi plotado utilizando o software Microsoft Excel e a equação da reta foi utilizada para calcular a concentração de açúcares redutores [AR] em µL.

#### **4.4.2 Determinação da concentração de glicose [G]**

Para determinação da concentração de glicose [G] foi utilizado um kit enzimático (LABORLAB®) contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (PAD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato. O kit age na oxidação da glicose produzindo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que por sua vez é oxidado por meio da enzima peroxidase que em conjunto com a 4-AF e o 4-hidroxibenzoato conferem uma coloração rosácea a solução (BOBBIO; BOBBIO, 2005; WONG; WONG; CHEN, 2008).

Para quantificar a glicose foi utilizado um tubo de ensaio 15 ml. Foram adicionados 35 µL de amostra e 3,5mL de solução do kit enzimático GOD-PAP® (Laborlab). O branco foi obtido utilizando o mesmo procedimento, substituindo amostra por água destilada. O tubo de ensaio foi levado a um banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min. Após sair do banho Dubnoff, a absorvância da solução foi medida em um espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) utilizando o comprimento de onde de 505 nm.

Também foi lida a absorvância em triplicata do padrão (solução glicose 1g. L<sup>-1</sup>) fornecido pelo fabricante do kit enzimático. Para obter a concentração de glicose foi utilizada a equação 5, fornecida pelo manual técnico do kit analítico GOD-PAP:

$$[G] \text{ (mg.dl}^{-1}\text{)} = \frac{D \times 100 \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}}\right)}{P} \quad (14)$$

Com D sendo a absorvância lida no espectrofotômetro e P o padrão de glicose.

#### 4.5 OBTENÇÃO DE MASSA SECA DO BIOCATALISADOR

Após o término de cada ensaio catalítico no reator PBR, a massa de biocatalisador utilizada para preencher o reator foi retirada e pesada. O leito catalítico foi retirado e transferido para uma solução contendo citrato de sódio 2% (m/m), como reportado por Gonçalves (2019). Após a solubilização das esferas de alginato de cálcio em solução citrato de sódio, a solução resultante foi filtrada a vácuo para separar as células íntegras reticuladas do restante da solução. As células íntegras separadas foram então levadas a estufa (ProLab®, São Paulo, Brasil) a 60 °C para secagem do biocatalisador sendo mantida em estufa até a obtenção de massa constante (24 horas aproximadamente).

#### 4.6 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA

Para calcular o coeficiente de transporte de massa externa foi utilizada equação (8), determinando o valor dos números adimensionais de Sherwood, Reynolds de partícula e Schmidt, com as equações (9), (10) e (11), respectivamente.

Os parâmetros operacionais utilizados foram extraídos dos ensaios de análise de influência da vazão, temperatura e concentração na atividade de transfrutossilação, utilizando dados que geraram maiores atividades enzimáticas. Para o cálculo do coeficiente de difusão mássica ( $D_{AB}$ ) foram utilizadas as correlações de Darken, equação 12 e Geankoplis, equação 13.

Além das correlações empíricas, o método gráfico proposto pro Fogler (2012) (Figura 5) também foi utilizado para análise do momento em que a reação é limitada pelo transporte de massa externa ou pela própria reação química. O gráfico foi construído variando o parâmetro  $(U \cdot dp^{-1})^{0.5}$  em função da atividade enzimática, em que U é a velocidade do fluido reagente no estado estacionário e dp é o tamanho da partícula catalítica.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. REFORMULAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO BIOCATALISADOR

Este trabalho foi conduzido seguindo os métodos descritos por Gonçalves (2019) para encapsular células íntegras reticuladas com glutaraldeído em gel de alginato de baixa viscosidade, utilizando cloreto de cálcio como agente reticulante durante a encapsulação. No entanto, em contraste com a metodologia descrita por Gonçalves (2019), as células íntegras de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 foram encapsuladas imediatamente após a reticulação, ao invés de serem armazenadas como biomassa úmida no tampão tris-acetato 0,2 mol. L<sup>-1</sup> para uso posterior, visto que a quantidade de tampão tris-acetato 0,2 mol. L<sup>-1</sup> utilizado pela autora não foi descrita.

Esta decisão resultou em uma alteração na viscosidade da solução pré-encapsulada, devido à incorporação de umidade proveniente das células reticuladas. Tal fato resultou em desafios durante o processo de encapsulação, tais como a formação de aglomerados alongados em vez de esferas regulares, uma obstrução frequente da ponta de gotículas e problemas relacionados à transferência de massa entre a bomba peristáltica e a ponta de gotículas.

A proporção da solução de alginato contendo células íntegras utilizada para a encapsulação foi ajustada a fim de atingir uma viscosidade adequada para o processo. Para tal, a concentração de células íntegras na solução de alginato de sódio foi varrida em concentrações de 20, 18, 15, 12 e 10% em massa. A solução contendo 12% de células íntegras apresentou a melhor viscosidade para o processo, e foi utilizada durante todo o trabalho. A Tabela 2 a seguir apresenta a nova proporção da solução utilizada para a encapsulação das células íntegras reticuladas.

Tabela 2 - Nova proporção para solução contendo alginato de sódio

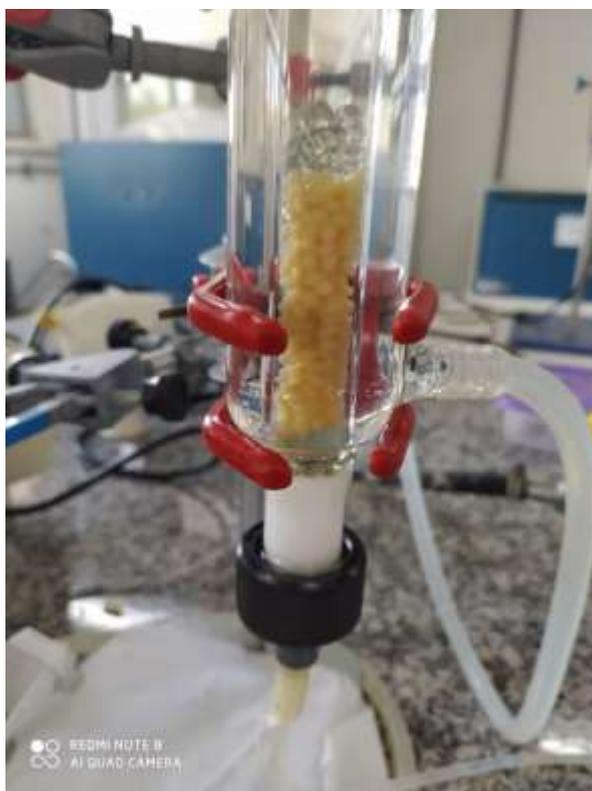
<b>Componentes</b>	<b>% (m/m)</b>
Células íntegras reticuladas com glutaraldeído, secas	12
Alginato	4
Água	84

Fonte: Autor

### 5.1.1 Configuração do leito catalítico

Os ensaios iniciais no reator PBR utilizaram um leito catalítico completo de 20 g. Contudo, a baixa densidade do leito causou problemas de entupimento e aumento de pressão quando a vazão excedeu  $7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  no fluxo ascendente. Para solucionar essa questão, reduziu-se a massa do leito para 5,66 g e adicionou-se 20 esferas de vidro acima e abaixo do leito catalítico. Essas esferas evitaram o deslocamento do leito e o novo arranjo está representado na Figura 14.

Figura 14 - Reator PBR recheado com esferas de alginato e esferas de vidro



Fonte: Autor

### 5.1.2 Formação de caminhos preferenciais e volumes mortos

A passagem de fluxo em um leito de um reator, na maioria das vezes, apresentam comportamentos que divergem da idealidade. Dependendo da configuração do leito catalítico, existe a possibilidade da formação de zonas de estagnação do fluxo de substrato, forçando que o fluido seja recirculado em uma área sem contato com o leito catalítico, resultando em uma conversão muito baixa ou nula.

Essa zona de estagnação do fluxo de substrato é chamada de volume morto. (LEVENSPIEL, 2000).

Durante os ensaios em reator PBR foi possível notar a formação de caminhos preferenciais e volumes mortos no sistema reacional. Inicialmente as esferas de alginato preencheram todo o reator PBR, porém com a passagem de fluxo o leito catalítico se contraiu e o volume ocupado pelas esferas diminuiu e deixou de ocupar todo o volume disponível para o leito catalítico.

A deformação do leito também causou zonas de volumes mortos com recirculação de fluxo, diminuindo drasticamente a conversão de substratos em produto final. A formação de volumes mortos ocorreram também no interior do leito catalítico e a observação deste fenômeno só foi possível com a retirada do leito no fim dos ensaios com o reator PBR, impossibilitando o ajuste do leito no início da reação.

Figura 15 - Deformação do leito catalítico com a passagem de fluxo



Fonte: Autor

As linhas vermelhas na figura 15 representam os limites do volume reacional disponível. Ao observar a figura 15 é possível notar que certa parte do volume reacional não está totalmente preenchido pelo leito catalítico.

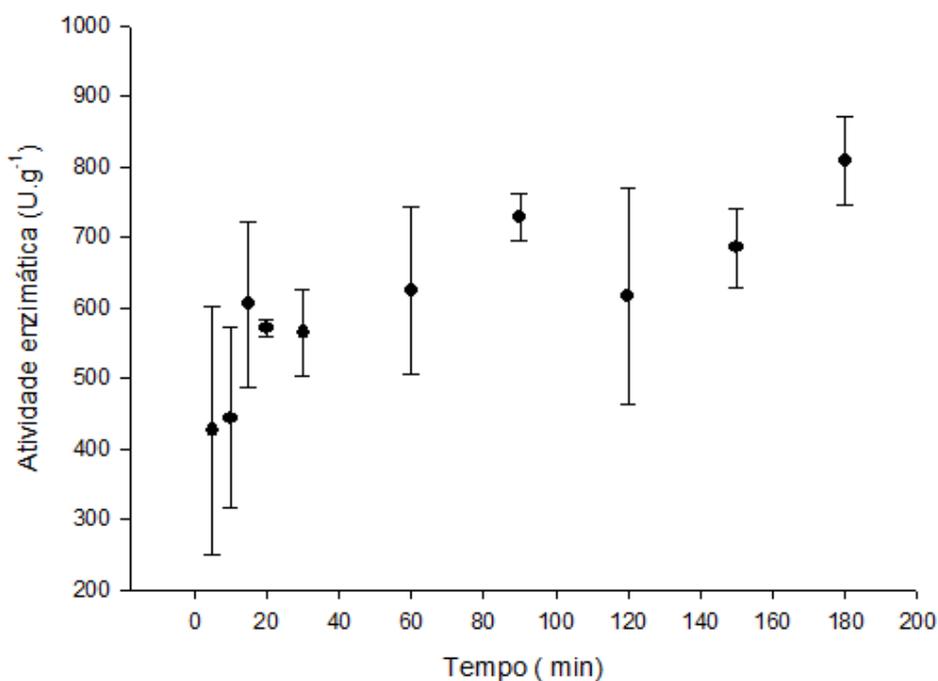
A análise de determinação do tempo de residência seria fundamental para o estudo da deformação do leito catalítico, no entanto, não foi possível realizar a análise DTR, pois ensaios prévios com traçadores do tipo corante já foram realizados por este grupo de pesquisa pelo autor Prata (2020) e não foi possível chegar a uma conclusão correta deste fenômeno devido à absorção do corante pelo gel de alginato de cálcio.

## 5.2 ANÁLISE DOS EFEITOS DA VAZÃO VOLUMÉTRICA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

A seguir serão apresentados os efeitos de cada uma das vazões volumétricas avaliadas na atividade enzimática. Os gráficos estão dispostos separadamente para evitar a sobreposição dos resultados obtidos e facilitar a visualização.

### 5.2.1 Análise dos efeitos da vazão volumétrica de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ na atividade enzimática

Figura 16 - Perfil de atividade enzimática para vazão volumétrica de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a  $50^\circ\text{C}$ , concentração de substrato de  $470 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e pH de 5,5

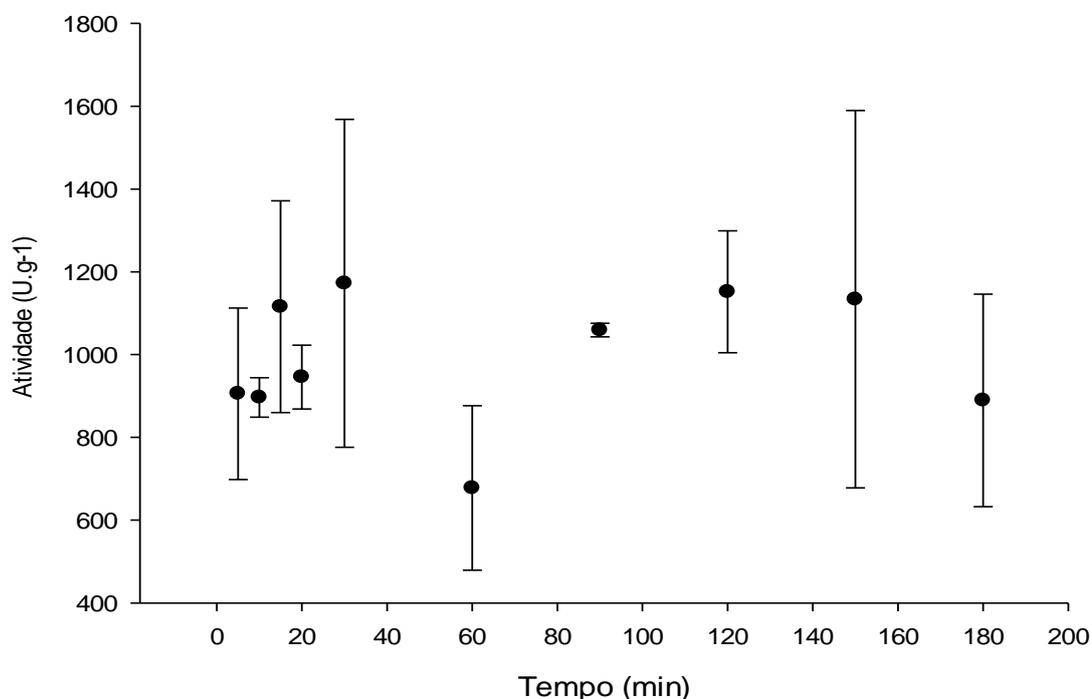


Fonte: Autor

Os dados apresentados na figura 16 foram submetidos a um teste Tukey de comparação de médias para verificar estatisticamente em que ponto o reator PBR começou a operar em regime estacionário. O ponto de 20 minutos ( $570 \pm 12 \text{ U.g}^{-1}$ ) de reação foi o primeiro em que a média da atividade enzimática não apresentou diferença significativa a um nível de 5% de significância em comparação com os pontos anteriores e posteriores, indicando que a partir de 20 minutos atividades constantes ao longo do tempo. O resultado com o p valor de cada ponto obtidos durante o teste Tukey constam na tabela A1 do apêndice A.

### 5.2.2 Análise dos efeitos da vazão volumétrica de $4 \text{ ml. min}^{-1}$ na atividade enzimática

Figura 17- Perfil de atividade enzimática obtida alimentando o sistema operacional com vazão de  $4 \text{ ml. min}^{-1}$



Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software SigmaPlot.

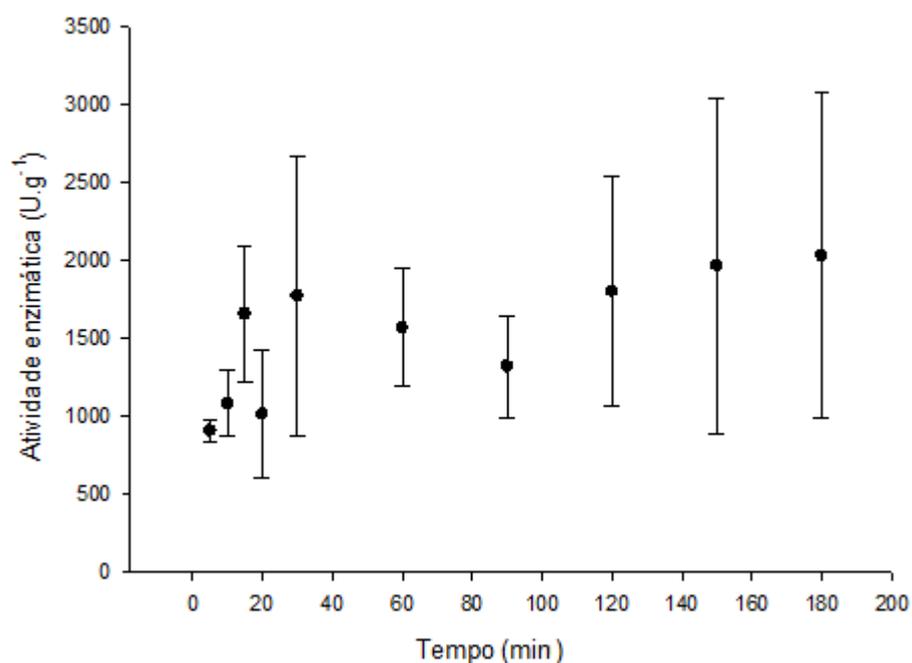
Os dados representados na figura 17 foram submetidos ao teste estatístico de Tukey para obtenção do ponto onde o reator PBR começou a operar em estado

estacionário. Conforme a análise, não existe diferença significativa entre as médias de 5 a 180 minutos, o que indica que o reator opera com uma faixa contínua de atividade enzimática desde o início da operação. O resultado com o p valor de cada ponto obtido durante o teste Tukey constam na tabela A2 do apêndice A.

### 5.2.3 Análise dos efeitos da vazão volumétrica de 7 ml. min<sup>-1</sup> na atividade enzimática

A figura 18 a seguir ilustra o perfil de atividade enzimática obtida alimentando o sistema operacional com vazão de 7 ml.min<sup>-1</sup>.

Figura 18 - Perfil de atividade enzimática para vazão volumétrica de 7 ml.min<sup>-1</sup> a 50°C  
concentração de substrato de 470 g.L<sup>-1</sup> e pH de 5,5



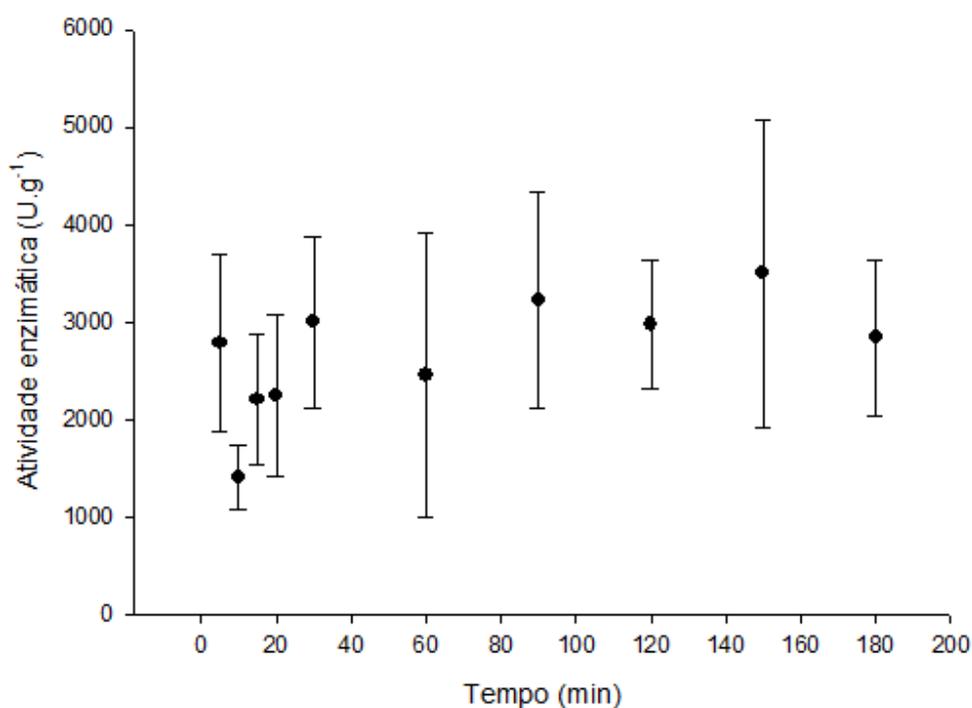
Fonte: Elaborado pelo autor

Conforme o teste Tukey realizados com os dados apresentados na figura 18, não existe diferença entre os valores das médias ao nível de 5% de significância, o que sugere que o reator atingiu o regime estacionário logo no início da operação. Graficamente, o regime estacionário começa a partir do ponto de 20 minutos, com atividade enzimática de  $1600 \pm 410$  U.g<sup>-1</sup>. O resultado com o p valor de cada ponto obtido durante o teste Tukey constam na tabela A3 do apêndice A.

### 5.2.4 Análise dos efeitos da vazão volumétrica de 10 ml. min<sup>-1</sup> na atividade enzimática

A figura 19 a seguir ilustra o perfil de atividade enzimática obtida alimentando o sistema operacional com vazão de 10 ml.min<sup>-1</sup>.

Figura 19 - Perfil de atividade enzimática para vazão volumétrica de 10 ml.min<sup>-1</sup> a 50°C, concentração de substrato de 470 g.L<sup>-1</sup> e pH de 5,5



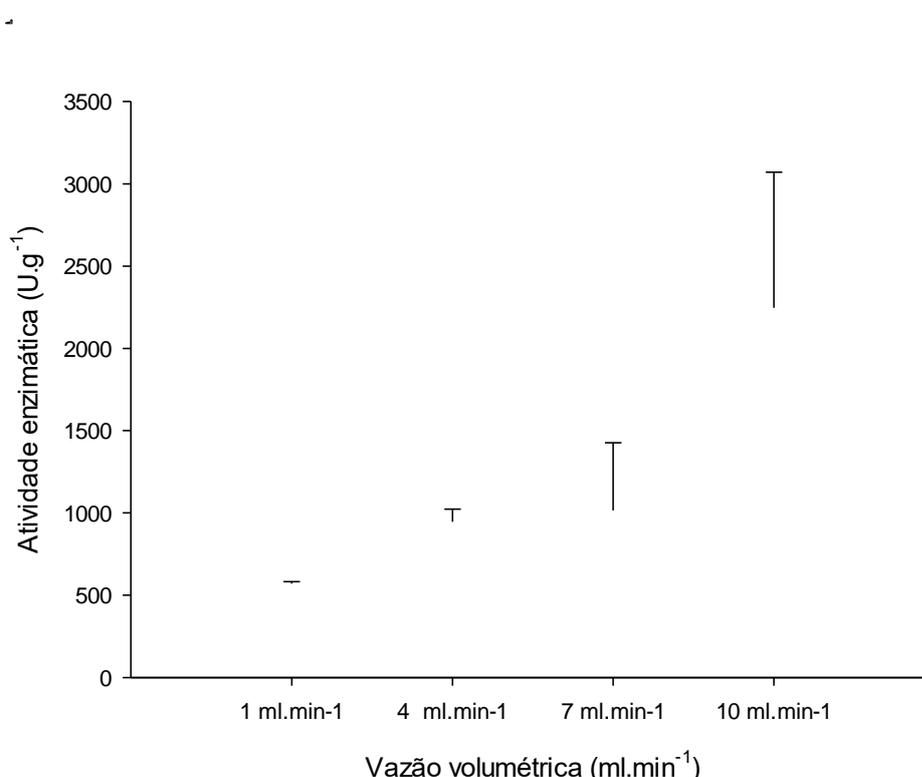
Fonte: Elaborado pelo autor

Conforme o teste Tukey realizado com os dados apresentados na figura 19, as médias de atividades enzimáticas do ponto 5 a 180 minutos não apresentam diferenças significativas a 5% de significância. Graficamente é possível observar que o reator começa a operar em regime estacionário a partir dos 20 minutos, com atividade enzimática de  $2246 \pm 823$  U.g<sup>-1</sup>. O perfil obtido para vazão de 10 ml.min<sup>-1</sup> foi a que apresentou maiores atividades enzimáticas, enquanto exibiu os maiores desvios. O resultado com o p valor de cada ponto obtido durante o teste Tukey constam na tabela A4 do apêndice A.

### 5.2.5 Comparação das atividades enzimáticas obtidas no estado estacionário

A figura 20 a seguir exibe a atividade enzimática obtida durante o estado estacionário aos 20 minutos de reação, temperatura de 50 °C, concentração de substrato de 470 g.L<sup>-1</sup> e pH de 5,5 para todas as vazões analisadas:

Figura 20 - Atividades enzimáticas obtidas aos 20 minutos para vazões volumétricas de 1,4,7 e 10 ml.min<sup>-1</sup>



Fonte: Elaborada pelo autor

A análise da atividade obtida aos 20 minutos para vazões de 1,4,7 e 10 ml.min<sup>-1</sup> permite inferir que a atividade enzimática apresenta um perfil crescente em função do aumento da vazão volumétrica. A vazão de 10 ml.min<sup>-1</sup> foi o ensaio que apresentou maior atividade enzimática (3497 ± 1580 U.g<sup>-1</sup>) aos 150 minutos de reação enquanto exibiu as maiores deformações do leito catalítico e conseqüentemente, os maiores desvios, o que dificultou a reprodutibilidade dos ensaios neste ponto. Prata (2020) também relatou maiores produções de FOS para vazões acima de 10 ml. min<sup>-1</sup>,

utilizando as células íntegras de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 aprisionadas em gel de alginato para preencher um reator PBR em condições reacionais semelhantes.

As partículas catalíticas estão sujeitas a formação de uma camada limite difusional em seu entorno, causado pela passagem de fluido. A camada limite difusional dificulta o acesso do substrato aos sítios ativos presentes no complexo enzimático, com conseqüente queda na atividade enzimática. A espessura da camada limite difusional possui dependência linear negativa com a vazão volumétrica, por isso, altas vazões favorecem a diminuição da camada limite difusional e favorecem o acesso do substrato ao sítio ativo do biocatalisador. (FOGLER, 2012; LEVENSPIEL, 2000).

A vazão de 10 ml.min<sup>-1</sup> apresentou as maiores atividades enzimáticas, no entanto, a vazão de 1 ml.min<sup>-1</sup> foi escolhida para os ensaios subsequentes para garantir a reprodutibilidade, pois houve menor deformação do leito catalítico e, conseqüentemente, menores variações nas atividades enzimáticas.

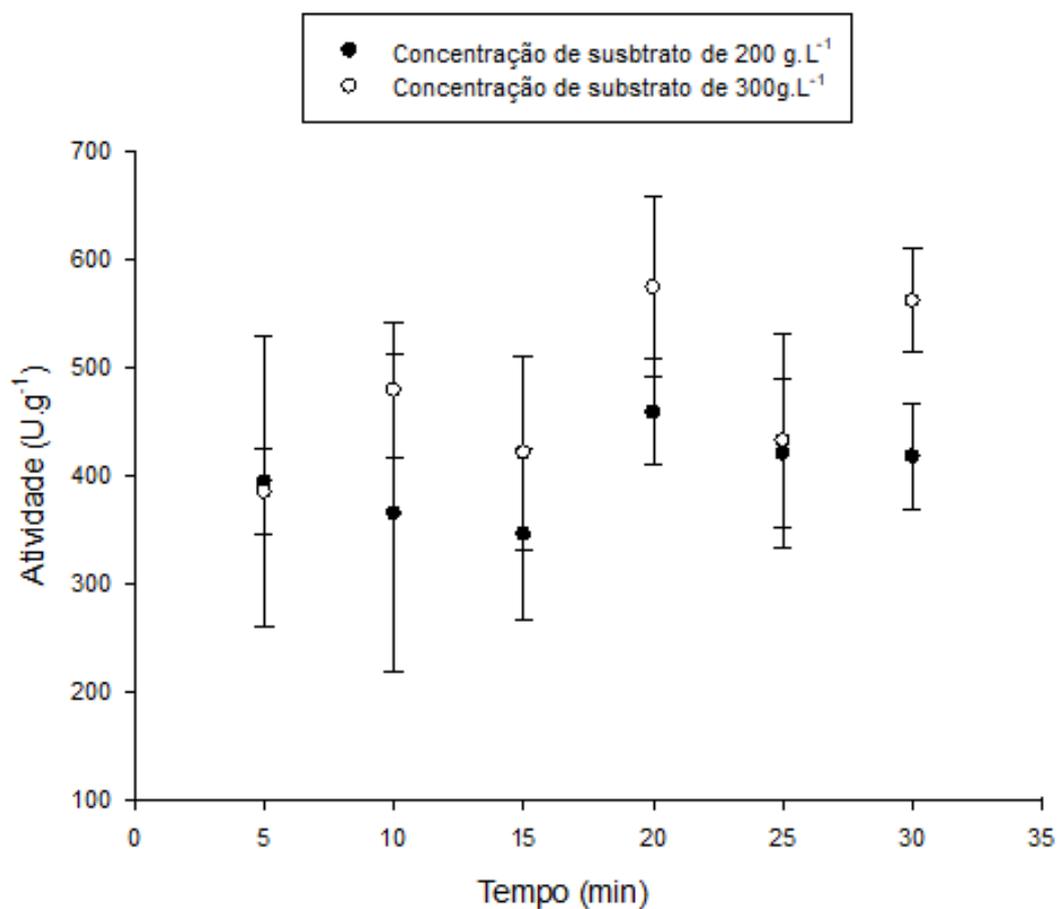
O estado estacionário foi atingido em aproximadamente 20 minutos de reação. Em comparação, Ribeiro (2022) reportou o estado estacionário após 135 minutos de reação utilizando a FTase reticulada com glutaraldeído em operação contínua em condições semelhantes. A adição de uma camada de gel de alginato na enzima FTase reticulada com glutaraldeído melhorou a estabilidade do leito catalítico no sistema reacional, resultando em uma redução significativa do tempo para atingir o estado estacionário. Prata (2021) utilizando FTase encapsulada em gel de alginato de cálcio em reator PBR também obteve estado estacionário em um período menor de reação (50 minutos) em relação à FTase livre e imobilizada com glutaraldeído de Ribeiro (2022).

### 5.3 ANÁLISE DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.

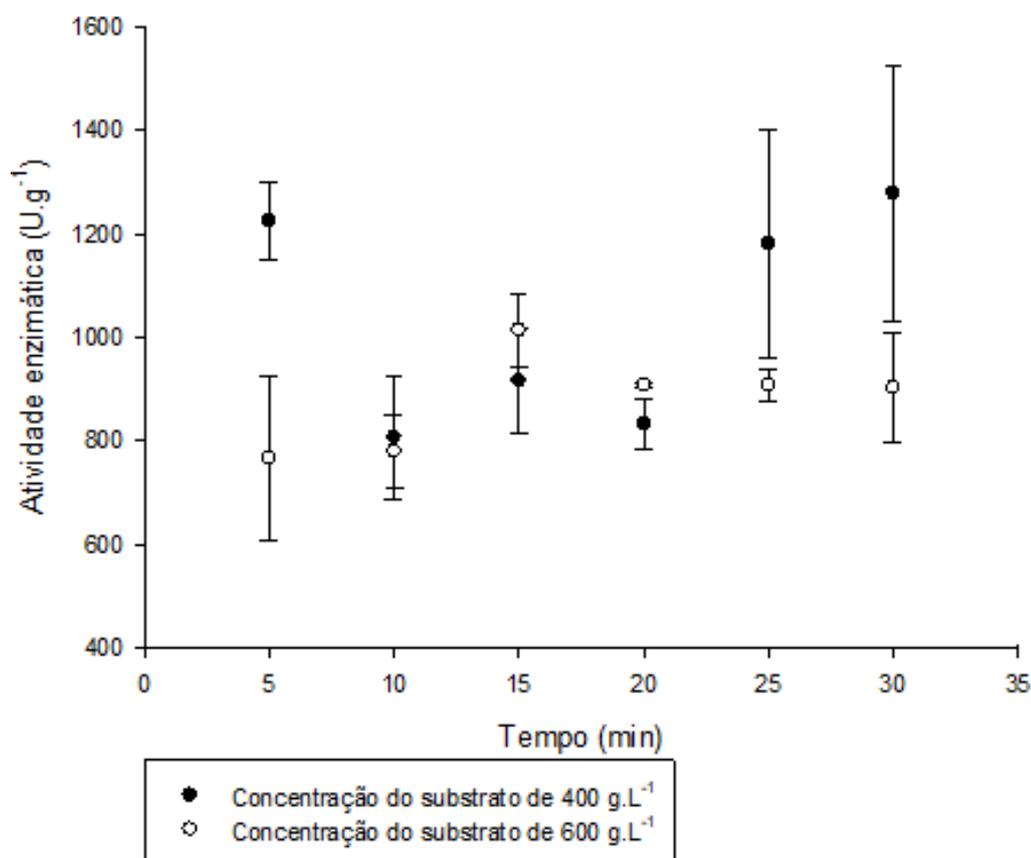
Os ensaios para a análise do efeito da concentração na atividade enzimática foram realizados variando a concentração da solução de sacarose na corrente de alimentação do reator. Foram testadas vazões de 200,300,400 e 600 g.L<sup>-1</sup>. A vazão utilizada foi de 1 ml.min<sup>-1</sup> por apresentar os menores desvios, como pode ser observado na figura 20. Os parâmetros reacionais de temperatura (50°C) e pH (5,5)

foram os resultados ótimos reportados por Gonçalves (2019) para o mesmo biocatalisador em operação batelada. Os resultados obtidos foram divididos em dois gráficos para melhor visualização e estão dispostos nas figuras 21 e 22 a seguir:

Figura 21 - Perfil de atividade enzimática obtida para concentrações de 200 e 300 g.L<sup>-1</sup>



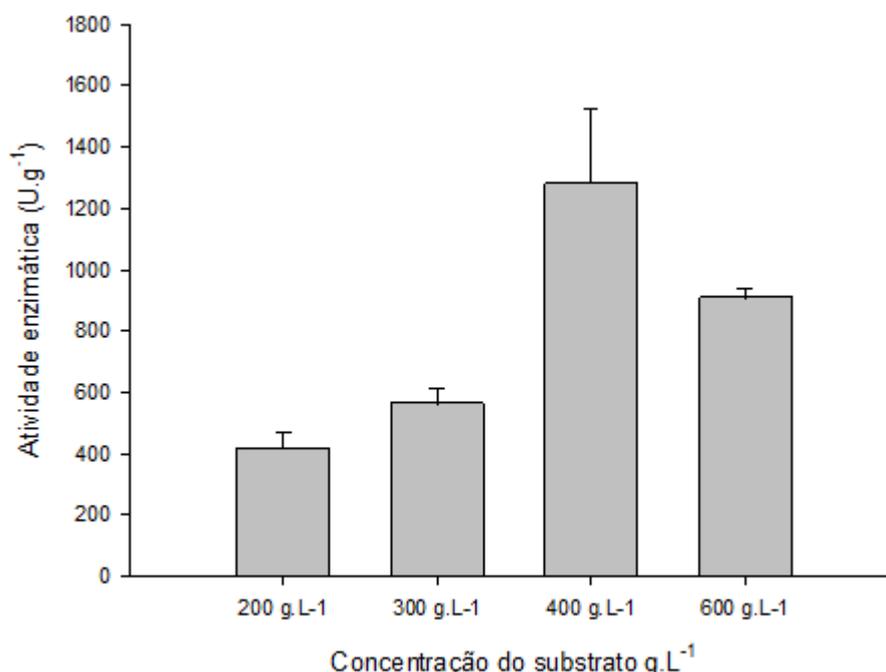
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 22 - Perfil de atividade enzimática obtido para vazões de 400 e 600 g.L<sup>-1</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se que para menores concentrações de substrato (200 e 300 g.L<sup>-1</sup>) a atividade enzimática foi menor. Também é possível notar a tendência de crescimento da atividade com o aumento da concentração de substrato. No entanto, há uma diminuição da reação quando a concentração é aumentada a partir de 400 g.L<sup>-1</sup>, sugerindo a saturação dos sítios ativos enzimáticos. A figura 23 a seguir ilustra o perfil de atividade obtido para diferentes concentrações aos 30 minutos de reação:

Figura 23 - Variação da atividade enzimática em função da concentração de substrato aos 30 minutos de reação.



Fonte: Elaborado pelo autor

Ao trabalhar com a concentração de 600 g.L<sup>-1</sup> Ribeiro (2022) e Dias (2020) também obtiveram decaimento da atividade enzimática, indicando possível inibição complexo enzimático pelo substrato ou produtos formados.

A maior atividade enzimática ( $1277 \pm 246$  U.g<sup>-1</sup>) foi obtida com a concentração de 400 g.L<sup>-1</sup> aos 30 minutos de reação. Gonçalves (2019) ao analisar a influência da concentração na atividade enzimática utilizando o mesmo biocatalisador, também relatou atividade enzimática máxima (2200 U.g<sup>-1</sup>) com a concentração de 400 g.L<sup>-1</sup>, operando um reator batelada. De maneira análoga aos ensaios realizados neste trabalho, a autora também relatou queda da atividade enzimática para concentrações acima de 400 g.L<sup>-1</sup>.

Comparando com os resultados obtidos por Gonçalves (2019) para o mesmo biocatalisador, a atividade máxima obtida para 400 g.L<sup>-1</sup> de  $1277 \pm 246$  U.g<sup>-1</sup> neste trabalho é menor que a reportada pela autora (aproximadamente 2200 U.g<sup>-1</sup>). A diminuição da atividade pode ser explicada pela necessidade de adaptação do teor de células íntegras na solução de alginato utilizada durante o processo de encapsulação, relatado na tabela 3.

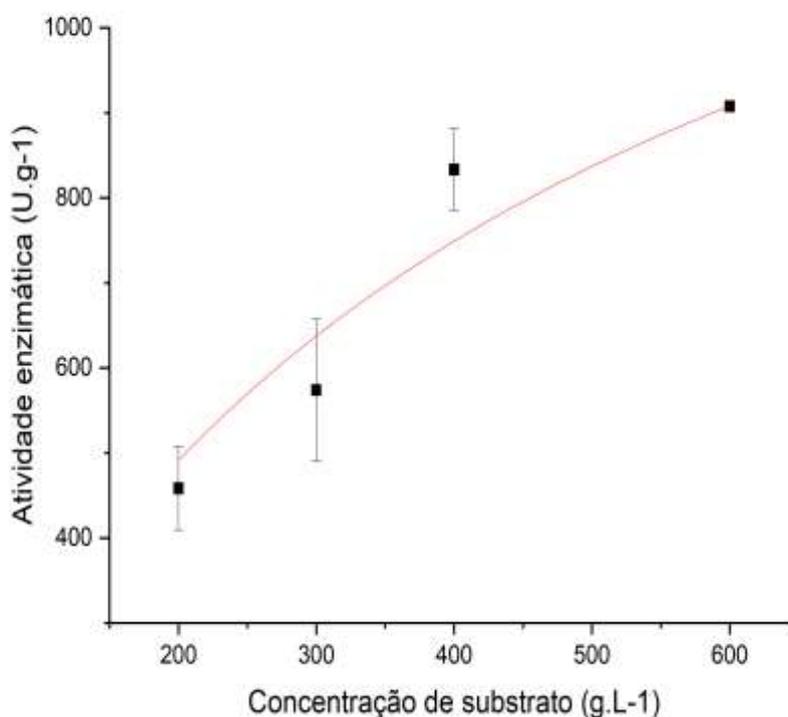
## 5.4 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

A avaliação da cinética enzimática foi realizada utilizando os modelos de Michaelis-Menten (equação 6) e Hill (equação 7).

Os pontos experimentais foram retirados dos dados obtidos dos ensaios de análise da concentração do substrato na atividade de transfrutossilação, colhidos aos 20 minutos de reação, onde o sistema reacional encontra-se em estado estacionário bem definido. O ajuste do modelo de Michaelis-Menten e Hill foi realizado através do método de regressão não linear com auxílio do software Origin. A figura 24 retrata o ajuste do modelo de Michaelis-Menten.

Figura 24 - Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para obtenção dos dados cinéticos.

— representa o modelo de Michaelis-Menten e ■ são os dados obtidos.



Fonte: Elaborado pelo autor

O ajuste do modelo de Michaelis-Menten resultou em  $R^2$  de 95,96%, o que significa que o modelo tem a capacidade de explicar a maioria absoluta dos dados. A tabela 3 representa os dados cinéticos obtidos com o ajuste do modelo.

Tabela 3 - Dados cinéticos obtidos pelo modelo de Michaelis-Menten.

Modelo	Michaelis-Menten
V <sub>máx</sub> (U.g <sup>-1</sup> )	1575 ± 287
K <sub>m</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	441 ± 189
R <sup>2</sup>	0.9596

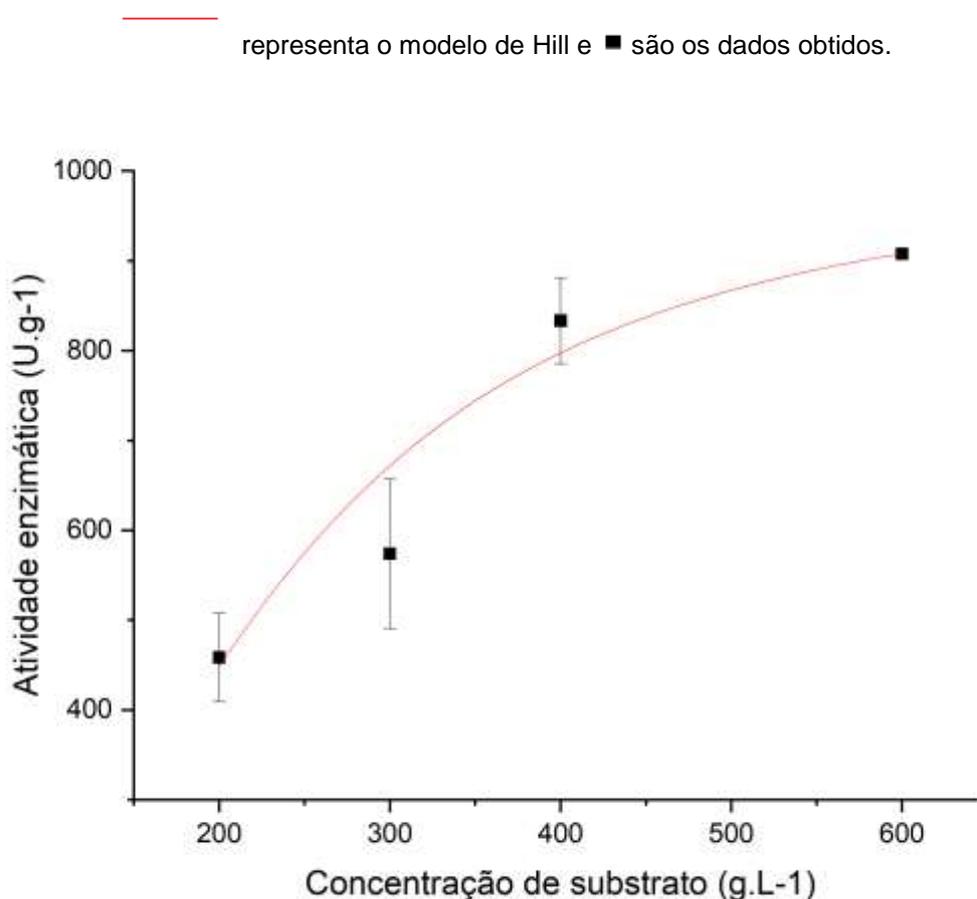
Fonte: Elaborado pelo autor

O valor de V<sub>máx</sub> e K<sub>m</sub> obtido é substancialmente maior que os valores relatados para a mesma enzima. Ribeiro (2022) relatou V<sub>máx</sub> de 13,07 ± 0,38 U.g<sup>-1</sup> e K<sub>m</sub> 132,11 ± 52,12 g.L<sup>-1</sup> para FTase reticulada com glutaraldeído e reação em reator PBR e Dias (2020) relatou V<sub>máx</sub> de 632,8 ± 78,2 U.g<sup>-1</sup> e K<sub>m</sub> de 632,8 ± 78,2 g.L<sup>-1</sup> para FTase livre e reação contínua em reator PBR.

O comportamento gráfico observado na figura 24 é semelhante ao comportamento obtido com o modelo de Michaelis-Menten. Para concentrações mais baixas de substratos, a reação comporta-se como modelo de primeira ordem, ao passo que o aumento da concentração de substrato acima de 400 g.L<sup>-1</sup> faz com que a reação exiba comportamento de ordem zero. Este fato também pode ser observado analisando o tópico 5.3, onde o aumento da vazão acima de 400 g.L<sup>-1</sup> não implica em aumento na atividade enzimática.

O modelo de Hill é amplamente utilizado na literatura para descrever enzimas alostéricas. Este tipo de enzima exibe formato de sigmoide de velocidade em função da concentração de substrato, diferente do formato hiperbólico exibido pelo modelo de Michaelis-Menten (MARQUES, 2008). O ajuste cinético realizado para o modelo de Hill são mostrados na figura 25 a seguir:

Figura 25 - Ajuste do modelo de Hill para obtenção dos dados cinéticos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O ajuste cinético ao modelo de Hill apresentou coeficiente de determinação de erros  $R^2$  de 98,04%, superando o coeficiente de determinação obtido pelo modelo de Michaelis-Menten, indicando que o modelo de Hill ajustou-se melhor aos dados. Gonçalves (2019) investigou a cinética enzimática para o mesmo biocatalisador em reação batelada e relatou um ajuste melhor do modelo de Hill aos dados cinéticos em comparação ao modelo de Michaelis-Menten. Gonçalves obteve  $K_m$  de  $132,11 \pm 52,12 \text{ g.L}^{-1}$ . O aumento do valor  $K_m$  ( $441 \pm 189 \text{ g.L}^{-1}$ ) obtidos para a FTase reticulada com glutaraldeído e encapsulada em gel de alginato operando em reator PBR indica que existe maior afinidade da enzima e substrato com o processo contínuo.

Os dados cinéticos obtidos com o modelo de Hill são apresentados na tabela 4 a seguir:

Tabela 4 - Dados cinéticos obtidos pelo modelo de Hill

Modelo	Hill
V <sub>máx</sub> (U.g <sup>-1</sup> )	998.52 ± 143
K <sub>0,5</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	218.73 ± 34
R <sup>2</sup>	0.9596
n	2.28 ± 1.30

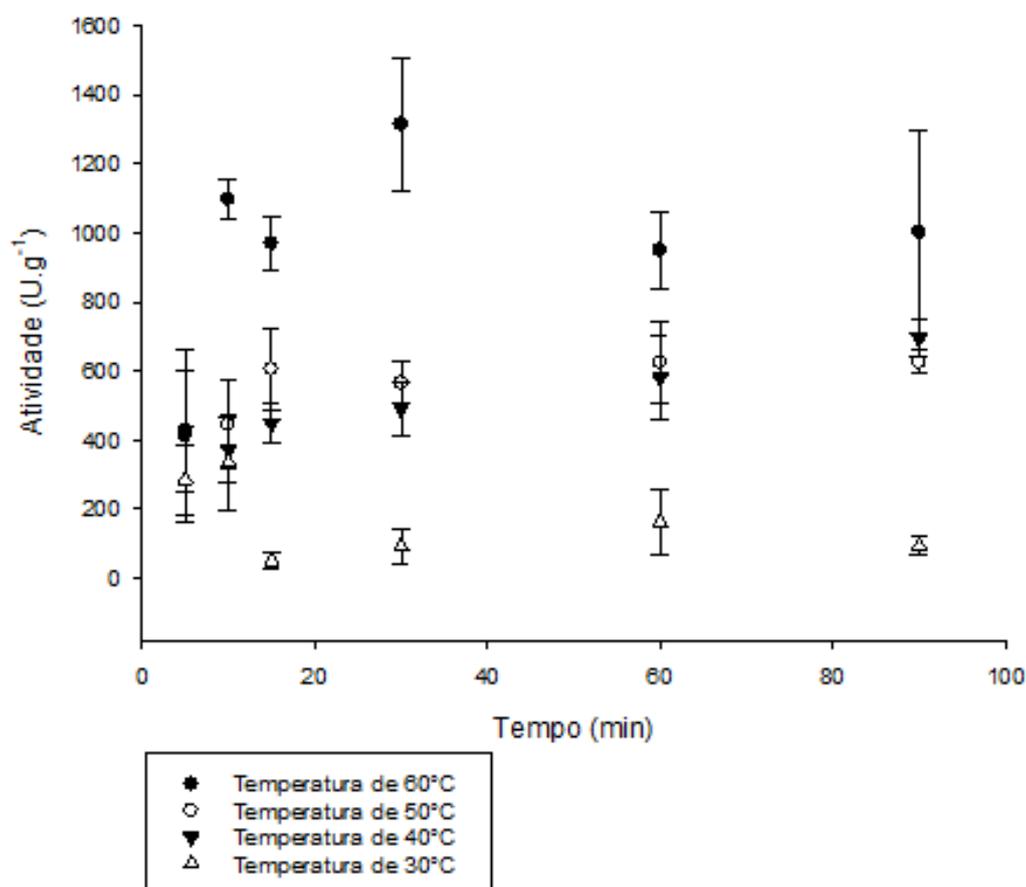
Fonte: Elaborado pelo autor

O valor de  $n > 1$  obtido com o modelo de Hill indica cooperação positiva entre os sítios ativos do complexo enzimático, o que significa que a ligação de um substrato a um sítio ativo aumenta a afinidade de outros sítios com o substrato e consequentemente, a atividade enzimática. (RODWELL *et al.* 2015).

## 5.5 ANÁLISE DOS EFEITOS DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os parâmetros operacionais utilizado nos ensaios de influência da temperatura na atividade enzimática foram os mesmos onde Gonçalves (2019) obteve as maiores atividades enzimáticas (concentração de substrato de 473 g.L<sup>-1</sup> e pH de 5,5). A vazão volumétrica utilizada foi de 1 ml.min<sup>-1</sup>, conforme a discussão do tópico 5.2.1. A figura 26 a seguir expressa o perfil cinético da atividade de transfrutossilacção obtido em função da temperatura.

Figura 26 - Perfis cinéticos da atividade de transfrutossilacção em função da temperatura



Fonte: Elaborado pelo autor

É possível observar com o perfil obtido na figura 26 que durante o estado estacionário a temperatura de 60 °C foi a que apresentou as maiores atividades enzimáticas, com valores variando entre  $1315 \pm 190 \text{ U.g}^{-1}$  e  $949 \pm 111 \text{ U.g}^{-1}$ , a partir dos 20 minutos de reação. Esse resultado corrobora com o trabalho de Gonçalves (2019), que obteve as maiores faixas de atividade enzimática entre 40 e 60 °C para o mesmo biocatalisador, em modo de operação batelada.

Ganaie *et al.* (2014 b) também relataram atividade de transfrutossilacção ( $A_T$ ) máxima com 60 °C para FTase aprisionada em gel de alginato. Os autores também relataram perda da atividade de transfrutossilacção para temperaturas maiores que 60°C, sugerindo possível deformação da matriz enzimática por conta da temperatura. Da mesma forma, Gonçalves (2019) também relatou perda de atividade enzimática com temperaturas maiores que 60°C para FTase reticulada com glutaraldeído e aprisionada em gel de alginato de cálcio.

A utilização da FTase reticulada com glutaraldeído e encapsulada com gel de alginato de cálcio em reator PBR apresentou maior estabilidade térmica quando comparado com a FTase livre e reticulada com glutaraldeído. Analisando o perfil obtido na figura 26, é possível observar que não houve queda de atividade de transfrutossilacção ao longo do tempo, mesmo para temperaturas mais altas. Ribeiro (2022) relatou decréscimo da atividade de transfrutossilacção para temperaturas entre 40 e 60 °C para FTase reticulada com glutaraldeído e operação em reator PBR. Cunha *et al.* (2017) e Dias (2020) relataram o mesmo comportamento para FTase livre, em operação batelada e continua, respectivamente.

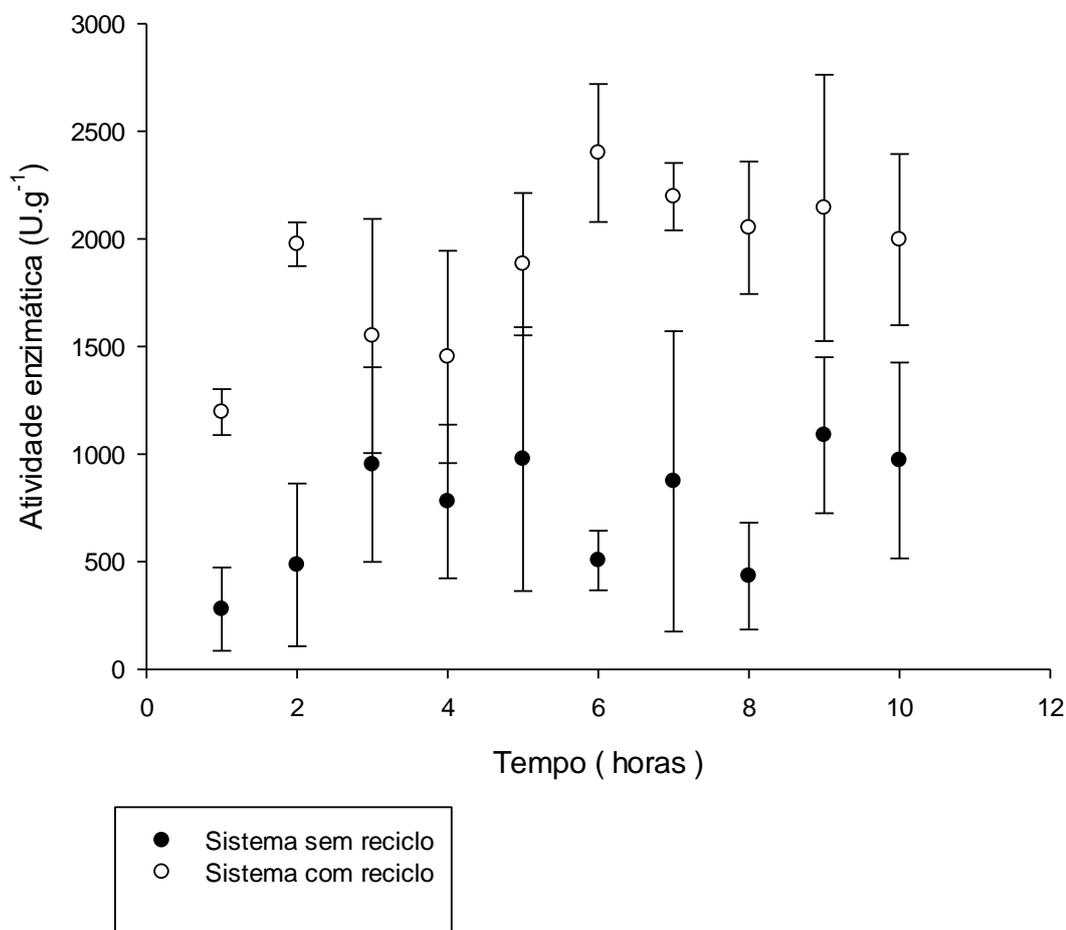
Embora a temperatura de 60°C tenha sido a que gerou maior atividade de transfrutossilacção ( $A_T$ ), a temperatura utilizada nos ensaios de estabilidade operacional foi 50°C. Gonçalves (2019) relatou em seu trabalho, utilizando a FTase reticulada com glutaraldeído e encapsulada em gel de alginato de cálcio para produção de FOS com operação em batelada, que embora a temperatura de 60 °C resulte nas maiores atividades enzimáticas, a temperatura de 50 °C foi a que exibiu menor atividade hidrolítica ( $A_H$ ), resultado em maiores razões  $A_T/A_H$ , favorecendo a produção de FOS.

## 5.6 ANÁLISE DA ESTABILIDADE OPERACIONAL DO PROCESSO

A maior vantagem da imobilização de enzimática na matriz de suporte é sua utilização por longos períodos durante o processo de produção industrial, sendo um fator significativo para diminuição dos custos de um processo (FOGLER,2012).

Para análise da estabilidade operacional da FTase reticulada com glutaraldeído e encapsulada com alginato de cálcio, a reação foi conduzida durante dez horas em um sistema operacional sem reciclo e outro com reciclo. Os parâmetros operacionais utilizados foram: vazão volumétrica de 1 ml.min<sup>-1</sup>, concentração de sacarose de 473 g.L<sup>-1</sup>, temperatura de 50 °C e pH de 5,5. A figura 27 a seguir expressa os resultados de estabilidade operacional obtidos para operação com e sem reciclo:

Figura 27 - Perfil de atividade de transfrutossilção ao longo de 10 horas de reação



Fonte: Elaborado pelo autor

É possível notar o aumento da atividade de transfrutossilção do regime operacional com reciclo comparado com sistema sem reciclo. O reciclo total faz com que exista a diminuição da concentração do substrato na corrente de entrada do reator enquanto eleva a concentração de produtos e subprodutos, o que explica o aumento de atividade para o sistema com reciclo.

O pico de atividade enzimática foi de  $2400 \pm 320$  U.g<sup>-1</sup>, obtido após 6 horas de reação, pelo regime operacional com reciclo. Sob o mesmo regime foi registrada atividade média de  $1960 \pm 360$  U.g<sup>-1</sup> das 2 as 10 horas de reação, sem apresentar sinais de diminuição da atividade. Já o regime operacional sem reciclo manteve atividade média de  $770 \pm 433$  U.g<sup>-1</sup>, expressivamente menor que o sistema com reciclo.

Prata (2020) sugere que o aumento da atividade de transfrutoseilação ao longo do tempo, observado no sistema com reciclo implica que os efeitos inibitórios do subproduto glicose foram sobrepostos pela conservação da atividade catalítica atribuída a encapsulação da FTase em gel de alginato. O aumento da atividade enzimática para reação com reciclo também foi observado pelos autores Dias (2020) e Ribeiro (2022).

A reação sem reciclo exibiu atividade enzimática constante ao longo das dez horas de reação, sendo assim, é possível concluir que a FTase reticulada com glutaraldeído e encapsulada em gel de alginato consegue reter atividade enzimática durante longos períodos de reação. Para a reação sem reciclo, a atividade média máxima de  $1087 \pm 362 \text{ U.g}^{-1}$  foi obtida com 9 horas de reação, evidência que a matriz enzimática pode conseguir manter a atividade enzimática por longos períodos.

Chien, Lee e Lin (1995) estudaram a estabilidade operacional para produção de FOS em reator de leito fixo, imobilizando as células íntegras de *Aspergillus japonicas* em gel de alginato e relataram atividade enzimática constante durante 35 dias de reação, utilizando vazão volumétrica de  $1 \text{ ml.min}^{-1}$  e temperatura de  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 5.7 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA

A obtenção do coeficiente de transferência de massa externa foi obtido conforme os procedimentos descritos no tópico 3.8. Os cálculos foram realizados considerando os seguintes parâmetros operacionais: vazão volumétrica de  $1 \text{ ml.min}^{-1}$ , temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , concentração de substrato na alimentação de  $473 \text{ g.L}^{-1}$  e pH de 5,5.

A tabela 5 a seguir apresenta os dados físico-químicos utilizados para obter o coeficiente de transferência de massa externa:

Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos para solvente água líquida e solução de sacarose 50 % m.m<sup>-1</sup>, a 50°C.

Propriedades físicas materiais	Água líquida	Solução Aquosa de sacarose (50% m.m <sup>-1</sup> )
MM (g.mol <sup>-1</sup> )	18,01	342,3
$\rho$ (kg.m <sup>-3</sup> )	988,1	1214,5
$\mu$ (cP)	0,5494	6,18
$v$ (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$5,6 \times 10^{-7}$	$5,1 \times 10^{-6}$

Fonte: Adaptada de MATHLOUTH e REISER (1995, p. 200 - 217).

O número adimensional de Reynolds de partícula ( $Re_p$ ), Schmitd, Sherwood e difusividade  $D_{AB}$  obtidos para cálculo do coeficiente de transferência de massa  $K_s$  são apresentados na tabela 6 a seguir:

Tabela 6 - Números adimensionais de Reynolds, Schmitd, Sherwood e difusividade

Propriedade	Valor
Reynolds de partícula	0,072
Schmitd	$4,261 \times 10^3$
Sherwood	4,22
$D_{AB}$ (m <sup>2</sup> .seg <sup>-1</sup> )	$1,76 \times 10^{-9}$
$K_c$ (m.s <sup>-1</sup> )	$1.84 \times 10^{-11}$ m.s <sup>-1</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor

O valor obtido para Reynolds de partícula indica que a operação no reator PBR ocorreu em regime laminar. Dias (2020) obteve o valor de  $Re_p$  de 0,59 sob condições semelhantes em reator PBR, utilizando células íntegras livres de *Aspergillus Oryzae* IPT 301 como catalisador heterogêneo.

O número adimensional de Schmitd é definido como a razão do momento de difusividade, relacionado a viscosidade, e a difusividade de massa, que funciona como uma aproximação relativa da razão da camada hidrodinâmica e a camada limite de transferência de massa. Por tanto, o valor 1 para  $Sc$  significa equiparidade das espessuras da camada hidrodinâmica e da camada limite de transferência de massa. O valor obtido de  $Sc$  de  $4,261 \times 10^3$  expõe grande predominância do momento de

viscosidade sob o transporte de massa. Prata (2021) e Dias (2020) utilizando os mesmos parâmetros reacionais com diferentes biocatalisadores e obtiveram valores expressivos para  $Sc$  de  $4,43 \times 10^4$ ,  $6,64 \times 10^6$  e  $6,6 \times 10^6$ , respectivamente.

O número adimensional de Sherwood representado pela equação (10) é análogo ao número de Nusselt para transferência de massa e representa a razão entre a transferência de massa convectiva e difusiva, sendo que um valor 1 resulta na igualdade entre os dois fenômenos. O valor obtido de 4,22 significa que efeitos convectivos são mais significativas que efeitos difusivos no regime reacional. O aumento da vazão proporciona a diminuição da camada hidrodinâmica ao redor das esferas de alginato, diminuindo a resistência à transferência de massa convectiva e favorece o aumento da atividade de transfrutificação (FOGLER, 2012; PRATA, 2020).

Com parâmetros reacionais semelhantes, Dias (2020) obteve um valor de 88 para o número de Scherwood enquanto Prata (2021) e obtiveram valores de 2,82 e 118,027 respectivamente. Todos os regimes com dominância da transferência de massa convectiva.

Para o cálculo do coeficiente de transporte de massa externo é preciso primeiro validar a equação (9) verificando se a solução de sacarose possui comportamento semelhante a uma solução ideal (PEACOCK; STARZAKE, 1997). Starzake e Peacock (1997) demonstrou em seus estudos que uma solução com teor de substância seca de sacarose (TS) entre 37 e 50% podem ser consideradas ideais.

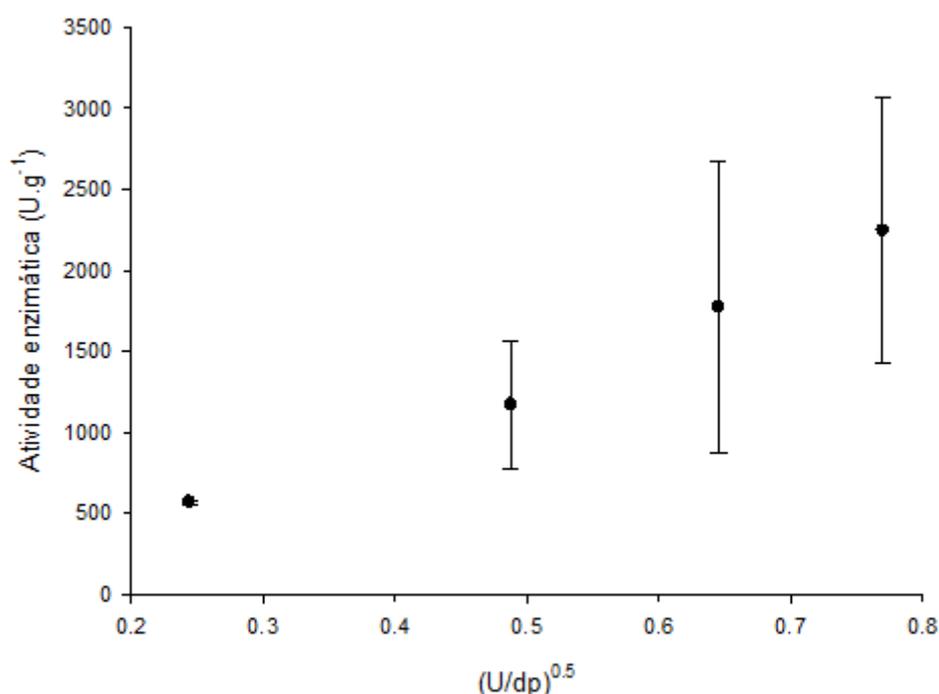
Para solução de sacarose de estudo de  $473 \text{ g.L}^{-1}$  e os dados da tabela 5, foi possível calcular a fração molar da solução de sacarose, que segundo dados da literatura, correspondem a TS de aproximadamente 30% e validando a equação (9). Dias (2020) encontrou valor de TS de 37%, valor próximo ao obtido neste trabalho.

Com os dados obtidos na tabela 5 e utilizando a equação (9), é possível calcular o valor do coeficiente de transporte de massa externo  $K_s$  ( $\text{m.s}^{-1}$ ):

O valor obtido de  $K_s$  foi de  $1.84 \cdot 10^{-11} \text{ m. s}^{-1}$ . Fogler (2012) afirma que para analisar se há limitação da reação pela transferência de massa externa, é necessário comparar  $K_s$  com a constante de reação de Arrhenius ( $K$ ). No entanto, não foi possível comparar os parâmetros cinéticos obtidos pela equação de Michaelis-Menten com a constante de Arrhenius, visto que o modelo não pode ser aproximado como modelo de primeira ordem ou ordem zero. Neste caso, a análise do TME foi realizada graficamente,

utilizando o procedimento apresentado na figura 5. Os resultados obtidos são demonstrados na figura 28 a seguir:

Figura 28 - Atividade enzimática em função da variação da velocidade do fluido e tamanho da partícula catalítica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico apresentado na figura 28 foi construído utilizando a atividade enzimática obtida aos 20 minutos, em estado estacionário, para as vazões volumétricas de 1,4,7 e 10  $ml \cdot min^{-1}$ . O perfil obtido na figura 28 é de crescimento linear, o que configura limitação da velocidade de reação pelo transporte externo de massa para vazões entre 1 e 10  $ml \cdot min^{-1}$ . Seria necessário testar vazões acima de 10  $ml \cdot min^{-1}$  para observar o momento em que o perfil de atividade enzimática em função de  $(U/dp)^{0.5}$  apresenta comportamento linear, configurando limitação da reação pela própria reação química. No entanto, ensaios com vazões acima de 10  $ml \cdot min^{-1}$  não foram possíveis devido ao arraste do leito catalítico pelo fluxo de substrato.

Destaca-se que mesmo operando o reator em faixas de vazões volumétricas onde existe a limitação da reação pelo transporte de massa externa, a FTase reticulada com glutaraldeído e encapsulada com gel de alginato de cálcio exibiu

atividades de transfrutoseilação muito elevada e apresentou boa estabilidade térmica e operacional sob o regime TME, mostrando-se eficaz para proteger a enzima dos efeitos de lixiviação e possibilita a manutenção da atividade de transfrutoseilação ( $A_T$ ) durante grandes períodos.

## 6 CONCLUSÃO

Com os estudos realizados foi possível constatar um grande potencial do uso da FTase micelial obtida com o cultivo submerso de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 reticulada com glutaraldeído e encapsulada com gel de alginato de cálcio utilizada em reator contínuo PBR para produção de frutooligossacarídeos, apresentando boa estabilidade operacional e altas atividades de transfrutossilção.

Mesmo com a modificação da proporção das células íntegras (aproximadamente 24% no trabalho de Gonçalves (2019) para 12% no presente trabalho) foi possível obter alta atividade enzimática em reator contínuo PBR. Foi possível atingir a atividade média de  $2246 \pm 823 \text{ U.g}^{-1}$  ao atingir o estado estacionário para vazão de  $10 \text{ ml.min}^{-1}$  enquanto Gonçalves atingiu atividade média máxima de  $1828 \pm 166 \text{ U.g}^{-1}$  sob condições reacionais semelhantes, em modo de operação batelada.

O uso de esferas de alginato contendo células íntegras reticuladas com glutaraldeído favoreceu o surgimento de caminhos preferenciais e volumes mortos, principalmente devido ao diminuição do volume das esferas com a passagem do fluxo reacional. Também foi possível observar grande arraste das esferas de alginato com a passagem do fluxo ascendente, sendo necessário a diminuição do leito catalítico para 25% do volume do reator e a utilização de esferas de vidro tanto acima quanto abaixo do leito para evitar o arraste de esferas de alginato de cálcio e entupimento na corrente de saída do reator.

Quanto a vazão, foi possível observar a obtenção do estado estacionário foi obtido aos 20 minutos de reação para todas as vazões testadas, sugerindo boa adaptação do leito catalítico e diminuição expressiva do tempo de necessário para obtenção do estado estacionário, comparado a outros autores.

A temperatura que exibiu maior atividade enzimática ( $1315 \pm 190 \text{ U.g}^{-1}$ ) foi a de  $60^\circ\text{C}$  aos 25 minutos de reação. Foi possível manter a atividade média de  $949 \pm 111 \text{ U.g}^{-1}$  durante os 90 minutos de reação, média superior à obtida para  $50^\circ\text{C}$  ( $604,8 \pm 82 \text{ U.g}^{-1}$ ), indicando boa estabilidade térmica do biocatalisador durante todo o período de reação, mesmo para temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , ponto em que outros autores relataram diminuição expressiva da atividade enzimática.

A concentração de substrato que obteve maior atividade enzimática ( $1277 \pm 246 \text{ U.g}^{-1}$ ) foi a de  $400 \text{ g.L}^{-1}$  obtida aos 30 minutos de reação. A atividade enzimática exibiu perfil crescente com o aumento da concentração de substrato até  $400 \text{ g.L}^{-1}$ . Acima deste valor a atividade enzimática diminuiu, o que sugere saturação dos sítios ativos do complexo enzimático. Com os resultados obtidos para análise da concentração do substrato na atividade de transfrutoseilação foi possível avaliar os parâmetros cinéticos. O modelo de Hill foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais, exibindo valor de  $n = 2.28 \pm 1.30$ , indicando cooperação positiva entre o sítio ativo e substrato. O perfil de atividade enzimática em função da concentração do substrato apresentou formato de sigmoide, característico de enzimas alostéricas.

A análise gráfica da atividade de transfrutoseilação em função da velocidade do substrato na corrente de entrada e do diâmetro de partícula permitiu observar que para as vazões estudadas de  $1$  a  $10 \text{ ml.min}^{-1}$ , o gráfico exibe comportamento linear, o que indica limitação da reação pelo transporte de massa externo. É necessário o estudo da reação em vazões maiores para verificar o momento em que o gráfico se torna constante, caracterizando limitação pela reação química. A constante de transferência de massa  $K_c$  obtido ( $1.84 \cdot 10^{-11} \text{ m.s}^{-1}$ ) é muito pequeno, sugerindo lentidão para troca de massa externo ao substrato, comprovando a limitação da reação pelo transporte de massa externo.

A estabilidade operacional das esferas de alginato de cálcio contendo a FTase reticulada com glutaraldeído foi satisfatória tanto para o sistema sem reciclo quanto para o sistema com reciclo. Após 10 horas de reação, o sistema reacional sem reciclo exibiu 100% da atividade enzimática, enquanto a reação com reciclo exibiu atividade máxima equivalente a 300% da atividade enzimática sem reciclo, evidenciando a excelente estabilidade operacional do biocatalisador.

Por fim, o preenchimento do leito catalítico do reator PBR com as células íntegras de *Aspergillus oryzae* IPT-301 reticuladas com glutaraldeído e encapsuladas com gel de alginato de cálcio apresentaram altas atividades de transfrutoseilação no reator PBR, além de estabilidade térmica e operacional, provando-se um biocatalisador promissor para suprir as necessidades de produção contínua de frutooligossacarídeos (FOS).

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com os resultados obtidos com o presente trabalho, propõe-se as seguintes sugestões para continuação do trabalho:

- a) Implementar o mesmo sistema reacional com um reator PBR com maior resistência a passagem de fluxo com leito totalmente preenchido e massa ( $w$ ) de biocatalisador maior, para que seja possível minimizar os efeitos de deformação do leito catalítico.
- b) Realizar ensaios para vazões acima de  $10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  para verificar se a reação deixa de ser limitada pelo transporte de massa (TME) sob vazões volumétricas altas.
- c) Verificar a estabilidade operacional do biocatalisador para períodos reacionais acima de 10 horas.
- d) Estudar se existe inibição enzimática com o sistema reacional proposto.
- e) Quantificar a produtividade de FOS com os parâmetros reacionais que exibiram maiores atividades de transfrutoseilação neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- GUIAR, E.; MAUGERI, F. Effects of the addition of substrate and salts in both the fructosyltransferase immobilization and its catalytic properties. **Journal Food Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 520-527, 2012.
- ALLEN, L. *et al.* Edible corn-carbohydrate food coatings: Development and physical testing of a starch-alginate coating. **Food Technology**, v.17, p.1437, 1963.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New Delhi: McGraw-Hill Kogakusha, Ltd. 1977.
- BALI, V., PANESAR, P. S., BERA, M. B., & PANESAR, R. Fructo-oligosaccharides: Production, Purification and Potential Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1475–1490, 2015. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.694084>.
- BENKEBLIA, N. Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 55–57, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.013>.
- BOBBIO, F. O; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.
- BOTTS, J.; MORALES, M. Analytical description of the effects of modifiers and of enzyme multivalency upon the steady state catalyzed reaction rate. **Transactions of the Faraday Society**. London, v. 49, p. 696-707, 1953. <http://dx.doi.org/10.1039/tf9534900696>.
- BRUNARI, N. C.; SOUZA, B. M. S. Bactérias probióticas e sua aplicação em leites fermentados. **Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP**, v. 1, n. 1, p. 22-29, 2017.
- CABRAL, B. V. Hidrólise de Sacarose por Invertase Imobilizada em Duolite A-568 por Adsorção e Ligação Cruzada. **Sistema de Bibliotecas Da UFU**, MG - Brasil, 2012. 115 p. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15184/1/d.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2023.
- CACURO, T. A. **Compósitos de Alginato como Material Inteligente, Modulação de Solubilidade e Objeto de Ensino**. Orientador: Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman. 2019. Tese (Doutorado) - UFSCAR, Sorocaba, 2019.
- CAO, L.; LANGEN, L. V.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, n. 4, p. 387-394, 2003. CASTRO, C.C. *et al.* Screening and selection of potential carriers to

immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p.82-90, fev. 2017.

CHEN, W. C., & LIU, C. H. Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 2, p. 153–160, 1996. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00099-2)

CHIEN, C. S; LEE, W.C; LIN, T.J. Immobilization of *A. japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme Microbiology Technology**, v.29. p.252-257, 2001.

COIMBRA, C. G. O. **Produção de Fruto-oligossacarídeos e Aspectos da Biosseparação das Frações Leves de Levana Hidrolisada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. <https://doi.org/10.5004/dwt.2011.2038>

CRUZ, R., CRUZ, V. D., BELENI, M. Z., BELOTE, J. G., & VIEIRA, C. R. Production of fructo oligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. **Bioresource Technology**, v. 65, n. 1–2, p. 139–143, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00005-4)

CUNHA, J. S. *et al.*. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus Oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 657-668, 2019.

DAL MASSO, S. S. S. **Produção de Frutosiltransferase e  $\beta$ -Frutofuranosidase por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em Cultivo Submerso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

DELBIANCO, J. V. T., DE OLIVEIRA, L. F. M. C., BOAS, L. V., & NOVAZZI, L. F. Análise e otimização das condições operacionais de um reator de leito fixo na síntese de Fischer-Tropsch. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 2, 2017. <https://doi.org/10.18540/2446941603022017281>.

DETOFOL, M. R., OLIVEIRA, E. A., VARGAS, C. E. B., SOARES, A. B. J., SOARES, M. B. A., & MAUGERI, F. Modeling and simulation of fructooligosaccharides synthesis in a batch basket reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 44–51, 2015.

--

DIAS, Giancarlo. **Implementação de reator de leito fixo empacotado com biomassa catalítica de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 para a produção de frutooligossacarídeos**. Orientador: Rafael Firmani Perna. 2020. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2020.

DOMINGUEZ, A. L.; RODRIGUES, L. R.; LIMA, N. M.; TEIXEIRA, J. A. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 2, p. 324-337, 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1221-6>. Acesso em: 15 fev. 2023.

DONATI, I. *et al.*. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 1031-1040, 2005.

FARIA, L. L. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 em sílica-gel para produção de frutooligossacarídeos**. Poços de Caldas, 2019.

FEKETY, R.; SHAH, A. B. **Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis**. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 289, p. 71-75, 1993.

FERNANDEZ-ARROJO, L. *et al.*. Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 677-682, 2013.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. *et al.*. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 517-523, 1995.

FERREIRA, I. E. P.; TRINCA, L. A.; FERREIRA, C. P. Delineamentos experimentais eficientes para estudos de cinética química. **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 589-596, 2014. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140102>.

FOGLER, H. S. Elementos da engenharia das reações químicas. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

FROMENT, G. **Fixed bed catalytic reactors**. Vol. 19. AH) 4 U dz'. UTC, 2021. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

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

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

GANAIÉ, M. A.; LATEEF, A.; GUPTA, U. S. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 172, p. 2143-2159, 2014a.

GARCIA, R.; DIAS, G.; MORALES, S.; XAVIER, M.; SABINO, E.; MAIORANO, A.; TARDIOLI, P.; PERNA, R. Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus Oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, 2021. <https://doi.org/10.1007/s43153-021-00110-9>.

- HEIDTMANN, R. B., Duarte, S. H., Pereira, L. P., & Graga, A. R. C. (2012). Caracterização cinética e termodinâmica de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio Kinetics and thermodynamic characterization of  $\beta$ -galactosidase from. **Brazilian Journal of Food Technology**, **15(1)**, 41–49.
- HIDAKA, H., Hirayama, M., & Sumi, N. (1988). A Fructooligosaccharide-producing Enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, **52(5)**, 1181–1187.
- HONG, S. I., Ma, N. D. S., Choi, N., Baik, J. Y., Kim, C. T., Kim, Y., Chang, E., & Kim, I. H. (2014). Enrichment of DHA from tuna oil in a packed bed reactor via lipase-catalyzed esterification. *JAOCs*, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, **91(11)**, 1877–1884. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2536-9>.
- JUNG, K. H., Kim, M. J., Kim, Y. S., Seo, J. H., & Park, C. S. (2011). Industrial production of fructooligosaccharides by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* in a packed bed reactor. **Biotechnology Letters**, **33(8)**, 1621–1624. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0614-4>.
- JUNIOR, A. C. B., & Cruz, A. J. G. (2012). Reatores Químicos e Bioquímicos: um texto introdutório. São Carlos.
- KAENPANAO, P., & Jaturapiree, P. (2016). Prebiotic fructooligosaccharide production from yeast strain ML1. **International Food Research Journal**, **23(1)**, 425–428.
- KAMIMURA, E. S., Monteiro, M. R., Zanin, G. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2009). Immobilization of fructosyltransferase from *Pichia pastoris* in blend of alginate and gelatin. **New Biotechnology**, **25**, S149.
- KASHYAP, R., Palai, T., & Bhattacharya, P. K. (2015). Kinetics and model development for enzymatic synthesis of fructo-oligosaccharides using fructosyltransferase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, **38(12)**, 2417–2426. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1478-4>.
- KUHN, R. C., Palacio, L., Prádanos, P., Hernández, A., & Filho, F. M. (2011). Selection of membranes for purification of fructooligosaccharides. *Desalination and Water Treatment*, **27(1–3)**, 18–24. <https://doi.org/10.5004/dwt.2011.2038>Levenspiel, O. **Engenharia das reações químicas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2000.
- LORENZONI, A. S. G., Aydos, L. F., Klein, M. P., Ayub, M. A. Z., Rodrigues, R. C., & Hertz, P. F. (2015). 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**, **111**, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.11.002>.

MAGASSY, T. B., Fagundes, J. V. C., Araújo, A. S., & De Oliveira NETTO, A. P. (2017). Utilização da bucha vegetal de curcubitácea como material suporte em reator anaeróbio de leito fixo. In **Brazilian Journal of Biosystems Engineering v** (Vol. 11, Issue 2).

MARQUES, R.B.O.; Yamanaka, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, p. 1791-1799, 2008.

Marzzoco, Anitta; TORRES, Bayardo Baptista. **Bioquímica básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 356 p. v. 1.

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

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

MATHLOUTH, M.; Reiser, P. **Sucrose: Properties and Applications**. Boston: Springer, 1995.

MCFARLAND, L. V, and Bemasconi, P. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. **Microb Eco Health Dis**. v.6: 157-171, 1993.

MERENSTEIN, D. Salminen, S. **World Gastroenterology Organisation Practice Guideline** – probióticos e prebióticos, 2017.

MUTANDA, T. *et al.* Microbial enzymatic production and applications of short-chain perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p.893– 906, 2014

NOBRE, C. *et al.* Production of fructo-oligosaccharides by *Aspergillus ibericus* and their chemical characterization. **LWT -Food Science and Technology**, v. 89, p. 58–64, 2018

OLIVEIRA, L. G. de, & Mantovani, S. M. (2009). Transformações biológicas: Contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, p.742–756.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300018>

OTTONI, C. A. *et al.* Media Optimization for  $\beta$ -Fructofuranosidase production by *Aspergillus Oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 49–59, 2012

OTTONI, C. A., Cuervo-fernández, R., Piccoli, R. M., Moreira, R., Guilarte-Maresma, B., da Silva, E. S., Rodrigues, M. F. A., & Maiorano, A. E. (2012). Media optimization for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus Oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 29(1), 49–59.  
<https://doi.org/10.1590/S0104-66322012000100006>

PACHECO, Laís. **Obtenção e caracterização de uma matriz polimérica a base de alginato com diferentes agentes reticulantes**. 2016. Dissertação (Mestrado em engenharia de materiais) - UENF, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://uenf.br/posgraduacao/engenharia-de-materiais/wp-content/uploads/sites/2/2013/07/Dissertação-Laíssa-R-E-Pacheco.pdf>. Acesso em: 8 dez. 2022.

PASCHOALIM, S.A.C. **Contribuição ao estudo da hidrólise enzimática da sacarose por células de *Saccharomyces cerevisiae*** (levedura de panificação). São Paulo, 1990. 67p. Dissertação (Mestrado em engenharia química) - Escola Politécnica - Universidade de São Paulo.

PASSOS, L. M. L., & PARK, Y. K. (2003). Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural*, v.33, n.2, p.385–390. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782003000200034>

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

PRADO, Silvia *et al.* **Enzimas: Uma senhora biomolécula**. 1. ed. Paraná: UFPR, 2019. 82 p. v. 1.

PRATA, M. G. (2020). **Implementação de reator de leito fixo recheado com biomassa microbiana encapsulada em alginato para a produção de frutooligossacarídeos**. Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna. 2019. 103 p. Dissertação (Mestrado) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, POÇOS DE CALDAS-MG, 2020.

Renuka, B., Kulkarni, S. G., Vijayanand, P, and Prapulla, S. G. (2009). Frutooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: Effect on the quality characteristics. *LWT - Food Sci Technol*. V.42, n.5, p. 1031-1033.

RICO, A. (N.D.). **Produção enzimática de biodiesel etílico em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano**. Lorena/SP 2015.

Rodwell, V. W. *et al.* Harper's illustrated biochemistry. Nova Iorque: **McGraw-Hill Education** / Medical, 2015.

SIMON, P. M. **Pharmaceutical oligosaccharides**. *DDT*, v.1, n.12, p.522-528, 1996.

SKORONSKI, E., Fernandes, M., Júnior, A. F., Soares, C. H. L., & João, J. J. (2014). Imobilização de lacase de *aspergillus* sp. em quitosana e sua aplicação na bioconversão de fenóis em reatores de leito fixo. *Química Nova*, 37(2), 215–220. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140037>

TOSHIAKI, K. (1995) **Fructooligosaccharides**. In: Oligosaccharides: Production, Properties and Applications. Vol. 3, No. 2, ed. T. Nakakuki. Gordon and Breach Science Publishers, Shizuoka, Japan, p.50-78.

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

WALSH, C.; NATURE 2001, 409, 226; NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER: Principles of Biochemistry, 3rd ed., Worth Publishers: New York, 2000; Campbell, M. K.; **Biochemistry**, 2nd ed., Saunders College Publication, 1995.

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

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.

YOUNESI E, Ayseli MT. An integrated systems-based model for substantiation of health claims in functional food development. **Trends Food Sci Technol**. 2015; 41(1): 95–100.

ZAMBELLI, P.*et al.* An efficient continuous flow process for the synthesis of a non-conventional mixture of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 190, p.607-613, jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.002>, acesso em 22 de mar. De 2020.

## APÊNDICE A - TESTE TUKEY DE COPARAÇÃO DE MÉDIAS

Tabela A 1 - p valor obtido com teste tukey para vazão de 1ml.min<sup>-1</sup>.

	5	10	20	30	60	90	120	150	180
5		1	0.7367	0.7765	0.3721	0.04362	0.4201	0.1154	0.006331
10	0.3007		0.8453	0.8762	0.4888	0.06595	0.5425	0.1678	0.009831
20	2.411	2.11		1	0.9991	0.641	0.9997	0.9001	0.1773
30	2.308	2.007	0.1031		0.9981	0.597	0.9993	0.8724	0.1565
60	3.303	3.002	0.8921	0.9951		0.9368	1	0.9976	0.4533
90	5.054	4.753	2.643	2.746	1.751		0.9095	0.9998	0.9864
120	3.175	2.874	0.7636	0.8666	0.1285	1.879		0.9948	0.4033
150	4.329	4.028	1.918	2.021	1.026	0.7248	1.154		0.8595
180	6.393	6.092	3.982	4.085	3.09	1.34	3.219	2.064	

Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software PAST

Tabela A 2 - p valor obtido com teste tukey para vazão de 4 ml.min<sup>-1</sup>.

	5	10	20	30	60	90	120	150	180
5		1	0.9997	1	0.9993	1	1	1	1
10	0.4322		0.9929	0.9996	1	0.9999	0.9999	0.9991	1
20	0.777	1.209		1	0.9562	1	1	1	0.9981
30	0.3634	0.7955	0.4136		0.9924	1	1	1	1
60	0.8572	0.425	1.634	1.221		0.9967	0.9963	0.9875	0.9999
90	0.2208	0.653	0.5562	0.1426	1.078		1	1	1
120	0.2391	0.6712	0.538	0.1243	1.096	0.01825		1	1
150	0.464	0.8961	0.3131	0.1006	1.321	0.2432	0.2249		0.9999
180	0.2154	0.2168	0.9924	0.5788	0.6418	0.4362	0.4544	0.6794	

Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software PAST

Tabela A 3 - p valor obtido com teste tukey para vazão de 7 ml.min<sup>-1</sup>.

	5	10	20	30	60	90	120	150	180
5		0.9989	0.9999	1	0.9987	0.9877	0.9987	0.9999	0.9985
10	0.8782		0.9653	1	0.9223	0.8254	0.9218	1	1
20	0.6359	1.514		0.996	1	0.9999	1	0.9886	0.9608
30	0.4208	0.4574	1.057		0.9842	0.9398	0.984	1	1
60	0.897	1.775	0.261	1.318		1	1	0.966	0.9147
90	1.263	2.141	0.6272	1.684	0.3661		1	0.9	0.8141
120	0.8991	1.777	0.2631	1.32	0.00209	0.364		0.9658	0.9142
150	0.6115	0.2667	1.247	0.1907	1.509	1.875	1.511		1
180	0.9137	0.03544	1.55	0.4929	1.811	2.177	1.813	0.3021	

Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software PAST

Tabela A 4 - p valor obtido com teste tukey para vazão de 7 ml.min<sup>-1</sup>

	5	10	20	30	60	90	120	150	180
5		1	0.9999	0.9265	1	0.9743	1	1	1
10	0.2158		1	0.9622	1	0.9901	1	1	1
20	0.5833	0.3675		0.9923	1	0.9991	0.9999	1	1
30	1.754	1.538	1.171		0.9857	1	0.9115	0.9458	0.9716
60	0.4583	0.2425	0.125	1.296		0.9976	1	1	1
90	1.434	1.218	0.8509	0.32	0.9759		0.9664	0.9834	0.9935
120	0.07088	0.2867	0.6542	1.825	0.5292	1.505		1	1
150	0.105	0.1108	0.4784	1.649	0.3534	1.329	0.1759		1
180	0.2941	0.07835	0.2892	1.46	0.1642	1.14	0.365	0.1892	

Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software PAST