

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MATEUS GALVÃO PRATA

**IMPLEMENTAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO RECHEADO COM
BIOMASSA MICROBIANA ENCAPSULADA EM ALGINATO PARA A PRODUÇÃO
DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Poços de Calda - MG

2020

MATEUS GALVÃO PRATA

IMPLEMENTAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO RECHEADO COM
BIOMASSA MICROBIANA ENCAPSULADA EM ALGINATO PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

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

Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna
Coorientador: Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Poços de Caldas – MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

Prata, Mateus Galvão.
P912i Implementação de reator de leito fixo recheado com biomassa
microbiana encapsulada em alginato para a produção de
frutooligossacarídeos / Mateus Galvão Prata. – Poços de Caldas/MG,
2020.

102 f. –

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade
Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2020.
Bibliografia.

1. Enzimas microbianas. 2. Cinética enzimática. 3. Massa –
Transferência. 4. *Aspergillus oryzae*. 5. Alginatos. I. Perna, Rafael
Firmani. II. Título.

CDD – 660.2

**IMPLEMENTAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO RECHEADO COM BIOMASSA MICROBIANA
ENCAPSULADA EM ALGINATO PARA A PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

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

Aprovada em: 08 de maio de 2020.

Prof. Dr. Rafel Firmani Perna

Instituição: Universidade Federal de Alfnas

Profa. Dra. Michelle da Cunha Abreu Xavier

Instituição: Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales

Instituição: Universidade Federal de Alfnas



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior**, em 08/05/2020, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michelle da Cunha Abreu Xavier, Usuário Externo**, em 08/05/2020, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Andres Villalba Morales, Professor do Magistério Superior**, em 08/05/2020, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0295708** e o código CRC **5BF5DD01**.

*Dedico a Deus, a minha família
e a todos que participaram
dessa conquista.*

AGRADECIMENTOS

Quero expressar aqui meu agradecimento ao Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade e apoio concedidos à realização deste trabalho. Agradeço especialmente o trabalho e a atenção dos funcionários da secretaria do PPGEQ e do laboratório.

Aos professores e orientadores de mestrado, Dr. Rafael Firmani Perna e Dr. Theo Guenter Kieckbusch, por terem percorrido junto comigo parte importante desse longo caminho. Seus incentivos e amizade serão sempre lembrados.

Aos colegas do grupo de trabalho e aos companheiros de pós-graduação.

Aos professores Dr. Sérgio Morales e Dra. Melina Savioli pelo valioso exame de qualificação.

Aos meus de casa, dedico um agradecimento profundamente especial, pelo apoio incondicional e formação humana, Alencar e Maria Consuelo e aos meus irmãos Pedro e Bel, assim como a toda minha família por ter sempre me apoiado.

A minha namorada, Letícia, que me trouxe conforto e apoio nas horas mais difíceis, sempre me incentivando a prosseguir.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

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

RESUMO

Frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de cadeia curta, constituídos por polímeros de frutose ligados à sacarose. Os FOS são classificados como prebióticos devido aos excelentes benefícios fisiológicos ocasionados pela sua ingestão regular. Os resultados promissores alcançados pela aplicação de frutossiltransferases (FTase) procedentes do fungo *Aspergillus oryzae* micelial imobilizado em matriz de alginato de cálcio na produção de FOS em regime batelada, subsidiam a transposição do processo para o regime de fluxo contínuo. Diante disso, este trabalho propôs a implementação de um reator de leito fixo (PBR) enzimático aplicado na produção de FOS via reação de transfrutossilidação. A influência da temperatura e da vazão na atividade enzimática foi investigada por meio de delineamento composto central rotacional com triplicata no ponto central. Foi realizado, ainda, o estudo dos efeitos da concentração de substrato e da vazão volumétrica de alimentação na atividade do biocatalisador e obtidos os parâmetros cinéticos da reação enzimática. Os parâmetros de transferência de massa foram estimados e avaliou-se a estabilidade operacional do processo na ausência e presença de reciclo. As superfícies de resposta e curvas de contorno foram construídas e obteve-se, como os melhores parâmetros operacionais, a reação conduzida a 50°C, com o reator alimentado com solução de sacarose 400g.L⁻¹ a uma vazão de 7,5mL.min⁻¹. A respeito da cinética enzimática, os dados experimentais foram ajustados pelo modelo cooperativo de Hill, indicando afinidade positiva entre enzima e substrato. O coeficiente de transferência de massa externo ($k_c = 1,0 \times 10^{-2} m \cdot s^{-1}$) e o fator efetividade ($\eta_m = 0,974$), calculado para a transferência de massa interna à partícula, comprovaram a baixa limitação imposta pelas etapas de transporte mássico à taxa de desenvolvimento da reação. O estudo da estabilidade operacional indicou retenção de 96 % da atividade enzimática após 12h de processo. Portanto, pode-se concluir que a implementação de reator PBR, recheado com biocatalisador encapsulado em gel de alginato de cálcio, mostrou-se promissora para a aplicação na produção enzimática de FOS.

Palavras-Chave: Frutooligossacarídeos. Frutossiltransferase. *Aspergillus oryzae*. Imobilização. Encapsulação. Alginato. Reator de leito fixo.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are short chain oligomers, consisting of fructose polymers linked to sucrose. FOS are classified as prebiotics due to the excellent physiological benefits caused by their regular intake. The promising results achieved by the application of fructosyltransferases (FTase) from the mycelial fungus *Aspergillus oryzae* immobilized in a calcium alginate matrix in the production of FOS in a batch regime, support the transposition of the process to the continuous flow regime. Therefore, this work proposed the implementation of an enzymatic fixed bed reactor (PBR) applied in the production of FOS via transfructosylation reaction. The combined influence of temperature and flow on enzymatic activity was investigated by means of a central rotational composite design with triplicate at the central point. The effects of the substrate concentration and the volumetric flow rate on the activities of the biocatalyst were also studied and the kinetic parameters of the enzymatic reaction were obtained. The mass transfer parameters were estimated and the operational stability of the process was evaluated in the absence and presence of recycle. The response surfaces and contour curves were constructed and the reaction conducted at 50°C was obtained as the best operational parameters, with the reactor fed with sucrose solution 400g.L⁻¹ at a flow rate of 7.5mL.min⁻¹. Regarding the enzymatic kinetics, the experimental data were adjusted by Hill's corporate model, indicating positive affinity between enzyme and substrate. The external mass transfer coefficient ($k_c = 1,0 \times 10^{-2} m.s^{-1}$) and the effectiveness factor ($\eta_m = 0.974$), calculated for the internal mass transfer to the particle, demonstrate the low limitation imposed by the mass transport steps on the rate of reaction development. The study of operational stability indicated 96% retention of the enzymatic-catalytic activity after 12h of the process. Therefore, it can be concluded that the implementation of PBR reactor, filled with biocatalyst encapsulated in calcium alginate gel, has shown promise for application in the enzymatic production of FOS.

Keywords: Fructooligosaccharides. Frutosyltransferase. *Aspergillus oryzae*. Immobilization. Encapsulation. Alginate. Packed bed reactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais grupos de frutooligossacarídeos.....	19
Figura 2 -	Principais tipos de frutooligossacarídeos.....	20
Figura 3 -	Ilustração de um substrato ligado ao sítio ativo enzimático.	23
Figura 4 -	Mecanismo de reação ligado à FTase.	25
Figura 5 -	Reação de transfrutossilacção da sacarose.....	26
Figura 6 -	Reação de hidrólise da sacarose ou do FOS.	27
Figura 7 -	Ilustração do perfil de uma curva de progresso de reação.....	28
Figura 8 -	Gráficos utilizados em análises cinéticas.....	29
Figura 9 -	Enzima encapsulada.....	37
Figura 10 -	Micrografias MEV de uma esfera de alginato de cálcio contendo biomassa catalítica.....	38
Figura 11 -	Representação da partícula de catalisador para balanço de massa.....	40
Figura 12 -	Regiões de limitação pela transferência de massa e pela própria reação.....	42
Figura 13 -	Representação da partícula de catalisador para balanço de massa.....	43
Figura 14 -	Esquema de um reator catalítico de leito fixo.....	49
Figura 15 -	Procedimento experimental aplicado na etapa de imobilização, por encapsulamento, da biomassa catalítica.....	54
Figura 16 -	Aparato experimental... ..	56
Figura 17 -	Perfis de atividade de transfrutossilacção em função do tempo obtidos para diferentes temperaturas de reação e vazão volumétrica em reator PBR.....	64
Figura 18 -	Diagrama de Pareto para os fatores temperatura reacional e vazão de alimentação na atividade relativa de transfrutossilacção da biomassa catalítica encapsulada.....	65
Figura 19 -	Atividade de transfrutossilacção em função da temperatura do sistema e da vazão de substrato.....	68
Figura 20 -	Perfis de atividade hidrolítica absoluta em função do tempo obtidos para diferentes temperaturas de reação e vazão volumétrica em reator PBR.....	70
Figura 21 -	Diagrama de Pareto para os fatores temperatura reacional e vazão de alimentação na atividade relativa hidrolítica da biomassa catalítica	

encapsulada.....	71
Figura 22 - Atividade hidrolítica absoluta em função da temperatura do sistema e da vazão de substrato.....	73
Figura 23 - Perfis de atividade enzimática de transfrutossilção para diferentes concentrações de substrato (100g.L^{-1} a 600g.L^{-1} , com $\Delta=100\text{g.L}^{-1}$).....	77
Figura 24 - Ajuste dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten, Hill e Andrews aos dados experimentais no tempo de 90min de reação.....	78
Figura 25 - Perfis de atividade de transfrutossilção em função da vazão de sacarose à $4,0\text{mL.min}^{-1}$, $6,0\text{mL.min}^{-1}$, $7,5.\text{mL.min}^{-1}$, 9mL.min^{-1} e $11.\text{mL.min}^{-1}$	80
Figura 26 - Regiões de limitação pela TME e pela velocidade de reação.....	84
Figura 27 - Estabilidade operacional do leito catalítico (biomassa encapsulada em alginato) do reator PBR, na ausência e presença de reciclo, monitorada durante 12h de processo.....	87
Figura 28 - Curva analítica do método DNS para determinação de açúcares redutores.....	100
Figura 29 - Curva analítica do método GOD - PAP para determinação de glicose..	100
Figura 30 - Comparativo entre predição do modelo e dados experimentais para atividade de transfrutossilção.....	101
Figura 31 - Comparativo entre predição do modelo e dados experimentais para atividade hidrolítica.....	101
Figura 32 - Histograma de distribuição dos dados de A_t/A_h	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fontes microbianas de FTase e suas formas de uso.....	25
Tabela 2 - Matriz experimental DCCR.....	57
Tabela 3- Nível dos fatores usados no planejamento experimental e seus correspondentes valores experimentais obtidos no estado estacionário.....	63
Tabela 4 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos da temperatura reacional e vazão volumétrica na atividade relativa de transfrutossilação da biomassa catalítica encapsulada.....	66
Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) da regressão quadrática para a avaliação dos efeitos da temperatura reacional e vazão de alimentação na atividade relativa de transfrutossilação da biomassa encapsulada.	67
Tabela 6 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos da temperatura reacional e vazão volumétrica na atividade relativa hidrolítica da biomassa catalítica encapsulada.	71
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) da regressão quadrática para a avaliação dos efeitos da temperatura reacional e vazão de alimentação na atividade relativa hidrolítica da biomassa encapsulada.	72
Tabela 8 - Resultado do teste de normalidade de Shapiro-Wilk.....	74
Tabela 9 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste aos modelos cinéticos.....	79
Tabela 10 - Propriedades físicas da água e da solução aquosa de sacarose 35% (m/m) à 50 °C.	81
Tabela 11 - Valores dos números adimensionais de Sh, Sc e Re_p	82
Tabela 12 - Parâmetros para avaliação da transferência de massa interna.....	85
Tabela 13 - Valores calculados dos módulos de Thiele e dos fatores de efetividade...	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)	19
3.2	ENZIMAS	22
3.3	ENZIMAS MICROBIANAS E ROTAS CATALÍTICAS	24
3.3.1	Atividade de transfrutossilacção	26
3.3.2	Atividade hidrolítica	26
3.3.3	Razão A_T/A_H	27
3.4	CINÉTICA ENZIMÁTICA	28
3.4.1	Modelo de Michaelis-Menten	29
3.4.2	Modelo de Hill	33
3.4.3	Inibição enzimática e Modelo de Andrews	34
3.5	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	35
3.5.1	Métodos de imobilização	36
3.5.2	Método de Encapsulação	36
3.5.1	Imobilização de frutossiltransferases	38
3.6	TRANSFERÊNCIA DE MASSA.....	40
3.6.1	Transferência de massa externa	40
3.6.2	Transferência de massa interna	43
3.7	REATORES DE LEITO FIXO	49
3.7.1	Produção de FOS em reator de leito fixo	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	PRODUÇÃO DA BIOMASSA CATALÍTICA	53
4.1.1	Microrganismo e condições de cultivo	53
4.1.2	Produção da biomassa catalítica por fermentação submersa	53

4.2	IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA CATALÍTICA EM ESFERAS DE GEL DE ALGINATO DE CÁLCIO	54
4.3.	ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM REATOR ENZIMÁTICO DE LEITO FIXO (PBR).....	56
4.3.1	Especificações do reator PBR e montagem do aparato experimental ...	56
4.3.2	Influência da temperatura reacional e vazão volumétrica nas atividades enzimáticas	57
4.3.3	Influência da concentração de substrato nas atividades enzimáticas e obtenção dos parâmetros cinéticos	58
4.3.4	Ensaio de avaliação do regime operacional	58
4.3.5	Ensaio de estabilidade operacional.....	59
4.4	OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA INTERNO (TMI) E EXTERNO (TME).....	59
4.5	MÉTODOS ANALÍTICOS	60
4.5.1	Determinação das atividades enzimáticas de transfrutoseilação e hidrolítica.....	60
4.5.2.	Determinação da concentração de açúcares redutores (AR).....	61
4.5.3.	Determinação da concentração de glicose (G).....	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1	ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA REACIONAL E VAZÃO VOLUMÉTRICA NAS ATIVIDADES DE TRANSFRUTOSILAÇÃO E HIDROLÍTICA POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	63
5.1.1	Perfis de atividade enzimática e análise estatística	64
5.1.1.1	<i>Atividade de transfrutoseilação</i>	64
5.1.1.2	<i>Atividade hidrolítica</i>	69
5.1.1.3	<i>Razão entre as atividades relativas de transfrutoseilação e hidrolítica ...</i>	74
5.2	INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	75
5.3	DETERMINAÇÃO DO REGIME OPERACIONAL.....	79
5.4	TRANSFERÊNCIA DE MASSA.....	80
5.4.1	Transferência de massa externa	81
5.4.2	Transferência de massa interna	84
5.5	ENSAIOS DE ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	85

6	CONCLUSÕES	88
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90
	APENDICE A – CURVAS ANALÍTICAS	100
	APENDICE B – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	101

1 INTRODUÇÃO

Os carboidratos são a principal fonte energética de consumo humano. Por meio da oxidação de açúcares e amidos, as células animais obtêm a maior parte de sua energia. Os carboidratos dividem-se em três classes principais: monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

Alterações enzimáticas de polissacarídeos e monossacarídeos vêm sendo estudadas visando a modificação de sua funcionalidade e a agregação de propriedades benéficas ao organismo humano. Uma promissora frente de pesquisa é a utilização da reação de transfrutossilacção, catalisada por enzimas frutossiltransferases (FTase, EC 2.4.1.9), para transformar moléculas de sacarose em frutooligossacarídeos (GIESE et al., 2011).

Os Frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de cadeia curta, de baixo poder calórico e que apresentam propriedades prebióticas. A incorporação desses oligômeros à dieta humana como substitutos parciais à sacarose confere diversos benefícios à saúde. Sua inserção em uma dieta regular resulta na redução dos níveis de colesterol total e lipídeos, bem como do teor de glicose sanguínea (COUNDRAY et al., 2003; PEREIRA; GIBSON, 2002; SILVA et al. 2007). Os FOS podem ser consumidos seguramente por diabéticos, não são cariogênicos e favorecem a absorção de alguns micronutrientes pelo intestino humano (GONÇALVES, 2019, HIDAKA et al., 1986; MODLER, 1994; MODLER; MCKELLAR; YAGUCHI, 1990; YAMASHITA; KAWAI; ITAKAMURA, 1984). Também tem sido observado que a presença de FOS no trato intestinal ocasiona inibição de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* dentre outras (GIBSON; ROBERFROID, 1995; SPIEGEL et al., 1994; YAMASHITA; KAWAI; ITAKAMURA, 1984; WANG; GIBSON, 1993).

As enzimas FTases, biocatalisadoras da reação de transfrutossilacção, são sintetizadas por algumas espécies fúngicas, especialmente *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus aculeatus* via rota fermentativa (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2010; ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001; CHEN; LIU, 1996; CUNHA, 2017; GHAZI et al., 2005; L'HOCINE et al., 2000; NOBRE et al., 2018). Estes biocatalisadores têm sido amplamente estudados em biorreatores batelada, mediante testes de atividade enzimática de FTases microbianas livres (solúveis), imobilizadas ou na forma de célula íntegra (biomassa catalítica, isto é, complexo

enzima-microrganismo), em função de diferentes condições reacionais como temperatura, pH e concentração de substrato (CASTRO et al., 2017, CUNHA et al., 2019, GONÇALVES et al., 2020, PERNA et al., 2018;).

A biomassa catalítica tem se destacado na produção dos FOS por exibir alta atividade de transfrutossilacção e apresentar suporte natural (microrganismo) para própria enzima, o qual evita o uso de suportes externos. Especificamente, estudos reportados na literatura têm destacado o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 como fonte potencialmente produtora de biomassa catalítica contendo FTase com elevada atividade de transfrutossilacção (CUERVO et al., 2007; CUNHA et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020; OTTONI et al., 2012; PERNA et al., 2018;).

A catálise enzimática da sacarose já se demonstrou adequada à produção de FOS (CHIEN; LEE; LIN, 2001; GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014a; JUNG et al. 2011; ZAMBELLI et al., 2016). A abundância de matéria prima, o alto valor agregado ao produto final e, principalmente, o potencial do mercado mundial de FOS, atualmente estimado em U\$\$ 344 milhões, com perspectiva de crescimento de 13,1 % entre os anos de 2018 a 2022 (MORDOR INTELIGENCE, 2017), tornam a produção industrial dos frutooligossacarídeos uma atividade atrativa. No Brasil, ainda não há tecnologia desenvolvida para produção em larga escala que corresponda à demanda existente, suprida por importações. Os custos relacionados à produção enzimática e ao rendimento reacional ainda são desafios frente ao escalonamento do processo (MUSSATTO; TEIXEIRA, 2009; SILVA, 2008).

Uma alternativa promissora, frente às problemáticas levantadas, é a imobilização enzimática, de enzimas livres e biomassa catalítica, que permite a reutilização dos biocatalisadores, aumentando o custo-benefício do processo (DWEVEDI, 2016). A imobilização consiste em associar, física ou quimicamente, a enzima a um suporte, garantindo a retenção de suas atividades catalíticas e a estabilidade operacional do processo. As metodologias de imobilização oferecem diversos benefícios operacionais como o aumento da estabilidade do sistema reacional, a facilidade de separação dos produtos e a viabilidade de utilização em processos contínuos (OLSON; CHARLES, 1974; WEETALL, 2012).

A encapsulação da biomassa microbiana, contendo frutossiltransferases, em matriz de alginato desponta como uma alternativa para viabilizar a produção de FOS em reatores contínuos (JUNG et al. 2011; ZAMBELLI et al., 2016). A encapsulação enzimática em uma estrutura gelificada não produz alterações nos resíduos de

aminoácidos que compõe a estrutura do biocatalisador, preservando ao máximo seu potencial catalítico. O aprisionamento físico tem ampla aplicabilidade e pode ser utilizado em extratos purificados e brutos, em células inteiras e em caldos de cultura contendo a enzima desejada. Adicionalmente, as enzimas imobilizadas adquirem maior resistência mecânica e estabilidade, bem como resistência térmica, o que melhora sua capacidade operacional (CHANG, 2013; OLSON; CHARLES, 1974).

A adoção do alginato de cálcio como matriz de suporte visa agregar funcionalidades técnicas às enzimas. O alginato de cálcio é um polímero de origem natural, atóxico e de bom custo-benefício, possuindo capacidade de formar géis termoestáveis na presença de cátions divalentes, o que facilita o aprisionamento tridimensional dos biocatalisadores. (DONATI et al., 2005; SMIDSRØD; SKJÅK-BRAEK, 1990).

A imobilização da biomassa catalítica em alginato, especificamente de *Aspergillus oryzae* IPT-301, pode facilitar a implementação de um sistema de produção contínuo de FOS, principalmente em biorreatores de leito fixo (PBR). Esta configuração de operação proporciona maior contato efetivo entre o substrato e o biocatalisador (biomassa), resultando na obtenção de altos índices de conversão específica e sistemas passíveis de operação longínqua sem demandar manutenção (FOGLER, 2012; LEVENSPIEL, 2011). Ademais, os reatores PBRs possibilitam a otimização da taxa de transferência de calor por meio do ajuste do diâmetro do reator, consistindo, dessa forma, um sistema de escoamento mais facilmente controlável (FOGLER, 2012).

Desta forma, tendo como principal justificativa a necessidade em se desenvolver a produção contínua de FOS visando atender à crescente demanda comercial, este trabalho propôs implementar um sistema de reação contínuo em biorreator de leito fixo (PBR) recheado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 encapsulada em esferas de alginato de cálcio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi implementar um sistema reacional contínuo em reator de leito fixo enzimático (PBR) recheado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, encapsulada em esferas de alginato de cálcio, visando obter elevada atividade de transfrutoseilação para a produção de FOS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

- a) Produzir a biomassa catalítica (biocatalisador), rica em FTase, por fermentação submersa, por meio do cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em meio de cultura sintético;
- b) Imobilizar, por encapsulação, a biomassa catalítica em gel de alginato de cálcio de baixa viscosidade;
- c) Avaliar a influência dos parâmetros operacionais (i) vazão de alimentação e (ii) temperatura reacional nos perfis de atividade enzimática (transfrutoseilação e hidrolítica) por planejamento experimental aplicando a técnica do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR);
- d) Avaliar a influência da concentração de substrato (sacarose) nos perfis de atividade de transfrutoseilação para o processo contínuo;
- e) Obter os parâmetros cinéticos da biomassa catalítica por meio de ajustes de dados experimentais aos modelos cinéticos enzimáticos reportados na literatura;
- f) Determinar o regime de operação do sistema, cinético ou difusional, por meio do estudo da variação da vazão;
- g) Determinar os parâmetros de transferência de massa internos e externos do sistema reacional contínuo;

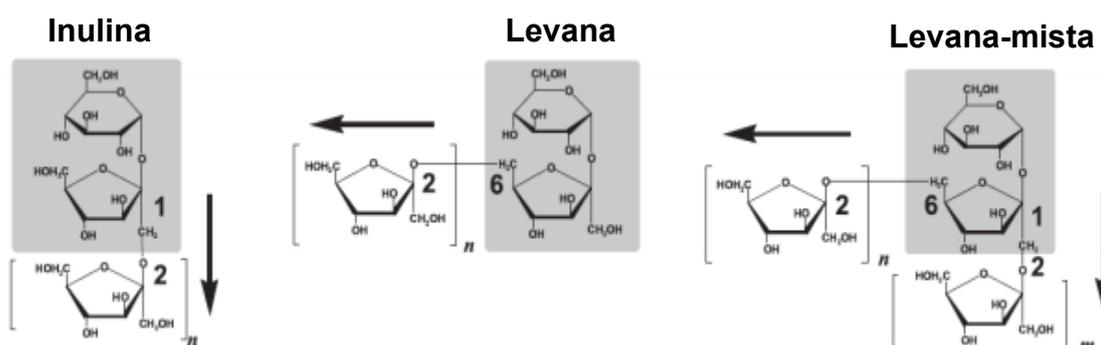
- h) Avaliar a estabilidade operacional do sistema de reação contínuo, na ausência e presença de reciclo, por meio do monitoramento das atividades de transfrutossilacção.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Frutooligossacarídeos são carboidratos de cadeia curta, constituídos por oligômeros de frutose ligados à sacarose. A posição das ligações frutose-frutose pode ser utilizada para classificar os FOS, quanto à estrutura, em três grupos principais apresentados na Figura 1: levana, em que predominam as ligações (2→6), inulina, ligações (2→1), ou levanas-mistas, onde há um equilíbrio entre ligações (2→1) e (2→6) (BENKEBLIA, 2013; LORENZONI, 2014; YUN, 1996).

Figura 1 - Principais grupos de frutooligossacarídeos

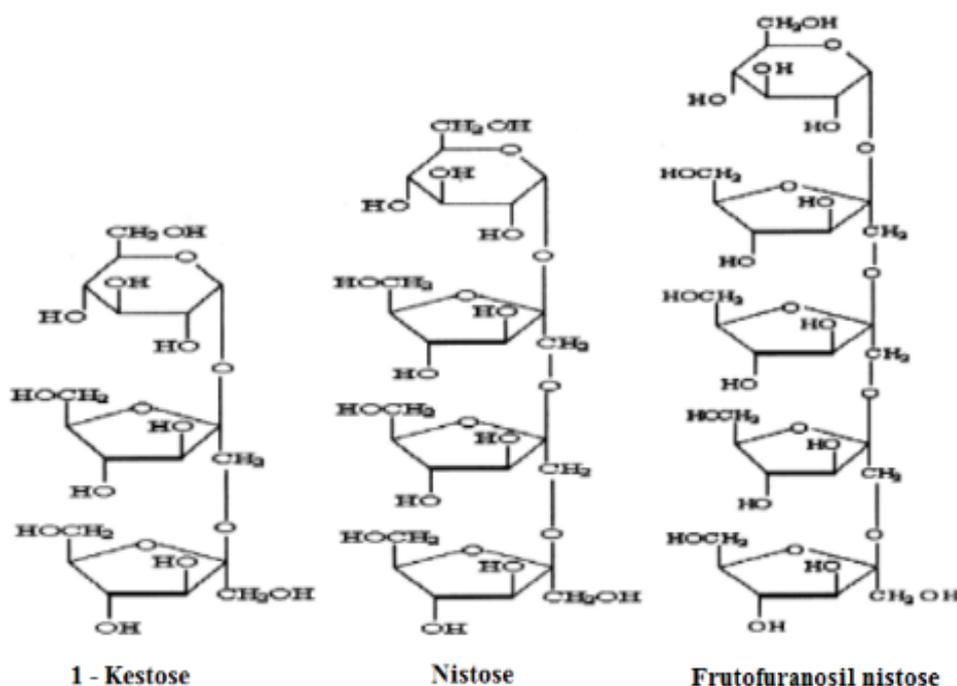


Fonte: Adaptado de Lorenzoni (2014).

Nota: Classificação das principais estruturas químicas dos frutooligossacarídeos embasada na posição da ligação entre sacarose (destaque cinza) e frutose.

Os FOS apresentam fórmula bioquímica genérica designada por $1^F(1-\beta\text{-D-frutofuranosil})_n$ sacarose, com baixo grau de polimerização ($n < 10$). Moléculas com mais de 10 unidade monoméricas são classificadas polímeros de frutano. Os tipos mais relevantes de FOS, apresentados na Figura 2 são: 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e 1- β -frutofuranosil nistose (GF4) (CRITTENDEN; PLAYNE 1996; NEMUKULA et al. 2009, PASSOS; PARK, 2003).

Figura 2 - Principais tipos de frutooligossacarídeos



Fonte: Adaptado de Passos e Park (2003).

Os FOS são comumente encontrados na natureza em plantas monocotiledôneas, dicotiledônias e em algas verdes, onde desempenham funções de reserva energética. A ocorrência dos frutooligossacarídeos nessas plantas deriva de múltiplas rotas catalíticas integradas, como, por exemplo, a formação de trissacarídeos (GF2) pela ação de IF-frutossiltransferase (SST) e, em seguida, a formação de oligossacarídeos superiores (GF) pela atuação de fructan IF-fructossiltransferase (YUN, 1996).

Também é observada a ocorrência natural de FOS em culturas bacterianas e fúngicas. Nesses meios, a síntese de frutooligossacarídeos possui dupla função, reduzindo a quantidade de frutose livre, que em grandes quantidades opera como inibidora do crescimento microbiano, e servindo como armazenamento energético, utilizado quando o suprimento de sacarose livre é reduzido. A produção de enzimas relacionadas à reação de transfrutossiltransferase foi observada em uma diversidade de microrganismos, como *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus oryzae*, dentre outros (BALI et al., 2015).

Os FOS apresentam, tipicamente, 30% a 60% do poder adoçante da sacarose, dependendo do tamanho e da estrutura molecular da cadeia. As moléculas de frutooligossacarídeos tem caráter redutor e são altamente higroscópicas, o que contribui para evitar o ressecamento de alimentos e ainda diminui a quantidade de água ativa livre, auxiliando na inibição de contaminações microbianas. A elevada massa molecular, comparada aos monossacarídeos e dissacarídeos, proporciona uma maior viscosidade, favorecendo melhora da textura alimentícia, também altera o ponto de congelamento das substâncias. Possuem, ainda, boa estabilidade térmica e a pH, resistindo a degradação de processos como a pasteurização (BENKEBLIA, 2013).

Apesar da grande quantidade de propriedades físico-químicas interessantes, o principal atrativo do emprego de FOS procede de sua atividade fisiológica. Diferentemente da maioria dos açúcares, os frutooligossacarídeos não são metabolizados pelo trato digestivo humano. Dessa forma, são carregados para o cólon, onde estimulam a regularidade da atividade intestinal e atuam como fonte seletiva de nutrientes para as bifidobactérias. Essa característica faz com que os FOS sejam incluídos no grupo seletivo de alimentos probióticos, com benefícios diretos à saúde humana. Além disso, por apresentarem baixos índices de metabolização, os FOS não contribuem significativamente para armazenamento de energia celular, sendo, portanto, considerados alimentos de baixo poder calórico, o que os torna opções viáveis de consumo seguro para diabéticos (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

Os FOS também não são utilizados como substrato para fermentação pelos microrganismos bucais, o que acarreta na não geração de ácidos danosos à saúde dos dentes, conferindo-lhes a qualidade de anticariogênicos (LIMA, 2019).

Atualmente, a comercialização dos frutooligossacarídeos é segmentada nos setores farmacêutico e alimentício. Na indústria farmacêutica são empregados, principalmente, como suplementos alimentares, provocando um aumento no conteúdo de fibras, sem alterar indesejavelmente as características organolépticas (FORTES; MUNIZ, 2009). Na indústria alimentícia é possível verificar a presença de FOS em iogurtes, bebidas lácteas, sorvetes, biscoitos, produtos de panificação, bebidas funcionais como sucos e néctares frescos, molhos, balas mastigáveis infantis, em barras de cereais, em produtos alimentares para animais, dentre outros (BALI et al., 2015; YUN, 1996).

Do ponto de vista industrial, a produção de FOS é exclusivamente realizada a partir de catálise enzimática microbiana, visto que a extração a partir de espécies vegetais está sujeita a sazonalidade e limitações severas de volume. Existem, atualmente, duas rotas de manufatura majoritariamente empregadas na produção desse probiótico (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

A primeira rota emprega enzimas frutossiltransferases para condução da reação de transfrutossilacção da sacarose, gerando como produtos principais: I-kestose (Glu-Fur), I-5-fructofuranosidasenistose (Glu-Fru) e IF-fructossilnystose (Glu-Fru), que podem ser separados dos subprodutos e da sacarose residual por cromatografia. Uma grande concentração de substrato é demandada para uma reação eficiente (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

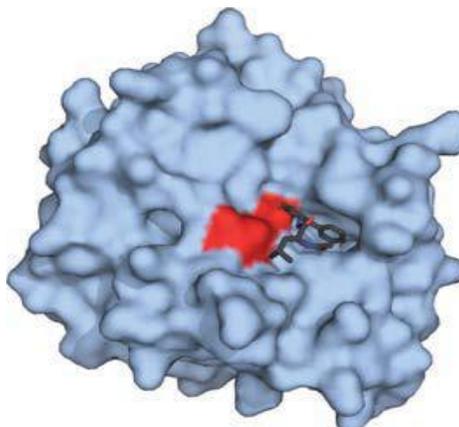
A segunda via de produção é a condução controlada da hidrólise enzimática da inulina, utilizando a enzima inulinase, resultando na formação uma mistura de frutooligossacarídeos semelhantes aos produzidos pela primeira rota, entretanto, com massa molecular média ligeiramente superior ao da rota de transfrutossilacção (YUN, 1996).

3.2 ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos constituídos de proteínas conformadas em estruturas complexas. As enzimas apresentam um ambiente extremamente específico, que proporciona condições favoráveis para celeridade de reações particulares, atuando de forma rigorosamente seletiva sobre o substrato e sobre mecanismo de reação (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

A especificidade das enzimas deve-se a uma estrutura denominada sítio ativo, situada na superfície da proteína enzimática e formada por resíduos de aminoácidos capazes de se ligarem ao substrato com alta seletividade. A ligação do substrato ao sítio ativo, formando um complexo enzima-substrato, ocorre por meio de interações fracas, e possibilita rota reacional alternativa, diminuindo a energia de ativação da reação (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014; MOTTA, 2005,). A Figura 3 apresenta a ilustração de um complexo enzima-substrato.

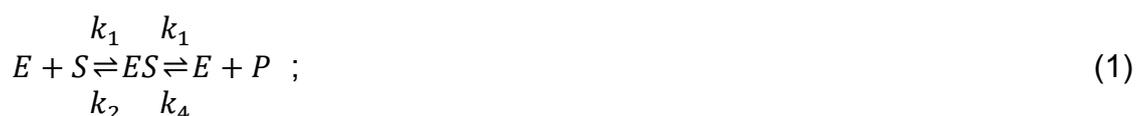
Figura 3 - Ilustração de um substrato ligado ao sítio ativo enzimático



Fonte: Lehninger, Nelson e Cox (2014, p. 192)

As etapas que intermediam a formação do complexo de transição e a separação em enzima livre e produto são denominados mecanismos enzimáticos, e constituem uma série de reações covalentes transitórias e interações fracas entre substrato e sítio ativo, com a propriedade de ativar a molécula para reação, aumentando a taxa de velocidade do processo, sem, todavia, influenciar na alteração do equilíbrio químico (MOTTA, 2005).

Uma reação genérica de um substrato catalisada por enzima pode ser representada da seguinte forma:



em que E representa a enzima livre, S o substrato, ES o complexo transitório enzima-substrato e P o produto da reação.

Devido à estrutura tridimensional sustentada por interações fracas e à composição de caráter aminoácido da cavidade do sítio ativo, as enzimas são altamente sensíveis a temperatura e pH. A elevação da temperatura favorece o aumento da energia cinética molecular, aumentando a velocidade de reação. Entretanto, a enzima possui uma tolerância térmica máxima, acima da qual sofre desnaturação proteica, com decaimento acentuado da atividade (BERG, STRYER; TYMOCZKO, 2014).

A concentração de íons hidrogênio influencia na ionização e protonização das cadeias laterais de aminoácidos constituintes do sítio ativo e do substrato. Dessa forma, a atividade catalítica enzimática só é verificada em uma faixa ótima de pH, particular para cada reação. O controle do pH em reações enzimáticas é realizado por meio da utilização de soluções-tampão (MARZZOCO; TORRES, 2007).

3.3 ENZIMAS MICROBIANAS E ROTAS CATALÍTICAS

Os frutooligossacarídeos oriundos da transfrutosilação da sacarose podem ser obtidos por meio de duas rotas catalíticas enzimáticas microbianas. A primeira emprega a ação de frutossiltransferases (FTases, EC 2.4.1.9), e a segunda, de enzimas da classe β -frutofuranosidase (FFTases, EC 3.2.1.26) (FLORES-MALTOS et al., 2014).

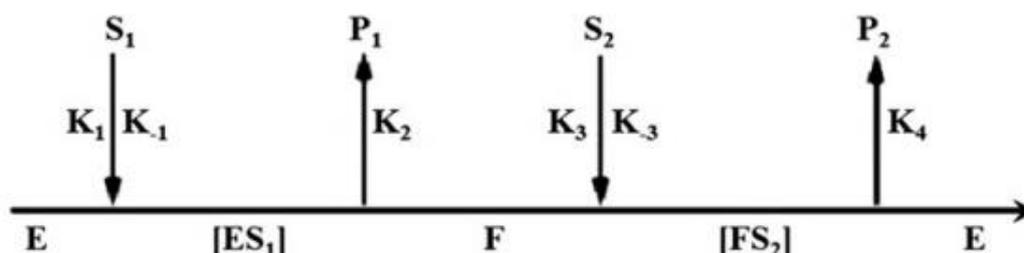
As β -frutofuranosidases têm como principal atividade a hidrólise da sacarose, mas podem também exibir atividade de transfrutosilação sob condições apropriadas. Tais enzimas produzem FOS por hidrólise reversa ou transfrutosilação (MUTANDA et al., 2014).

O mecanismo de reação ligado a ação das FTases é complexo e consiste em uma pluralidade de reações simultâneas, catalisadas pelas frutossiltransferases quando há disponibilidade de sacarose e condições favoráveis de síntese (MONSAN; PAUL, 1995). Três etapas principais podem ser identificadas: a hidrólise da molécula de sacarose em açúcar invertido, originando uma molécula de frutose e outra de glicose, a polimerização da frutose, que é ligada a um oligômero frutossil, e a transferase, com a transferência da frutose a um aceptor, formando um frutosídeo (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001).

Chambert, Treboul e Dedonder (1974), ao analisarem estudos cinéticos de velocidade inicial, sugeriram que a reação enzimática segue o mecanismo de reação do tipo "Ping-Pong" (Figura 4). Tal mecanismo propõe que a molécula de sacarose se liga à enzima, resultando na formação do complexo $[ES_1]$. O complexo, então, libera uma molécula de glicose (P_1) (Pong), e forma o intermediário enzima-frutose (F) (Ping). O intermediário interage com um segundo substrato (S_2), formando $[FS_2]$ (Ping), e libera a molécula contendo frutose ao meio reacional (Pong). O segundo substrato pode ser uma molécula de água, o que acarreta na liberação de uma frutose,

ou pode ser uma cadeia de frutose, que gera uma nova cadeia acrescida de uma molécula de frutose (OLVERA et al. 2007). O mecanismo é apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Mecanismo de reação ligado à FTase



Fonte: Adaptado de Chambert, Treboul e Dedonder (1974).

Uma variedade de microrganismos produtores de enzimas que exibem atividade de transfrutossilatação é reportada na literatura. A Tabela 1 sintetiza algumas fontes microbianas bem como sua forma aplicação.

Tabela 1 – Fontes microbianas de FTase e suas formas de uso

Microrganismo	Enzima / Forma de uso	Condições ótimas	Referência
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Levansucrase (E.C. 2.4.1.10) – Enzima livre	40 °C - pH 5,5 - 18 h - 200 rpm - sacarose 60%	Támbara et al. (1999)
<i>Bacillus macerans</i>	Frutossiltransferase (E.C. 2.4.1.9) – Enzima livre	50 °C - pH 7,0 - 100 h - sacarose 50%	Kim et al. (2000)
<i>Kluyveromyces marcianus</i>	Inulinase – Enzima Imobilizada	50 °C - pH 6,0 - 4 h - sacarose 45%	Santos & Maugeri (2007)
<i>Penicillium citrinum</i>	Neo-frutossiltransferase – Micélio livre	50 °C - 40 h - 100 rpm - sacarose 70%	Hayashi et al. (2000)
<i>Penicillium citrinum</i>	Neo-frutossiltransferase – Micélio e enzima co-imobilizados	50 °C - pH 6,0 - 48 h - 100 rpm - sacarose 60%	Lim et al. (2007)
<i>Aspergillus sp.</i>	β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Enzima livre	40 °C - pH 5,5 - 6 h - sacarose 61,5%	Fernández et al. (2004)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Frutossiltransferase (E.C. 2.1.4.9.) – Enzima livre	40 °C - pH 5,5 - 25 h - 500 rpm - sacarose 40%	Yun & Song (1993)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Frutossiltransferase (E.C. 2.1.4.9.) – Enzima livre	55 °C - pH 5,5 - 24 h - sacarose 80%	Sangeetha et al. (2004a)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Frutossiltransferase (E.C. 2.1.4.9.) – Enzima livre	55 °C - pH 5,5 - 12 h - sacarose 55%	Sangeetha et al. (2004b)
<i>Aspergillus niger</i>	β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Enzima livre	40-65 °C - pH 6,0-8,5 - sacarose 40-70%	Park & Pastore (2006)
<i>Aspergillus japonicus</i>	β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Micélio imobilizado	55 °C - pH 5,5 - 4 h - sacarose 65%	Cruz et al. (1998)
<i>Aspergillus japonicus</i>	β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Enzima livre	37 °C - pH 5,5 - 8,5 h - 200 rpm - sacarose 30%	Sheu et al. (1998)

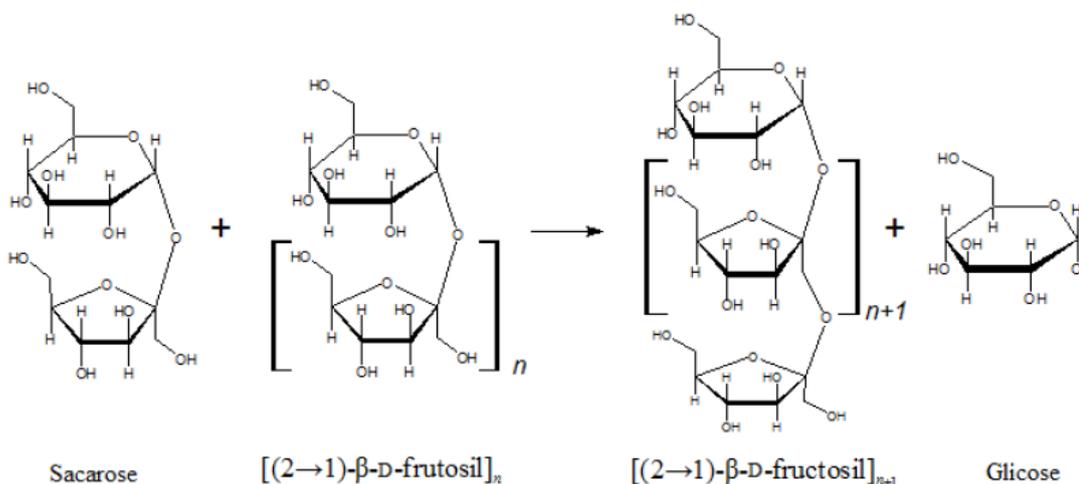
Fonte: Adaptado de Silva (2009).

3.3.1 Atividade de transfrutossilacção

As frutossiltransferases catalisam a reacção de transferéncia de grupos frutossil entre moléculas de sacarose (Figura 5), atuando na cisão das ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1) e realizando a transferéncia de um grupo frutossil para uma nova molécula de sacarose ou polimerizando outra molécula de FOS, realizando a liberaçáo de moléculas de glicose como subproduto da reacção. Tal mecanismo é conhecido com transfrutossilacção (MUNIZ-MÁRQUEZ et al., 2016).

As FTases, portanto, exibem destacadamente atividade de transfrutossilacção (A_t) que pode ser interpretada como a quantidade de enzima capaz de gerar um micromol (1 μ mol) de FOS por minuto, nas condições da reacção (temperatura, pH e concentraçáo de substrato) (GANAIE; GUPTA, 2014b). A atividade A_t também pode ser interpretada em termos da quantidade de enzima necessária para transferir um micromol (1 μ mol) de frutose por minuto (CHEN; LIU, 1996; HAYASHI et al., 1990; KURAKAKE; NOUE; KOMAKI, 1996; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011).

Figura 5 - Reacção de transfrutossilacção da sacarose



Fonte: Cunha, (2017, p. 25).

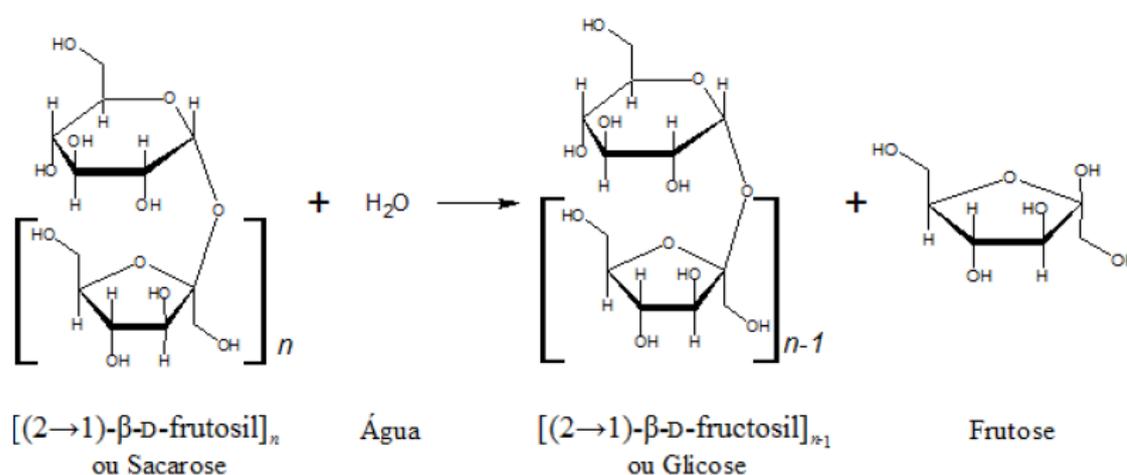
3.3.2 Atividade hidrolítica

A clivagem da molécula de sacarose, por hidrólise (Figura 6) resulta na produçáo de açúcar invertido, com liberaçáo de uma molécula de glicose e outra de

frutose. A β -frutofuranosidase, ou invertase, é a enzima responsável pela hidrólise da sacarose e de FOS (SHULER, 2002).

A atividade hidrolítica (A_h) pode de ser definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de um dos produtos da hidrólise da sacarose por minuto, a frutose, ou seja, uma unidade de atividade hidrolítica representa a quantidade de enzima que libera um micromol ($1\mu\text{mol}$) de frutose por minuto (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; OTTONI et al., 2012).

Figura 6 - Reação de hidrólise da sacarose ou do FOS



Fonte: Cunha, (2017, p. 27).

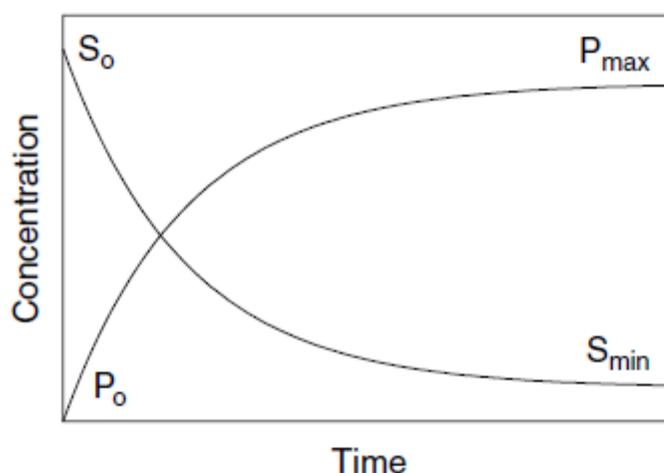
3.3.3 Razão A_T/A_H

O parâmetro de seletividade da reação aplicado à produção de FOS, pode ser definido como a razão entre a atividade de transfrutosilação e a atividade hidrolítica, (A_T/A_H). Tal parâmetro é uma importante ferramenta de avaliação da eficiência catalítica enzimática (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988). Quanto maior a razão A_T/A_H maior a predominância da atividade de transfrutosilação sobre a hidrolítica, ou seja, um maior rendimento final em FOS. Para se obter uma produção eficiente de FOS, portanto, deve-se buscar a otimização deste parâmetro por meio do ajuste das condições operacionais (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988).

3.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A concentração de substrato é um fator determinante na velocidade das reações catalisadas por enzimas. A abordagem tradicional de levantamento cinético em sistemas fechados, consiste no acompanhamento das concentrações de substrato e produto, no decorrer do desenvolvimento reacional, possibilitando a obtenção de um perfil exponencial de primeira ordem, exemplificado na Figura 7 (MARANGONI, 2003).

Figura 7 - Ilustração do perfil de uma curva de progresso de reação



Fonte: Adaptado de Leskovac (2003).

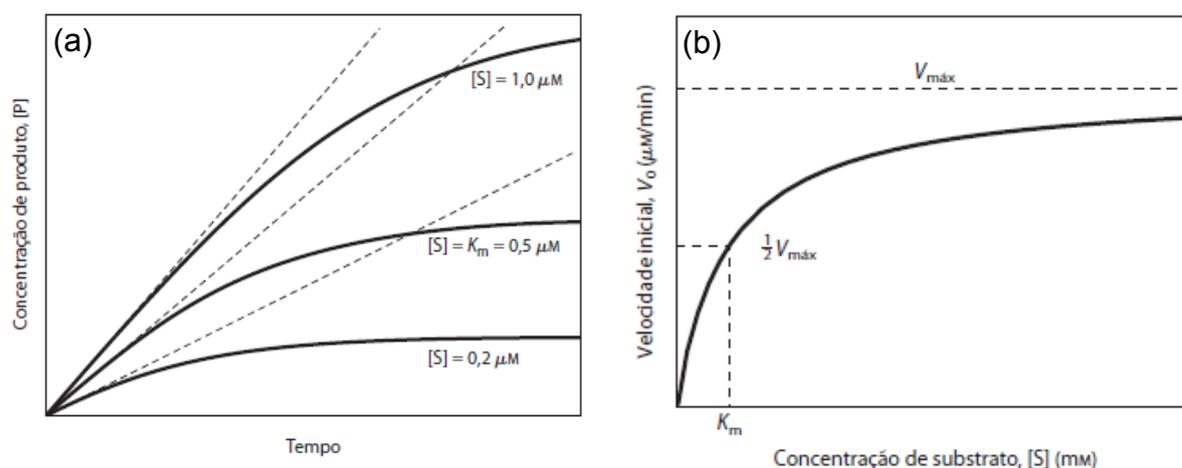
A obtenção dos parâmetros cinéticos baseada na análise das curvas de progresso da reação pode ser realizada por meio do ajuste dos dados experimentais. Diferentes abordagens matemáticas podem ser aplicadas, dentre as mais comuns tem-se: integração numérica, regressão não-linear e resolução de sistemas de equações lineares. Entretanto, a modelagem das curvas de progresso é severamente limitada por fatores como instabilidade enzimática, decaimento no grau de saturação da enzima, predominância da reação reversa, inibição por produto, dentre outros (DUGGLEBY; MORRISON, 1977; MARANGONI, 2003).

Dessa forma, um tratamento alternativo, adequado ao estudo enzimático, consiste na utilização da velocidade inicial da reação para determinação dos modelos cinéticos.

Durante os instantes iniciais da reação, a conversão de substrato em produto é aproximadamente nula, sugerindo que a concentração de substrato possa ser

considerada constante e efetivamente igual à concentração inicial (Figura 8a). É possível, portanto, estabelecer uma relação direta entre a velocidade inicial e a concentração de substrato (Figura 8b). A região linear das curvas de progressão se estende, aproximadamente, até conversões de substrato inferiores a 20% (MARANGONI, 2003; LEHINGER 2000).

Figura 8 - Gráficos utilizados em análises cinéticas



Fonte: Lehninger, Nelson e Cox (2014, p.201).

Legenda: Gráfico de concentração do substrato em função do tempo, utilizado para obtenção das velocidades iniciais (a); gráfico da velocidade inicial em função da concentração de substrato (b).

Os gráficos da velocidade inicial em função da concentração de substrato geralmente apresentam dependência hiperbólica da velocidade inicial sobre a concentração de substrato, demonstrando o efeito da saturação sobre a população enzimática. O comportamento hiperbólico é bem descrito pela cinética de Michaelis-Menten. Alternativamente, um perfil sigmoide também pode ser observado em casos de conexão cooperativa entre substrato e sítio ativo. A cinética cooperativa é bem descrita pelo modelo de Hill ou modelos mais complexos como o de Koshland (FONTES, 1996).

3.4.1 Modelo de Michaelis-Menten

A modelagem algébrica do perfil hiperbólico retangular, descrito pela dependência da velocidade inicial com relação à concentração do substrato, foi

acuradamente descrita por Michaelis-Menten (1913), ao estudarem a ação de invertases na decomposição da sacarose.

Para desenvolvimento do modelo, foi postulado que a etapa inicial da reação enzimática, de formação do complexo enzima-substrato, apresenta uma alta taxa relativa de desenvolvimento, quando comparada com a etapa de separação do complexo em enzima livre e produto. Esta última, portanto, é uma etapa lenta e limitante da velocidade de reação, sendo possível afirmar que a lei de velocidade de reação é proporcional a concentração do complexo enzima substrato (MICHAELIS; MENTEN, 1913).

Partindo desses pressupostos, Michaelis-Menten propuseram uma expressão para quantificar a velocidade inicial de uma reação enzimática simples, com um substrato, catalisada por uma enzima. Para tanto, consideraram que no início da reação, não há produto disponível no meio e que a velocidade inicial reflete o estado estacionário, e, portanto, as velocidades de formação e de cisão (direta e inversa) do complexo enzima-substrato são iguais (RODWELL et. al. 2016). A expressão obtida é apresentada abaixo:

$$v_0 = k_3[E_T] \frac{[S]}{\frac{k_2}{k_1} + [S]} ; \quad (2)$$

Em que k_1, k_2, k_3 são as constantes de velocidade do processo, apresentadas na Equação 1, $[S]$ é a concentração de substrato e $[E_T]$ é a concentração total de enzimas. Tomando-se o produto $k_3[E_T]$ como a velocidade máxima da reação, e denominando-se $\frac{k_2}{k_1}$ como constante de Michaelis-Menten (k_M), pode-se reescrever a equação da seguinte forma:

$$v_0 = v_{m\acute{a}x} \frac{[S]}{k_M + [S]} ; \quad (3)$$

Uma das hipóteses iniciais de desenvolvimento da cinética de Michaelis-Menten, citada acima, requisita o equilíbrio químico na reação de formação do complexo enzima-substrato.



Essa proposição impõe que para que haja validade da equação, as taxas de desenvolvimento da reação, direta e inversa, entre enzima e substrato para formação do complexo transitório devem ser iguais ($k_1 = k_2$). Tal exigência é conhecida como hipótese do equilíbrio, e insere uma grande restrição à aplicação do modelo (ENGEL, 1981).

Em 1925, Briggs e Haldane desenvolveram uma expressão formalmente igual à estabelecida por Michaelis-Menten, suprimindo a hipótese do equilíbrio e inserindo uma nova suposição mais flexível, denominada hipótese do estado estacionário (BRIGGS; HALDANE, 1925).

O modelo do estado estacionário propõe que uma reação enzimática pode ser subdividida em duas etapas. A primeira, denominada pré-estacionária, abrange o período de tempo imediatamente seguinte ao início da reação, e é caracterizada pelo aumento da concentração do complexo intermediário. A fase decorrente é designada etapa estacionária, e envolve o período no qual a concentração do complexo enzima-substrato é aproximadamente constante. Diferentemente da hipótese assumida no equilíbrio, a constância da concentração do intermediário pressupõe a igualdade de formação e decomposição do complexo em qualquer direção (TAYLOR, 2004).



Dessa maneira, a expressão que descreve a velocidade inicial em função da concentração de substrato, para a hipótese do regime estacionário, é apresentada na Equação 6.

$$v_0 = k_3 [E_T] \frac{[S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + [S]} ; \quad (6)$$

Denominando-se a razão $\frac{k_2+k_3}{k_1}$ como constante de Michaelis-Menten para hipótese de estado estacionário (k_M'), obtém-se uma expressão matematicamente análoga à obtida sob a conjectura do equilíbrio (Equação 2). É possível se verificar, que restituindo a hipótese do equilíbrio, $k_3 \ll k_2$, a expressão se torna idêntica à Equação 3.

$$v_0 = v_{m\acute{a}x} \frac{[S]}{k_M' + [S]} ; \quad (7)$$

Apesar de a cinética de Michaelis-Menten ter sido fundamentada em uma mecânica reacional relativamente simples, composta por duas etapas, verifica-se sua aplicabilidade na modelagem de qualquer reação com dependência hiperbólica entre velocidade inicial e concentração de substrato, sendo útil, inclusive, na descrição de mecanismos complexos com pluralidade de etapas catalíticas (RODWELL et. al. 2016).

Todavia, a interpretação física das constantes cinéticas não deve ser generalizada, carecendo da análise conjunta com mecanismos de ação enzimática. A constante k_M pode ser interpretada como uma medida da afinidade da enzima pelo substrato quando verificada a condição de equilíbrio, entretanto, quando os valores de k_3 e k_2 , são equiparáveis, k_M pode representar uma função complexa de várias constantes, impedindo a simplificação de conclusões acerca da aferição da afinidade (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

Da mesma forma, a constante de velocidade máxima da reação ($v_{m\acute{a}x}$) apresenta dependência significativa das etapas da reação. Para uma reação em duas etapas, por exemplo, $v_{m\acute{a}x}$ equivale ao produto $k_3[E_T]$, entretanto, em reações com mais etapas, ou com limitações de velocidade impostas por etapas distintas, a velocidade se torna função de uma constante de velocidade distinta (k_3, k_4 , etc.), podendo, inclusive, ser uma função complexa de várias constantes, quando as etapas limitantes são múltiplas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

3.4.2 Modelo de Hill

O perfil sigmoide da velocidade inicial em função da concentração de substrato é observado em reações onde ocorre a ligação cooperativa da enzima ao substrato. Esse comportamento é exclusivamente observado em enzimas multiméricas, capazes de estabelecer ligações simultâneas com várias moléculas de substrato (RODWELL et. al. 2016).

Em 1912, Hill propôs uma modelagem adequada ao comportamento da curva de saturação da hemoglobina em reações com O₂ e CO. Essa curva apresenta o mesmo perfil sigmoide observado nas enzimas cooperativas. Dessa maneira, a análise pôde ser amplamente estendida à cinética enzimática. A equação de Hill é apresentada abaixo (Equação 8).

$$v_0 = v_{m\acute{a}x} \frac{[S]^n}{[S_{0,5}]^n + [S]^n} ; \quad (8)$$

em que $[S_{0,5}]$ é a concentração de substrato para o qual a enzima encontra-se hemisaturada, com velocidade de reação igual 50 % da velocidade máxima. O coeficiente n é o coeficiente de Hill, e uma medida do grau de cooperatividade da enzima.

O coeficiente de Hill é um parâmetro empírico cujo valor depende do número, do tipo e da força das interações entre os múltiplos sítos ativos e as moléculas de substrato. Para n igual a 1, a equação de Hill é reduzida ao comportamento cinético apontado por Michaelis-Menten, indicando que há ausência de cooperatividade entre enzima e substrato, com todos os sítios ativos comportando-se independentemente. Se n é maior que 1, a enzima apresenta cooperatividade positiva, sugerindo que a ligação de um substrato a um sítio ativo aumenta a afinidade dos sítios restantes. Quanto maior o valor do coeficiente maior o grau de cooperatividade e mais acentuado o caráter sigmoidal do diagrama da velocidade inicial em função do tempo. Valores de n inferiores a 1 indicam cooperatividade negativa do ligante com o sítio ativo enzimático (RODWELL et. al. 2016; WEISS, 1997).

3.4.3 Inibição enzimática e Modelo de Andrews

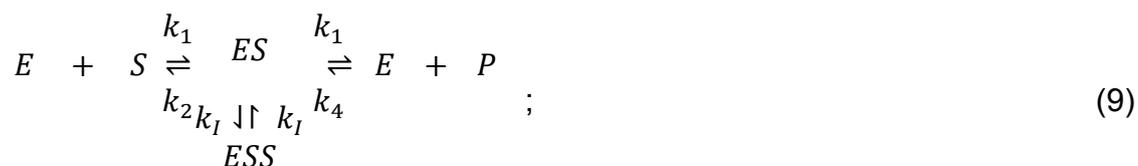
A ação enzimática é suscetível à interferência negativa de moléculas que atuam na inibição da atividade catalítica. A inibição pode apresentar caráter reversível ou irreversível.

Na inibição reversível a molécula inibidora pode atuar de forma competitiva ou incompetitiva em relação ao substrato. A competição ocorre quando o inibidor possui estrutura bioquímica equivalente à do substrato, e se liga ao sítio ativo formando um complexo enzima-inibidor, que impede, dessa maneira, a formação do intermediário enzima-substrato e prejudica a catálise. Mesmo ligações transitórias do sítio com o inibidor afetam a taxa de desenvolvimento da reação (RODWELL et. al. 2016).

A inibição irreversível ocorre quando as moléculas inibidoras inutilizam o potencial catalítico do sítio ativo de forma permanente, por meio de ligações covalentes ou alterações químicas no sítio ativo. Os efeitos da inibição permanente são similares aos observados na presença de inibição reversível não-competitiva, o. Os inibidores podem constituir importantes ferramentas na investigação dos mecanismos reacionais, ajudando a identificar os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise (DUGAS, 2013).

O substrato pode provocar inibição da sua própria catálise quando sua conformação possibilita uma posição de ligação não-produtiva a um sítio enzimático. Na presença desta ação inibitória, a taxa de desenvolvimento de reação é proporcional à concentração do substrato apenas até um valor limiar, a partir do qual, torna-se inversamente proporcional e decresce assintoticamente com o aumento da disponibilidade de substrato no meio (REED et al., 2010).

Muitas teorias são propostas para explicar os mecanismos de ação da inibição pelo substrato. O modelo de Andrews propõe a existência de múltiplos sítios enzimáticos passíveis de ligação com substrato, entretanto, prevê a ausência de potencial catalítico em alguns deles, sendo estes considerados sítios alostéricos. Dessa forma, este modelo sugere que após a formação do primeiro sítio ativo catalítico, torna-se possível a formação de sítios inativos procedentes da ligação de uma molécula de substrato a um local inibitório (IGNEST, 2003). A mecânica de inibição proposta por Andrews é apresentada na Equação 9.



em que ESS é o complexo inativo formado por substrato e sítio alostérico. Considerando-se o caso simples de uma molécula de substrato ligando-se primeiramente ao local catalítico, seguida por um substrato conectado a um sítio alostérico, pode-se derivar a Equação 10

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} ;$$
(10)

sendo K_m a constante de Michaelis-Menten e K_i a constante de inibição. Observa-se que para concentrações elevadas de substrato, o termo quadrático do denominador torna-se mais significativo, conduzindo a velocidade de reação para zero quando $[S] \rightarrow \infty$. Na ausência de inibição pelo substrato, a constante K_i assume valores elevados, o que torna parcela $[S]^2/K_i$ desprezível, reduzindo o modelo de Andrews à equação de Michaelis-Menten (Equação 7) (KIM et al., 2005; REGINATTO et al., 2008).

3.5 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A imobilização enzimática consiste na associação física ou química dos biocatalisadores a um suporte, visando a manutenção de suas atividades catalíticas e permitindo sua utilização repetida e contínua em um processo químico. Os benefícios da imobilização são vários e incluem aumento da estabilidade operacional, redução de custos de processo, recuperação do catalisador, facilidade da separação e purificação do produto final. (CHANG, 2013; MIURA, 1975).

A escolha da melhor metodologia de imobilização deve ser realizada mediante análise minuciosa das características do meio reacional e dos reagentes da reação. As metodologias de imobilização enzimática abrangem ligação covalente, adsorção, reticulação e aprisionamento em matriz ou microencapsulamento (CHANG, 2013).

3.5.1 Métodos de imobilização

A imobilização enzimática por ligação covalente consiste na interação elétrica de um grupo funcional da enzima com uma matriz sólida, que anexa o biocatalisador à sua superfície. A fixação da enzima por ligação química reduz extensamente a perda por carreamento. Entretanto, a fixação da enzima deve ser realizada de maneira cautelosa, pois uma alocação equivocada pode dificultar o acesso do substrato à cavidade catalítica (SOUZA et al. 2017).

Os procedimentos que abarcam fixação por adsorção têm como grande vantagem a simplicidade metodológica. As partículas catalíticas são aderidas mediante exposição simples a um suporte ativado. Como a imobilização não envolve modificações físicas ou químicas, a estrutura conformacional da enzima permanece intacta, favorecendo a manutenção do potencial catalítico. Entretanto, devido à adsorção possuir caráter de fraca interação, a enzima é facilmente desorvida sob condições desfavoráveis de processo, restringindo seu uso a meios que apresentem condições não agressivas à ligação (DUGAS, 2013; OLSON, 1974).

A reticulação enzimática fundamenta-se no pressuposto de imobilizar a enzima independentemente de um suporte físico, empregando-se agentes químicos capazes de fortalecer as ligações intramoleculares, criando uma estrutura com maior grau de rigidez, apropriada para impedir o carreamento dos biocatalisadores. Grande parte das abordagens metodológicas consistem em utilizar uma reação química entre preparações enzimáticas e agentes reticulantes, capazes de se ligarem a grupos específicos de aminoácidos na superfície da enzima, promovendo as adaptações na estrutura terciária (SOUZA et al., 2017). Essa metodologia de imobilização oferece vantagens como elevada estabilidade e baixo custo de produção, associado à prescindibilidade do suporte.

3.5.2 Método de Encapsulação

A imobilização de enzimas por encapsulação fundamenta-se na polimerização in situ da matriz porosa, que passa a envolver a enzima em um suporte. O processo ocorre por meio da incorporação do biocatalisador a uma mistura reativa polimerizável. Conforme a reação de polimerização progride, a matriz polimérica passa a confinar a enzima em sua estrutura (SOUZA et al., 2017). A Figura 9

apresenta uma ilustração do processo de encapsulação.

Figura 9: Enzima encapsulada



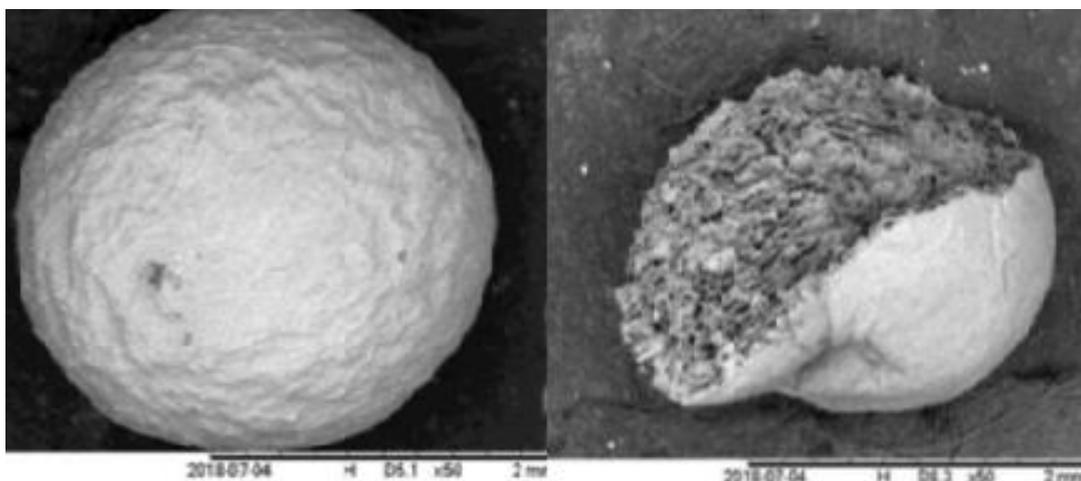
Fonte: Adaptado de Souza et al. (2017).

O aprisionamento da enzima em matriz gelificada possibilita a imobilização do catalisador sem a realização de alterações físicas e químicas expressivas, preservando intacta sua capacidade catalítica. As técnicas de imobilização por encapsulamento são geralmente simples e estabilizam significativamente a enzima para resistir às condições operacionais (CHANG, 2013). Todavia, a alteração das resistências aos fenômenos de transferência de massa e calor através da membrana semipermeável devem ser levadas em consideração, consistindo parâmetros importantes na aplicação desta metodologia. Outro ponto sensível no processo, é o controle do grau de polimerização da matriz, que influencia diretamente na dimensão média dos poros, que devem possibilitar as difusões do substrato e do produto, sem facilitar a dessorção enzimática (SOUZA et al., 2017). A oclusão da enzima em matriz esférica de diâmetro microscópico é denominada microencapsulamento (DUGAS, 2013; MIURA, 1975; OLSON, 1974).

Portanto, a escolha adequada da metodologia de imobilização deve visar a otimização do custo-benefício do processo, sendo importante observar a eficiência de imobilização, a simplicidade da metodologia, a reatividade da enzima imobilizada e os custos dos materiais de suporte e dos reagentes empregados na imobilização.

A Figura 15 apresenta micrografias de uma esfera de alginato produzida segundo metodologia de encapsulação de frutossiltransferases miceliais, proposta por Gonçalves (2019), com adição de uma fase extra de reticulação enzimática utilizando gluteraldeído.

Figura 10 - Micrografias MEV de uma esfera de alginato de cálcio contendo biomassa catalítica



Fonte: Adaptado de Gonçalves (2019).

Nota: Esfera de alginato de baixa viscosidade (4,0% m/m) reticulada com Ca^{2+} na concentração de $0,2\text{mol.L}^{-1}$ contendo a biomassa catalítica (aumento de 50 vezes).

3.5.1 Imobilização de frutossiltransferases

A imobilização de frutossiltransferases em diferentes matrizes, visando otimização das características operacionais na produção de FOS, vêm sendo amplamente investigada pela comunidade científica.

Yun e Song (1996) conduziram estudos acerca da produção de frutooligossacarídeos a partir de frutossiltransferases extracelulares imobilizadas em resinas altamente porosas (Diaion HPA 25, Mitsubishi Chemical Co., Japan). Os resultados relatados indicam excelente estabilidade operacional, com manutenção expressiva da atividade catalítica por 30 dias, alcançando uma produtividade de $1174\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de FOS, significativamente próxima a obtida com a enzima livre nas mesmas condições de operação.

Platková et al (2006), avaliaram a imobilização de frutossiltransferases miceliais, visando a produção de FOS, em resinas comerciais de troca iônica, por fixação direta ou fixação combinada à reticulação. Os procedimentos foram avaliados quanto a estabilidade de armazenamento e atividade. Concluiu-se que a adsorção simples em resinas Dowex Marathon MAS® e Amberlite IRA 900® garantem os melhores resultados operacionais.

Onderkov, Bryjak e Polakovi (2007) desenvolveram estudos de imobilização de FTase micelial de *Aureobasidium pullulans* por associação covalente aos copolmeros acrilato de butilla e dimetacrilato de etileno glicol. Utilizou-se gluteraldeído como ativador, obtendo-se um aumento das estabilidades térmica e operacional e uma atividade do biocatalisador imobilizada semelhante ao da enzima livre.

Kamimura et al. (2009) estudaram a imobilização de frutossiltransferases miceliais de *Pichia pastoris*, reticuladas com gluteraldeído, em um *blend* de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio. Foi aplicado um planejamento fatorial visando a otimização das condioes de encapsulamento. As concentraoes ótimas foram: gelatina (3-4,2%), alginato de sódio (1,5-2%) e cloreto de cálcio de 0,1 a 0,2 M. Relatou-se uma melhora nas características mecânicas e nas estabilidades térmica e operacional da enzima imobilizado e um decréscimo acentuado na atividade catalítica.

Aguiar-oliveira e Maugeri (2010) investigaram a imobilização de FTases extracelulares de *Rhodotorula sp.* em minério de nióbio por adsorção. A enzima imobilizada apresentou alta atividade e boa estabilidade nos valores de pH de 4,5 e 6,0. O tempo de meia vida do biocatalisador a 48 ° C sob ph controlado na faixa de 4,5 a 6,0 foi de 72 dias. A atividade da enzima imobilizada foi comparável  da enzima livre, e a concentração de substrato ótima foi reduzida de 785g.L para 600g.L⁻¹.

Ganaie, Lateef e Gupta (2014a) investigaram a imobilização de frutossiltransferases miceliais em quitosana e gel de alginato e sua aplicação na produção de FOS. Foi verificada uma melhoria da resistência mecânica dos materiais e um aumento da resistência térmica. A análise comparativa das matrizes indicou que o alginato apresentou resultados mais promissores do que a quitosana.

Gabrielczyk, Duensing, Buchholz, Schwinges e Jrdening (2018) estudaram a imobilização por encapsulação de frutossiltransferases, oriundas de *Bacillus subtilis*, em polímeros biodegradáveis por meio de diferentes técnicas: emulsão, suspensão e eletrofiação coaxial. Foram reportados resultados positivos de incremento da atividade, de até 30 U.mg⁻¹, na imobilização por fibras coaxiais, e aumento na estabilidade operacional, com retenção de atividade significativa em reator de leito fixo por 700 h.

Gonçalves (2018) investigou as condioes de imobilização de FTases micelial em alginato de cálcio e de bário, e sua aplicação na produção de

frutooligossacarídeos. Foram avaliadas as condições de imobilização, obtendo-se resultado ótimo de síntese para uma solução de 4,0 % (m/m) de alginato de baixa viscosidade, com concentração de biomassa seca nas esferas de 3,0% (m/m) e diâmetro da abertura do bico de gotejamento utilizado de 0,7 mm. Foram relatadas melhorias significativas nas propriedades térmicas, mecânicas e operacionais da enzima imobilizada em regime batelada.

3.6 TRANSFERÊNCIA DE MASSA

Reações catalíticas enzimáticas sucedem-se na interface ativa dos biocatalisadores. Para tanto, deve ocorrer o transporte do substrato reagente, do fluido de alimentação, para o sítio ativo, conjecturando a influência considerável dos fenômenos de transferência de massa na eficiência de conversão de tais reações (FOGLER, 2012).

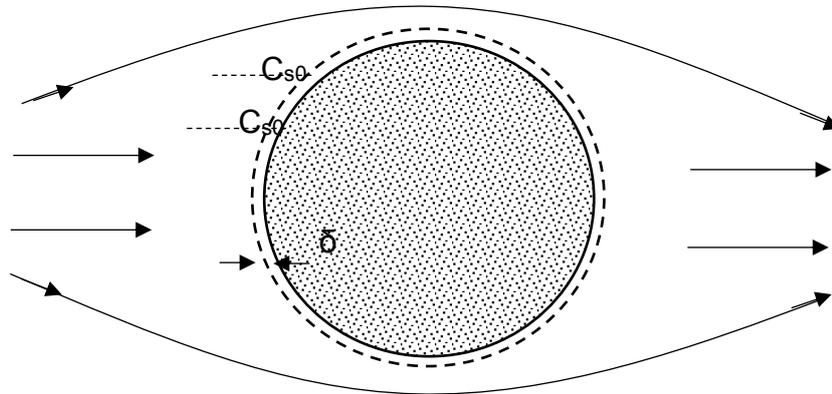
Em reações heterogêneas com imobilização, a interferência da transferência de massa tende a ser ainda mais acentuada, visto que o soluto deve se transportar do seio do fluido para a interface da partícula e, em seguida, difundir-se radialmente até o centro da partícula, alcançando as cavidades ativas e servindo de substrato para os biocatalisadores (DORAN, 1995).

Portanto, pode-se realizar a análise do processo de transporte mássico subdividindo-se a transferência em transferência de massa externa, e transferência de massa interna à partícula.

3.6.1 Transferência de massa externa

A transferência de massa externa à partícula catalítica pode ser modelada por meio da teoria do filme estagnado, que pressupõe a existência de uma camada fictícia de fluido, de espessura δ , adjacente à superfície da esfera catalítica, que concentra toda a resistência à transferência de massa (BAILEY; OLLIS, 1977). A Figura 10 apresenta a representação de uma partícula isolada de catalisador.

Figura 11 - representação da partícula de catalisador para balanço de massa



Fonte: Autor.

Desse modo, o fluxo de substrato transferido do fluido para a interface de uma partícula catalítica isolada pode ser descrito por:

$$N_s = k_s(C_{s0} - C_{sb}), \quad (11)$$

Sendo N_s o fluxo unidirecional do substrato, C_{s0} e C_{sb} são as concentrações de substrato na interface da partícula e no seio do fluido, respectivamente, e k_s é o coeficiente de transferência de massa.

O coeficiente de transferência de massa é uma função das propriedades físicas e das condições hidrodinâmicas do sistema, e pode ser avaliado a partir de correlações adimensionais. Para transferência de massa sob escoamento em torno de uma partícula de geometria esférica pode-se determinar k_s em função do número de Sherwood (Sh), do diâmetro da partícula (d_p) e da difusividade mássica (FOGLER, 2012).

$$k_c = \frac{Sh \cdot D_{AB}}{d_p}, \quad (12)$$

O número de Sherwood representa a razão entre a transferência de massa convectiva e difusiva, e pode ser calculado por:

$$Sh = 2 + 0,6 \cdot Re^{0,5} \cdot Sc^{\frac{1}{3}}, \quad (13)$$

em que Re é o número de Reynolds e Sc é o número de Schmidt, que representa a razão entre a difusividade de momento e a difusividade mássica, calculados, respectivamente, pelas Equações 14 e 15:

$$Re = \frac{U.D}{\nu}, \quad (14)$$

$$Sc = \frac{\nu}{D_{AB}}, \quad (15)$$

sendo D o diâmetro do reator, ν a viscosidade cinemática, U a velocidade de escoamento do fluido reagente e D_{AB} o coeficiente de difusão do soluto (A) no fluido (B). A difusividade do substrato em água pode ser determinada por meio de correlações empíricas, como a Equação de Darken (Equação 16), que relaciona os valores de difusão para diluição infinita do soluto no solvente e do solvente no soluto. (CREMASCO, 2016).

$$D_{AB} = X_A D_{0BA} + X_B D_{0AB}, \quad (16)$$

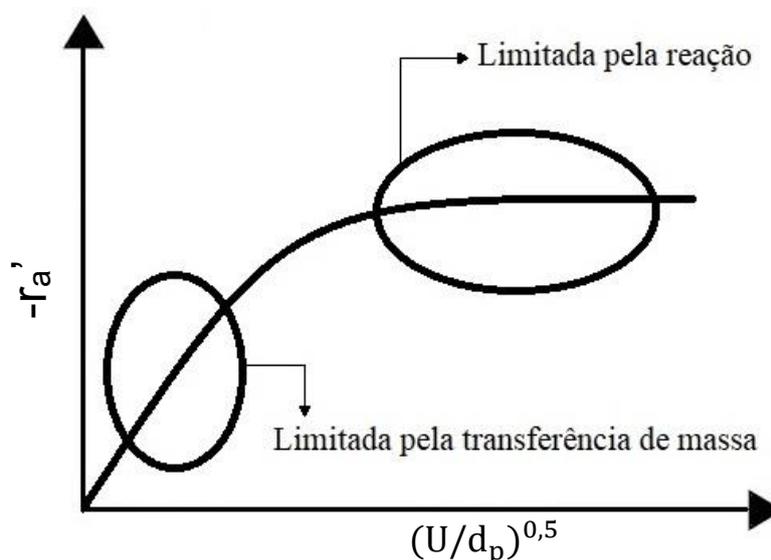
sendo x_A e x_B as frações molares dos soluto e do solvente e D_{0BA} D_{0AB} os coeficientes de difusão para diluição infinita do solvente no soluto e do soluto no solvente, respectivamente. Para estimar os coeficientes de difusão D_{0BA} e D_{0AB} pode-se empregar a correlação de Geankoplis, indicada para avaliação de difusividades de açúcares e proteínas em geral (CREMASCO, 2016)..

$$D_{0AB} = \frac{9,40 \cdot 10^{-11} \cdot T}{MM_A^{\frac{1}{3}} \cdot \mu_B}, \quad (17)$$

sendo T a temperatura absoluta da solução, a μ viscosidade dinâmica, e MM a massa molar.

A interferência da transferência de massa externa na taxa de desenvolvimento da reação pode ser avaliada por meio da construção de um gráfico relacionando a velocidade de consumo dos reagentes com a raiz da razão entre velocidade superficial e diâmetro de partícula (Figura 11).

Figura 12 - Regiões de limitação pela transferência de massa e pela própria reação



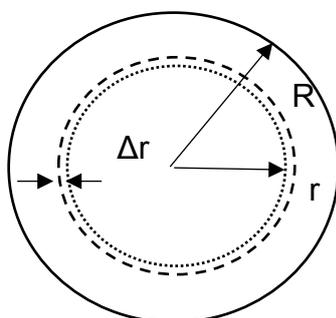
Fonte: Adaptado de Fogler (2012).

Para pequenos valores do coeficiente $(U/d_p)^{0,5}$, observa-se a correspondência de baixas velocidades de reação, indicando uma região onde prevalece a limitação da transferência de massa no processo de conversão. A mitigação de tais efeitos pode ocorrer por meio do incremento do fator $(U/d_p)^{0,5}$, com o aumento da vazão, proporcionando um aumento da velocidade superficial, ou mediante diminuição do diâmetro das partículas do catalisador (DORAN, 1995; FOGLER, 2012).

3.6.2 Transferência de massa interna

A análise da transferência de massa interna demanda o balanço de massa, em estado estacionário, no interior da partícula catalítica (Figura 12). Para tanto, toma-se uma casca esférica de espessura diferencial, com raio interno (r) e raio externo ($r + \Delta r$), procedendo-se a integração para toda a dimensão radial (DORAN, 1995).

Figura 13 - Representação da partícula de catalisador para balanço de massa



Fonte: Autor.

Com o objetivo de construir o modelo matemático do sistema, são estabelecidas as seguintes considerações: (i) assume-se que a transferência de massa no interior da partícula ocorre exclusivamente via difusão e que pode ser acuradamente descrita pela lei de Fick, considerando-se a difusividade efetiva constante; (ii) pressupõe-se a inexistência de gradientes de temperatura no interior da esfera e (iii) que a concentração de substrato varie exclusivamente com relação ao raio (DORAN, 1995; FOGLER, 2012; BAILEY; OLLIS, 1977). Portanto, tem-se que:

$$D_e \frac{dC_S}{dr} 4\pi r^2 \Big|_{r+\Delta r} - D_e \frac{dC_S}{dr} 4\pi r^2 \Big|_r - r_S 4\pi r^2 = 0, \quad (18)$$

em que D_e é a difusividade efetiva, r é o raio da partícula, C_S é a concentração de substrato. O coeficiente de difusão efetiva busca descrever a influência da geometria dos poros da partícula catalítica sobre a difusividade, e pode ser predito a partir do conhecimento de propriedades conformacionais do catalisador, como tortuosidade (τ) e porosidade (ϕ). Schmideder et al. (2019) estudaram os efeitos difusionais em esferas de biomassa de *Aspergillus niger* MF22.4 e propuseram um modelo capaz de prever, com 95% de acurácia, a difusividade efetiva em fungos filamentosos.

$$D_{Ae} = D_{AB} \cdot \phi^2, \quad (19)$$

sendo D_{AB} o coeficiente de difusão em solução e ϕ a porosidade da partícula.

Dividindo-se a Equação 20 por $4\pi\Delta r$ e tomando o limite de $\Delta r \rightarrow 0$, obtém-se:

$$\lim_{\Delta r \rightarrow 0} \frac{D_e \frac{dC_S}{dr} 4\pi r^2 \Big|_{r+\Delta r} - D_e \frac{dC_S}{dr} 4\pi r^2 \Big|_r}{\Delta r} = \frac{d}{dr} \left(D_e \frac{dC_S}{dr} r^2 \right) - r_s r^2 = 0, \quad (20)$$

Aplicando-se o operador de derivada ao termo entre parênteses e dividindo por $r^2 D_e$, obtém-se a equação diferencial de segunda ordem:

$$\frac{d^2 C_S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_S}{dr} = \frac{r_s}{D_e}, \quad (21)$$

Para a qual tem-se as seguintes condições de contorno:

$$\begin{cases} C_S|_{r=R} = C_{S0} \\ \frac{dC_S}{dr} \Big|_{r=0} = 0 \end{cases}, \quad (22)$$

que indicam, respectivamente, que a concentração de substrato na parede interna da esfera é igual à concentração do meio externa, e que o perfil de distribuição é simétrico com relação ao centro da partícula. A fim de solucionar a equação diferencial define-se os parâmetros adimensionais:

$$\bar{r} = \frac{r}{R}, \quad (23)$$

$$\bar{C}_S = \frac{C_S}{C_{S0}}, \quad (24)$$

E obtém-se:

$$\frac{d^2 \bar{C}_S}{d\bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}} \frac{d\bar{C}_S}{d\bar{r}} = \frac{r_s R^2}{D_e C_{S0}}, \quad (25)$$

Para encontrar a solução da Equação 25, faz-se necessária a definição da cinética reacional. Adotando-se a cinética de Michaelis-Menten, amplamente empregada para descrever sistemas enzimáticos, já com as variáveis

adimensionalizadas, obtém-se

$$\frac{d^2\bar{C}_S}{d\bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}} \frac{d\bar{C}_S}{d\bar{r}} = \frac{v_{m\acute{a}x}\bar{C}_S}{k_m + C_{S0}\bar{C}_S} \frac{R^2}{D_e}, \quad (26)$$

Tomando-se $\beta = \frac{K_m}{C_{As}}$, reescreve-se:

$$\frac{d^2\bar{C}_S}{d\bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}} \frac{d\bar{C}_S}{d\bar{r}} = \frac{v_{m\acute{a}x}R^2}{D_e} \frac{\bar{C}_S}{1 + \beta\bar{C}_S}, \quad (26)$$

A magnitude do parâmetro β pode ser interpretada como uma medida do desvio da cinética de primeira ordem, com grandes valores indicando aproximação de uma cinética de ordem zero. A partir da Equação 26 é possível introduzir um segundo termo:

$$\Phi^2 = \frac{R^2 v_{m\acute{a}x}}{k_m D_e}, \quad (27)$$

conhecido como módulo de Thiele. Tal parâmetro descreve a relação entre as taxas de difusão e reação em catalisadores porosos. Para valores de Φ^2 significativamente maiores que 1, conclui-se que o sistema é limitado pela ação da difusão, e para valores menores que 1, admite-se que o regime é limitado pela reação química (FOGLER, 2012). O módulo de Thiele pode assumir diversas configurações a depender da cinética adotada e da geometria do sistema. Dessa maneira, uma forma generalizada do modulo de Thiele, independente da dedução do balanço mássico (DORAN, 1995), pode ser determinada por:

$$\Phi = \frac{V_p}{S_x} \frac{r_s|_{C_{S0}}}{\sqrt{2}} \left(\int_{C_{S,eq.}}^{C_{S0}} D_e r_s dC_S \right)^{1/2}, \quad (28)$$

onde V_p é o volume de catálise, S_x é a área da superfície externa e $r_s|_{C_{S0}}$ é a velocidade de reação quando a concentração de substrato no interior da partícula é igual à

concentração da superfície externa. Utilizando a Equação 28 é possível determinar os módulos de Thiele para geometria esférica e cinéticas de ordem zero, primeira ordem e Michaelis-Menten, respectivamente:

$$\Phi_0 = \frac{R}{3\sqrt{2}} \left(\frac{k_0}{D_e C_{S0}} \right)^{1/2}, \quad (29)$$

$$\Phi_1 = \frac{R}{3} \left(\frac{k_0}{D_e} \right)^{1/2}, \quad (30)$$

$$\Phi_M = \frac{R}{3\sqrt{2}} \left(\frac{v_{m\acute{a}x}}{D_e C_{S0}} \right)^{1/2} \left(\frac{1}{1+\beta} \right) \left(1 + \frac{1}{\beta} \ln \frac{1}{1+\beta} \right)^{-1/2}, \quad (31)$$

Dessa forma, a transferência de massa interna em uma partícula catalítica pode ser descrita pela equação diferencial:

$$\frac{d^2 \bar{C}_S}{d\bar{r}^2} + \frac{\bar{r}}{2} \frac{d\bar{C}_S}{d\bar{r}} = \Phi^2 \frac{\bar{C}_S}{1+\beta C_S}, \quad (32)$$

Buscando-se avaliar a influência da transferência de massa na reação global, define-se o fator de efetividade η , tido como a razão entre a taxa de reação observada e a taxa de reação na ausência de resistência à transferência de massa, ou seja, a taxa de reação caso toda o interior da partícula fosse submetido à concentração da superfície externa

$$\eta = \frac{\text{tx. de reação observada}}{\text{tx. de reação sem limitação de transferência de massa}}, \quad (33)$$

Valores de η próximos a 1 indicam similaridade entre a taxa de reação observada e a taxa de reação na ausência de resistência difusiva, resultando em baixa influência dos fenômenos de transferência de massa internos. Para sistemas sob significativa influência relativa da transferência de massa interna, observam-se altos valores de η , pois a taxa observada é diminuída pela atenuação da concentração de substrato no interior da partícula (BAILEY; OLLIS, 1977).

O fator de efetividade, todavia, não pode ser avaliado analiticamente quando a cinética reacional assume formas não lineares, como o caso estudado de Michaelis-Menten, pois a Equação 32 admite, tão somente, solução numérica, sendo inviável descrever a concentração em função do raio da partícula para a taxa de reação observada.

Dessa forma, é possível estabelecer-se uma aproximação com base na análise da cinética reacional. Avaliando-se a equação proposta por Michaelis-Menten, tem-se:

$$-r_s = v_{m\acute{a}x} \frac{[S]}{k_{M'} + [S]}, \quad (34)$$

Quando a concentração de substrato é muito maior do que a constante de Michaelis-Menten, ou seja, $[S] \gg k_m$, tem-se que a Equação 34 se reduz a:

$$-r_s = v_{m\acute{a}x}, \quad (35)$$

que descreve uma cinética de ordem zero. Quando a concentração de substrato é muito menor do que a constante de k_m , $[S] \ll k_m$, tem-se que a Equação 34 se aproxima de:

$$-r_s = \frac{v_{m\acute{a}x}}{k_{M'}} [S], \quad (36)$$

que equivale a um perfil cinético de primeira ordem. Portanto, conclui-se que a cinética michaelinana possui ordem intermediária entre zero e um, e sua posição relativa depende da proporção descrita pela constante β . Portanto, uma aproximação razoável decorre da análise da ordem da cinética de Michaelis-Menten, para valores de $\beta \rightarrow \infty$, adota-se a expressão de efetividade para cinética de ordem 0:

$$\eta_{i0} = 1; \text{ para } 0 < \Phi_0 \leq 0,577, \quad (37)$$

onde Φ_0 é o módulo de Thiele para geometria esférica e cinética de ordem zero, calculado pela Equação 29 com $k_0 = v_{m\acute{a}x}$. Para valores de $\beta \rightarrow 0$ adota-se a

efetividade de uma cinética de primeira ordem:

$$\eta_{i1} = \frac{1}{3\Phi_1^2} (3\Phi_1 \cdot \coth 3\Phi_1 - 1), \quad (38)$$

onde Φ_1 é o módulo de Thiele para geometria esférica e cinética de primeira ordem, calculado pela Equação 30 com $k_0 = v_{m\acute{a}x}/k_m$. Para valores intermediários do parâmetro β , pode-se utilizara a equação proposta por Moo-Young e Kobayashi (1972):

$$\eta_m = \frac{\beta\eta_0 + \eta_1}{1 + \beta}, \quad (39)$$

3.7 REATORES DE LEITO FIXO

Reatores de leito fixo (PBR) consistem em reatores cilíndricos tubulares preenchidos com partículas imobilizadas de catalisadores, que são submetidas ao escoamento dos reagentes (FOGLER, 2012). Para que a reação ocorra, a mistura reacional deve estabelecer contato adequado com as partículas catalíticas, sendo necessário, portanto, um fluxo aleatório e bem distribuído de reagentes. (AZEREDO, 1996; FEYO DE AZEVEDO et al., 1990)

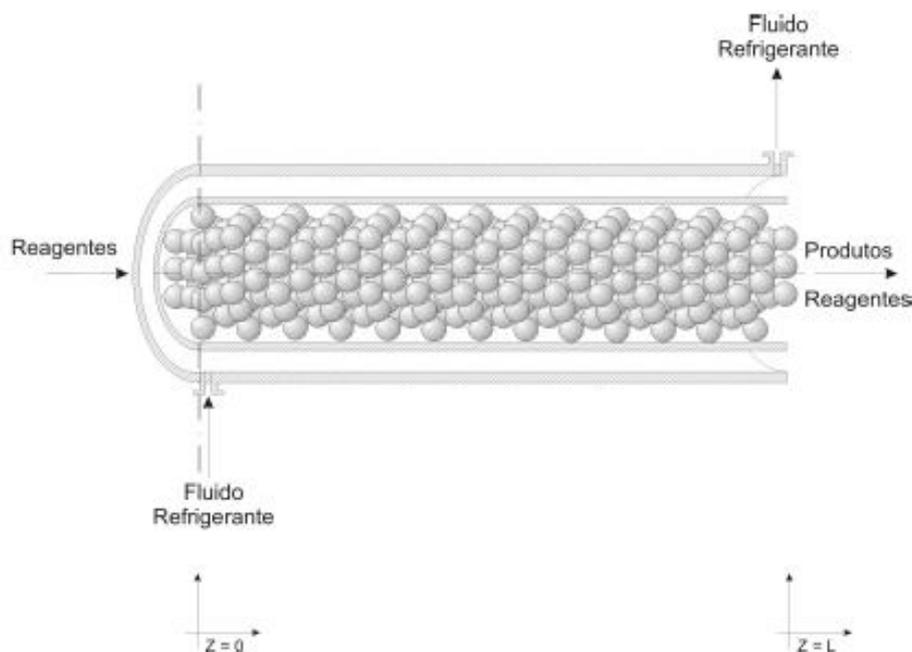
Grande parte dos processos químicos atualmente implementados no setor industrial utiliza, em alguma escala, reatores de leito fixo. As sínteses de metanol, ácido sulfúrico e amônia pela indústria química, a reforma catalítica e os processos de isomerização e polimerização pela indústria petroquímica são exemplos de aplicações da catálise em reatores de leito empacotado (FROMENT; BISCHOFF, 1990; HILL, 1977; MORAIS, 2007a; MORAIS, 2007b).

Reatores PBR apresentam uma vasta gama de características atrativas, possuindo operação e implementação simplificadas, acarretando em baixos custos de manutenção e construção. A imobilização do catalisador elimina necessidade de etapas de separação, permitindo, também, longas escalas de operação ininterruptas. Os reatores de leito fixo possuem, ainda, grande flexibilidade operacional, mantendo operacionalidade em extensas faixas de temperatura, pressão e vazão (FOGLER, 2012; HILL, 1977; MORAIS, 2007).

A Figura 13 apresenta o esquema de operação de um reator de leito fixo clássico. Os reagentes na fase fluida são alimentados em fluxo axial na coluna de

reação cilíndrica empacotada com partículas catalíticas imobilizadas, com dimensões uniformes para favorecer a distribuição do escoamento. O controle térmico do processo é exercido pela ação do fluido refrigerante que envolve a carcaça do reator (FOGLER, 2012; HILL, 1977).

Figura 14 - Esquema de um reator catalítico de leito fixo



Fonte: Morais (2007, p.6).

A utilização de reatores PBR na produção de frutooligossacarídeos valendo-se de frutossiltransferases imobilizadas constitui uma promissora frente de desenvolvimento do escalonamento industrial da produção de FOS. A produção contínua desenvolvida em PBR possibilita a geração de altos volumes de produto e uma maior efetividade frente à operação em regime batelada. A aplicação do biocatalisador encapsulado confere um aumento das estabilidades operacional e térmica do processo, permitindo a operação por extensos períodos de tempo e diminuindo a suscetibilidade à degradação térmica enzimática. Adicionalmente, diminui a influência dos efeitos de lixiviação e carreamento do catalisador, garantindo altas taxa de retenção enzimática no leito catalítico, o que simplifica o processo de separação e aumenta a eficiência do processo. Essas vantagens constituem atrativos significativos à diminuição dos custos associados à produção da enzima e à condução

da reação, justificando o desenvolvimento de processos operacionais empregando reatores de leito catalítico (ZAMBELLI et al., 2016; JUNG et al. 2011; CHIEN et al., 2001; GANAIE; LATEEF; GUPTA 2014; PARK et al., 2005; YUN, KANG; SONG, 1995; FOGLER, 2012).

3.7.1 Produção de FOS em reator de leito fixo

O atual desafio encontrado na produção de FOS está relacionado à melhoria da atratividade financeira do processo. Apesar do alto valor agregado inerente ao produto e da demanda certificada, os custos relacionados à obtenção do biocatalisador acabam sendo fatores predominantemente impeditivos. Desta maneira, diversos estudos vêm sendo conduzidos visando a viabilização da produção industrial.

Chien Lee e Lin (2001) estudaram a imobilização de *Aspergillus japonicus* celular em glúten e compararam sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos em reatores batelada e de leito fixo. Para o regime batelada, 1g da biomassa imobilizada foi adicionada a 100mL de um meio de sacarose 400g.L⁻¹, à temperatura de 37°C e agitação de 125rpm. Na produção contínua, 8g do biocatalisador imobilizado foram empacotadas em uma coluna de 18cmx1,55cm, mantendo-se a temperatura e a composição do substrato idênticos à batelada, com um fluxo volumétrico de 0,8mL min⁻¹. A produtividade alcançada no regime contínuo foi de 173g.L⁻¹.h⁻¹, quase duas vezes superior a apresentada no regime batelada. Também se verificou a boa estabilidade operacional dos biocatalisadores, que mantiveram atividade significativa com até 34 dias de operação.

Jung et al. (2011) estudaram o escalonamento da produção contínua de frutooligossacarídeos por *Aureobasidium pullulan* a nível industrial, partindo de estudo prévio em bancada demonstrando viabilidade do processo. A biomassa foi imobilizada em esferas de alginato de cálcio com cerca de 2mm de diâmetro. O reator de 1,2m³ foi alimentado com 0.72m³ de esferas de alginato e a reação foi conduzida à temperatura constante de 50°C, com substrato, na concentração de 770g.L⁻¹, alimentado à vazão de 200L.h⁻¹, com pH mantido na faixa 6-7. Alcançou-se uma produtividade de 180g.L⁻¹.h⁻¹, aliada a verificação de um processo produtivo estável,

com atividade relevante mantida por 100 dias. Também se verificou que as principais variáveis envolvidas no processo produtivo de FOS são: a vazão e a concentração do substrato, a temperatura e o pH.

Lorenzoni et al. (2015), estudaram a imobilização de frutofuranosidades e frutossiltransferases em esferas de quitosana por ligação covalente, utilizando gluteraldeído como agente reticulante. A produção de FOS foi avaliada em reatores de leito fixo e fluidizado empregando-se solução de sacarose a 600g.L e pH 5,5 como substrato. Os reatores de leito fixo destacaram-se apresentado maiores volumes produtivos de FOS. A estabilidade operacional foi mantida por 40 dias.

Zambelli et al. (2016) propuseram a criação de um processo contínuo em reator de leito fixo, utilizando frutossiltransferases obtidas de *Cladosporium cladosporioides* MUT 5506. As enzimas miceliais foram encapsuladas em alginato de cálcio, seguindo metodologia proposta por Fernandez-arrojo et al. (2013). As cápsulas de alginato foram secas por fluxo de ar até evaporação da água livre. Posteriormente, as esferas secas foram inseridas na coluna e conduziu-se a reação à temperatura de 35°C, com alimentação de sacarose à concentração de 600g.L⁻¹, em tampão de acetato pH 6,0. O resultado obtido para a produção de FOS foi de até 1,7 vezes maior que as taxas de obtenção apresentadas pelas metodologias convencionais em reatores batelada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DA BIOMASSA CATALÍTICA

4.1.1 Microrganismo e condições de cultivo

Para a produção da biomassa catalítica, contendo a enzima FTase, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). Os esporos liofilizados do microrganismo foram ressuspensos em 10mL de água destilada estéril e alíquotas de 70µL foram inoculadas em meio sólido, preparado em placa de Petri, contendo (em %, m/v): ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0, glicerina (Isofar®) 2,5, extrato de levedura (Synth®) 0,5 e glicose (Dinâmica®) 2,5. Após incubação por 7 dias a 30 °C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371), os esporos produzidos foram coletados, por meio de raspagem utilizando alça de Drigalski, em 10mL de solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95% (m/v) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1% (v/v). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isolar®) 20,0% (m/v), cujo volume foi variável, de modo a ajustar a concentração de esporos para aproximadamente 1×10^7 esporos.mL⁻¹, quantificado com auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®), seguido de armazenamento sob refrigeração (CUNHA, 2017; FARIA, 2019; GARCIA, 2018).

4.1.2 Produção da biomassa catalítica por fermentação submersa

O meio de cultura sintético, utilizado para a fermentação e produção da biomassa catalítica, foi constituído por (em %, m/v): sacarose (Synth®) 15,0, extrato de levedura (Synth®) 0,5, NaNO₃ (Dinâmica®) 0,5, KH₂PO₄ (Synth®) 0,2, MgSO₄.7H₂O (Dinâmica®) 0,05, MnCl₂.4H₂O (Synth®) 0,03 e FeSO₄.7H₂O (Synth®) 0,001. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,5 com solução de NaOH (Synth®) 0,01mol.L⁻¹. Foram distribuídos 50mL deste meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250mL e, em seguida, autoclavados a 120°C e 1atm durante 20 minutos (CUNHA, 2017; CUNHA et al., 2019; FARIA, 2019; GARCIA, 2018).

A fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo *Shaker* TE-4200

(Tecnal®) a 30°C e 200rpm ao longo de 64h de processo, inoculando-se 0,5mL de suspensão de esporos com concentração de 1×10^7 esporos.mL⁻¹ em meio de cultura estéril (CUNHA et al., 2019; GARCIA, 2018; GONÇALVES et al., 2020). O conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi filtrado à vácuo, com auxílio de uma bomba TE-058 (Tecnal®), utilizando papel filtro do tipo Whatman nº1 com diâmetro de 90mm. A biomassa catalítica, retida no papel, foi pesada e armazenada sob refrigeração para ensaios posteriores de imobilização.

4.2 IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA CATALÍTICA EM ESFERAS DE GEL DE ALGINATO DE CÁLCIO

Os ensaios de imobilização da biomassa catalítica, por encapsulamento em gel de alginato, foram realizados conforme método descrito por Gonçalves (2019). Preparou-se uma solução de alginato de baixa viscosidade 4% (m/m) (Sigma Aldrich®, EUA) em água destilada e a mesma foi mantida sobre agitação magnética constante à temperatura ambiente, por aproximadamente 1h, até completa dissolução e homogeneização do material.

Adicionou-se, à solução, biomassa catalítica úmida de forma que o teor desta, na solução final, atingisse 23,08% (m/m), visando a composição final de 3,0% (m/m) de biomassa seca. Submeteu-se, então, a suspensão a um tratamento cisalhante promovido por um Ultra Turrax® (modelo T18 basic, IKA Werke, Staufen, Alemanha) por 2min na rotação de 1000rpm.

Para obtenção das esferas de alginato de cálcio, realizou-se o gotejamento da suspensão obtida, adotando-se vazão média de 140gotas.min⁻¹, em solução de cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O) (Synth®, Brasil) 0,2mol.L⁻¹, nas proporções de 41,17% (m/m) de suspensão de alginato e biomassa e 58,83% (m/m) de solução de cloreto de cálcio (solução reticulante). As proporções mássicas foram otimizadas por Gonçalves (2019).

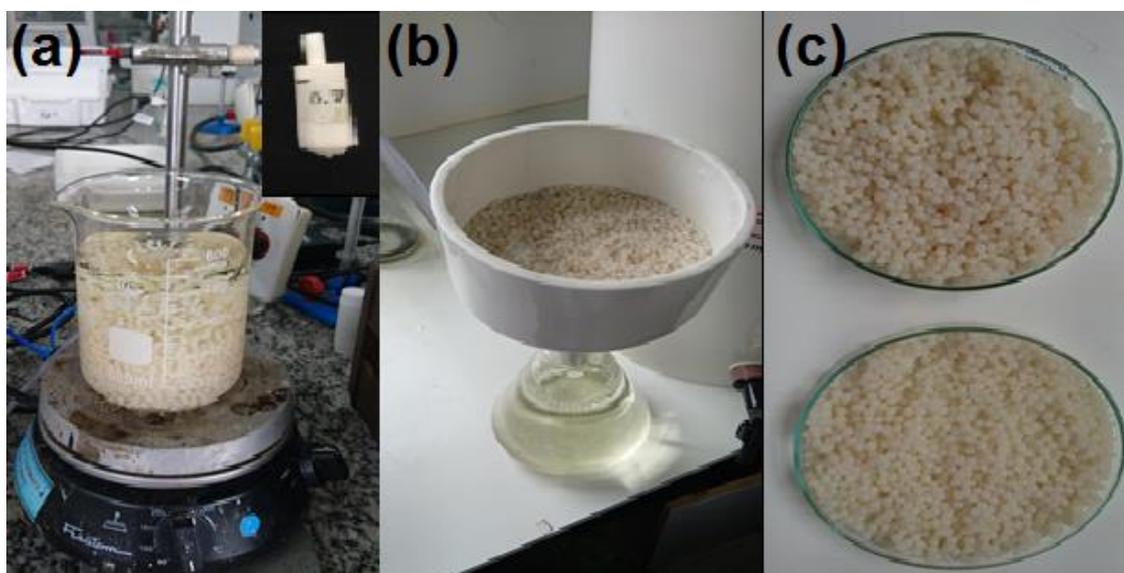
A suspensão obtida (biomassa catalítica em alginato) foi conduzida por uma bomba peristáltica (Pump IV, BCC, Áustria) com controle de rotação acoplada a uma mangueira de silicone de 3mm de diâmetro interno e 5mm de diâmetro externo. Essa mangueira foi conectada ao bico aspersor de gotejamento.

Os bicos de gotejamento consistiam de tarugos com cerca de 40mm de comprimento, usinados de peças de teflon®, de 12mm de diâmetro. Uma extremidade

do tarugo foi rebaixada até 4,5mm de diâmetro para receber a mangueira de silicone. A outra extremidade foi torneada formando um pequeno tubo (bico de 2mm de comprimento) com uma parede de 0,15mm de espessura. O eixo do tarugo foi perfurado por uma broca de 1mm de diâmetro, exceto na extremidade do bico (1cm), em que a aberturas foi de 0,7.

De acordo com Gonçalves (2019), a distância entre o bico de gotejamento e a solução de alginato foi fixada em 10cm. As esferas obtidas, com diâmetro de aproximadamente 2mm, foram mantidas na solução reticulante, à temperatura ambiente, por 15 minutos após o gotejamento da última esfera. Na maioria dos casos, um tempo de gelificação mínimo de 15 minutos é suficiente para obter partículas de tamanho uniforme e formato esférico (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013). Em seguida, foram separadas por filtração à vácuo utilizando papel de filtro qualitativo, lavadas com água destilada e secas em papel macio para composição do leito catalítico do reator PBR. As etapas do procedimento de imobilização são apresentadas na Figura 15.

Figura 15 - Procedimento experimental aplicado na etapa de imobilização, por encapsulamento, da biomassa catalítica



Fonte: Autor.

Legenda: (a) gotejamento da suspensão de biomassa em alginato 4 % em solução de cloreto de cálcio $0,2\text{mol.L}^{-1}$ e bico injetor (canto superior), (b) filtração à vácuo da solução, (c) biomassa catalítica imobilizada em alginato.

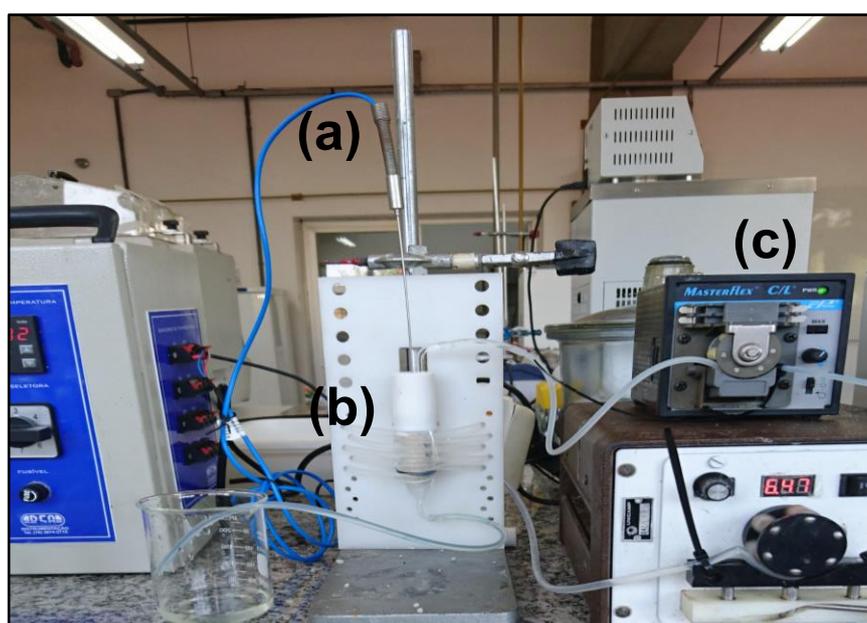
4.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM REATOR ENZIMÁTICO DE LEITO FIXO (PBR)

4.3.1 Especificações do reator PBR e montagem do aparato experimental

Para a obtenção dos perfis de atividade enzimática, montou-se o aparato experimental esquematizado na Figura 16. Uma bomba peristáltica (Pump IV, BCC, Áustria), com controle de vazão, foi utilizada para alimentar a solução reagente (sacarose), em fluxo descendente, até a entrada do reator PBR. O reator foi recheado com 12g de esferas de alginato (2mm de diâmetro) contendo a biomassa catalítica encapsulada (biocatalisador). Uma mangueira de silicone, envolvendo as paredes externas do reator, foi utilizada para controle de temperatura reacional por meio da recirculação de água oriunda de um banho termostático (Tecnal®, Modelo TE-2000). O monitoramento da temperatura no interior do leito catalítico foi realizado com o auxílio de um termopar.

O reator utilizado foi construído em vidro, contendo 7,5cm de altura e 2,1cm de diâmetro, equipado com bandejas de distribuição, nas suas entrada e saída, usinadas em material Teflon®, afim de homogeneizar a dispersão radial de substrato (solução reagente). A coleta das amostras foi realizada na saída inferior do reator.

Figura 16 – Aparato experimental



Fonte: Autor.

Legenda (a) termopar; (b) reator, (c) bombas peristálticas

4.3.2 Influência da temperatura reacional e vazão volumétrica nas atividades enzimáticas

Ensaio de planejamento experimental foram aplicados visando avaliar a influência dos parâmetros operacionais nos perfis de atividade enzimática em reator PBR recheado com biomassa catalítica encapsulada em esferas de alginato de cálcio. As variáveis temperatura e vazão de substrato foram escolhidas visando a transposição do processo batelada desenvolvido por Gonçalves (2019), que avaliou as melhores condições de diâmetro de partícula, pH e concentração de substrato.

Para tal estudo, foi empregado o software STATISTICA® versão 7.0 (StatSoft. Inc. 2007, EUA). Realizou-se um planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com quatro pontos fatoriais (2^2), 3 pontos centrais e quatro pontos axiais para o estudo de dois fatores: (i) vazão de alimentação de solução reagente e (ii) temperatura de reação; cada fator foi constituído por cinco níveis. Os pontos axiais foram adicionados no planejamento experimental para compor um modelo estatístico de segunda ordem, conforme disposto na matriz de planejamento (Tabela 2). Os valores dos fatores selecionados foram escolhidos após uma série de ensaios preliminares.

Tabela 2 - Matriz experimental DCCR

Ponto	Codificada		Descodificada	
	Temperatura (°C)	Vazão (mL.min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Vazão (mL.min ⁻¹)
1	1	1	60,0	10,0
2	1	-1	60,0	5,0
3	-1	-1	40,0	5,0
4	-1	1	40,0	10,0
5	-1,41	0	35,9	7,5
6	1,41	0	64,1	7,5
7	0	-1,41	50,0	4,0
8	0	1,41	50,0	11,0
9	0	0	50,0	7,5
10	0	0	50,0	7,5
11	0	0	50,0	7,5

Fonte: Autor.

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas também pelo software STATISTICA® versão 7.0 (StatSoft. Inc. 2007, EUA). Os modelos da superfície de resposta foram ajustados para duas variáveis de resposta (Y): (i) atividade de transfrutossilagem (em U.g⁻¹) e (ii) atividade hidrolítica (em U.g⁻¹), ambas para a biomassa catalítica encapsulada contendo a enzima FTase. As atividades enzimáticas foram determinadas conforme método descrito no item 4.5.1. A função resposta, de segunda ordem, para os dois fatores avaliados foi dada pela Equação 40 com p-valor ≤ 0,05.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_{12} AB + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 ; \quad (40)$$

em que A e B representam os níveis dos fatores vazão volumétrica (mL.min⁻¹) e temperatura reacional (°C), respectivamente, enquanto que β_0 , β_1 , β_2 , β_{12} , β_{11} e β_{22} representam os coeficientes estimados.

Os valores otimizados para os parâmetros temperatura reacional e vazão de alimentação foram utilizados para a realização dos ensaios posteriores.

4.3.3 Influência da concentração de substrato nas atividades enzimáticas e obtenção dos parâmetros cinéticos

Para avaliar a influência da concentração de substrato nas atividades enzimáticas do processo contínuo, foram preparadas soluções reagentes constituída por tampão tris-acetato 0,2mol.L⁻¹, pH 5,5 e sacarose comercial (União ®) nas concentrações de 100g.L⁻¹, 200g.L⁻¹, 300g.L⁻¹, 400g.L⁻¹, 500g.L⁻¹ e 600g.L⁻¹. A reação foi conduzida por 120 minutos à 50°C e vazão de 7,5mL.min⁻¹ no reator PBR, conforme aparato experimental descrito no Tópico 4.3.1. Após a obtenção das atividades de transfrutossilagem, os parâmetros cinéticos foram estimados, em regime estacionário, por meio de ajustes dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten, Hill e Andrews (Equações 7, 8 e 10, respectivamente) aos dados experimentais, mediante auxílio de software gráfico.

4.3.4 Ensaio de avaliação do regime operacional

Para se avaliar o regime operacional, em cinético ou difusional, observou-se a

influência da vazão volumétrica nas atividades enzimáticas, alimentou-se o reator PBR a diferentes vazões ($4,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $6,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $7,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $9,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $11\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) com solução reagente constituída por sacarose comercial (União ®) $400\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e tampão tris-acetato $0,2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5,5. A alimentação foi realizada por bombas peristálticas (Masterflex, modelo 77120-70 e MS TecnoPON, modelo LDP-201-3/DMC 100) e a reação enzimática foi conduzida a 50°C por 120 minutos.

4.3.5 Ensaio de estabilidade operacional

Os estudos de estabilidade operacional foram realizados em sistema reacional na ausência e presença de reciclo. Para isso, o reator PBR foi recheado com esferas de alginato (2 mm de diâmetro), contendo a biomassa catalítica encapsulada, e a reação foi conduzida a 50°C , alimentando a solução reagente com vazão volumétrica de $7,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com o auxílio de uma bomba peristáltica MS TecnoPON, modelo LDP-201-3/DMC 100. A solução reagente foi constituída por sacarose comercial (União ®) $400\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e tampão tris-acetato $0,2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 5,5. Para realizar o reciclo, a montagem do aparato experimental foi configurada de modo que toda a corrente do efluente do reator fosse reintroduzida como corrente de alimentação, caracterizando um reciclo total.

As amostras foram coletadas por 10 segundos (tempo necessário para obter amostra suficiente para análise) e os ensaios de estabilidade foram conduzidos por um período de 12h.

4.4 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA INTERNO (TMI) E EXTERNO (TME)

O coeficiente de transferência de massa externo foi obtido por meio da Equação (12). Para isso, determinaram-se os valores dos números adimensionais de Reynolds de partícula, Schmidt e Sherwood, utilizando, respectivamente, as Equações (14), (15) e (13). A velocidade de escoamento do fluido foi obtida considerando a vazão que resultou na maior atividade de transfrutossilagem e as dimensões do reator, apresentadas no Tópico 4.3.1. Para o cálculo coeficiente de difusão mássica (D_{AB}), as correlações de Darken (Equação 16) e Geankoplis (Equação 17) foram utilizadas.

Os módulos de Thiele e o fator de efetividade interna foram calculados por meio

das Equações (29) a (31) e (37) a (39), respectivamente. O coeficiente de difusão efetivo de massa, por se tratar de um fungo filamentoso, foi calculado pela Equação (19). O valor de C_{s0} foi determinado pela Equação (11).

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Determinação das atividades enzimáticas de transfrutoseilação e hidrolítica

Ao se coletar amostras na saída do reator PBR, as mesmas foram imersas em banho de água fervente durante 10 minutos, seguido por banho de água e gelo por 5 minutos, para interrupção da reação enzimática (CUNHA *et al.*, 2019; CUERVO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2007; OTTONI *et al.*, 2012). Posteriormente, as amostras foram utilizadas para a quantificação das concentrações de açúcares redutores (AR) e glicose (G) pelos métodos colorimétricos do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959, VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013) (Tópico 4.5.2) e GOD-PAP® (CUNHA, 2017; GANAIE; GUPTA 2014b; OLIVEIRA, 2007; VEJA e ZÚNIGA-HANSEN, 2011), (Tópico 4.5.3), respectivamente. Por fim, utilizando as concentrações obtidas de frutose transfrutoseilada (F_T) (Equação 43), determinou-se a atividade enzimática de transfrutoseilação (Equação 44). Adicionalmente, a atividade hidrolítica (Equação 45) foi obtida a partir da concentração de frutose (F) liberada no meio reacional (Equação 42). Uma unidade (1U) de atividade enzimática de transfrutoseilação e hidrolítica foram definidas, respectivamente, como a quantidade de enzima que transfere um micromol (1 μmol) de frutose ou libera um micromol (μmol) de frutose, por minuto, sob as condições experimentais realizadas. (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2019; OTTONI *et al.*, 2012).

$$[\text{AR}] = [\text{F}] + [\text{G}] \quad ; \quad (41)$$

$$[\text{F}] = [\text{AR}] - [\text{G}] \quad ; \quad (42)$$

$$[\text{F}_T] = [\text{G}] - [\text{F}] = 2[\text{G}] - [\text{AR}] \quad ; \quad (43)$$

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

Com a concentração de $[F_T]$, determinou-se a atividade de transfrutossilagem (A_T , em $U \cdot g^{-1}$ biomassa seca) e com a concentração de F , obteve-se a atividade hidrolítica (A_H , em $U \cdot g^{-1}$ biomassa seca)

$$A_T = \frac{[F_T]Q}{m_{biomassa}} ; \quad (44)$$

$$A_H = \frac{[F]Q}{m_{biomassa}} ; \quad (45)$$

em que Q refere-se à vazão volumétrica (em $L \cdot min^{-1}$) e $m_{biomassa}$ à massa de biomassa microbiana seca (em g). As atividades relativas foram calculadas tomando-se a razão da atividade, em um ponto experimental, pela maior atividade obtida no conjunto do experimento (Equação 46).

$$A_{Relativa \ t/h} = \frac{Atividade \ do \ ponto \ experimental}{Atividade \ máxima \ no \ conjunto} \cdot 100\% ; \quad (46)$$

Tais atividades foram utilizadas com intuito de diminuir a influência da variabilidade do microrganismos no processo.

4.5.2. Determinação da concentração de açúcares redutores (AR)

O método DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) foi utilizado para determinar a concentração de açúcares redutores (AR) presente no meio reacional (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Preparou-se a solução de DNS pela adição de 10g de ácido 3,5-dinitrossalicílico ($C_7H_4N_2O_7$) a 200mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) $2mol \cdot L^{-1}$ (solução A). Em paralelo, 300g de tartarato de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) foram dissolvidos em 500mL de água destilada (solução B). A solução A foi adicionada à solução B, sob aquecimento e agitação constantes, até a sua completa dissolução. Após resfriamento, a solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 1000mL e o seu volume foi completado com água destilada. O reagente foi então armazenado em frasco âmbar, ao abrigo da luz.

A quantificação dos açúcares redutores ocorreu pela adição, em tubo de

ensaio, de 0,5mL da amostra (efluente coletado do reator PBR) em 0,5mL da solução de DNS. A solução resultante foi colocada sob fervura por 10min e, em seguida, em banho de gelo por 5min. Feito isso, foram adicionados 4mL de água destilada a essa mesma solução. Para a obtenção do branco, as mesmas etapas foram realizadas, apenas substituindo a amostra por água destilada. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) no comprimento de onda de 540nm.

Para a construção da curva analítica do método DNS preparou-se uma solução padrão de glicose $1,0\text{g.L}^{-1}$ e, a partir desta, foram feitas as diluições necessárias para obter concentrações na faixa de 0,0 a $1,0\text{g.L}^{-1}$ (Figura 29 – Apêndice A).

4.5.3. Determinação da concentração de glicose (G)

O método GOD-PAP® foi empregado para a determinação da concentração de glicose no meio reacional, consistindo em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (PAD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato. A ação desse kit promove a oxidação da glicose pela glicose oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio, o qual é oxidado por meio da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem coloração rosácea (BOBBIO; BOBBIO, 2005; WONG; WONG; CHEN, 2008).

A quantificação da glicose ocorreu, em tubo de ensaio, pela adição de 35 μL da amostra (efluente coletado do reator PBR) em 3,5mL de solução do kit enzimático GOD-PAP® (Laborlab). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min. Para a obtenção do branco foram realizadas as mesmas etapas, apenas substituindo a amostra por água destilada. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) no comprimento de onda de 505nm. A concentração de glicose no meio reacional foi obtida por meio da curva analítica previamente preparada (Figura 30 – Apêndice B).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA REACIONAL E VAZÃO VOLUMÉTRICA NAS ATIVIDADES DE TRANSFRUTOSILAÇÃO E HIDROLÍTICA POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A matriz experimental foi elaborada (Tabela 2) e realizou-se a randomização da ordem de execução dos experimentos. A variável resposta foi definida como as atividades de transfrutosilação e hidrolítica exibidas pela biomassa catalítica no decorrer do regime estacionário da reação. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para os fatores previamente definidos.

Tabela 3 – Nível dos fatores usados no planejamento experimental e seus correspondentes valores experimentais obtidos no estado estacionário

Experimento	Fatores		Atividade enzimática		
	Valores codificados (Reais)		Respostas		
	Temperatura (°C)	Vazão (mL.min ⁻¹)	A _T (U.mL ⁻¹)	A _H (U.mL ⁻¹)	A _T / A _H
1	(-1) 40,0	(-1) 5,0	5,26	4,09	1,24
2	(1) 60,0	(-1) 5,0	9,22	7,92	1,16
3	(-1) 40,0	(1) 10,0	6,57	6,27	1,05
4	(1) 60,0	(1) 10,0	1,65	2,55	0,65
5	(-1,41) 35,9	(0) 7,5	2,88	3,80	0,76
6	(1,41) 64,1	(0) 7,5	1,99	1,78	1,12
7	(0) 50,0	(-1,41) 4,0	8,20	6,84	1,20
8	(0) 50,0	(1,41) 11,0	7,15	6,70	1,07
9	(0) 50,0	(0) 7,5	7,84	5,92	1,32
10	(0) 50,0	(0) 7,5	7,92	6,11	1,30
11	(0) 50,0	(0) 7,5	7,76	6,21	1,25

Fonte: Autor.

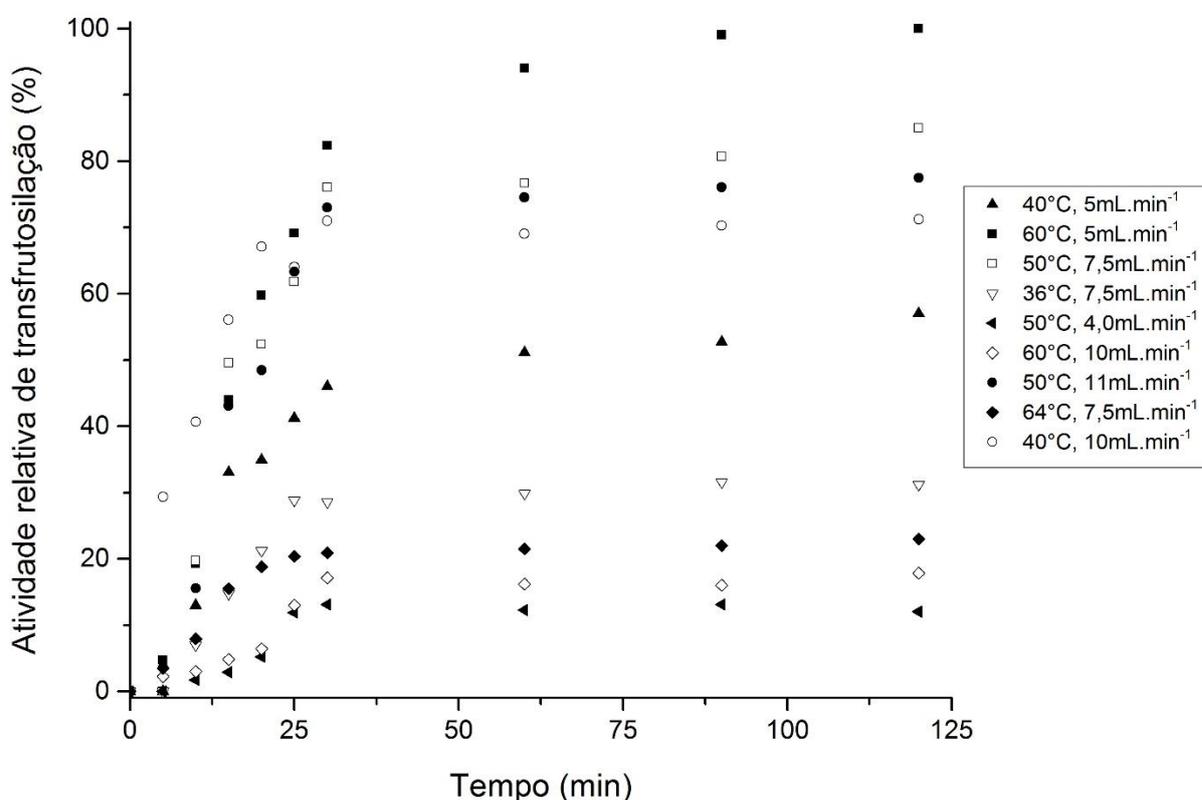
Nota: A_T: atividade de transfrutosilação; A_H: atividade hidrolítica. Condições experimentais utilizadas: concentração de substrato de 400g.L⁻¹, pH 5,5 e diâmetro de partícula de 2mm.

5.1.1 Perfis de atividade enzimática e análise estatística

5.1.1.1 Atividade de transfrutoseilação

A Figura 17 apresenta o comportamento dos perfis de atividade de transfrutoseilação monitorados durante a condução dos experimentos sob as condições previamente determinadas no planejamento experimental.

Figura 17– Perfis de atividade de transfrutoseilação em função do tempo obtidos para diferentes temperaturas de reação e vazão volumétrica em reator PBR



Fonte: Autor.

Nota: Condições experimentais: leito catalítico (7,5cm de altura) recheado com esferas de alginato de cálcio (2mm de diâmetro) e alimentado com solução de sacarose 400g.L⁻¹ e pH 5,5.

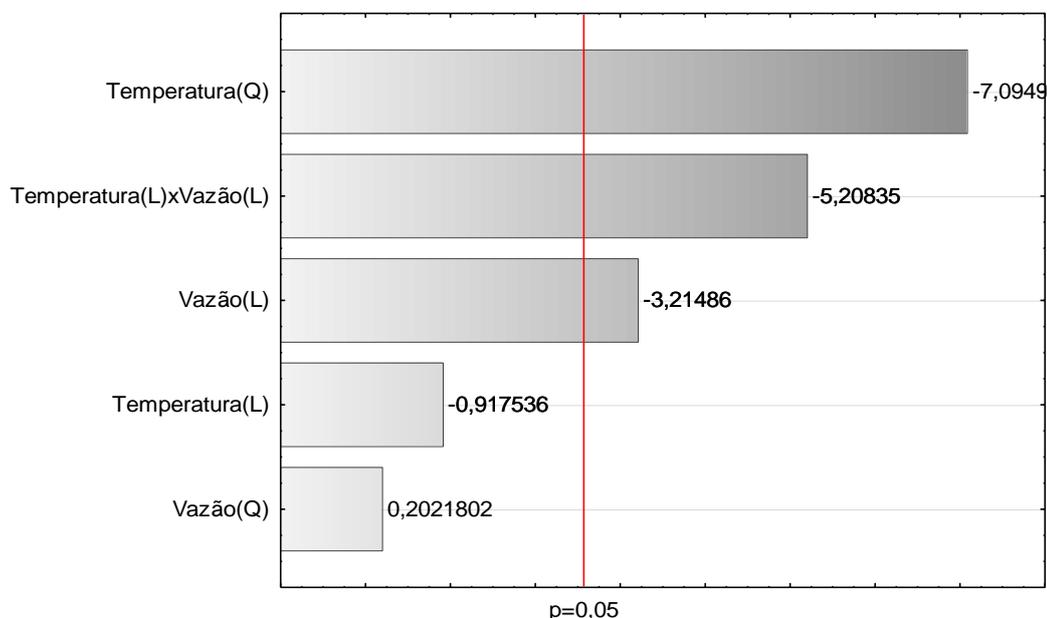
A análise da disposição dos pontos experimentais permite inferir que a atividade de transfrutoseilação apresenta um comportamento uniforme, descrito por um perfil hiperbólico aparente, abrangente às diferentes condições experimentais. Destaca-se

uma fase inicial transiente de crescimento acelerado da atividade com o tempo, dominante até os 20min de reação, seguida de uma fase de decréscimo da taxa de variação da atividade, com o alcance do estado estacionário após os 30min de monitoramento. Tal resposta evidencia uma reação estável.

Dessa forma, as atividades relativas de transfrutossilação, no regime estacionário, foram tomadas como variáveis de resposta do planejamento experimental. Com auxílio do software Statistica® 9.0 realizou-se a análise estatística do planejamento, adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para avaliar a influência dos fatores nas variáveis respostas, construiu-se o diagrama de Pareto (Figura 18) e a Tabela 4. Dessa forma, foi possível comparar a magnitude relativa e a significância estatística dos efeitos da temperatura reacional e da vazão de alimentação, em termos lineares (L), quadráticos (Q) e inter-relacionados.

Figura 18 – Diagrama de Pareto para os fatores temperatura reacional e vazão de alimentação na atividade relativa de transfrutossilação da biomassa catalítica encapsulada



Fonte: Autor.

Tabela 4 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos da temperatura reacional e vazão volumétrica na atividade relativa de transfrutossilagem da biomassa catalítica encapsulada

Variável	Efeitos Estimados	Erro Padrão	p-valor
Interação Média	7,84	0,49	0,000017
Temperatura(L)	-0,55	0,60	0,400954
Temperatura(Q)	-5,09	0,72	0,000861
Vazão(L)	-1,94	0,60	0,023600
Vazão(Q)	0,14	0,72	0,847744
Temperatura(L)xVazão(L)	-4,44	0,85	0,003443

Fonte: Autor.

Observou-se que a temperatura quadrática, a vazão linear e a interação entre vazão e temperatura lineares são estatisticamente significativos para construção do modelo, $p \leq 0,05$, indicando que há uma chance de 95% desses termos serem associados à resposta do sistema (Tabela 4). Desta forma, foi gerado o modelo (Equação 46), considerando-se os parâmetros estatisticamente significativos.

$$A_T = -84,22 + 3,88Q - 0,025T^2 - 0,089TQ ; \quad (46)$$

sendo A_T a atividade de transfrutossilagem, T a temperatura do sistema e Q a vazão de substrato.

O modelo desenvolvido apresentou coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,95, o que indica que 95 % da variabilidade das respostas observadas podem ser explicadas pelo modelo estatístico.

A assertividade do modelo também foi mensurada mediante comparação entre os valores preditos e observados. Para tanto, construiu-se o gráfico apresentado na Figura 31 (Apêndice B), sendo possível observar boa correspondência entre os dados e baixos desvios relativos dos pontos experimentais em relação aos previstos, o que corrobora a adequação da modelagem estatística ao processo.

Na Tabela 5, apresenta-se a análise de variância (ANOVA) para o modelo

quadrático gerado. Adicionalmente, aplicou-se o Teste F, que compara o modelo ajustado a um modelo obtido por interceptação dos pontos experimentais (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Para que o modelo ajustado seja considerado relevante, o valor do coeficiente F calculado pela razão entre os quadrados médios da regressão e os Quadrados médios do resíduo deve ser superior ao valor correspondente obtido na distribuição F. O valor referente aos graus de liberdade determinados, utilizando um nível de significância de 5 %, é de 4,46.

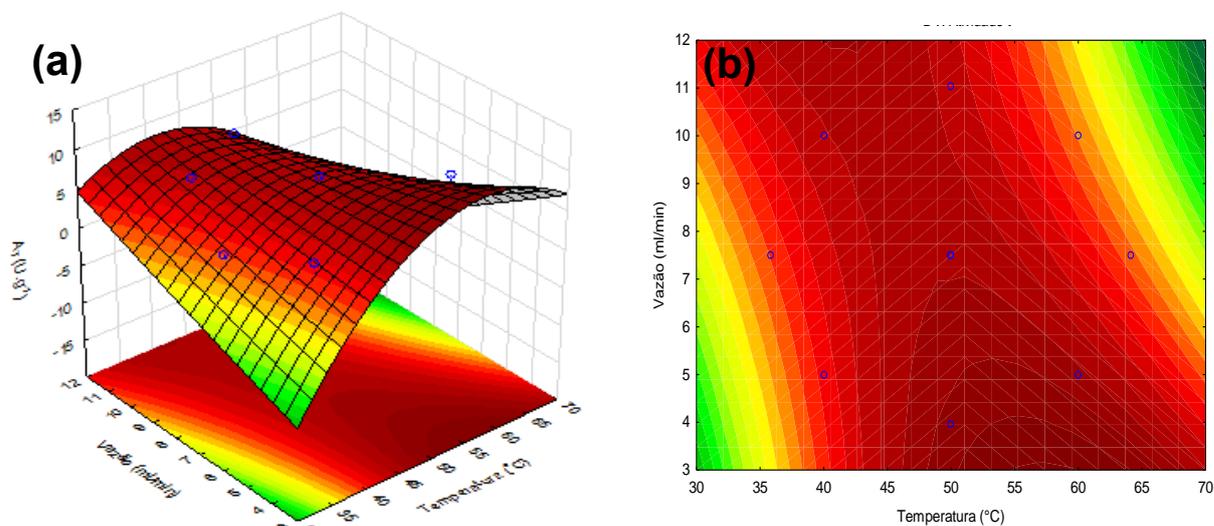
Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) da regressão quadrática para a avaliação dos efeitos da temperatura reacional e vazão de alimentação na atividade relativa de transfrutossilção da biomassa encapsulada

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	64,2	2	4,1	7,89	0,62
Resíduos	8,1	8	8,0		
Falta de Ajuste	3,6				
Erro Puro	3,6				
Total	79,6	10			
$R^2 = 0,95$	$F_{2;8;0,05} = 4,46$				

Fonte: Autor.

Como o coeficiente de variação explicada foi elevado e o valor tabelado de F para nível de significância de 5% foi de 4,46, inferior ao valor de 7,89 obtido pelo modelo, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é maior que a variação não explicada e, portanto, o modelo pode ser considerado válido. Desta forma, o modelo de regressão pode ser utilizado para gerar a superfície de resposta (Figura 19-a) e a curva de contorno (Figura 19-b).

Figura 19 - Atividade de transfrutoseilação absolutas em função da temperatura do sistema e da vazão de substrato



Fonte: Autor.

Legenda: (a) superfície de resposta e (b) curva de nível.

A superfície de resposta apresenta conformação de sela, com região de máxima atividade delimitada pelas temperaturas de 45°C e 60°C. Tal comportamento é igualmente descrito pelos estudos de Cuervo-Fernandez et al. (2007), Ottoni et al. (2012), Cunha (2017) e Perna et al. (2019), que corroboram a maximização da atividade de transfrutoseilação para temperaturas próximas a 50°C.

Gonçalves (2019), em estudo avaliativo da influência singular da temperatura sob a atividade de transfrutoseilação da FTase micelial, reportou alcance das atividades máximas A_t para as temperaturas de 50°C, com a enzima livre, e de 55°C para enzima encapsulada em alginato de cálcio, utilizando concentração de substrato de 400g.L⁻¹ e pH 5,5 em reator batelada. Ganaie, Lateef e Gupta . (2014a) relataram 60°C como a temperatura responsável pela maximização da atividade A_t da FTase micelial em gel de alginato, e 50°C a temperatura ótima para a FTase livre.

Portanto, pode-se inferir que o encapsulamento e o sistema de reator contínuo não modificaram a temperatura ótima para maximização da A_t de FTase micelial de *A. Oryzae* IPT-301

Também é possível observar, por meio da análise da Figura 19 e da Tabela 3, uma influência reduzida da vazão na região central do planejamento, com elevações deste parâmetro resultando em pequenas modificações desfavoráveis na atividade de

transfrutossilacção. Na faixa de temperatura compreendida entre 50°C e 60°C, a influência da vazão é mais significativa, e destaca-se a existência de uma tendência à elevação da atividade A_t com a diminuição da vazão de substrato.

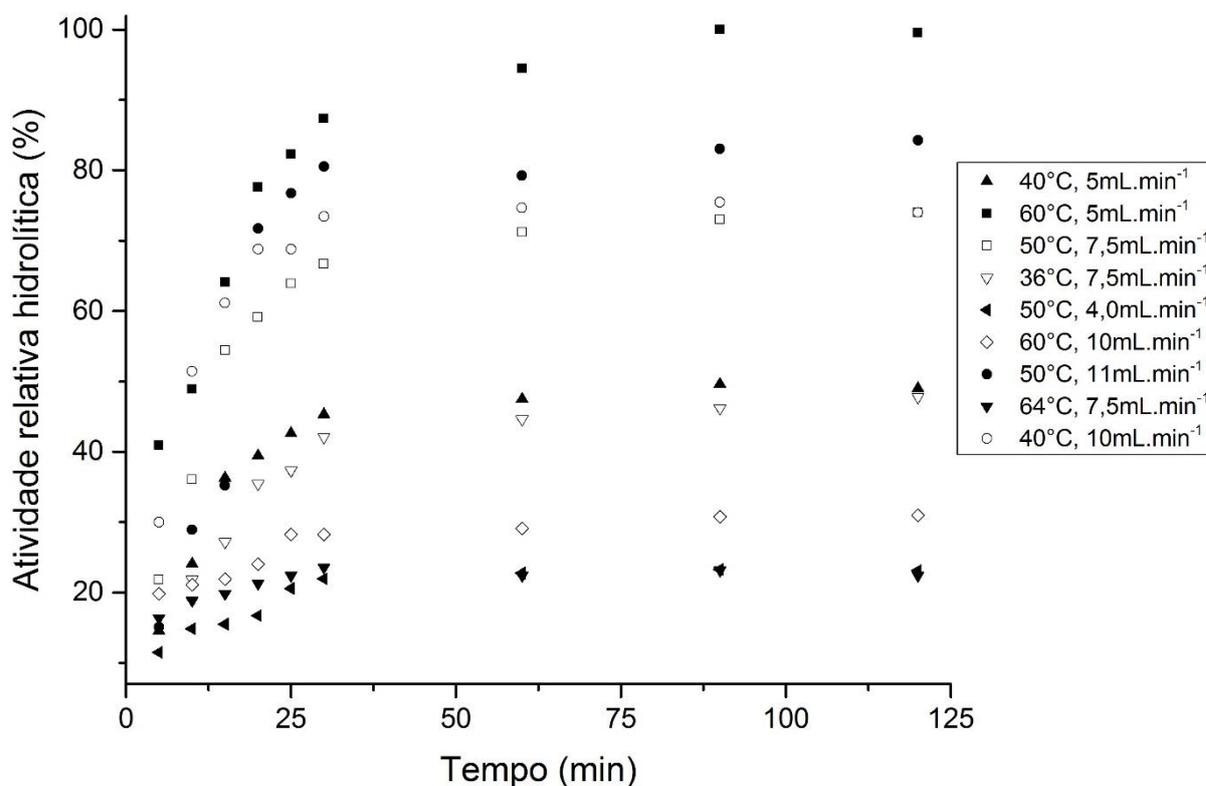
Resultado análogo foi observado por Lorenzoni et al. (2015), em estudo avaliativo da influência da vazão em reator de leito empacotado com β -fructofuranosidases e β -fructosyltransferases imobilizadas em quitosana. Foi relatado que a concentração de FOS se maximiza a baixas vazões, mantendo-se relativamente constante na faixa estudada (0,5mL.min⁻¹ a 0,44mL.min⁻¹). Todavia, foi destacada uma dependência da composição dos frutoligossacarídeos relativa à vazão de substrato. Para velocidades superficiais mais baixas foi observada a prevalência de nistose, enquanto vazões superiores favoreceram a formação de kestose.

A vazão mais baixa sugere maior tempo de residência e conseqüente aumento do tempo de contato entre substrato e sítio ativo, entretanto com o aumento da vazão ocorre a diminuição da limitação à transferência de massa, dependendo da textura do suporte de imobilização e da localização dos sítios ativos. A região de vazões intermediárias entre os dois fenômenos parece concentrar os melhores resultados de atividade A_T . Uma avaliação mais aprofundada da influência da vazão na transferência de massa foi efetuada no Item 5.3.

5.1.1.2 Atividade hidrolítica

A Figura 20 apresenta os perfis de atividades hidrolíticas relativas para cada um dos pontos experimentais. Pode-se observar um comportamento similar ao das atividades de transfrutossilacção, com regime estacionário bem estabelecido decorridos 30min do início da reação.

Figura 20 - Perfis de atividade hidrolítica em função do tempo obtidos para diferentes temperaturas de reação e vazão volumétrica em reator PBR

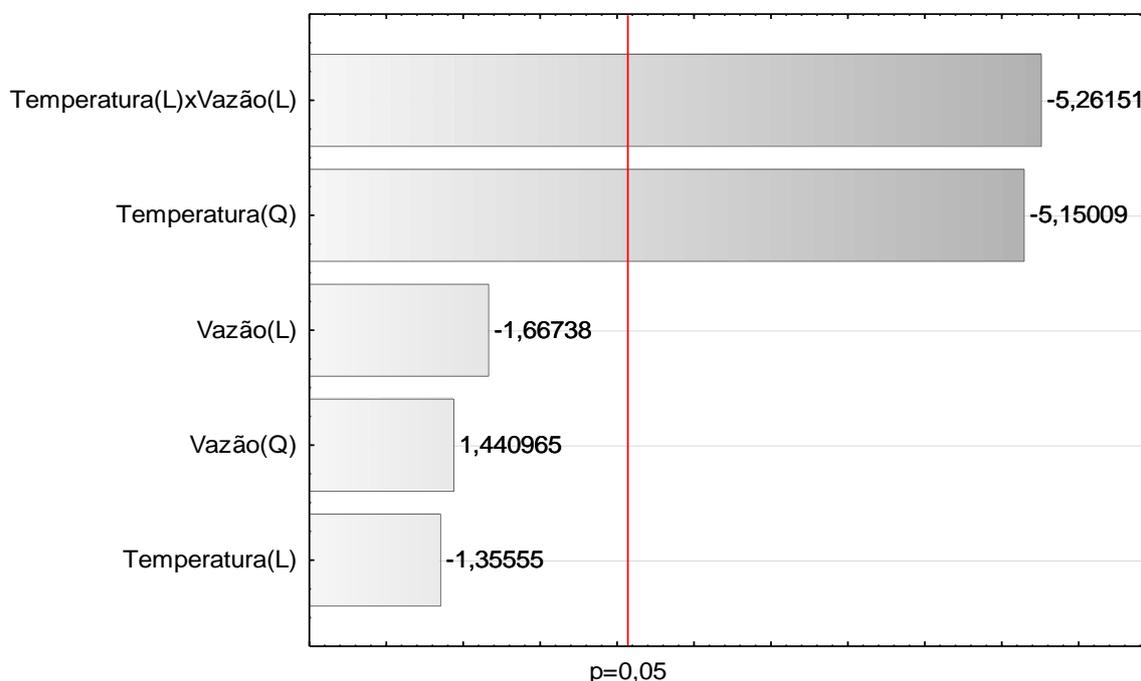


Fonte: Autor.

Nota: Reator PBR recheado com esferas de alginato (diâmetro do leito: 2,1cm, altura de leito:7,5cm), alimentado com solução de sacarose 400g.l⁻¹ e pH 5,5.

As atividades relativas hidrolíticas, no regime estacionário, foram utilizadas para construção de um diagrama de Pareto (Figura 21) e da tabela de efeitos estimados (Tabela 6), visando avaliar a relevância das variáveis lineares quadráticas e interacionais na resposta do sistema. Novamente adotou-se um grau de significância de 5% ($p < 0,05$). Pode-se concluir que a temperatura quadrática e a interação entre temperatura e vazão de primeira ordem são estatisticamente significativas na análise da variabilidade da superfície de resposta.

Figura 21 – Diagrama de Pareto para os fatores temperatura reacional e vazão de alimentação na atividade relativa hidrolítica da biomassa catalítica encapsulada



Fonte: Autor.

Tabela 6: Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos da temperatura reacional e vazão volumétrica na atividade relativa hidrolítica da biomassa catalítica encapsulada

Variável	Efeitos Estimados	Erro Padrão	p-valor
Interação Média	6,11	0,42	0,000028
Temperatura(L)	-0,69	0,52	0,240584
Temperatura(Q)	-3,11	0,61	0,003884
Vazão(L)	-0,85	0,52	0,161508
Vazão(Q)	0,87	0,61	0,215469
Temperatura(L)xVazão(L)	-3,78	0,73	0,003540

Fonte: Autor.

Após a avaliação estatística dos parâmetros foi possível a proposição de uma equação matemática para modelar a resposta da atividade hidrolítica frente as variações de temperatura e vazão (Equação 47).

$$A_H = -54,15 + 2,08T - 0,0155T^2 + 2,56Q + 0,07Q^2 - 0,075TQ \quad ; \quad (47)$$

sendo A_H a atividade hidrolítica, T a temperatura do sistema e Q a vazão de substrato.

O coeficiente de determinação para o modelo proposto foi de $R^2=0,94$, demonstrando bom ajuste aos dados experimentais. Partindo-se da modelagem sugerida e dos dados experimentais, foi possível a construção de um diagrama comparativo entre os valores preditos e os valores experimentalmente observados (Figura 32 - Apêndice B). Pode-se verificar boa coincidência entre os valores, fornecendo mais uma confirmação da adequação da modelagem à situação proposta.

A significância global do modelo ajustado foi verificada pela análise da variância e pelo teste F (Tabela 7). O valor do coeficiente F, referente aos graus de liberdade determinados, utilizando um nível de significância de 5%, é de 4,46.

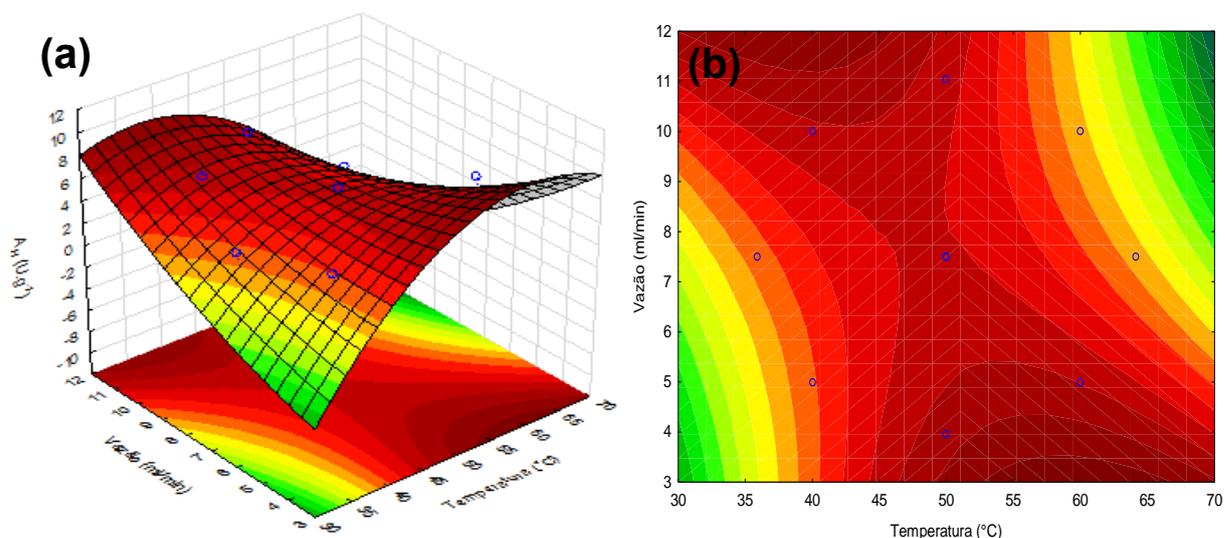
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) da regressão quadrática para a avaliação dos efeitos da temperatura reacional e vazão de alimentação na atividade relativa hidrolítica da biomassa encapsulada

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	35,37	2	4,421656	14,89	0,62
Resíduos	2,37	8	1,187588		
Falta de Ajuste	2,57				
Erro Puro	2,57				
Total	42,89	10			
$R^2 = 0,94$	$F_{2;8;0,05} = 4,46$				

Fonte: Autor.

O valor tabelado de F para a confiabilidade atribuída é inferior ao valor do coeficiente calculado, portanto, é possível afirmar que a quantidade de variação explicada pelo modelo foi maior que a variação não prevista. A estimativa do p-valor foi superior ao nível de significância atribuído, indicando que não há variabilidade significativa entre o modelo e os pontos experimental. Dessa forma, o modelo foi considerado válido e foi possível a elaboração das superfícies de resposta do sistema (Figura 22).

Figura 22 - Atividade hidrolítica absoluta em função da temperatura do sistema e da vazão de substrato



Fonte: Autor.

Legenda: (a) superfície de resposta e (b) curva de nível.

A superfície de resposta obtida para a atividade hidrolítica (Figura 22) apresenta configuração semelhante à resultante da atividade de transfrutossilção (Figura 19). Observa-se que a função assume formato de sela, com regiões de máxima atividade concentradas nos extremos das vazões analisadas.

Na região abrangida pelas vazões superiores, observou-se atividades hidrolíticas relativamente altas na faixa de temperatura entre 30°C a 45°C. Tal fato pode ser um indicativo da atuação da β -frutofuranosidase como hidrolase, impulsionando a hidrólise da sacarose e provocando uma elevação das A_h . Esse comportamento tende a ocorrer sob temperaturas reacionais brandas (ALMEIDA et al., 2005).

Para temperaturas entre 50°C e 65°C, a diminuição da vazão provoca o aumento acentuado da atividade hidrolítica. Esse comportamento pode estar duplamente relacionado, ao aumento do tempo de residência das moléculas de sacarose no reator e ao favorecimento da reação de hidrólise pelo aumento da temperatura (PEREIRA, 2019; ALMEIDA et al., 2005).

Em vazões intermediárias, observa-se uma diminuição da atividade hidrolítica com achatamento da região superior da superfície. Comparativamente, na geometria gerada para a atividade de transfrutossilção (Figura 19), observa-se que o espaço central é marcadamente plano, não havendo grande interferência da vazão na

alteração da atividade A_t , que é máxima neste limite. Dessa forma, essa contraposição sugere que a região maximizadora da razão A_t/A_h , que fornece a melhor faixa para produção de FOS, se localize nas temperaturas e vazões centrais do planejamento.

O perfil obtido está congruente com o trabalho de Gonçalves (2019), que relatou atividade hidrolítica mínima na temperatura de 50°C, para reação em regime batelada utilizando a FTase encapsulada em alginato de cálcio e a diminuição da A_h em temperaturas superiores a 50°C, utilizando a enzima micelial livre.

É importante ressaltar que, temperaturas elevadas podem ocasionar perda de atividade enzimática devido à desnaturação do biocatalisador e à degradação da matriz polimérica, que passa a facilitar a lixiviação da enzima (GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014a).

5.1.1.3 Razão entre as atividades relativas de transfrutossilação e hidrolítica

A fim de definir as condições de temperatura e vazão que maximizam a conversão de sacarose em FOS, no processo estudado, deve-se analisar a razão entre atividade de transfrutossilação e atividade hidrolítica. A potencialização da razão A_t/A_h , garante a predominância da atividade de transfrutossilação sobre a hidrolítica, aumentando o rendimento reacional (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988).

Todavia, os resultados do coeficiente A_t/A_h obtidos, apresentados na Tabela 3, não podem ser utilizados como respostas diretas do planejamento experimental, pois não atendem aos critérios de normalidade exigidos pelo método (GARCIA, 2019; LEMOS, 2019; RODRIGUES; IEMMA, 2009;). Por meio da aplicação do teste de aderência de *Shapiro-Wilk*, obtém-se os dados da Tabela 8, que comprovam, mediante regra de decisão do método, que a distribuição não é Gaussiana, com o p-valor calculado inferior ao nível de significância de 5% adotado.

Tabela 8 – Resultado do teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*

Estatística Shapiro-Wilk	p-valor
0,85217	0,0455

Fonte: Autor.

O histograma da distribuição de dados é apresentado na (Figura 32 – Apêndice B), e ilustra a não-normalidade dos dados experimentais.

Dessa forma, corrobora-se a inaplicabilidade de estatísticas paramétricas para as razões A_t/A_h (RODRIGUES; IEMMA, 2009). A análise da condição ótima, portanto, deve ser realizada partindo-se da observação das razões pontuais. Consequente, conclui-se que a máxima razão é obtida para as condições de 50,0°C e 7,5mL.min⁻¹ (Tabela 3).

As condições encontradas coincidem com ponto central do planejamento experimental. Conforme discutido no Tópico 5.1.1.1, tal região, abrangendo as temperaturas de 45°C a 60°C, concentra a área de maximização das atividades de transfrutossilacção, que são pouco influenciadas pela variação da vazão do substrato. Em adição, na análise da atividade hidrolítica (Tópico 5.1.1.2), observa-se que a mesma região de temperaturas apresenta maior sensibilidade às alterações de vazão, sendo verificada diminuição da taxa de hidrólise indicada pela atividade hidrolítica, para valores médios próximos a 7,5mL.min⁻¹, afastados das extremidades do intervalo de análise.

O resultado obtido pode ser analisado em conjectura com o estudo de Gonçalves (2019), que demonstrou a temperatura de 50°C como potencializadora da razão A_t/A_h para produção de FOS em reator batelada. Portanto, obtém-se um indicativo de que a transposição da reação de reator batelada para reator de leito fixo não altera as condições ótimas do processo.

5.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILACÇÃO E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

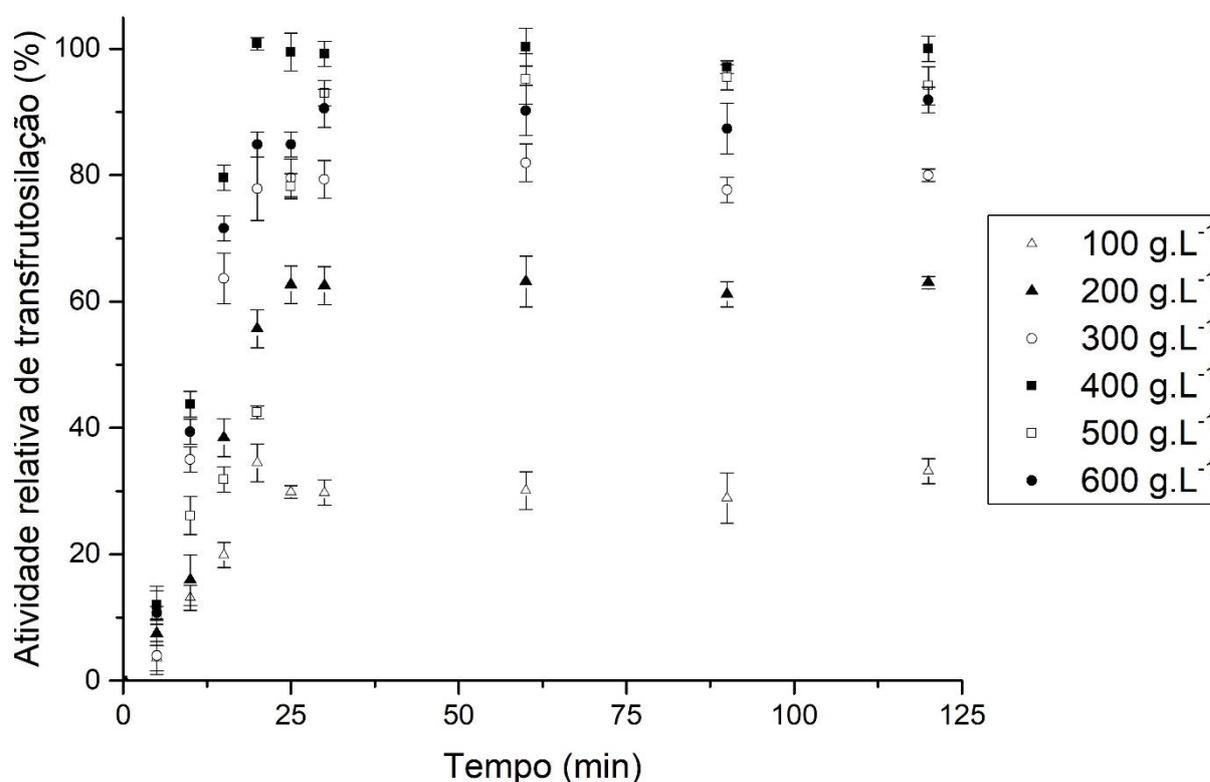
Avaliou-se a influência da concentração de substrato sobre a atividade de transfrutossilacção da biomassa catalítica encapsulada, utilizando diferentes concentrações de sacarose e alimentando o reator PBR com vazão volumétrica de 7,5mL.min⁻¹ a 50°C. Os perfis de concentração foram obtidos mediante 2 horas de monitoramento do processo contínuo (Figura 23).

É possível afirmar que o estado estacionário foi alcançado após 50 min de reação, independentemente da concentração da solução reagente. A atividade de transfrutossilacção apresentou um perfil crescente, que acompanha o aumento da concentração de sacarose até a faixa de 400g.L⁻¹, onde a biomassa catalítica

apresenta atividade máxima. Para concentrações acima de 400g.L^{-1} verifica-se a diminuição da A_T com o aumento da concentração.

O decaimento da atividade sugere a ocorrência de possíveis mecanismos de inibição enzimática por ação do substrato, devido à saturação do biocatalisador, ou limitação do transporte difusivo do meio externo para a biomassa catalítica (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

Figura 23 - Perfis de atividade enzimática de transfrutoseilação para diferentes concentrações de substrato (100g.L^{-1} a 600g.L^{-1} , com $\Delta = 100\text{g.L}^{-1}$)



Fonte: Autor.

Nota: Condições operacionais: altura do leito catalítico 7,5cm, diâmetro de partícula 2,0mm, temperatura da solução reagente 50°C e vazão de $7,5\text{mL.min}^{-1}$.

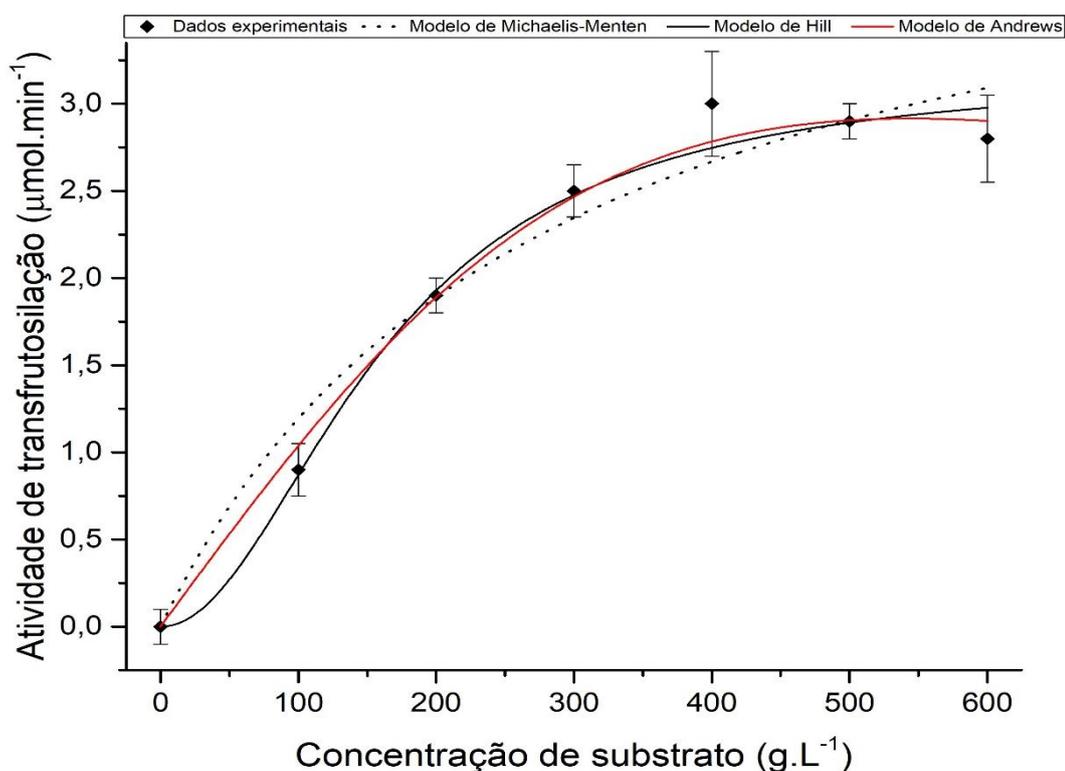
Comportamento análogo foi reportado por Gonçalves (2019) em experimentos em batelada, usando a biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 encapsulada em gel de alginato. Foram obtidas atividades de transfrutoseilação máxima para concentração de 400g.L^{-1} e decréscimo da atividade para concentrações superiores. Outros trabalhos também avaliaram, em regime batelada, a atividade de transfrutoseilação da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301. Cunha et al.,

(2019) estudaram a biomassa microbiana livre, obtendo-se o maior valor de atividade enzimática para 470g.L^{-1} de sacarose. Garcia (2019), ao reticular a biomassa catalítica com glutaraldeído, alcançou atividade máxima para um meio reacional constituído por 480g.L^{-1} do substrato.

Portanto, nota-se semelhança na dependência da atividade com a concentração, entre reatores batelada e reatores de leito fixo, com faixas ótimas de concentração coincidentes e constatação de decréscimo em concentrações elevadas de substrato. Esse resultado fornece um indicativo da independência da cinética reacional em relação ao regime adotado. Também se verifica que a encapsulação não afetou a concentração ótima para atividade máxima, conforme apresentado por Gonçalves (2019) para reatores batelada.

A avaliação da cinética enzimática foi realizada mediante ajuste dos modelos de *Michaelis-Menten*, *Hill* e *Andrews* (Figura 24) aos pontos experimentais de atividade de transfrutossilção obtidas no estado estacionário bem estabelecido, para o tempo de 90 min, em função da concentração de substrato (Figura 23).

Figura 24 - Ajuste dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten, Hill e Andrews aos dados experimentais no tempo de 90 min de reação



Fonte: Autor.

Nota: Condições operacionais: altura do leito catalítico 7,5cm, diâmetro de partícula 2,0mm, temperatura da solução reagente 50°C e vazão de $7,5\text{mL.min}^{-1}$.

Observa-se que a dispersão formada pelos dados experimentais apresentou conformação hiperbólica. Os parâmetros cinéticos para cada modelo, bem como seus respectivos coeficientes de determinação estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros obtidos a partir do ajuste aos modelos cinéticos

Parâmetros cinéticos	Modelo de Michaelis-Menten	Modelo de Hill	Modelo de Andrews
$v_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	$4,53 \pm 0,77$	$3,19 \pm 0,14$	$4196 \pm 2 \times 10^6$
K_M ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	279 ± 110	162 ± 9	$391212 \pm 1,5 \times 10^8$
n	-	$2,0 \pm 0,3$	$0,7 \pm 300$
K_i	-	-	-
R^2	0,954	0,996	0,996

Fonte: Autor.

A partir da comparação dos coeficientes de determinação dos modelos ajustados, e da análise da Figura 24, foi possível constatar o melhor ajuste dos dados experimentais ao modelo de *Hill*. Segundo Ghazi et al. (2007), enzimas com atividade de transferência de grupos frutossil, em geral, são bem descritas pela cinética de Hill, indicando a presença de fenômenos de cooperatividade entre enzima e substrato.

Como o valor do coeficiente de Hill (n) foi superior a 1, a cooperatividade induzida é positiva, ocasionando aumento da afinidade dos sítios ativos subsequentes após formação do primeiro complexo enzima-substrato. O modelo de inibição pelo substrato, proposto por Andrew, apesar de ter apresentado elevado coeficiente de determinação, acarretou em erros significativos associados às constantes cinéticas, desqualificando a significância do ajuste.

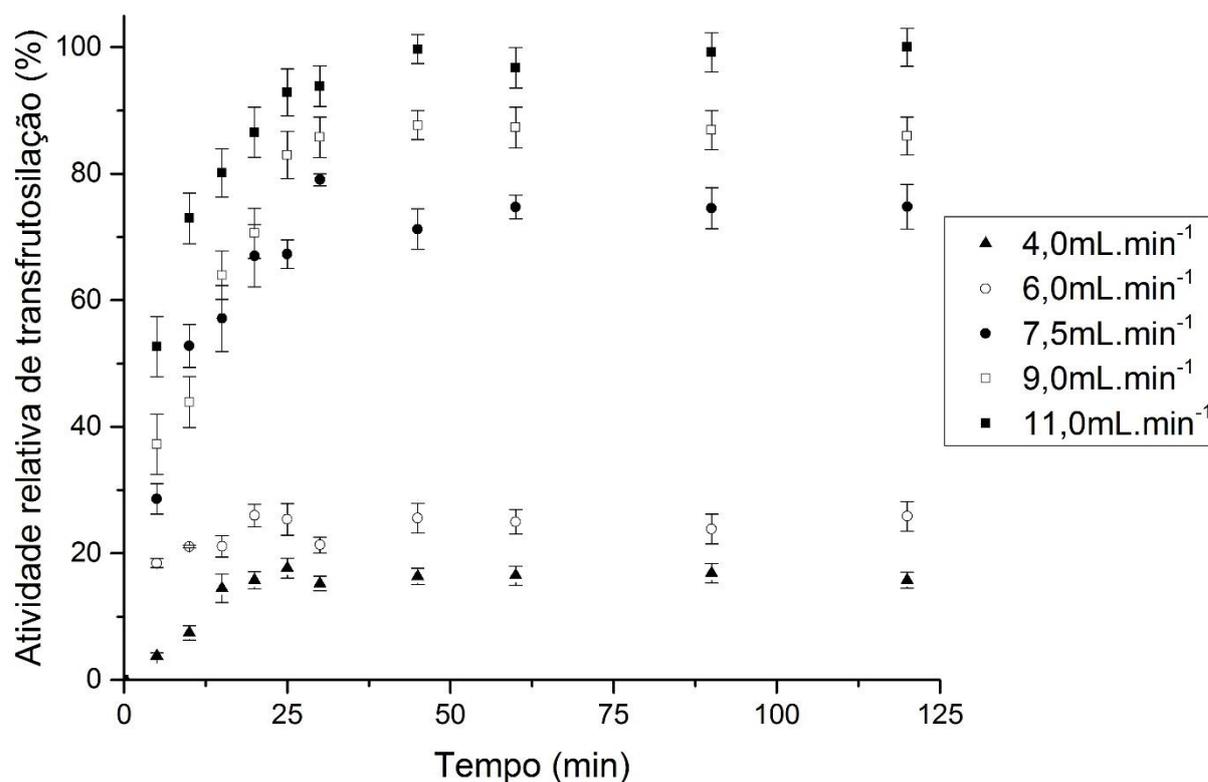
O ajuste dos pontos experimentais à cinética de Michaelis-Menten, para a região analisada, apresentou um coeficiente de determinação de 0,95. O valor obtido para k_m , de (279 ± 110) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, indica a concentração necessária para obtenção da metade da velocidade máxima $v_{m\acute{a}x}$, que foi estimada em $(4,53 \pm 0,77)\text{U}$. Gonçalves (2019) reportou valores de k_m e $v_{m\acute{a}x}$ iguais a $(132,11 \pm 52,12)$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $(3,07 \pm 0,38)\text{U}$, respectivamente, para processo em batelada empregando mesmas condições de reação utilizadas neste estudo. Isto evidencia que o processo em reator de leito fixo proporciona uma alteração positiva na velocidade máxima de reação. Os elevados erros associados aos parâmetros do modelo, da ordem de 50%, atribuem um alto grau de imprecisão ao ajuste dos dados por esta cinética.

Contudo, para efeitos de modelagem matemática do reator, justifica-se a aplicação da cinética de Michaelis-Menten, que apresenta um menor número de parâmetros que a cinética de Hill.

5.3 DETERMINAÇÃO DO REGIME OPERACIONAL

Os efeitos da variação da vazão de alimentação do reator foram investigados mediante procedimento experimental descrito no Tópico 4.3.4. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 25.

Figura 25 - Perfis de atividade de transfrutoseilação em função da vazão de sacarose à $4,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $6,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $7,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $9\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $11\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$



Fonte: Autor.

Nota: Condições operacionais: concentração de sacarose de $400\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5,5 e temperatura de 50°C .

Observa-se, nas vazões avaliadas, que a atividade enzimática demonstra uma relação de contra proporcionalidade com os tempos de residência, sendo possível perceber o no aumento da atividade com o aumento da vazão. Tal comportamento pode indicar a ocorrência de um reator de leito fixo não-idealidade do reator, nos quais

é inerente a interligação entre a fluidodinâmica do sistema e a cinética reacional (FOGLER, 2012).

O aumento da velocidade superficial da fase fluida que carrega o substrato introduz uma melhora nas condições de mistura do fluido, gerando a redução da espessura do filme laminar que envolve a partícula catalítica e a consequente diminuição da resistência à transferência de massa externa, favorecendo o transporte do substrato para a parede da esfera (WELTY; WILSON; WICKS, 2001). Outro efeito favorecido pela intensificação do fluxo é o aumento da tensão cisalhante na superfície da partícula, que introduz um efeito lixiviante, responsável por remover produtos e subprodutos potencialmente aderidos às esferas. No entanto, este fenômeno também pode facilitar o arraste das enzimas, resultando em uma diminuição da atividade.

Portanto, as baixas atividades relativas observadas nas vazões de $4,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $6,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ estão possivelmente associadas ao aumento da espessura da camada limite difusional, resultando na ampliação da resistência à transferência de massa. A lacuna expressiva presente entre os estados estacionários das vazões de $6,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $7,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pode indicar uma transição na região de limitação da reação, conforme demonstrado na Figura 11, deslocando a limitação da transferência de massa para a velocidade de reação. Esses fenômenos também podem ser verificados nos resultados do planejamento experimental, visto que os pontos de vazão mais baixa se encontram no regime difusional e os pontos de vazão mais alta caracterizam-se pela transição para o regime cinético.

Para a faixa de valores de vazão analisada, portanto, a uma temperatura constante, o aumento da vazão produziu um consoante aumento nas atividades relativas, indicando que o sistema se direciona ao regime cinético, diminuindo a influência difusional. Entretanto, o acréscimo demasiado da vazão pode ocasionar redução excessiva de tempo de residência das moléculas de substrato no reator, reduzindo o tempo de contato entre sacarose e a enzima FTase aderida à biomassa microbiana, prejudicando a conversão e diminuindo a atividade enzimática.

5.4 TRANSFERÊNCIA DE MASSA

Para os estudos de transferência de massa, utilizou-se solução de alimentação com concentração de $400\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de substrato e temperatura de 50°C . Para esta condição, foram obtidas, da literatura, as propriedades físico químicas para o

substrato (Tabela 10).

Tabela 10 - Propriedades físicas da água e da solução aquosa de sacarose 35%(m/m) à 50°C

Propriedades físicas	Água	Solução aquosa de sacarose (35% m/m)
ρ (kg.m ⁻³)	988,1*	1137,65**
μ (mPa.s)	0,55*	4,68**
ν ($\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)	0,556*	1,87**
MM (g.mol ⁻¹)	18,01*	342,3**

Fonte: Autor.

Nota: Dados obtidos de *Geankoplis (1993) e **Mathlouth e Reiser (1995).

5.4.1 Transferência de massa externa

Os parâmetros de transferência de massa externa foram avaliados a fim de se ponderar a limitação imposta pelo transporte mássico na atividade enzimática. Para tanto, utilizou-se a modelagem descrita no Item 4.4 para examinar a hidrodinâmica do sistema e a sua influência no processo de disponibilização do substrato na interface da esfera catalítica.

O coeficiente de difusão da sacarose em água pode ser determinado pela correlação apresentada na Equação 16, utilizando-se as difusividades, do soluto e do solvente, calculadas em diluição infinita. Para que esta consideração seja válida, todavia, a solução reagente deve aproximar-se da idealidade.

A idealidade de uma solução pode ser mensurada por meio do coeficiente de atividade (γ), que afere a hegemonia das ligações intermoleculares, aproximando-se da unidade quando a solução é ideal (KORESTSKY, 2007; SMITH; VAN NESS; ABBOTT 2007). Para uma solução de sacarose e água, Starzak e Peacock (1997) postularam que teores de soluto, em base seca, inferiores a 50% (m.m) não acarretam desvio significativo da idealidade. Dessa maneira, como o teor de substancia seca na solução de alimentação é de 35% (MATHLOUTH; REISER, 1995), pode-se avaliar a utilização das Equações 16 e 17, obtendo-se a difusividade D_{AB} (Tabela 11).

Seguindo a metodologia descrita no Tópico 4.4, realizou-se a determinação dos valores dos adimensionais de Reynolds, Sherwood e Schmidt, dispostos na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores dos números adimensionais de Sh , Sc e Re_p

Número adimensional	Valor
<i>Difusividade D_{AB}</i>	$7,75 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
<i>Reynolds de partícula - Re_p</i>	0,007
<i>Schmidt - Sc</i>	4434
<i>Sherwood - Sh</i>	2,82

Fonte: Autor.

O número de Reynolds relaciona as forças inerciais e as forças viscosas, e pode ser utilizado para prever os modelos de fluxo observados em escoamentos. O valor de Re_p calculado indica prevalência absoluta das forças viscosas, apontando para um escoamento bem definido, notadamente laminar. Tal fato se deve às baixas vazões adotadas neste estudo, que acarretam velocidades superficiais diminutas.

O número de Schmidt é utilizado para caracterizar escoamentos nos quais verifica-se a ocorrência simultânea de transporte de massa e momento, podendo ser interpretado como uma medida relativa entre a camada hidrodinâmica e a camada limite de transferência de massa. A aproximação de Sc ao valor unitário indica comparabilidade das espessuras das camadas limites. O valor obtido, portanto, expressa predominância da difusividade de momento e da viscosidade cinemática sob difusividade mássica (WELTY; WILSON; WICKS, 2001).

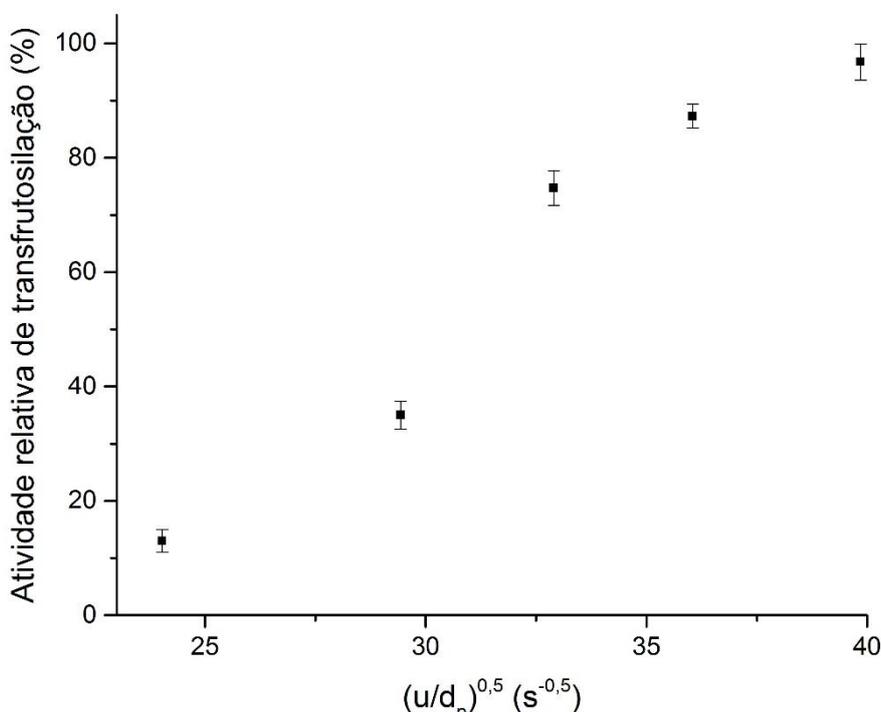
O número de Sherwood representa a razão entre a transferência de massa convectiva e difusiva. Dessa forma, o valor obtido exprime que os efeitos convectivos se sobressaem aos efeitos difusivos para as condições da reação. Tal conclusão é coerente com a observada na Figura 25, pois o aumento da vazão proporciona aumento da velocidade superficial de escoamento, com conseqüente diminuição de resistência à transferência de massa convectiva, resultando no aumento do fluxo de substrato para o interior da partícula e na melhora da atividade de transfrutificação observada (FOGLER, 2012). Com os resultados do número de Sherwood e da difusividade, determinou-se o coeficiente de transferência de massa.

$$k_c = 1,0 \times 10^{-2} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1} ; \quad (48)$$

A investigação da limitação imposta pela transferência de massa externa é

comumente realizada por meio da análise comparativa entre os coeficientes de transferência de massa externo (k_c) e a constante cinética da reação (k). Todavia, a cinética de Michaelis-Menten, adotada neste estudo, possui uma forma não-linear que não permite definição explícita da constante de velocidade de reação (FOGLER, 2012). Uma abordagem alternativa consiste na avaliação da dependência da atividade frente à razão entre velocidade superficial e diâmetro de partícula, por meio da construção de um gráfico $A_t \times (u/d_p)^{0,5}$, conforme discutido no Tópico 3.6.1. Portanto, construiu-se o gráfico que é apresentado na Figura 26.

Figura 26 - Regiões de limitação pela TME e pela velocidade de reação



Fonte: Autor.

Nota: Condições operacionais: concentração de sacarose de 400g.L^{-1} , pH 5,5 e temperatura de 50°C , com diâmetro de partícula de 2mm e diâmetro do reator de 2,1cm.

O perfil do gráfico obtido na Figura 26 é semelhante à curva teórica exibida na Figura 11. É possível distinguir uma região de crescimento linear da atividade relativa, caracterizada pela predominância da limitação pela transferência de massa externa. Nesta região, a espessura da camada limite é significativa, e a difusão do substrato para o interior do catalisador é dificultada, impactando na disponibilidade de sacarose nos sítios ativos (LEVENSPIEL, 1972).

O aumento da vazão proporciona uma modificação na tendência da atividade A_t , que passa a ser menos favorecida pelo acréscimo da velocidade superficial a partir da vazão de $7,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Esse resultado, também observado na Figura 25, pode ser associado ao crescimento da influência dos efeitos inerciais e diminuição da espessura da camada limite de transferência de massa (FOGLER, 2012). Desse modo, para as vazões de $9\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $11\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, observa-se uma estabilização do crescimento da atividade indicando que a curva está passando para região limitada pela reação química. Esse resultado indica que todos os níveis adotados no planejamento experimental foram sujeitos, em diferentes graus, à limitação por transferência de massa.

Ressalta-se, ainda, que para vazões superiores a $11\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ é esperado que o aumento da vazão exerça, gradualmente, menos influência sobre a vazão, até o completo estabelecimento do regime cinético.

5.4.2 Transferência de massa interna

A avaliação da significância da transferência de massa interna para o sistema deve ser realizada mediante determinação do fator de efetividade, que propicia uma estimativa da magnitude da resistência à difusão do substrato no interior da partícula.

O interior da esfera é preenchido por biomassa catalítica. Portanto, utilizando-se a Equação 19, pode-se determinar a difusividade efetiva da sacarose no microrganismo, levando em consideração a porosidade da partícula. Também é possível determinar o parâmetro β a partir da simplificação adotada na Equação 26. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Parâmetros para avaliação da transferência de massa interna

Parâmetro	Valor
<i>Difusividade efetiva D_{Ae}</i>	$7,21 \times 10^{-8} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
<i>Coefficiente β</i>	1,43

Fonte: Autor.

Observa-se uma diminuição na difusividade quando comparada à difusividade do substrato no seio do fluido, explicada pela resistência imposta pela tortuosidade dos poros do biocatalisador imobilizado. O valor de β pode ser interpretado como um

indicativo de que a cinética do sistema se aproxima à uma cinética de primeira ordem. A partir da estimativa de β é possível calcular os módulos de Thiele para reações de ordem zero, primeira ordem e de Michaelis-Menten, segundo metodologia descrita no Tópico 4.4. os resultados são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores calculados dos módulos de Thiele e dos fatores de efetividade

Cinética	Parâmetro	
	Φ	η
Ordem zero	0,2	1
Primeira ordem	0,34	0,937
Michaelis-Menten	6,5	0,974

Fonte: Autor.

O valor de η (Michaelis-Menten) de 0,974 indica que a taxa de reação observada corresponde a 97,4% da taxa teórica obtida pela desconsideração do gradiente interno de concentrações. Dessa maneira, conclui-se que a disponibilidade de substrato no interior da partícula é pouco afetada pelo encapsulamento em gel de alginato, sob as condições de 50°C e 7,5mL.min⁻¹ para as quais realizou-se o levantamento cinético, e que a etapa de difusão interna não constitui fase significativamente limitante ao desenvolvimento da reação.

5.5 ENSAIOS DE ESTABILIDADE OPERACIONAL

A principal vantagem da imobilização enzimática no processo produtivo é a retenção do biocatalisador na matriz do suporte, que possibilita a sua utilização por períodos prolongados em sistemas contínuos ou sua reutilização sucessiva em ciclos de reação batelada, tornando-se um fator significativo para a diminuição dos custos de um processo industrial (FOGLER, 2012).

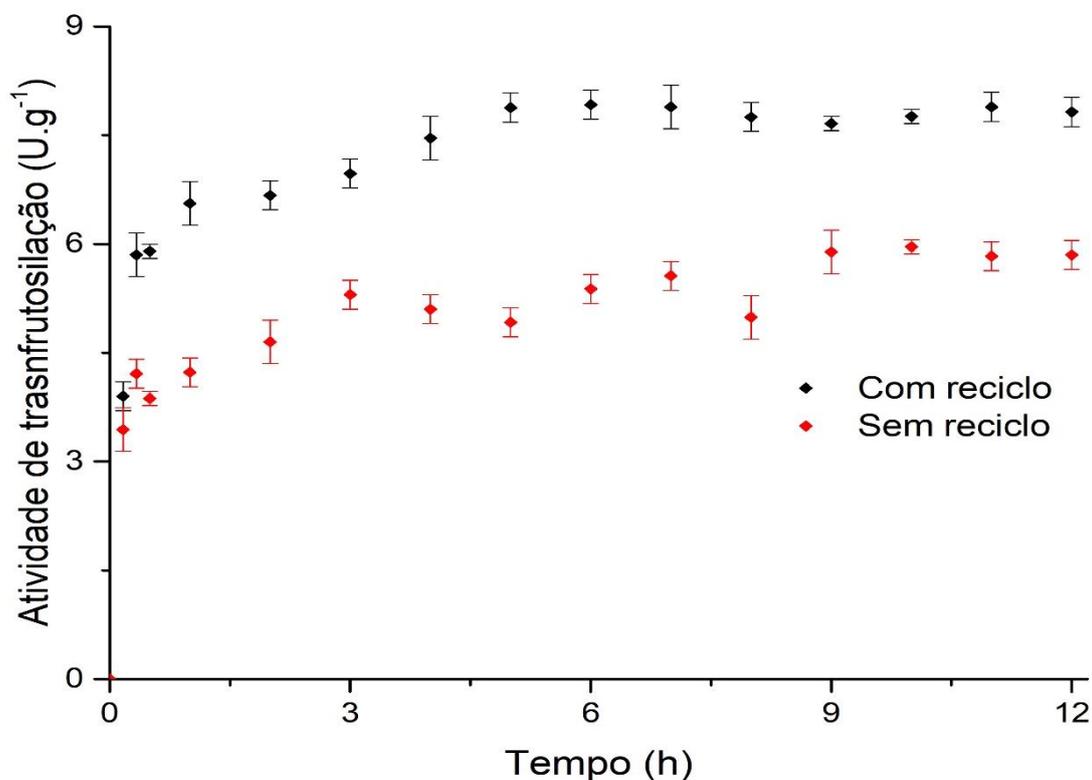
A estabilidade operacional do biocatalisador imobilizado foi avaliada mediante reação sob as condições otimizadas de operação (T = 50°C, Q = 7,5mL.min⁻¹, pH = 5,5, C_s = 400g.L⁻¹). O sistema foi configurado de duas maneiras distintas, empregando-se, em uma primeira avaliação, o reciclo total da

alimentação de substrato, e em seguida, sem reciclo. A Figura 27 apresenta os resultados obtidos de atividades relativas de transfrutoseilação ao longo de 12 horas de processo.

É possível constatar que o biocatalisador apresentou alta retenção de atividade após 12h de operação, em ambas as configurações propostas, sendo observada atividade de $(7,9 \pm 0,2)U.g^{-1}$, correspondente a $(96 \pm 2)\%$ da atividade máxima no período, para o sistema com reciclo e $(5,1 \pm 0,2)U.g^{-1}$, correspondente a $(92 \pm 2)\%$, para o sistema sem reciclo.

Tal resultado está em concordância com o estudo de Gonçalves (2019), que investigou a estabilidade operacional, em regime batelada, da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizada em alginato, segundo mesma metodologia de síntese empregada neste trabalho. Foi verificada a retenção de 92% da atividade de transfrutoseilação após a conclusão de três ciclos de 4h de processo.

Figura 27 - Estabilidade operacional do leito catalítico (biomassa encapsulada em alginato) do reator PBR, na ausência e presença de reciclo, monitorada durante 12h de processo



Fonte: Autor.

Nota: Condições operacionais: concentração de sacarose de $400g.L^{-1}$, pH 5,5, vazão volumétrica de $7,5mL.min^{-1}$ e temperatura de $50\text{ }^{\circ}C$.

Jung et al. (2011) corroboraram a estabilidade do encapsulamento de frutossiltransferases de *Aureobasidium pullulans* em alginato ao avaliar a produção contínua e ininterrupta de FOS, em reator industrial, ao longo de 100 dias de operação. Foi reportada a retenção da atividade enzimática no período de observância e a aplicabilidade da matriz de alginato para escalonamento industrial na produção de FOS.

Chien, Lee e Lin (1995), também investigaram a estabilidade operacional na produção em leito fixo de frutooligossacarídeos, utilizando biomassa catalítica de *Aspergillus japonicus* imobilizados em gel de alginato. A atividade enzimática manteve-se retida por 35 dias, operando o reator a 42 °C.

O reciclo total constitui um sistema onde a concentração de substrato na entrada do reator diminui com o tempo, pois a cada passe no reator uma fração da sacarose é consumida. Tal configuração também ocasiona o aumento da concentração de produtos e subprodutos confinados no meio reacional. O resultado obtido na Figura 27, indicando manutenção das atividades relativas para o período estudado, sugere que os efeitos inibitórios causados pela presença do subproduto glicose foram sobrepostos pela conservação da atividade catalítica atribuída à imobilização em matriz de alginato.

Dessa forma, pode ser demonstrado que o processo de imobilização utilizado viabiliza a operação contínua em reator catalítico, conferindo estabilidade operacional à enzima. Ademais, a proximidade entre os valores de atividade relativa para os sistemas com e sem reciclo forneceu um indicativo de eficiência na contenção enzimática no interior das esferas de alginato, diminuindo os efeitos de lixiviação do biocatalisador, que contribuem para o decaimento da atividade.

6 CONCLUSÕES

A partir dos estudos conduzidos foi possível constatar a aplicabilidade da imobilização de biomassa catalítica, oriunda do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, encapsulada em gel de alginato de cálcio de baixa viscosidade, na reação de transfrutoseilação da sacarose em reator PBR para a produção de FOS

A avaliação da influência da temperatura e da vazão nas atividades de transfrutoseilação e hidrolítica da enzima foi realizada com a aplicação de um delineamento composto central rotacional (DCCR). Os resultados foram estatisticamente analisados e um modelo matemático foi ajustado às atividades do regime estacionário em função das atividades de transfrutoseilação e hidrolítica. Foram obtidas superfícies de resposta que propiciaram a estimativa do ponto operacional mais adequado ($T= 50^{\circ}\text{C}$ e $Q=7,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

O estudo da dependência da atividade com a concentração de substrato foi conduzido e comprovou-se o bom ajuste dos pontos experimentais aos modelos de Hill e Michaelis-Menten, com possível tendência a inibição por substrato para concentrações maiores que as utilizadas neste trabalho.

A análise dos parâmetros de transferência de massa permitiu concluir que o transporte mássico do substrato para o interior da partícula catalítica e sua difusão interna não contribuem significativamente para limitar a velocidade de reação.

A estabilidade operacional do microrganismo encapsulado foi comprovada mediante ensaios de 12h de reação. Com a utilização de reciclo total da vazão de substrato, foi observada a retenção de 96% da atividade máxima, enquanto para reações com alimentação convencional alcançou-se 92%, fornecendo indícios da aplicabilidade do processo contínuo, em reator PBR, para a produção de FOS.

Por fim, conclui-se que o processo desenvolvido, empregando biomassa encapsulada em alginato de cálcio como recheio do reator de leito fixo, é um potencial processo para implementação industrial da produção de furtooligossacarídeos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De acordo com as conclusões obtidas neste estudo, sugere-se a continuidade desta pesquisa visando:

- a) Avaliar o processo por meio da quantificação direta da conversão de FOS;
- b) Aprimorar as condições de síntese do biocatalisador, visando aumentar a concentração de biomassa catalítica no interior da esfera de alginato;
- c) Realizar estudos de modelagem matemática e simulação do reator a fim de prever a conversão teórica de sacarose e a formação de produto (FOS);
- d) Avaliar a implementação do processo em reator de leito fluidizado.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, 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.
- ANTOSOVÁ, M., POLAKOVIC, M., Fructosyltransferases: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides, **Chemical Papers**, v. 55, p. 350, 2001.
- AZEREDO, Maria Cristina Ribeiro de. **Desenvolvimento de um software para estudo do comportamento dinâmico de reatores de leito fixo**. 1996. 177f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 1996. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/267496>. Acesso em: 22 jul. 2019.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New Delhi: McGraw-Hill Kogakusha, Ltd. 1977.
- BALI, V. et al. Fructo-oligosaccharides: production, purification and potential applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1475-1490, 2015.
- BENKEBLIA, N. Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1313, p.54-61, out. 2013.
- BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.
- BOUHNİK, Y. et al. Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. **Nutr Cancer**, Paris, v.26, n.1, p.2129, 1996.
- BRIGGS, George Edward; HALDANE, John Burdon Sanderson. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.338-33. Portland Press Ltd. 1925. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1042/bj0190338>, acesso em 22 de out. de 2019.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H.H. Protease from *Aspergillus oryzae*: Biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolases with antioxidant activities. **Journal of Food Processing**, v. 2014, 2014.
- CASTRO, C.C. et al. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 82–90, 2017.
- CHAMBERT, R.; TREBOUL, G.; DEDONDER, R. Kinetic studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. **Eur J Biochem**, v. 41, p. 285–300, 1974.

CHANG, T. M. S. **Biomedical applications of immobilized enzymes and proteins**. v. 1. Nova Iorque: Springer Science & Business Media, 2013.

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

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

COOK, P. F.; CLELAND, W. W. **Enzyme kinetics and mechanism**. Nova Iorque: Garland Science, 2007.

COUNDRAY, C. et al. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 375-380, 2003.

CREMASCO, M. A. **Fundamentos de transferência de massa**. São Paulo: Blucher, 2016.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 7, n. 11, p.353-361. Elsevier BV. nov. 1996. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244\(96\)10038-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244(96)10038-8). Acesso em 13 de out. de 2019.

CRUZ, R. et al. Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicas* immobilized in calcium alginate. **Bioresource Technology**. v.65, p.139-143. 1998.

CUERVO-FERNANDEZ, R. et al. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp. 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 268-272, 2004.

CUERVO-FERNANDEZ. R. Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 87-93, 2007.

CUNHA, Josivan de Sousa. **Produção e caracterização da enzima Frutossiltransferase de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 visando a obtenção de Frutooligossacarídeos** 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.

CUNHA, J. S. 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.

DETOFOL, M. R. et al. Modeling and simulation of fructooligosaccharides synthesis in a batch basket reactor. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 210, p.44-51, set. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.410>, acesso em 22 de dez.

de 2019.

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.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Nova Iorque: Elsevier Science & Technology Books, 1995.

DUGAS, H.; PENNEY, C. **Bioorganic chemistry: a chemical approach to enzyme action**. Nova Iorque: Springer Science & Business Media, 2013.

DUGGLEBY, R. G.; MORRISON, J. F. The analysis of progress curves for enzyme-catalysed reactions by non-linear regression. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Enzymology**, [s.l.], v. 481, n. 2, p.297-312, abr. 1977. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2744\(77\)90264-9](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2744(77)90264-9), acesso em 13 de fev. de 2020.

DWEVEDI, A. Enzyme Immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment.: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment. **Springer International Publishing**, [s.l.], p. 132, 2016.

ENGEL, P. C. **Enzyme Kinetics** [s.l.] Springer US. p.96, 1981 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-3278-5>, acesso em 13 de out. de 2019.

FARIA, Larissa Lemos. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica-gel para produção de frutooligossacarídeos**. 2019. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2019

FERNÁNDEZ, R. C. et al. Production of fructooligosaccharides by β frutofuranosidase from *Aspergillus* sp. 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.79, p.268-272, 2004.

FLORES-MALTOS, A. et al. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Critical Reviews in Biotechnology**. 36. 10.3109/07388551.2014.953443, 2016.

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

FONTES, R. **Conceitos de cinética enzimática e modelos clássicos de inibição enzimática**. 1999. Disponível em https://users.med.up.pt/~ruifonte/PDFs/PDFs_arquivados_anos_anteriores/2011-2012/cinetica_enzimica_2011_vs02.pdf. Acesso em 23 de out. de 2019.

FORTES, R. C; MUNIZ, L. B. Efeitos da suplementação dietética com frutooligossacarídeos e inulina no organismo humano: estudo baseado em evidências. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 20, n. 3, p. 241-252, 2009.

FROMENT, G. F., **Fixed Bed Reactor Design, Chemical Engineering: Concepts and Reviews**, v. 3, Nova Iorque: Gordon and Breach Science Publishers S. A., 179-

212, 1986.

FROMENT, G. F.; HOFMANN, H. P. K., Chemical Reaction and Reactor Engineering, Design of Fixed-Bed Gas-Solid Catalytic Reactors, *In*: CARBERRY, J. J.; VARMA, A. **Chemical Reaction and Reaction Engineering**. New York: Marcel Dekker Inc., 1987.

FROMENT, G. F.; BISCHOFF, K.B., **Chemical Reactor Analysis and Design**, 2th ed., Nova Iorque:: John Wiley & Sons, 1990.

GABRIELCZYK, J. et al. A Comparative Study on Immobilization of Fructosyltransferase in Biodegradable Polymers by Electrospinning. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 185, n. 3, p. 847-862, 24 jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-018-2694-6>, acesso em 02 de jan. de 2020.

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

GANAIÉ, M. A.; GUPTA, U. S. Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.110. p. 253-258. 2014b.

GARCIA, Rogério Lopes. **Imobilização da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, caracterização e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. 2018. 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2018

GHAZI, I. et al. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v.128, n.1, p. 204-211, 2005.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Cambridge, v.125, n.6, p.1401- 1412, 1995.

GIESE, E. C. et al. Produção, propriedades e aplicações de oligossacarídeos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 683-700, abr/jun. 2011.

GONÇALVES, Maria Carolina Pereira. **Imobilização de frutossiltransferase microbiana em gel de alginato e sua caracterização para a produção de frutooligossacarídeos**. 2019. 139 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2019.

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

HAYASHI, S. et al.. **Production of a novel syrup containing neofructooligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum***. **Biotechnology Letters**, 22(18), 1465-1469, 2000.

HIDAKA, H. et al. Effects of fructooligosaccharids on intestinal flora and human health. **Bifidobacterium Microflora**, Toio, v.5, p.37-50, 1986.

HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A. Fructooligosaccharide-producing Enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 2061 1. **Agric. Biol. Chem**, v. 52, n. 5, p. 1181–1187, 1988.

HILL, C. G. Jr., **An Introduction to Chemical Engineering Kinetics & Reactor Design**, Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1977.

JUNG, K.H. et al. Industrial production of fructooligosaccharides by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* in a packed bed reactor. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 8, p. 1621–1624, 2011.

KAMIMURA, E. S. et al. Immobilization of fructosyltransferase from *Pichia pastoris* in blend of alginate and gelatin. **New Biotechnology**, [s.l.], v. 25, p.149-149, set. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.485>, acesso em 29 de nov. de 2019.

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

KORETSKY, M. D. **Termodinâmica para Engenharia Química**. São Paulo: Editora LTC, 2007.

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

LIM, J. S. et al. Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase. **European Food Research and Technology**, 225 (3-4), 457- 462. 2007.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. São Paulo: Sarvier, 2014.

LESKOVAC, Vladimir. **Comprehensive enzyme kinetics**. Nova Iorque: Springer Science & Business Media, 2003.

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

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

LORENZONI, A. S. G. et al. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p.51-55, jan. 2015.

LÓPEZ-FIDALGO, J.; TOMMASI, C.; TRANDAFIR, P. Optimal designs for discriminating between some extensions of the Michaelis–Menten model. **Journal Of Statistical Planning And Inference**, [s.l.], v. 138, n. 12, p.3797-3804, dez. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspi.2008.01.014>, acesso em 22 de out. de 2019.

MARANGONI, A.. **Enzyme Kinetics: A Modern Approach**. 10.1002/0471267295.ch12. 2003. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2003.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B.. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do delineamento composto rotacional em experimentos com alto coeficiente de variação**. 2012. 80f. Dissertação (Pós-graduação em Estatística Aplicada e Biometria) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.

MICHAELIS, L. e MENTEN, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. **Biochem. Z.** v. 49, p. 333–369, 1913.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n. 3, p. 426–428,. DOI: 10.1021/ac60147a030. 1959.

MIURA Y. et al.. Activity of Enzyme Immobilized by Microencapsulation. In: Weetall H.H., Suzuki S. (eds) **Immobilized Enzyme Technology**. Springer, Boston, MA. 1975.

MODLER, H.W. Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. **Intern Dairy J**, Kamptville, v.4, p.383-407, 1994.

MODLER, H.W.; MCKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. **Bifidobacteria and bifidogenic factors**. Canad Instit Food SciTechn J, Kamptville, v.23, p.29-41, 1990.

MONSAN, P., PAUL, F., Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microbiology**, v. 16, p. 187–192, 1995.

MORAIS, Edvaldo Rodrigo de. **Modelagem e simulação de reatores catalíticos de leite fixo: avaliação de diferentes configurações para o fluido refrigerante**. 2004. 202p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 2004. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266478>. Acesso em: 3 ago. 2018.

MORAIS, Edvaldo Rodrigo de. **Modelagem e análise de reatores catalíticos de leite fixo**. 2007. 179 p. Tese (doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 2007. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/267109>. Acesso em: 15 ago. 2019.

MORDOR INTELIGENCE. **Global nutraceuticals market - growth, trends and forecasts (2017 - 2022)**. Mordor Inteligence. Abril de 2017. Disponível em: https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-nutraceuticals-market-industry?gclid=CjsKDwjw6qnJBRDpoonDwLSeZhkAlpTR8Lv0J0UzcsFD-TDSowPYe15clf2I1hTNGZ5NW-D1GLKGgJKzPD_BwE. Acesso em 20 de out de 2019.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Básica**. 2. ed. São Paulo: Autolab Ltda, 2003.

MUÑIZ-MÁRQUEZ, D. B.; et al. Enhancement of fructosyltransferase and fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in Solid-State Fermentation using aguamiel as culture medium. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 276-282, 2016.

MUSSATTO, S. I.; TEIXEIRA, J. A. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. **Biochemical Engineering Journal**, 2009.

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

NEMUKULA, A. et al. Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Bioresource Technology**, 100(6), 2040-2045. 2009.

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.

OLSON, A. C., e CHARLES L. C. **Immobilized enzymes in food and microbial processes**. New York: Plenum Press, 1974.

OLIVEIRA, E. A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2007.

OLVERA, C.; CASTILLO, E.; LOPEZ M. A.. **Fructossiltransferasas, fructanas y fructosa**. 2007.

ONDERKOVÁ, Z.; BRYJAK, J.; POLAKOVIČ, M.. Properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* immobilized on an acrylic carrier. **Chemical Papers**, [s.l.], v. 61, n. 5, p.359-363, 1. Springer Nature. jan. 2007.

OTTONI, C. A. et al. Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, ed. 1, p.49-59, 2012.

PARK Y. K., PASTORE G. M., inventors; Usina da Barra S/A - Açúcar e Álcool, assignee. **Process for preparing beta-fructofuranosidase enzyme and a process for producing fructooligosaccharides**. U.S. patent 7,063,976. 2006.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Fructooligosacarídeos: Implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, 33(2), 385-390. 2003.

PEREIRA, D. I; GIBSON, G. R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, p.259-281, 2002.

PEREIRA, F. **Biochemistry In A Chemical Approach**. 10.13140/Rg.2.2.17251.14889. 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/311994359_BIOCHEMISTRY_IN_A_CHEMICAL_APPROACH_in_portuguese_BIOQUIMICA_NUMA_ABORDAGEM_QUIMICA. Acesso em 13 de out. de 2019.

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

PLATKOVÁ, Z. et al. Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Chem. Pap.** 60, 469–472, 2006. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.2478/s11696-006-0085-x>, acesso em 12 de jan. de 2020.

RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

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

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.65, p.530-537. 2004.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, 2005a.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, 2005b.

SANTOS, A. M. P. e MAUGERI, F. Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45(2), p. 181-186. 2007.

SCHMIDEDER, S. et al. From three - dimensional morphology to effective diffusivity in filamentous fungal pellets. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 116, n. 12, p.3360-3371, 8 out. 2019..

SHEU, D. C. et al. Production of fructooligosaccharides in high yield used a mixed enzyme system of β fructofuranosidase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**, 23, 1499-1503. 2001.

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

SILVA, A. S. S da. et al. Frutoligossacarídeos: fibras alimentares ativas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.25, n.2, p.295-304, 2007.

SILVA, C. E. V. **Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Universidade de São Paulo (USP). Piracicaba, 2008.

SILVA, J. C. **Seleção de microrganismos produtores de frutossiltransferase e estudo das propriedades bioquímicas da frutossiltransferases de Penicillium sp.** 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - UNICAMP, Campinas, SP, 2009.

SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 71-77, 1990.

SMITH, J.M.; VAN NESS, H.C.; ABBOTT, M.M. **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2007.

SOUZA, L. T. A. et al. **Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte**. São Paulo: Editora Blucher, *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria* vol.4. p. 529-568, 2017.

SPIEGEL, J.E. et al. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Techn, Boston**, v.48, p.85-89, 1994.

TÁMBARA, Y et al. Structural analysis and optimized production of fructooligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* STR4. **Biotechnology Letters**. v.21, p.117-121. 1999.

TAYLOR, K. B.. Enzyme Kinetics and Mechanisms. **Springer Netherlands**, [s.l.], p.1-3. Kluwer Academic Publishers. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/0-306-48025-5>, acesso em 21 de set de 2019.

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

VEGA, R.; ZÚNIGA-HANSEN, M.E. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides

with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.102, p.10180–10186, 2011.

WANG, X.; GIBSON, G. R. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal of Bacteriology**, Cambridge, v.74, n.4, p.373. 380, 1993.

WEETALL, H. Immobilized Enzyme Technology: Research and Applications. **Springer Science & Business Media**, 2012.

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

WELTY, J. R., WILSON, R. E. e WICKS, C. E. “**Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer**,4. Ed.. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2001.

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. doi: 10.1007/s00253-008-1407-4, 2008.

YAMASHITA, K.; KAWAI, K.; ITAKAMURA, M. Effects of fructooligosaccharides on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, Fukuoka, v.4, p.961-966, 1984.

YUN, J. W.; SONG, S. K.. The production of high-content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**. v. 15 n. 6, p.573-576. 1993.

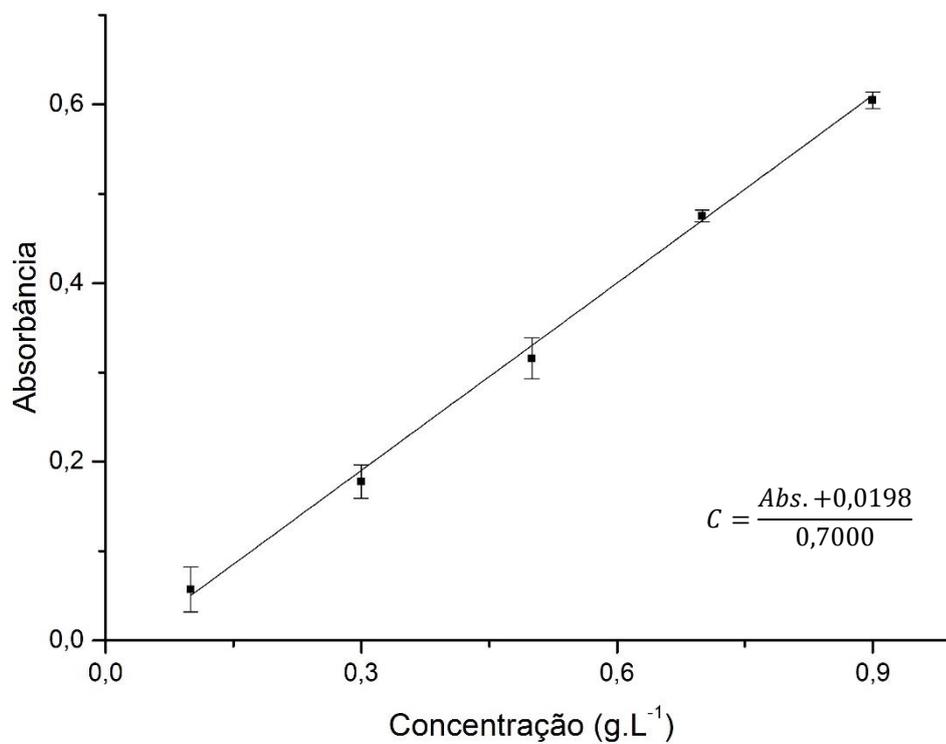
YUN, J. W; SONG, S. K... Continuous production of fructooligosaccharides using fructosyltransferase immobilized on ion exchange resin. **Biotechnology And Bioprocess Engineering**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.18-21. Springer Science and Business Media LLC. dez. 1996.

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

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.

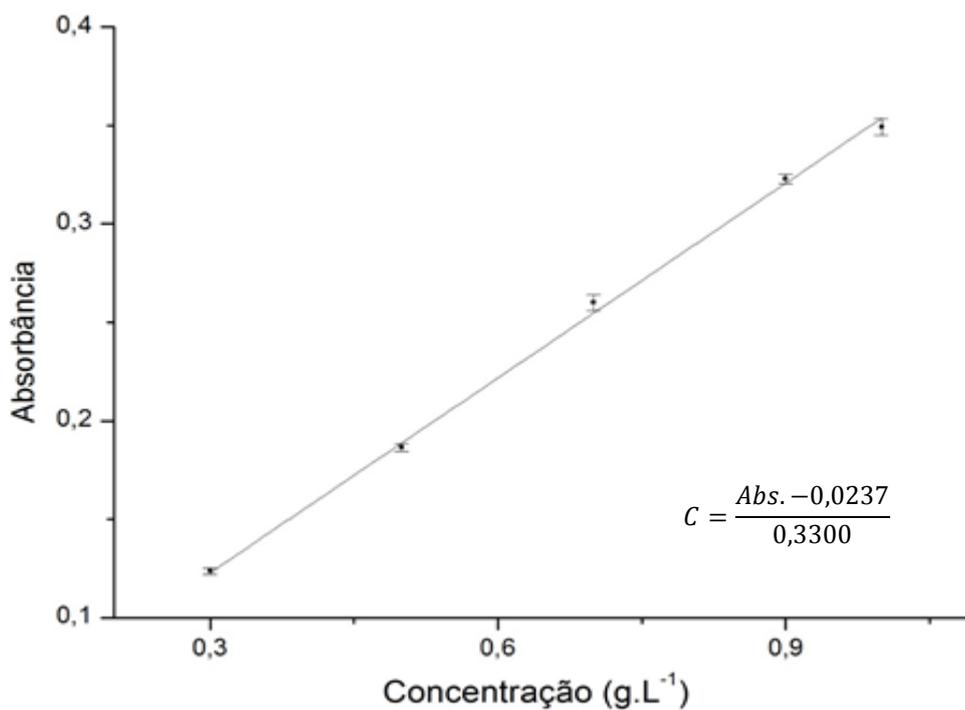
APÊNDICE A – Curvas Analíticas

Figura 28 - Curva analítica do método DNS para determinação de açúcares redutores



Fonte: Autor.

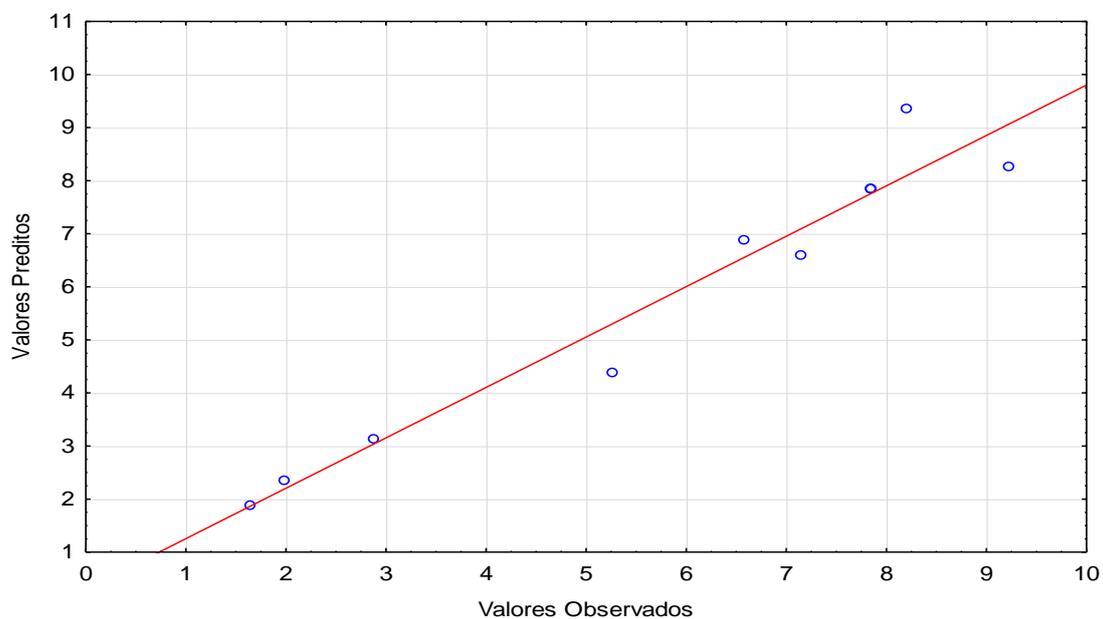
Figura 29 - Curva analítica do método GOD - PAP para determinação de glicose



Fonte: Autor.

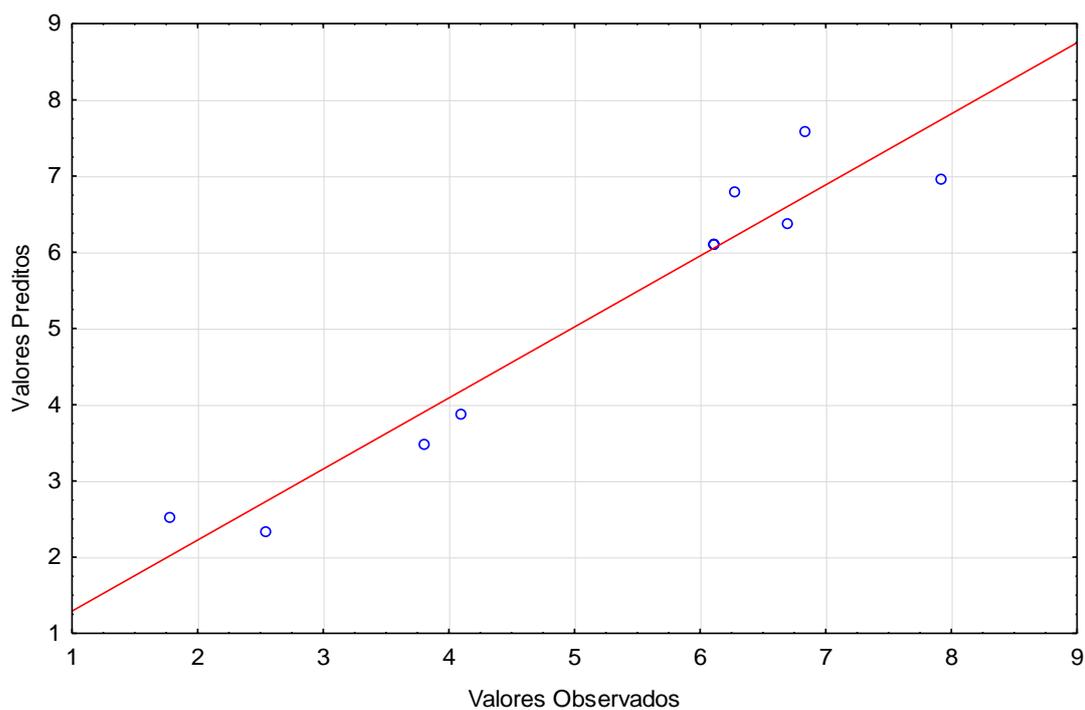
APÊNDICE B – Análises Estatísticas

Figura 30 - Comparativo entre predição do modelo e dados experimentais para atividade de transfrutossilagem

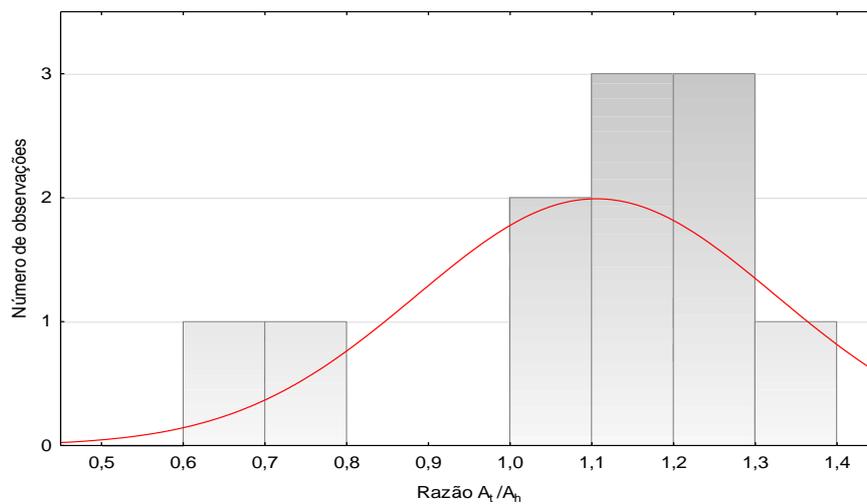


Fonte: Autor.

Figura 31 - Comparativo entre predição do modelo e dados experimentais para atividade hidrolítica



Fonte: Autor.

Figura 32 – Histograma de distribuição dos dados de A_t/A_h 

Fonte: Autor.

Nota: A linha vermelha indica a distribuição gaussiana teórica.