

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

ISABELLA MEDEIROS ARAÚJO

**IMOBILIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus*
oryzae IPT-301 EM POLIHIDROXIBUTIRATO E SUA CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA PARA A PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

POÇOS DE CALDAS/MG

2021

ISABELLA MEDEIROS ARAÚJO

IMOBILIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus oryzae*
IPT-301 EM POLIHIDROXIBUTIRATO E SUA CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARA A
PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários 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

Poços de Caldas / MG

2021

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

Araújo, Isabella Medeiros.

A663i Imobilização de frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em polihidroxibutirato e sua caracterização bioquímica para a produção de frutooligossacarídeos / Isabella Medeiros Araújo. -- Poços de Caldas/MG, 2021.

92 f. –

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2021.

Bibliografia.

1. *Aspergillus*. 2. Enzimas imobilizadas. 3. Glutaral. 4. Cinética enzimática. I. Perna, Rafael Firmani. II. Título.

CDD – 660

ISABELLA MEDEIROS ARAUJO

IMOBILIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM POLIHIDROXIBUTIRATO E SUA CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARA A PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

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

Aprovada em: 26 de novembro de 2021

Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Gisella Maria Zanin

Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano

Instituição: Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo



Documento assinado eletronicamente por Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior, em 26/11/2021, às 18:13, 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 Alfredo Eduardo Maiorano, Usuário Externo, em 29/11/2021, às 16:18, 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 GISELLA MARIA ZANIN, Usuário Externo, em 03/12/2021, às 16:58, 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 0640862 e o código CRC 14C59445.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou grata a Deus, por ser a minha força diária, me conceder saúde, resiliência e fé ao longo da caminhada, mesmo diante de tempos difíceis e incertos vivenciados com o cenário de pandemia causado pelo COVID-19.

Aos meus pais, Fernando e Rosângela, irmãos, Thiago e Nando, cunhada, Lu e meu sobrinho e afilhado Gugu, por serem meu alicerce, trazerem leveza aos meus dias, e pelo apoio incondicional em toda esta trajetória.

Aos demais familiares e amigos de longa data, em especial minha madrinha Tina, pelas orações e pela torcida. Aos queridos avós, *in memoriam*, que ficariam imensamente felizes com essa conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Firmani Perna pela oportunidade concedida em fazer parte do grupo de pesquisa, apoio, paciência e todo o conhecimento transmitido no decorrer dos experimentos.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP), em especial ao Dr. Alfredo Eduardo Maiorano e à Msc. Elda Sabino da Silva, pelo fornecimento do PHB, sem o qual a pesquisa não seria possível e pelo auxílio com a realização das análises laboratoriais.

Aos amigos e parceiros de pesquisa, em especial Bia e Rick, que sempre se dispuseram a compartilhar conhecimentos e amizade durante o mestrado.

Ao Pedro, meu aluno de IC, por todo o auxílio prestado na realização dos experimentos.

Ao mestre Giancarlo de Souza Dias, por ser solícito e pelos ensinamentos sobre a pesquisa.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, em especial Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales, por acompanhar e enriquecer as discussões pertinentes ao trabalho.

Aos técnicos e funcionários da UNIFAL, em especial Talita, Cristiano, Ícaro e Ju, por estarem sempre dispostos a ajudar e disponibilizar os recursos necessários à pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa.

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

RESUMO

Fruto-oligossacarídeos (FOS) se referem aos oligômeros de frutose, cujas unidades frutossil são ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose, o que os distingue dos demais oligômeros. Os FOS, também conhecidos como “açúcares não convencionais”, apresentam excelentes características funcionais em alimentos, além de seus aspectos físicos e fisiológicos. Estes açúcares podem ser produzidos de forma natural, por enzimas presentes em vegetais, ou por enzimas microbianas, dentre as quais tem-se a frutossiltransferase (FTase E.C.2.4.1.9), de *Aspergillus oryzae* IPT-301, que atua como o biocatalisador da reação de transfrutossilacção da sacarose. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo estudar o processo de imobilização da enzima FTase microbiana extracelular, utilizando o polihidroxibutirato (PHB) como suporte, nas formas pura e funcionalizada com glutaraldeído, visando à produção de FOS. Para tal, foram realizados testes de imobilização, por adsorção física e ligação covalente, na temperatura de 35 °C, durante 8 horas, com agitação de 175 rpm, 10 mL de caldo fermentado, pH 5,5, contendo a enzima microbiana extracelular, e 1,0 g de suporte puro e funcionalizado. Para estudos de caracterização do biocatalisador imobilizado, foram realizados ensaios de estabilidade frente ao pH de incubação (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0), estabilidade térmica (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C), avaliação da influência da concentração de substrato na reação enzimática (200 g L⁻¹, 300 g L⁻¹, 400 g L⁻¹, 470 g L⁻¹, 500 g L⁻¹ e 600 g L⁻¹), ensaios de estabilidade operacional e estabilidade ao armazenamento. Os perfis cinéticos de imobilização indicaram que a atividade de transfrutossilacção (A_t), presente no caldo fermentado, decresceu com o aumento do tempo de imobilização e que, o maior rendimento de imobilização foi cerca de 41 \pm 6 %, para a FTase adsorvida no suporte puro e 55 \pm 4 % para a FTase imobilizada no suporte funcionalizado, após 8 horas de imobilização. Além destes, foram encontrados valores de 17 \pm 3 % e 11 \pm 2 % para as atividades recuperadas (AR) para a enzima imobilizada nos suportes puro e funcionalizado, respectivamente. Desse modo, foram definidas as condições de imobilização para ambas as formas de suporte: temperatura de 35 °C, pH 5,5, agitação de 175 rpm e 8 h de imobilização. Os maiores valores de A_t foram obtidos na concentração de sacarose de 400 g L⁻¹ para a FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado e o modelo de Hill foi ajustado aos dados para a imobilização da FTase em ambos os suportes. A enzima imobilizada em PHB funcionalizado apresentou maiores estabilidades térmica, operacional e ao armazenamento que a FTase imobilizada em PHB puro. A FTase imobilizada em PHB funcionalizado apresentou retenção de atividade de 56,83 \pm 4,38 % após seis ciclos batelada,

enquanto a enzima adsorvida em PHB puro apresentou retenção de $41,29 \pm 3,24$ % da atividade inicial. Portanto, a partir dos estudos de imobilização e caracterização, foi possível concluir que a FTase extracelular foi adequadamente imobilizada em PHB puro e funcionalizado, com melhores resultados para a enzima ligada ao biopolímero funcionalizado.

Palavras-chave: Frutossiltransferase; *Aspergillus*; Imobilização; Polihidroxibutirato (PHB); Glutaraldeído; Caracterização Enzimática.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) refer to fructose oligomers, in which the fructosyl units are bound in β (2 \rightarrow 1) position of sucrose, which distinguishes them other oligomers. The FOS, also known as “unconventional sugars”, present excellent functional characteristics in foods, beyond their physical and physiological aspects. These sugars can be produced about naturally, by enzymes, present in vegetables, or by microbial enzymes, such as fructosyltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9), generated by *Aspergillus oryzae* IPT-301, which are the biocatalyst in transfructosylation reaction of sucrose. In that context, the current work focus on the studies of the immobilization process of the enzyme extracellular microbial FTase, using polyhydroxybutyrate as support, in the forms pure and functionalized, for the production of FOS. For this purpose, immobilization tests were performed, by physical adsorption and covalent bond, at temperature 35 °C, for 8 hours, with agitation of 175 rpm, 10 mL fermented broth, pH 5.5, containing the extracellular microbial enzyme, and 1.0 g of support, pure and functionalized. For the characterization studies of the immobilized biocatalyst, it was made assays of the: incubation pH stability (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0), thermal stability (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C), assessment of the substrate concentration in the enzymatic reaction (200 g L⁻¹, 300 g L⁻¹, 400 g L⁻¹, 470 g L⁻¹, 500 g L⁻¹ e 600 g L⁻¹), operational stability and storage stability. The kinetic immobilization profiles indicated that the transfructosylation activity (A_t), present in the fermented broth, decreased with the increase of the immobilization time and that the highest immobilization yield was about 41 \pm 6 % for the adsorbed FTase in pure support and 55 \pm 4 % for the immobilized FTase in functionalized support. Besides these, it was discovered values of 17 \pm 3 % and 11 \pm 2 % for recovered activities for the immobilized enzyme in pure and functionalized supports, respectively. Thus, the conditions of the immobilization was defined for both support forms: temperature of 35 °C, pH 5,5, stirring of 175 rpm and 8 h of immobilization. The highest values of A_t were obtained for a sucrose concentration of 400 g L⁻¹ for immobilized FTase in pure PHB and functionalized and the Hill model was fitted for immobilized FTase data from both supports. The immobilized enzyme in functionalized PHB presented higher thermal, operational, and storage stability than immobilized FTase in pure PHB. The immobilized FTase in functionalized PHB presented activity retention of 56,83 \pm 4,38 % after six batch cycles, whereas adsorbed enzyme in pure PHB presented activity retention of 41,29 \pm 3,24 % of the initial activity. Thus, from the studies of the immobilization and characterization it was possible to conclude that the extracellular FTase was properly adsorbed

in pure and functionalized PHB, presenting better results for the enzyme linked to functionalized biopolymer.

Keywords: Fructosyltransferase; *Aspergillus*; Immobilization; Polyhydroxybutyrate (PHB); Glutaraldehyde; Enzymatic characterization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estruturas químicas da sacarose e dos principais frutanos: (A) sacarose, (B) 1-kestose, (C) nistose, (D) frutofuranosilnistose 21
- Figura 2 - Métodos de imobilização de enzimas 33
- Figura 3 - Micrografias eletrônicas de amostras de partículas de PHB..... 49
- Figura 4 - Espectro de infravermelho por transformada de Fourier das amostras **A** (PHB puro na ausência da enzima), **B** (PHB puro contendo a enzima imobilizada), **C** (PHB funcionalizado na ausência da enzima) e **D** (PHB funcionalizado contendo a enzima imobilizada) 50
- Figura 5 - Perfil cinético de imobilização de FTase extracelular em PHB, puro e funcionalizado, em função do tempo: monitoramento da atividade de transfrutossilação no sobrenadante. Condições reacionais: (pH: 5,5, temperatura: 35 °C, velocidade de agitação: 175 rpm, 10:1 caldo de cultura/g de suporte 51
- Figura 6 - Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB puro ao longo de 24 horas de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C) 55
- Figura 7 - Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB funcionalizado ao longo de 24 horas de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C) 56
- Figura 8 - Determinação da energia de ativação para a desnaturação térmica (E_D). A linearização da Equação de Arrhenius [$\ln(k_D)$ em função da (T^{-1})] foi utilizada para estimar E_D da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB puro 57
- Figura 9 - Determinação da energia de ativação para a desnaturação térmica (E_D). A linearização da Equação de Arrhenius [$\ln(k_D)$ em função da (T^{-1})] foi utilizada para estimar E_D da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB funcionalizado com glutaraldeído 58
- Figura 10 - Influência da concentração de substrato na atividade de transfrutossilação da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB. Os maiores valores de atividades foram de $8,55 \pm 0,24 \text{ U g}^{-1}$ e $10,7 \pm 0,53 \text{ U g}^{-1}$ para o derivado FTase PHB-puro e derivado FTase-PHB funcionalizado, respectivamente 63
- Figura 11 - Ajuste do modelo cinético de Hill aos dados experimentais de atividade de

transfrutossilacção da enzima FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em PHB puro	65
Figura 12 - Ajuste do modelo cinético de Hill aos dados experimentais de atividade de transfrutossilacção da enzima FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em PHB funcionalizado.....	66
Figura 13 - Estabilidade enzimática da FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em PHB puro e funcionalizado após 24 h de incubação a 4 °C para diferentes valores de pH. A reacção enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m v ⁻¹) em tampão tris-acetato 0,2 mol L ⁻¹ , com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min.....	68
Figura 14 - Estabilidade operacional da FTase de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em PHB puro e funcionalizado avaliada durante ciclos reacionais consecutivos em batelada. A reacção enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m v ⁻¹) em tampão tris-acetato 0,2 mol L ⁻¹ (pH 5,5), com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min.....	70
Figura 15 - Estabilidade ao armazenamento da FTase de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada nos suportes PHB puro e funcionalizado. A reacção enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m v ⁻¹) em tampão tris-acetato 0,2 mol L ⁻¹ (pH 5,5), com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min.....	73
Figura 16 - Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicífico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR).....	90
Figura 17 - Perfil de estabilidade térmica da FTase solúvel de <i>A. oryzae</i> IPT-301 ao longo de 24 horas de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). A reacção enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução sacarose 47 % (m v ⁻¹) em tampão tris-acetato (pH 5,5) 0,2 mol L ⁻¹ , com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min.....	91
Figura 18 - Determinação da energia de ativação para a desnaturação térmica (E _D). A linearização da Equação de Arrhenius [ln (k _D) em função da (T ⁻¹)] foi utilizada para estimar E _D da FTase solúvel de <i>A. oryzae</i> IPT-301	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Empresas produtoras de fruto-oligossacarídeos de grau alimentício	23
Tabela 2 - Caracterização de partículas de PHB puro e funcionalizado, obtida pelos métodos BET e BJH.....	49
Tabela 3 - Parâmetros de imobilização para o PHB puro e funcionalizado após 8 horas de imobilização	53
Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos para a FTase extracelular solúvel (S) e imobilizada em PHB, puro (IP) e funcionalizado (IF), obtidos para diferentes temperaturas de incubação	59
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos para a FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em PHB puro	66
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos para a FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em PHB funcionalizado.....	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS: COMPOSIÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES	20
3.2	PRODUÇÃO DE FOS	22
3.3	ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE (FTase)	23
3.4	ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO (<i>At</i>)	24
3.5	CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	24
3.5.1	Influência da temperatura na cinética enzimática	25
3.5.2	Influência do pH na cinética enzimática	26
3.5.3	Influência da concentração dos substratos na cinética enzimática	27
3.6	ESTABILIDADE TÉRMICA DAS ENZIMAS	27
3.7	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	29
3.7.1	Estudos da imobilização da FTase extracelular	31
3.8	MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	28
3.8.1	Adsorção física (PHB)	34
3.8.2	Ligação covalente	35
3.9	TIPOS DE SUPORTES.....	37
3.9.1	Polihidroxitirato (PHB)	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	PREPARO E FUNCIONALIZAÇÃO DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO	40
4.2	PRODUÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR MICROBIANA	40
4.2.1	Micro-organismo e condições de cultivo	40
4.2.2	Cultivo celular submerso	41
4.3	ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	41
4.3.1	Parâmetros de imobilização	42
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO BIOCATALISADOR	42
4.5	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA IMOBILIZADA	43

4.5.1	Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos.....	43
4.5.2	Ensaio de estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos ...	44
4.5.3	Ensaio de estabilidade frente ao pH de incubação.....	44
4.5.4	Ensaio de estabilidade operacional.....	44
4.5.5	Ensaio de estabilidade ao armazenamento	45
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	45
4.6.1	Determinação das atividades enzimáticas	45
4.6.2	Quantificação dos açúcares	46
4.6.2.1	Determinação da concentração de açúcares redutores (AR)	46
4.6.2.2	Determinação da concentração de glicose (G)	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BIOCATALISADOR IMOBILIZADO	48
5.2	PERFIL CINÉTICO DE IMOBILIZAÇÃO DA FTASE EXTRACELULAR EM PHB PURO E FUNCIONALIZADO	50
5.3	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA IMOBILIZADA	54
5.3.1	Estabilidade térmica da FTase extracelular imobilizada em PHB puro e funcionalizado	55
5.3.2	Efeito da concentração de substrato na atividade de transfrutoseilação e obtenção dos parâmetros cinéticos	62
5.3.3	Estabilidade da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado frente ao pH.....	67
5.3.4	Estabilidade operacional da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado	69
5.3.5	Estabilidade ao armazenamento da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado	72
6	CONCLUSÃO.....	75
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICES	90

1 INTRODUÇÃO

Em meio à crescente utilização de enzimas como biocatalisadores nas indústrias farmacêutica, têxtil, alimentícia e de papel e celulose, tem-se o surgimento de processos tecnológicos capazes de aliar o aumento de produtividade à minimização de custos, mediante reuso destes biocatalisadores. Algumas vantagens como maior eficiência e sustentabilidade dos processos catalisados por enzimas ou menores custos de investimento e energia das instalações em que são realizadas reações enzimáticas corroboram com o crescimento do mercado global de enzimas, cuja expectativa é atingir US\$ 17,2 bilhões até 2027 (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Diante dessa perspectiva promissora e alta aplicabilidade na indústria, em que há a necessidade de enzimas com propriedades melhoradas, o avanço da tecnologia enzimática tona-se de extrema importância para o desenvolvimento de processos biotecnológicos (SINGHANIA *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) por meio de enzimas microbianas tem se destacado na indústria alimentícia. Sendo assim, estes açúcares podem ser obtidos a partir de processos enzimáticos, mediante ação de enzimas como as frutossiltransferases (FTases, E.C.2.4.1.9), as quais apresentam elevada atividade de transfrutossilacção ao se utilizar moléculas de sacarose como substrato (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; FLORES-MALTOS *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2020; PERNA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021). A síntese das FTases é realizada, predominantemente, por fungos dos gêneros *Aureobasidium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (ANTOSOVÁ *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2017). Especificamente, o *Aspergillus oryzae* IPT-301 tem se destacado como fonte potencialmente produtora de FTase extracelular (enzima excretada para o meio de cultura) com elevada atividade de transfrutossilacção dentre as dezessete linhagens de fungos filamentosos avaliadas (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007).

FOS é a nomenclatura dada aos oligômeros de frutose, que são constituídos pelos açúcares 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose, cujas unidades frutossil são ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (FLORES-MALTOS *et al.*, 2019; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2020; YUN, 1996). São também conhecidos como “açúcares não convencionais” e apresentam excelentes características funcionais em alimentos, além de seus aspectos físicos e fisiológicos (FARIA *et al.*, 2021; JAYALAKSHMI; SADIK; SIVAKUMAR, 2021; SPIEGEL *et al.*,

1994). Os FOS, de baixa caloria, são classificados como prebióticos, não são cariogênicos, atuam no controle do colesterol e dos triglicerídeos, e auxiliam no tratamento de doenças como anemia, osteoporose, hipertensão, diabetes, intolerância à lactose e insuficiência renal (CUNHA *et al.*, 2019; NOBRE *et al.*, 2018; PASSOS; PARK, 2003). Além disso, aumentam a absorção de cálcio e magnésio pelo organismo humano e, por não serem hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais, promovem a seletividade bacteriana na microbiota intestinal, auxiliando na eliminação de microorganismos patogênicos e na prevenção do câncer de cólon (JITONNOM; KETUDAT-CAIRNS; HANNONGBUA, 2018; ZHANG *et al.*, 2017).

O mercado mundial de FOS experimenta um notório crescimento, a uma taxa prevista de 10,4 % ao ano no período entre 2019 e 2027, com estimativa de se alcançar U\$\$ 3,88 bilhões em 2027 (REPORTS AND DATA, 2020). Não obstante, o Brasil ainda carece de processos biotecnológicos de produção adequados e prontos para a aplicação industrial. Com isso, tem-se a oportunidade de desenvolver processos capazes de intensificar sua produção e, dentre as possíveis formas, encontra-se o uso da enzima FTase extracelular imobilizada em suportes orgânico e/ou inorgânico. Por meio dessa técnica, fixa-se a enzima de interesse em um suporte para que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente, visando protegê-la contra condições adversas do meio (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

A utilização de enzimas imobilizadas, atuando como biocatalisadores, possibilita o seu reuso em processos contínuos e bateladas, elimina a necessidade de separação entre as enzimas e os produtos obtidos, além de poder aumentar, consideravelmente, a estabilidade enzimática. Tais características permitem uma grande vantagem operacional quando comparado ao uso de enzimas solúveis (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; SHELDON, 2007). Essa técnica ainda é capaz de promover aumentos significativos de atividade e estabilidade quanto à estocagem, tanto em solução como secas, a qual, geralmente, é superior à da enzima solúvel (ZANIN; MORAES, 2014).

Existem poucos estudos na literatura que abordam a imobilização de FTases em suportes orgânicos e inorgânicos visando à produção de FOS em pequena ou larga escala. Yun e Song (1996) imobilizaram a FTase de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10542 em uma resina altamente porosa Diaion HPA 25®, em que a enzima imobilizada revelou maior resistência às variações de pH do que sua forma solúvel. Ghazi *et al.* (2006) reportaram elevada atividade operacional de enzima comercial com atividade de transfrutossilção (Pectinex Ultra SP-L) imobilizada em suporte à base de polimetacrilato.

Platková *et al.* (2006) relataram a imobilização de FTases de *Aureobasidium pullulans* em vários materiais comerciais. Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) imobilizaram FTase extracelular de *Rhodotorula* sp., por adsorção, em minério de nióbio, e obtiveram alta atividade de transfrutoseilação e estabilidades térmica e frente ao pH satisfatórias para a enzima imobilizada. Oliveira *et al.* (2020) estudaram a imobilização da Pectinex Ultra SP-L de *Aspergillus aculeatus*, por ligação covalente, em nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄-quitosana, e observaram que a enzima imobilizada apresentou boa retenção da atividade de transfrutoseilação após seis ciclos de reuso e ainda, exibiu boa estabilidade ao armazenamento. Faria *et al.* (2021) imobilizaram, por adsorção física, a FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica-gel mesoporosa e realizaram a caracterização das propriedades bioquímicas do biocatalisador heterogêneo, de modo a aplicá-lo na produção de FOS.

Em meio aos numerosos suportes utilizados para a imobilização de enzimas, encontra-se o polihidroxibutirato (PHB), um polímero orgânico derivado de polihidroxialcanoatos (PHAs), que tem sido observado como um promissor suporte hidrofóbico na imobilização de lipases e nattokinase (BINHAYEEDING *et al.*, 2020; DEEPAK *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2014; REIS; FERREIRA; PEREIRA, 2020). O biopolímero apresenta propriedades físicas e mecânicas semelhantes às dos termoplásticos sintéticos como o polipropileno, que lhe confere boa resistência mecânica. Além do mais, é biodegradável, biocompatível, possui alta cristalinidade, capacidade de regeneração, dentre outras características desejáveis em suportes orgânicos para imobilização (MENDES *et al.*, 2011a). Essas propriedades sugerem que o PHB possa se tornar um suporte potencial para a imobilização de FTases.

Tem-se ainda, a possibilidade de funcionalizar a superfície do suporte, por meio do uso de glutaraldeído, conferindo maior resistência e rigidez à estrutura do biocatalisador heterogêneo perante agentes desnaturantes (calor, solventes orgânicos e pH extremos), além de minimizar o fenômeno de dessorção da enzima no suporte e possibilitar o seu uso em diferentes configurações de reatores (MENDES *et al.*, 2011b; SOUZA *et al.*, 2017). A molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima e esta é imobilizada covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminos que se ligam, por sua vez, aos grupos aldeídos do suporte funcionalizado (SOUZA *et al.*, 2017).

Neste contexto, visando intensificar a produção de FOS, principalmente no mercado interno, e atender a sua crescente demanda comercial, o presente estudo propõe desenvolver um biocatalisador heterogêneo inédito para a produção do açúcar prebiótico

por meio da imobilização da enzima FTase extracelular em suporte PHB. Buscou-se obter um biocatalisador robusto que apresente expressivas atividade, seletividade e especificidade, além de elevada estabilidade, especialmente térmica e operacional, de modo a ser empregado em diferentes configurações de reatores para a síntese de FOS nos modos batelada e contínuo. Ressalta-se que estes foram os primeiros resultados alcançados para a FTase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizada no biopolímero e, portanto, representam o início de uma sequência de estudos relacionados a esta enzima imobilizada para aplicação em processos biotecnológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Imobilizar, por adsorção física e ligação covalente, a enzima frutossiltransferase (FTase) extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em polihidroxibutirato (PHB), puro e funcionalizado, visando obter um biocatalisador heterogêneo ativo e estável para a produção de fruto-oligossacarídeos (FOS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o material de suporte, polihidroxibutirato (PHB), para a imobilização de FTase extracelular por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), área específica (método BET), tamanho e volume de poros (método BJH) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR);
- b) Funcionalizar o suporte polihidroxibutirato (PHB) com glutaraldeído, por meio da inserção de grupos funcionais na superfície do biopolímero, visando aumentar a imobilização da enzima e sua estabilidade;
- c) Imobilizar, por adsorção física e ligação covalente, a enzima FTase extracelular, produzida por cultivo celular submerso, no biopolímero PHB puro e funcionalizado;
- d) Determinar os perfis cinéticos de imobilização enzimática, utilizando os suportes PHB puro e funcionalizado, visando obter um biocatalisador heterogêneo com elevada atividade de transfrutossililação;
- e) Determinar os parâmetros de imobilização: rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR) para a enzima imobilizada nos suportes PHB puro e funcionalizado;
- f) Avaliar a influência da concentração de substrato (sacarose) na atividade de transfrutossililação e obter os parâmetros cinéticos da enzima imobilizada;
- g) Avaliar as estabilidades térmica, ao armazenamento e frente ao pH de incubação da enzima FTase imobilizada em PHB, puro e funcionalizado, e obter seus parâmetros termodinâmicos;

- h) Controlar o desempenho do biocatalisador imobilizado em ciclos de bateladas consecutivas para avaliação da sua estabilidade operacional.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo apresenta-se algumas características dos fruto-oligossacarídeos (FOS), aplicações e produção. Aborda-se também conceitos sobre a frutossiltransferase (FTase) e aspectos de imobilização dessa enzima em diferentes suportes. Expõe-se ainda os fatores que influenciam na cinética enzimática.

3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS: COMPOSIÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

A classe de carboidratos conhecida como frutanos contém a inulina, oligofrutose e/ou fruto-oligossacarídeos (FOS). Frutano é um termo genérico que engloba os polímeros de frutose, predominantemente com ligações do tipo frutossil-frutose, dentre as ligações glicosídicas (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

Segundo Saad (2006), os frutanos do tipo inulina são divididos em dois grupos: a inulina e seus compostos (oligofrutoses e FOS). Ambos são entidades quimicamente similares, com as mesmas propriedades nutricionais, e diferem apenas no grau de polimerização, ou seja, o número de unidades individuais de monossacarídeos que compõem a molécula (CARABIN; FLAMM, 1999).

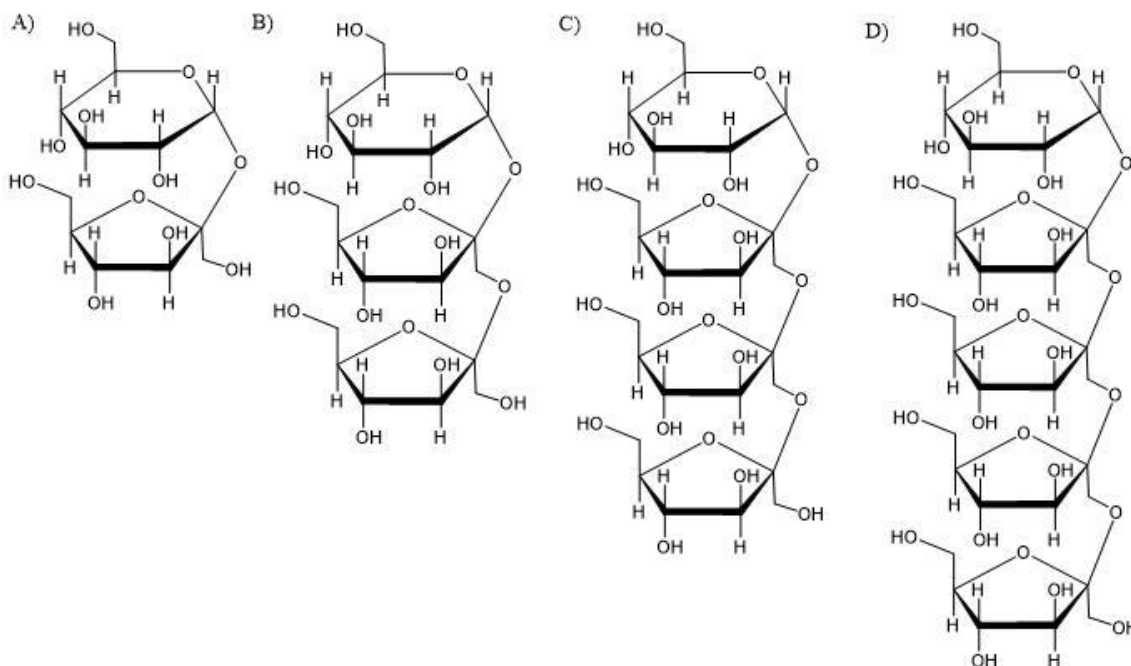
Conforme é colocado por Roberfroid (2007) e Saad (2006), oligofrutose e FOS são termos sinônimos utilizados para denominar frutanos do tipo inulina com grau de polimerização inferior a 10. O termo oligofrutose é mais empregado na literatura para descrever inulinas de cadeia curta, obtidas por hidrólise parcial da inulina da chicória. Já o termo FOS tende a descrever misturas de frutanos do tipo inulina de cadeia curta, sintetizados a partir da sacarose (CARABIN; FLAMM, 1999; ROBERFROID, 2005; SIVIERI *et al.*, 2014).

Sendo assim, os FOS são formados por moléculas de sacarose, compostas de duas ou três subunidades de frutose adicionais, acrescentadas enzimaticamente, por meio de ligações glicosídicas na posição β (2 \rightarrow 1) à subunidade frutose da sacarose (BIEDRZYCKA; BIELECKA, 2004; CARABIN; FLAMM, 1999). Os principais componentes dos FOS são: 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose, conforme mostrado na Figura 1.

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são utilizados na indústria de alimentos como fibras dietéticas em produtos alimentícios, conferindo a eles propriedades funcionais, que

os tornam capazes de reduzir o risco de algumas doenças e preveni-las (BERNER; O'DONNELL, 1998). Eles ainda apresentam efeito prebiótico, devido aos seus componentes alimentares não digeríveis capazes de trazer benefícios ao consumidor, por estimular seletivamente a proliferação de populações de bactérias desejáveis no cólon intestinal (SAAD, 2006).

Figura 1 - Estruturas químicas da sacarose e dos principais frutanos: (A) sacarose, (B) 1-kestose, (C) nistose, (D) frutofuranosilnistose



Fonte: Adaptado de CUNHA (2017).

Segundo Roberfroid (2007), para considerar um alimento como prebiótico, ele deve ser resistente à acidez gástrica, não sofrer hidrólise por enzimas de mamíferos e não ser absorvido pelo trato gastrointestinal, bem como favorecer o crescimento de bactérias intestinais benéficas à saúde humana. Como o tamanho da cadeia foi observado como um fator relevante para o crescimento da microbiota intestinal benéfica à saúde, são prebióticos os fruto-oligosacarídeos que possuem de 2 a 3 unidades de frutose ligadas a uma sacarose por ligação β (2 \rightarrow 1) (HIDAKA *et al.*, 1986).

FOS ainda apresentam baixos valores de consumo calórico (2,0 kcal/g) e baixo índice glicêmico (SANTOS-MORIANO *et al.*, 2015), sendo um alimento seguro para diabéticos por não terem efeito no teor de glicose sanguíneo do tipo 2 (MABEL *et al.*, 2008). Seu poder edulcorante, de cerca de 40 % a 60 % da sacarose, o torna altamente atrativo na indústria alimentícia (GONÇALVES, 2019).

Além das propriedades promotoras de saúde, os FOS são altamente higroscópicos e a sua viscosidade quando em soluções é relativamente maior que aquelas de sacarose quando na mesma concentração, além de apresentarem maior estabilidade térmica. Estas propriedades os tornam amplamente visados para a produção de iogurtes, bebidas funcionais como sucos e néctares frescos, sorvetes, biscoitos, produtos de confeitaria, molhos, entre outros (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; FORTES, 2006; PASSOS; PARK, 2003; SILVA, 2009). A abrangência da aplicação de FOS vai além da indústria alimentícia.

3.2 PRODUÇÃO DE FOS

Tem-se a ocorrência natural de FOS, em pequenas quantidades, como componentes de frutas, vegetais e alimentos com alta reserva de carboidratos. Dentre suas fontes conhecidas, destacam-se: aspargos, beterraba, chicória, alho, cebola, alcachofra de Jerusalém, trigo, banana, mel, cevada, tomate e centeio (MUSSATTO; MANCILHA, 2007; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005; YUN, 1996).

Conforme foi colocado por Tian, Karboune e Hill (2014), as estratégias enzimáticas para a síntese de FOS geralmente se baseiam na transfrutossilação da sacarose. Em escala industrial, as enzimas responsáveis pela produção de FOS são as inulinases (EC 3.2.1.7), a frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9), e a β -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26), sendo todas estas provenientes de fontes microbianas ou vegetais (GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014).

A síntese de FOS pela Meiji Seika Kaisha Ltda, teve início no Japão, em 1980, e este tem um dos maiores mercados comerciais (YUN, 1996). Seguidamente, outros países começaram a produção de FOS com diversas marcas. Os principais FOS produzidos comercialmente, tanto a partir da sacarose quanto da inulina estão resumidos na Tabela 1.

A produção industrial de FOS é realizada por meio de dois processos distintos. O primeiro inclui um procedimento fermentativo composto de duas etapas: a primeira consiste em produzir enzimas por fermentação, sendo estas aplicadas, posteriormente, de forma solúvel ou imobilizada na etapa reacional. Já no processo de apenas uma etapa, utiliza-se células completas de um determinado micro-organismo, seja este em suspensão ou imobilizado, sendo os FOS produzidos concomitantemente com o processo fermentativo (WANG, 2015).

Tabela 1 - Empresas produtoras de fruto-oligossacarídeos de grau alimentício

Substrato	Empresa Produtora	Nome Comercial
Inulina	Orafti Active Food Ingredients, Estados Unidos	Raftilose
	Beneo-Orafti, Bélgica	Orafti
	Cosucra Groupe Warcoing, Bélgica	Fibrulose
	Jarrow Formulas, Estados Unidos	Inulin FOS
Sacarose	Beghin-Meiji Industries, França	Actilight
	Cheil Foods and Chemicals Inc., Coreia	Oligo-Sugar
	GTC Nutrition, Estados Unidos	Nutraflora
	Meiji Seika Kaisha Ltda., Japão	Meioligo
	Victory Biology Engineering CO. Ltd., China	Prebiovis
		scFOS

Fonte: Adaptado de SINGH; SINGH (2010).

3.3 ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE (FTase)

Enzimas são um complexo de moléculas proteicas, também conhecidas como biocatalisadores de alta especificidade e seletividade, tanto para as reações que catalisam como para a discriminação de partes semelhantes de moléculas (regioseletividade) (CHAPLIN; BUCKE, 1990). Dentre suas vantagens para aplicação em escala industrial, cita-se a operação em condições mais brandas, e menor toxicidade ambiental e fisiológica (BOMMARIUS; PAYE, 2013).

A enzima frutossiltransferase (FTase), que é o biocatalisador em estudo, é classificada como uma *transferase* (IUBMB, 2020). Nessa classe, as enzimas catalisam a transferência de um átomo ou grupo de átomos entre duas moléculas, entretanto não liberam água ou oxigênio, que são características de uma reação de hidrólise ou oxirredução (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER; KARGI, 2002). Desse modo, na produção de FOS, a FTase catalisa a transferência de um grupo frutossil para a molécula de sacarose ou para um fruto-oligossacarídeo de cadeia curta, originando um FOS de cadeia mais longa. A baixa afinidade das frutossiltransferases pela água como acceptor explica a reduzida atividade de hidrólise (YUN, 1996).

A frutossiltransferase é produzida intra e extracelularmente por vários micro-organismos incluindo bactérias e fungos, geralmente por fermentação submersa, que é parte do processo usual de produção de FOS disponível no mercado (SINGH; SINGH, 2010).

A estrutura e as ligações dos FOS produzidos dependem da origem microbiana da frutossiltransferase utilizada na síntese. Tem-se que os FOS obtidos diretamente de frutos e folhas são constituídos a partir da frutose ligando-se tanto ao resíduo de frutose quanto de glicose, transformando-se numa cadeia ramificada, que difere dos FOS obtidos por meio da ação de enzimas de micro-organismos que ligam a frutose apenas aos resíduos de frutose (MURAMATSU *et al.*, 1994).

3.4 ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO (A_t)

As reações de transfrutossilação envolvem a clivagem da ligação glicosídica β - $(2\rightarrow1)$ e a transferência de frações frutossil dos carboidratos, atuando como doadores para qualquer receptor que não seja a água. A maioria das frutossiltransferases também possui atividade hidrolítica, de modo que a produção de FOS é um processo complexo no qual diferentes reações de síntese e hidrólise ocorrem simultaneamente, em paralelo e em série (VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2015).

A atividade de transfrutossilação (A_t) é predominante na FTase. Ela é definida como a quantidade de enzima que produz um micromol de FOS por minuto (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; OTTONI *et al.*, 2012) ou como a quantidade de enzima necessária para transferir um micromol de frutose por minuto, sob condições experimentais estabelecidas (CHEN; LIU, 1996; CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; HAYASHI *et al.*, 1990; KURAKAKE; ONOUE; KOMAKI, 1996; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011).

3.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A cinética enzimática é o estudo de fatores que determinam a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Os principais elementos capazes de influenciar a rapidez com que se processam as reações enzimáticas são: pH, temperatura, concentração de reagentes e das enzimas, presença ou não de ativadores e inibidores. Portanto, para apoiar os estudos da cinética enzimática, é possível estabelecer correlações, por meio de equações empíricas ou modelos matemáticos, entre as velocidades das reações e os fatores que as afetam.

A análise do mecanismo de uma reação enzimática é complexa e envolve estudos provenientes de várias áreas da ciência: enzimologia, química orgânica e físico-química.

Tal mecanismo é considerado conhecido quando há a caracterização dos substratos, produtos e compostos intermediários da reação e além disso, as formas enzimáticas sobre as quais atuam os ligantes. O conjunto dos estudos cinéticos da reação, químicos do processo e físicos de difração de raio X compõem o entendimento do mecanismo de uma reação (PINTO; MENEZES, 2009).

As enzimas que não seguem a curva de velocidade do tipo hipérbole, mas sim do tipo sigmoide, comportam-se dessa forma, possivelmente devido à uma relação de cooperatividade entre o substrato e o sítio ativo da enzima, em que a ligação da primeira molécula influencia a ligação das moléculas subsequentes (PUNEKAR, 2018). Essa ocorrência é mais frequente em enzimas denominadas alostéricas (WEISS, 1997), que possuem múltiplas subunidades e múltiplos sítios ativos.

A cooperatividade assume duas vertentes: pode ser positiva, que se verifica quando a primeira molécula do substrato favorece a afinidade dos demais sítios ativos; ou pode ser negativa, quando a primeira molécula do substrato reduz tal afinidade (WEISS, 1997).

O modelo que aborda o grau de cooperatividade das enzimas é o modelo de Hill, descrito pela Equação 1:

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

em que, $K_{0,5}$ é a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima, revelando a afinidade entre a enzima e o substrato e (n) é o coeficiente de Hill (WEISS, 1997).

O coeficiente de Hill (n) traduz a cooperatividade da ligação entre enzima e substrato. Para valores de (n) maiores do que 1, a cooperatividade é positiva, e tal fato revela a presença de mais de um sítio de ligação na enzima ou a possibilidade de formação de subunidades múltiplas da enzima, cada uma com um sítio de ligação com o substrato. No caso em que (n) é igual a 1, a Equação 1 reduz-se à expressão matemática descrita pelo modelo Michaelis-Menten. E por fim, para valores negativos assumidos por (n) , a reação apresenta uma cooperatividade negativa quanto à ligação ao substrato (WEISS, 1997).

3.5.1 Influência da temperatura na cinética enzimática

A velocidade de reação enzimática é diretamente afetada pela temperatura, de modo que até um valor limite, à medida que ela aumenta, tem-se um incremento na energia cinética das moléculas que compõem o sistema, aumentando a mobilidade entre elas e, conseqüentemente a frequência de colisões entre substratos e os sítios ativos das enzimas. As baixas temperaturas dificultam a difusão das enzimas até o substrato e assim a catálise é ineficiente; enquanto as altas temperaturas implicam no rompimento da estrutura tridimensional das enzimas, o que impede o encaixe específico com o substrato (FIELDS, 2001; DIXON; WEBB, 1979). Desse modo, para cada tipo de enzima existe uma temperatura ótima, na qual a velocidade de reação é máxima, permitindo o maior número possível de colisões moleculares sem desnaturar a enzima e assim, uma conversão mais rápida dos reagentes às moléculas de produto (REECE *et al.*, 2015).

Sendo assim, na reação enzimática, a constante de velocidade k , numa faixa limite de valores, é uma função crescente da temperatura do sistema. A relação entre a constante k e a temperatura obedece à lei de Arrhenius, que descreve tanto a ativação como a desnaturação térmica da enzima, e estas são representadas pelas equações 2 e 3:

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

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

em que, k_A e k_D são respectivamente as constantes de ativação e desnaturação térmicas, A_A e A_D são as constantes de Arrhenius, E_A é a energia requerida para promover a ativação térmica e E_D a energia necessária à desnaturação térmica, R representa a constante universal dos gases e T a temperatura absoluta (MIRANDA, *et al.*, 2014).

3.5.2 Influência do pH na cinética enzimática

O estudo da dependência do pH é de suma importância, pois pode deduzir a natureza química dos grupos enzimáticos que contribuem para a cinética. As enzimas são moléculas proteicas anfóteras, e possuem grupos ácidos e básicos em abundância, principalmente na sua superfície, que são sensíveis a variações das constantes de ionização e do pH do meio, o que influencia na reatividade dos grupos catalíticos e sítios ativos. Portanto, as mudanças no pH afetam a atividade enzimática, interferindo na

estabilidade estrutural da enzima (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER; KARGI, 2002). Tais mudanças permitem que os grupamentos do sítio ativo fiquem na forma química adequada para a interação com o substrato.

Vale ressaltar que existe uma faixa de pH ótimo, em que a velocidade de reação catalítica é máxima. E a definição da faixa de pH ótimo para determinada enzima considera as características de seu sítio ativo, como o número e tipo de grupos ionizáveis; elas geralmente são obtidas de forma empírica (SHULER; KARGI, 2002).

3.5.3 Influência da concentração dos substratos na cinética enzimática

Para entender o efeito da concentração de substrato na cinética enzimática, num meio em que a concentração da enzima é mantida constante, observa-se que a baixas concentrações de substrato, a velocidade de reação será igualmente baixa. E inicialmente, com o aumento da concentração de substrato, tem-se o aumento da velocidade de reação. Contudo, há situações em que a velocidade de reação, após uma determinada concentração de substrato; diminui com o aumento da concentração de substrato e neste caso tem-se o fenômeno da inibição pelo substrato (DIXON; WEBB, 1979; BAILEY; OLLIS, 1986).

3.6 ESTABILIDADE TÉRMICA DAS ENZIMAS

A estabilidade térmica das enzimas é um parâmetro de extrema importância para a aplicação em reatores, uma vez que ela determina os limites para a reutilização da enzima, o que implica nos custos do processo (SANTOS; OLIVEIRA; MAUGERI, 2007). Os estudos de estabilidade elucidam o mecanismo de desnaturação enzimática, cujo entendimento é iminentemente necessário para facilitar a compreensão da estrutura e função das enzimas (SADANA; HENLEY, 1987). Sendo assim, Sadana e Henley (1987) propuseram um modelo de ajuste exponencial não-linear capaz de estimar os parâmetros de desnaturação térmica, por meio do ajuste do modelo aos dados experimentais de atividade residual em função do tempo de incubação. Tal modelo é representado pela Equação 4:

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

em que A/A_0 é a atividade residual adimensional, α_1 é o parâmetro do modelo, k_D é a constante de desnaturação térmica de primeira ordem (min^{-1}) e t , o tempo de incubação (min).

Ao avaliar a estabilidade térmica, tem-se um parâmetro indispensável, o tempo de meia-vida $t_{1/2}$, descrito pela Equação 5, que se refere ao intervalo de tempo necessário, a uma dada temperatura, para que a enzima tenha sua atividade reduzida à metade do seu valor inicial. Ele é inversamente proporcional à constante de desnaturação térmica (k_D) (FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; SHULER; KARGI, 2002; SILVA *et al.*, 2021).

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

O fator de estabilidade (FE), utilizado para estabelecer a eficiência da imobilização, considera o tempo de meia-vida antes e após o processo de imobilização. Na Equação 6, $t_{1/2}$ *solúvel* e $t_{1/2}$ *imobilizada* simbolizam o tempo de meia-vida da enzima solúvel e imobilizada, respectivamente (FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016).

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

Os parâmetros termodinâmicos revelam informações pertinentes para se avaliar a estabilidade das enzimas solúveis ou imobilizadas, pois diante de variações de entalpia (ΔH), entropia (ΔS), e energia de Gibbs (ΔG), é possível mensurar a preservação da conformação inicial da enzima, e o estágio do processo de desnaturação no qual ela se encontra. Quando ocorre a desnaturação térmica da enzima, há uma transição de um estado de menor energia para um estado de maior energia. Essa transição se dá, de modo irreversível, pela energia de ativação para a desnaturação (E_D) à enzima, em forma de calor. A variação de entalpia de ativação da desnaturação (ΔH_D), calculada pela Equação 7, equivale à energia necessária para a desnaturação da enzima. Assim, altos valores de entalpia apontam uma maior termoestabilidade enzimática (FARIA *et al.*, 2021; FERREIRA, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2020; SAQIB *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2015).

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

O indicador mais confiável para estimar a estabilidade enzimática é a energia de Gibbs de ativação da desnaturação (ΔG_D), explicitado pela Equação 8, pois engloba entalpia e entropia para determinar a espontaneidade da perda de estabilidade da enzima. Há uma tendência maior de desnaturação da enzima para valores menores e mais negativos de energia de Gibbs. Assim, valores elevados apontam uma maior estabilidade térmica da enzima (KUMAR *et al.*, 2013; SAQIB *et al.*, 2010).

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

em que T corresponde aos valores experimentais para a temperatura (K), R é a constante universal dos gases ideais ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), h refere-se à constante de Planck ($11,04 \times 10^{-36} \text{ J min}^{-1}$) e k_b à constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) (FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2015).

A entropia de ativação da desnaturação térmica da enzima (ΔS_D) pode ser encontrada através da Equação 9. Tal medida relaciona-se com a aleatoriedade do processo de desnaturação da enzima, de modo que, quanto maior a aleatoriedade, maior e positivo será o valor da entropia de desnaturação térmica da enzima (FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2015).

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

3.7 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas tem se tornado uma estratégia atrativa para aplicação em larga escala de bioprocessos enzimáticos. Segundo Bickerstaff (1997) e Rosevear (1984), a imobilização é uma técnica que consiste em confinar a enzima, com atividade catalítica de interesse, em um sistema, impedindo sua migração para o meio onde se encontram o substrato e produto, de modo que ela esteja física ou quimicamente associada

a um suporte ou a uma matriz. As enzimas, quando em solução, comportam-se como outro soluto qualquer, tendo total liberdade de movimento, mas quando estão imobilizadas, sua autonomia torna-se altamente restringida (BICKERSTAFF, 1997).

Tem-se algumas variáveis que dificultam o emprego de enzimas solúveis, como a sensibilidade a solventes, agitação, temperatura, pH, dentre outros fatores. Para mais, a utilização de enzimas solúveis apresenta alto custo de produção e purificação, instabilidade da estrutura tridimensional ao isolar a enzima de seu ambiente, perda de atividade devido às condições do processo e inibição pelo substrato ou produto. Tais elementos implicam em um tempo de meia-vida operacional curto, bem como um alto custo. E ainda, o emprego de enzimas solúveis, em meio aquoso (catálise homogênea), pode causar contaminação do produto desejado e elas podem não ser recuperadas do meio reacional (KRAJEWSKA, 2004).

Um outro agravante no uso da enzima solúvel é a presença do biocatalisador no meio reacional, o que pode gerar alteração no sabor, além da necessidade de uma nova batelada de biocatalisador. Também, indícios de enzima no produto final, como alimentos e medicamentos, podem representar um fator de risco ao desencadear reações alérgicas nos consumidores finais (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005).

Em contrapartida, a enzima, em seu estado imobilizado, tem processamento e separação do produto facilitados, capacidade de reutilização, maior estabilidade sob condições químicas e físicas extremas, o transporte mais acessível, além disso, é aplicável a todos os tipos de reatores, e facilita o controle do processo (DATTA *et al.*, 2013; GRAY *et al.*, 2013). Logo, a imobilização pode ser entendida como um recurso capaz de resguardar a enzima contra condições adversas do meio, melhorando assim a estabilidade enzimática e possibilitando aplicação em larga escala, bem como em processos contínuos.

Quanto à aplicabilidade de enzimas imobilizadas, é elevada e pode ser exemplificada pela: síntese de intermediários de complexos fármacos; síntese química sob condições amenas sem a produção de subprodutos tóxicos; remediação de água, ar e solo poluídos, por remoção de poluentes recalcitrantes de maneira eficaz; diagnóstico de patologias; e correção de várias doenças genéticas decorrentes da ausência de enzimas metabólicas; dentre outras (DWEVEDI, 2016).

Shuler e Kargi (2002) apresentam alguns benefícios da utilização de enzimas imobilizadas, sendo eles: reutilização do suporte e redução de custos com o processo contínuo; altas concentrações por espaço e alta produtividade por volume; em alguns casos, melhor desempenho do biocatalisador. Outros benefícios da imobilização de

enzimas podem ser citados como: o aumento da resistência a mudanças do ambiente reacional, influências de temperatura, pH e solventes orgânicos, possibilidade de reutilização do biocatalisador; fácil separação do catalisador e do produto, bem como a facilidade de interrupção da reação ao atingir determinado grau de conversão (BRADY; JORDAN, 2009; MENDES *et al.*, 2011a).

Portanto, a imobilização tem sido cada vez mais difundida visando eliminar os entraves que limitam o uso de enzimas solúveis em aplicações industriais, e possibilitar uma catálise mais eficiente, com foco em incremento de produtividade e estabilidade.

3.7.1 Estudos da imobilização da FTase extracelular

Dentre os estudos encontrados na literatura sobre a imobilização da FTase extracelular, situa-se a pesquisa de Yun e Song (1996) sobre a produção contínua de FOS, em que FTase de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10542 foi imobilizada em uma resina com alta porosidade denominada Diaioa HPA 25®. Ao final do processo, obtiveram um biocatalisador mais resistente a variações de pH, com possibilidade de reutilização por até 30 dias e queda de 8 % da atividade de transfrutoseilação inicial. Além do mais, os valores de temperatura e pH ótimos para a reação de síntese de FOS foram inalterados com a imobilização.

A investigação reportada por Ghazi *et al.* (2006), em que a reação catalisada pela enzima comercial Pectinex Ultra SP-L (com atividade de transfrutoseilação), de *Aspergillus aculeatus*, imobilizada covalentemente em suporte à base de polimetacrilato, resultou na produção de 385 mg mL⁻¹ de FOS, tendo a sacarose como substrato (630 mg mL⁻¹).

Platková *et al.* (2006) realizaram estudos de imobilização de FTases de *Aureobasidium pullulans* em vários materiais comerciais. As FTases imobilizadas no Dowex Marathon MSA (estireno-DVB macroporoso) e Amberlite IRA 900® (estireno-DVB) apresentaram as maiores atividades específicas (1268 U g⁻¹ e 1169 U g⁻¹, respectivamente).

No estudo realizado por Oliveira *et al.* (2020), a Pectinex Ultra SP-L de *Aspergillus aculeatus*, que trata-se de uma preparação enzimática comercial com atividade de transfrutoseilação, foi imobilizada por ligação covalente, em nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄-quitosana. Ao final desse processo, a enzima imobilizada apresentou 86% de retenção da atividade de transfrutoseilação após seis ciclos de reuso e

ainda, exibiu 100% de atividade de transfrutossilagem residual, após 30 dias de armazenamento a 4°C. A maior concentração total de FOS (101,56 g L⁻¹) produzida foi menor do que a obtida por Ghazi *et al.* (2006), de 385 mg mL⁻¹, porém a concentração de substrato utilizada na reação foi de 700 g L⁻¹.

Kamimura *et al.* (2009) também exploraram a imobilização da FTase extracelular, produzida a partir da *Pichia pastoris* e imobilizada em uma mistura de gelatina, alginato de sódio e cloreto de cálcio. A técnica permitiu a reutilização do biocatalisador além da retenção de 20 % da atividade inicial.

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

Uma outra contribuição relevante no que se refere à imobilização da FTase extracelular foi realizada por Faria *et al.* (2021), que imobilizaram a FTase oriunda de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel, e realizaram sua caracterização bioquímica para a aplicação na reação de transfrutossilagem da sacarose, com foco na produção de fruto-oligossacarídeos (FOS). As máximas atividades de transfrutossilagem (A_t), obtidas a partir do planejamento experimental, foram em pH de 5,5 e temperaturas entre 40 °C a 60 °C, e a concentração ótima de sacarose foi de 470 g L⁻¹. A (A_t) para a enzima imobilizada teve comportamento cinético descrito pelo modelo de Hill. E o biocatalisador obtido no processo teve capacidade de reutilização por seis ciclos consecutivos, com pH e estabilidade térmica maiores do que para a enzima solúvel.

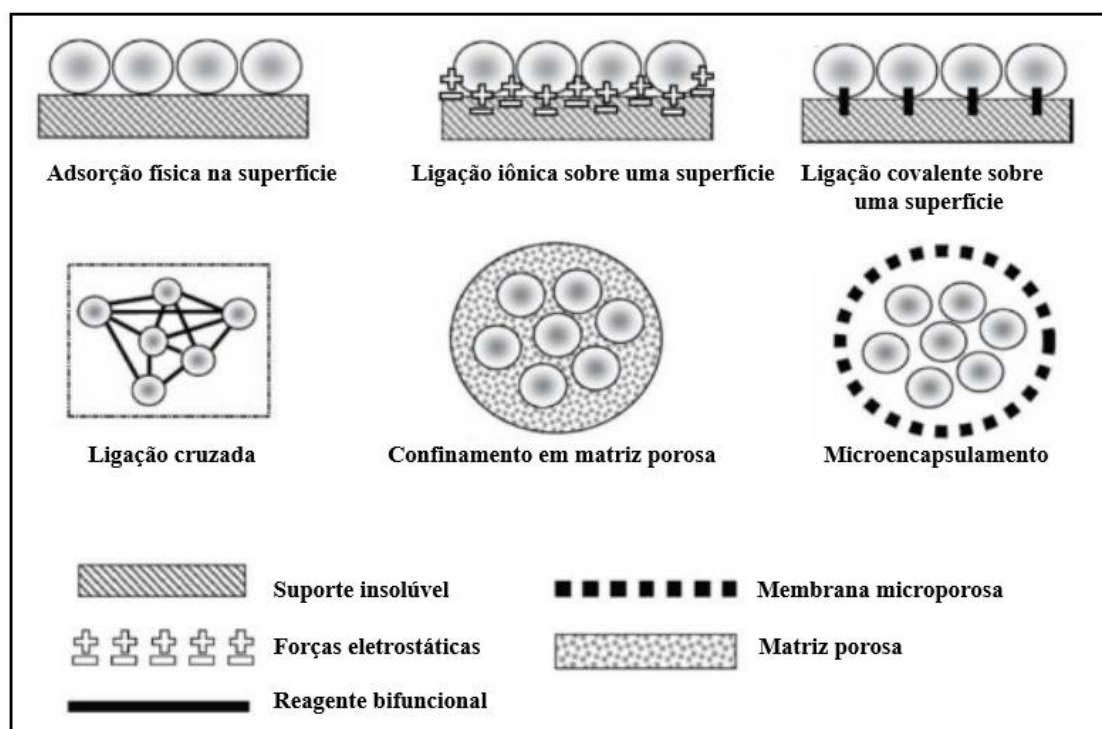
3.8 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Nas abordagens científicas, podem ser encontrados muitos métodos de imobilização que são aplicados para contornar os possíveis problemas de instabilidade das enzimas frente a solventes orgânicos. A escolha daquele que mais se adapta para cada biocatalisador depende fundamentalmente do processo catalítico no qual a enzima será inserida, pois fatores como natureza dos reagentes, solubilidade, compatibilidade com o suporte, matriz ou cápsula, além do custo, definem a opção por um método em relação ao outro (REGULY, 2000).

Tem-se ainda, alguns outros parâmetros que devem ser considerados na busca pelo método que resultará em maior eficiência na catálise enzimática como: atividade global do biocatalisador, características de regeneração e desnaturação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada (ILLANES, 2012; MENDES *et al*, 2013).

Dentre os diferentes métodos de imobilização existentes encontram-se: confinamento da enzima (encapsulamento e microencapsulamento), ligação em superfície sólida (adsorção física, covalente e iônica) e ligação cruzada da enzima com um material insolúvel multifuncional (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES *et al.*, 2011a). Os métodos são ilustrados pela Figura 2.

Figura 2 - Métodos de imobilização de enzimas



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

No processo de imobilização enzimática por confinamento, tem-se a incorporação da enzima como parte de uma mistura reativa e seu aprisionamento no interior de uma estrutura (GONÇALVES, 2019; HODGSON *et al.*, 2004). Existem dois tipos de contenção de enzimas, o envolvimento em matrizes porosas ou a contenção por barreiras.

No primeiro, verifica-se o confinamento físico da proteína em uma matriz polimérica, cujos poros devem ser menores do que as dimensões das enzimas contidas no seu interior, de modo a impedir o seu arraste, mas permite o fluxo de substratos e produtos. Na contenção por barreiras, as enzimas são envoltas por uma membrana, o que permite a retenção de uma quantidade maior de proteínas em relação à imobilização em matrizes porosas (GONÇALVES, 2019).

A imobilização por meio de ligação iônica baseia-se, principalmente, na interação eletrostática entre as moléculas da enzima e moléculas do suporte sólido, contendo cargas iônicas opostas (LYU *et al.*, 2021; MESQUITA, *et al.*, 2018).

O método de imobilização por ligação cruzada consiste na formação de ligações covalentes entre moléculas de proteínas, ocasionadas por um agente bifuncional, o qual é designado como agente reticulante (MATEO *et al.*, 2007; CRUZ *et al.*, 2012). Este tem a função de se ligar a grupos particulares de aminoácidos presentes na enzima, por meio de suas extremidades reativas (GONÇALVES, 2019). Dentre os agentes bifuncionais mais utilizados para possibilitar a ligação cruzada, pode-se citar o glutaraldeído (DRIDI *et al.*, 2015). Esta técnica de imobilização, geralmente, não requer o uso de um suporte sólido, o que é considerada uma das vantagens do método (HUDSON; COONEY; MAGNER, 2008).

Os métodos de adsorção física e ligação covalente, utilizados para imobilizar a FTase extracelular em PHB puro e funcionalizado estão detalhados nos tópicos 3.8.1 e 3.8.2.

3.8.1 Adsorção física (PHB)

Um dos métodos amplamente recorridos a fim de promover a imobilização de enzimas é a adsorção física, pois tem fatores como a simplicidade e o baixo custo associados à sua aplicação. Por meio desta técnica, a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia como: interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou ligações iônicas e o processo é favorecido pela agitação suave do sistema. Dessa forma, as fracas forças de interação entre enzima e suporte representam um desafio a ser superado quanto ao uso da adsorção física para produzir enzimas imobilizadas.

Assim, embora esta técnica forneça biocatalisadores de baixa estabilidade, a adsorção física apresenta custo reduzido se comparada a outros métodos, como por

exemplo, a ligação covalente (WISEMAN, 1985). Tem-se ainda, outros proveitos inerentes à adsorção física, dentre os quais estão a facilidade do método, a não necessidade de ativação do suporte e a possibilidade de reutilizá-lo por vários ciclos, uma vez que possibilita a regeneração da matriz utilizada. Além destes, a adsorção provoca pouca alteração na estrutura conformacional da enzima e em seu sítio ativo, que por não haver envolvimento de ligação química entre o suporte e a enzima, evita distorções do sítio ativo da proteína (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Dentre os inconvenientes associados à aplicação do método, destacam-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção da enzima, em casos de variações de temperatura, pH e força iônica (ARICA; ALTINTAS; BAYRAMOĞLU, 2009; BRADY; JORDAN, 2009; GUIDINI *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2011a). Todavia, existem técnicas que visam reduzir a dessorção da enzima, sendo elas: a modificação química do suporte, a redução do tamanho de seus poros ou a reticulação da enzima no interior dos poros (REIS; WITULA; HOLMBERG, 2008). Ainda, em outros estudos, há resultados que mostram que a hidrofobização do suporte pode reduzir a lixiviação e melhorar a atividade enzimática (SERRA *et al.*, 2008).

Fatores como tamanho da enzima a ser adsorvida, área específica do adsorvente, porosidade e tamanho do poro afetam diretamente a eficiência da adsorção de determinada enzima, na superfície de um suporte (MANECKE, 1972). Outro fator considerável é a concentração da enzima, posto que há o aumento da quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte à medida que a concentração de enzima aumenta, até atingir um patamar de saturação do adsorvente (DEREWENDA *et al.*, 1992).

Dentre as enzimas imobilizadas por esta técnica, há uma alta frequência em lipases.

3.8.2 Ligação covalente

A fixação covalente de uma enzima a um suporte é o método de imobilização mais interessante do ponto de vista industrial, dado o ganho de estabilidade frente a outros métodos, como o da adsorção física. Além de ser notada por elevadas forças de ligação, esta técnica geralmente envolve vários resíduos da enzima, proporcionando uma grande rigidez na sua estrutura, capaz de mantê-la inalterada perante agentes desnaturantes como

calor, solventes orgânicos e pH extremos (MACARIO *et al.*, 2009; MATEO *et al.*, 2007; MILETIĆ *et al.*, 2009).

Em geral, a modificação da superfície do suporte mediante reações de ativação, é o primeiro passo dos protocolos que envolvem a imobilização covalente. Para tal, tem-se o glutaraldeído como um dos reagentes mais utilizados, em virtude da obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis e da simplicidade dos métodos de ativação (BARBOSA *et al.*, 2012; CHAUBEY *et al.*, 2009; MATEO *et al.*, 2007). A presença do glutaraldeído, como agente de ativação do suporte ou braço espaçador, permite a reação entre os grupos aminos das enzimas e os grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff (BARBOSA *et al.*, 2012; MATEO *et al.*, 2007).

Alguns elementos são pertinentes à eficácia do método de imobilização covalente, mensurada pelo número de ligações covalentes entre a enzima e o suporte. Este indicador depende da densidade dos grupos reativos por unidade de área do suporte, da reatividade dos grupos funcionais tanto da enzima quanto do suporte e do estado de protonação dos mesmos, bem como da especificidade dos grupos ativos do suporte (ERDEMIR; YILMAZ, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013; GUISÁN, 1988; MATEO *et al.*, 2007).

A ligação covalente destaca-se ainda, por ser o método de imobilização mais efetivo em termos de estabilidade térmica e operacional das enzimas (MENDES *et al.*, 2011a; PEDROCHE *et al.*, 2007). Para mais, o emprego da técnica promove outros benefícios como a maior resistência do biocatalisador quanto a variações de pH, temperatura e incubação em solventes orgânicos, e ainda, a não dessorção da enzima do suporte (BARBOSA *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013; MATEO *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2011a).

Por outro lado, dentre as desvantagens do método, tem-se a dificuldade da seleção das condições de imobilização por ligação covalente quando comparada a outros métodos, além da desnaturação parcial ou redução da atividade catalítica da enzima, ocasionadas pela alteração em sua conformação nativa, impostas pelas ligações entre as enzimas e os grupos reativos do suporte (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; ERDEMIR; YILMAZ, 2009).

De um modo geral, a diversidade de suportes com grupos funcionais capazes de impulsionar ligações covalentes, ou suscetíveis à ativação, amplia aplicabilidade do método.

3.9 TIPOS DE SUPORTES

Os principais atributos a serem observados na seleção de um suporte para determinada aplicação são: área específica, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo, dentre outros (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES *et al.*, 2011a). Além destes, é de suma importância que o suporte seja inerte.

Os suportes, com base nos materiais, podem ser classificados como orgânicos, que engloba polímeros naturais, polímeros sintéticos e proteínas; ou inorgânicos: minerais, como areia e celite; manufaturados como óxidos metálicos, cerâmicas e géis de sílica, entre outros.

De acordo com Canilha, Carvalho e Silva (2006), os suportes também podem ser categorizados em cinco tipos fundamentais:

- a) Microporosos ou não porosos (vidro, sílica, nylon);
- b) Microencapsulados (nitrocelulose, triacetato de celulose);
- c) Polímeros com moderado grau de ligações cruzadas (poliacrilamida);
- d) Polímeros com baixo grau de ligações cruzadas (sephadex, DEAE celulose);
- e) Macroporosos (sílica, alumina).

Dentre os polímeros orgânicos, encontra-se o polihidroxibutirato (PHB), que é produzido como reserva de carbono e energia por uma variedade de micro-organismos. Sua síntese é promovida por estresses ambientais, como limitação de nitrogênio, fosfato ou oxigênio (CABRERA-PADILLA, *et al.*, 2012). Ele é sintetizado intracelularmente, no citoplasma de bactérias, em forma de grânulos.

Apesar dos poucos relatos na literatura que abordam o uso do PHB como suporte na imobilização de enzimas, Cabrera-Padilla *et al.* (2012) destacam algumas características que tornam sua aplicação atraente para este fim como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência, fácil reabsorção, não toxicidade e eco-amigável.

Assim como não há um método de imobilização aplicável para todas as enzimas, esse princípio é usado na definição do suporte, pois há vantagens e limitações em cada um deles, sendo necessária uma análise de um conjunto de informações para obter resultados expressivos no processo (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

3.9.1 Polihidroxibutirato (PHB)

Os atributos inertes e biocompatíveis de alguns polímeros naturais permitem sua aplicação direta como suportes na imobilização de enzimas (FANG *et al.*, 2011). Dentre eles, cita-se o polihidroxibutirato (PHB), um polímero orgânico sintetizado por bactérias a partir de pequenas moléculas como o ácido butírico (MOHANTY *et al.*, 2005; RAY; BOUSMINA, 2005).

O biopolímero destaca-se por apresentar as características esperadas em suportes orgânicos propícios à imobilização. Dentre elas estão: alta cristalinidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, boa resistência mecânica, capacidade de regeneração, além de ser atóxico e inerte (MENDES *et al.*, 2011).

Estudos como o de Mendes *et al.* (2012) apontam o PHB como suporte hidrofóbico promissor nos processos de imobilização. Após a imobilização da lipase de *Geobacillus thermocatenulatus* em polihidroxibutirato, este foi indicado como suporte adequado que promoveu atividade catalítica altamente incrementada da enzima imobilizada quando comparada à enzima em sua forma solúvel, para a síntese do biodiesel.

Um recurso comumente utilizado para promover a atividade de enzimas imobilizadas é a modificação da superfície do suporte, que lhe confere biocompatibilidade. Ao imitar o microambiente biológico das enzimas, os sistemas biomiméticos são supostamente capazes de estabilizar a estrutura das enzimas e reter suas atividades (FANG *et al.*, 2011).

Desse modo, a superfície do suporte pode ser ativada/funcionalizada com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima, conferindo maior resistência e rigidez à estrutura do biocatalisador heterogêneo perante agentes desnaturantes (calor, solventes orgânicos e pH extremos), além de minimizar o fenômeno de dessorção da enzima no suporte e possibilitar o seu uso em diferentes configurações de reatores (MENDES *et al.*, 2011b; SOUZA *et al.*, 2017). O glutaraldeído é um dos reagentes mais empregados na ativação de suportes e/ou utilizados como braço espaçador devido à simplicidade dos métodos de ativação empregados e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis (MATEO *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2012). A molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima e estas são imobilizadas covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminos que se ligam, por sua vez, aos grupos aldeídos do suporte ativado (SOUZA *et al.*, 2017).

Estudos como o de Binhayeeding *et al.* (2020) mostraram que a imobilização da lipase de *Candida rugosa* em partículas de PHB por adsorção, seguida de reticulação com glutaraldeído resultaram em um rendimento de imobilização de 92% e altos níveis de atividade para a produção de monoaciglicerol (MGA). Além desses, houve incremento da estabilidade térmica, estabilidade ao armazenamento e reusabilidade.

Portanto, com base nas propriedades apresentadas a respeito do biopolímero, espera-se obter êxito nos resultados de imobilização da FTase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em PHB puro e funcionalizado com glutaraldeído.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo apresenta-se os principais reagentes e equipamentos empregados no trabalho, assim como as técnicas de preparação e uso dos biocatalisadores.

4.1 PREPARO E FUNCIONALIZAÇÃO DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO

Na etapa preliminar à dos ensaios de imobilização, o biopolímero polihidroxibutirato (PHB), fornecido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP), foi submetido ao pré-tratamento (lavagem e funcionalização) conforme método descrito por Mendes *et al.* (2013) e Ramos *et al.* (2015). Inicialmente, o suporte, com 1,18 mm de diâmetro equivalente foi lavado com etanol P.A 95 % (v v⁻¹) na proporção de 1:10 (massa de suporte: volume de solvente) sob agitação magnética branda a 25 °C por 6 horas.

Uma fração de partículas de PHB lavada, cerca de 2,0 g, foi funcionalizada com solução constituída por 18 mL de glutaraldeído na concentração 25 % (v v⁻¹) e 10 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5. A funcionalização do suporte ocorreu sob agitação magnética branda por 18 horas a 25 °C. Partículas de PHB puro (apenas lavado com etanol) e funcionalizado foram filtradas à vácuo, secas em dessecador por 24 horas e usadas para ensaios de imobilização da enzima por adsorção física e ligação covalente, respectivamente.

4.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR MICROBIANA

4.2.1 Micro-organismo e condições de cultivo

Para a produção da enzima FTase extracelular, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). O *pellet*, contendo esporos liofilizados do micro-organismo, foi ressuspenso em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 70 µL foram inoculadas em meio sólido, preparado em placa de Petri, contendo (em %, m v⁻¹): 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 da raspagem com alça de Drigalski, em 10 mL de solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95 % (m v⁻¹) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1 % (v v⁻¹). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isofar®) 20,0 % (m v⁻¹) e ajustada a concentração de esporos, com auxílio de Câmara de Neubauer (Newoptics®), para aproximadamente 1 x 10⁷ esporos mL⁻¹, seguido de armazenamento sob refrigeração a - 6 °C (CUNHA, 2017; CUNHA *et al.*, 2019; FARIA, 2019).

4.2.2 Cultivo celular submerso

A enzima frutossiltransferase extracelular foi produzida, por cultivo celular submerso, a partir do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 utilizando meio de cultura sintético, pH 5,5, constituído por (em %, m v⁻¹): 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. Um volume de 50 mL do meio de cultura foi adicionado em frascos do tipo Erlenmeyers de 250 mL, vedados com algodão e esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120 ° C e 2,0 atm. Após a esterilização, os frascos foram incubados em agitador orbital do tipo *shaker* (Tecnal®, modelo TE-4200), inoculando-se 500 µL de suspensão de esporos do fungo na concentração de 1 x 10⁷ esporos mL⁻¹, dando-se início ao cultivo celular conduzido por 64 horas a 30 °C e 200 rpm (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Ao término do cultivo, o meio de cultura foi filtrado a vácuo e o permeado (caldo filtrado), contendo FTase extracelular, foi utilizado para estudos posteriores de imobilização e caracterização das propriedades bioquímicas da enzima.

4.3 ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Os ensaios de imobilização da FTase extracelular nos suportes PHB, puro e funcionalizado, foram realizados conforme método adaptado de Faria *et al.* (2021). Um volume de 10 mL de caldo, previamente filtrado a vácuo e contendo a enzima FTase, foi adicionado em frasco Erlenmeyer contendo 1 g do biopolímero PHB. A imobilização foi conduzida em Banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) por um período de 8 h, a 35 °C, pH 5,5 e sob agitação controlada de 175 rpm. Ao longo dos ensaios, foram retiradas

alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante em intervalos de tempo predefinidos (1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8 h) visando monitorar a atividade enzimática e obter os perfis cinéticos de imobilização da enzima nos suportes puro e funcionalizado. Posteriormente, as amostras foram filtradas a vácuo e a torta retida (biocatalisador heterogêneo) foi submetida a ensaios de atividade enzimática estabelecidos (tópico 4.6.1) para o cálculo dos parâmetros de imobilização e estudos de caracterização das propriedades bioquímicas do biocatalisador heterogêneo (tópico 4.5). Após os ensaios de atividade enzimática, o biocatalisador heterogêneo foi lavado abundantemente com água destilada, filtrado a vácuo e armazenado em estufa a 60 °C por 48 horas para a determinação da sua massa seca.

Os ensaios de imobilização foram realizados em triplicata e amostras controle, contendo o caldo enzimático e isentas de partículas de suporte, foram submetidas às mesmas condições experimentais a fim de se monitorar a atividade da FTase ao longo do processo.

4.3.1 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram obtidos conforme descrito por Ramos *et al.* (2015) e Ferreira *et al.* (2018). O rendimento de imobilização (RI) foi calculado pela Equação (10) medindo-se o número de unidades de atividade de transfrutossilação no sobrenadante antes (A_{ti}) e após (A_{tf}) os ensaios de imobilização (em U mL⁻¹).

$$RI (\%) = \frac{A_{ti} - A_{tf}}{A_{ti}} \times 100 \quad (10)$$

A percentagem de atividade recuperada (AR) foi calculada pela Equação (11), em que A_{td} representa a atividade de transfrutossilação (em U) calculada para o biocatalisador heterogêneo e A_D refere-se à atividade desaparecida no sobrenadante obtida antes e após a imobilização (A_{ti} e A_{tf}) e multiplicada pelo volume de caldo enzimático (em mL) utilizado.

$$AR (\%) = \frac{A_{td}}{A_D} \times 100 \quad (11)$$

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO BIOCATALISADOR

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

As amostras de partículas dos suportes também foram previamente preparadas em *Vap Prep 61 (Sample Degas System)*, secas a vácuo por 2 h a 60 °C e suas áreas específicas foram determinadas por fisissorção de nitrogênio a 77 K em analisador *Micromeritics Gemini VII Surface Area and Porosity*, usando o método BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). Para a obtenção do volume e distribuição de poros das partículas de PHB, foi utilizado o método BJH (BARRET; JOYNER; HALLEND, 1951). A caracterização das ligações químicas e estrutura do suporte, na presença e ausência da enzima imobilizada, foi determinada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) usando Espectrômetro (Agilent Technologies Cary 630, Estados Unidos) operado para uma faixa de 650 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas pelo Laboratório de Engenharia de Materiais da UNIFAL-MG.

4.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA IMOBILIZADA

4.5.1 Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos

As atividades de transfrutossilacção da enzima imobilizada em PHB puro e funcionalizado foram determinadas a 50 °C em meio reacional constituído por 1,2 mL de tampão tris acetato 0,2 mol L^{-1} , pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose comercial (substrato) nas concentrações de 200 g L^{-1} , 300 g L^{-1} , 400 g L^{-1} , 470 g L^{-1} , 500 g L^{-1} e 600 g L^{-1} . Ao meio reacional, foi adicionado 1,0 g de suporte, contendo o biocatalisador heterogêneo, e as atividades foram determinadas conforme condições experimentais estabelecidas (tópico 4.6.1). Os parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$, $K_{0,5}$ e n) foram estimados a partir de análises de regressão não linear mediante ajuste do modelo de Hill (Equação 1)

aos dados experimentais de atividade enzimática. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.2 Ensaios de estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos

As enzimas solúvel e imobilizada em PHB, puro e funcionalizado, foram incubadas em tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5, na ausência de substrato, para uma ampla faixa de temperatura ($30 \text{ }^\circ\text{C}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e $60 \text{ }^\circ\text{C}$). As amostras foram retiradas em intervalos de tempo distintos (1 h, 2 h, 4 h e 24 h), imediatamente resfriadas em banho de água e gelo por 5 min e as atividades enzimáticas residuais foram determinadas sob condições experimentais estabelecidas (tópico 4.6.1). Os experimentos foram realizados em triplicata. A constante de desnaturação térmica de primeira ordem (k_D , em min^{-1}) foi estimada por meio do ajuste do modelo de Sadana e Henley (1987) (Equação 4) aos dados experimentais de atividade residual em função do tempo de incubação (PERNA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2021). A energia de ativação (E_D , em kJ mol^{-1}) para a desnaturação térmica das enzimas solúvel e imobilizada foi determinada pela linearização da Equação de Arrhenius (Equação 3). O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, em min), o fator de estabilidade e as variações de entalpia (ΔH_D , em kJ mol^{-1}), energia de Gibbs (ΔG_D , em kJ mol^{-1}) e entropia (ΔS_D , em $\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) de ativação para a desnaturação térmica enzimática foram determinadas pelas Equações (5) a (9), respectivamente (SAQIB *et al.* 2010; SOUZA *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2020; FARIA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021), conforme descritas no tópico 3.6.

4.5.3 Ensaios de estabilidade frente ao pH de incubação

A enzima imobilizada em PHB puro e funcionalizado foi incubada, na ausência de substrato, em tampão tris acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0), durante 24 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao término da incubação, as atividades de transfrutossilacção foram determinadas sob condições experimentais estabelecidas (tópico 4.6.1). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.4 Ensaios de estabilidade operacional

A enzima imobilizada em PHB puro e funcionalizado foi adicionada em meio reacional contendo 3,7 mL de solução de sacarose comercial 47 % (m v⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5. A reação enzimática foi determinada sob condições experimentais estabelecidas (tópico 4.6.1). Ao término de cada ciclo batelada, correspondente a 1 h de reação, o biocatalisador heterogêneo foi removido do meio reacional por filtração a vácuo e, então, reintroduzido em um novo e similar meio reacional. As atividades de transfrutossilação foram avaliadas considerando a quantidade de ciclos reacionais enzimáticos e os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.5 Ensaios de estabilidade ao armazenamento

Os ensaios foram realizados com a enzima imobilizada nos suportes PHB puro e funcionalizado ao longo de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de armazenamento. O biocatalisador heterogêneo foi incubado em solução tampão tris acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5, na ausência de substrato, sob refrigeração a 4 °C e suas atividades de transfrutossilação foram monitoradas diariamente sob condições experimentais estabelecidas (tópico 4.6.1). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Determinação das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas de transfrutossilação (A_t) foram determinadas conforme procedimento descrito por Cunha *et al.* (2019), Gonçalves *et al.* (2020), Faria *et al.* (2021) e Garcia *et al.* (2021). Para isso, 1,0 g do biocatalisador heterogêneo (enzima imobilizada) ou 0,1 mL da enzima solúvel (presente no caldo) foi incubado com 3,7 mL de solução de sacarose 47 % (m v⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5. A reação foi conduzida em banho Dubnoff a 50 °C, 190 rpm por 1 h e interrompida pela imersão do meio reacional em água em ebulição por 10 min, seguido por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min para desnaturação enzimática. Posteriormente, o meio reacional foi filtrado a vácuo e a concentração de açúcares redutores e glicose foram quantificadas (item 4.6.2). As atividades de transfrutossilação (A_t) das enzimas solúvel ($A_t^{\text{solúvel}}$) e imobilizada ($A_t^{\text{imobilizada}}$) foram calculadas pelas Equações (12) e (13), respectivamente.

$$A_t^{solúvel} = \frac{[F_T] V_R}{V_E t_R} \quad (12)$$

$$A_t^{imobilizada} = \frac{[F_T] V_R}{m t_R} \quad (13)$$

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

Por definição, uma unidade (1U) de atividade de transfrutosilação refere-se à quantidade de enzima que transfere um micromol (1 μmol) de frutose (F_T) por minuto, sob condições experimentais estabelecidas (CUNHA *et al.*, 2019, GONÇALVES *et al.*, 2020, FARIA *et al.*, 2021, GARCIA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021).

4.6.2 Quantificação dos açúcares

As concentrações de glicose (G) e açúcares redutores (AR) foram quantificados pelos métodos colorimétricos GOD/PAP® (kit enzimático glicose-oxidase) e DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico), respectivamente. As concentrações de frutose liberada (F) e frutose transfrutosilada (transferida) (F_T) no meio reacional foram determinadas pelas Equações (14) e (15) (CHEN *et al.*, 1996, CUNHA *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.* 2020, FARIA *et al.* 2021; GARCIA *et al.* 2021; SILVA *et al.* 2021).

$$[F] = [AR] - [G] \quad (14)$$

$$[F_T] = [G] - [F] \quad (15)$$

4.6.2.1 Determinação da concentração de açúcares redutores (AR)

A concentração de açúcares redutores (AR), presentes no meio reacional, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), adaptado de Miller (1959), conforme descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013).

O preparo da solução de DNS (Reagente A) foi iniciado por meio da dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$) (Dinâmica®) em 200,0 mL de solução 2 mol L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®). Paralelamente, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (Reagente B) constituída por 600 g L^{-1} de tartarato duplo de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) (Dinâmica®). Após a dissolução, ambos os

reagentes (A e B) foram misturados e o volume final da mistura aferido para 1,0 L em balão volumétrico.

A quantificação dos AR foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 0,5 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 0,5 mL da solução preparada. A reação foi conduzida em banho maria, em ebulição, por 15 min e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 4,0 mL de água destilada.

Posteriormente, as alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Edutec ®, modelo EEQ901A-B) a 540 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos AR mediante auxílio da curva de calibração obtida para o método DNS (Figura 16, Apêndice A). O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco, porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática de transfrutossilação, por água destilada.

4.6.2.2 Determinação da concentração de glicose (G)

A concentração de glicose (G), presente no meio reacional, foi determinada pelo método GOD-PAP® (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.* 2021; GANAIE; GUPTA, 2014; GARCIA *et al.* 2021; GONÇALVES *et al.* 2020; SILVA *et al.*, 2021) O método é composto por um kit enzimático contendo glicose-oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato. Por meio da oxidação da glicose pela glicose-oxidase tem-se a produção do peróxido de hidrogênio, oxidado pela peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem coloração rosácea ou vermelha (BOBBIO; BOBBIO, 2005; WONG; WONG; CHEN, 2008). O kit enzimático utilizado foi da marca Laborlab®.

A quantificação da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 35 µL da amostra, oriunda da reação enzimática, em 3,5 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 minutos. A coloração final foi analisada com auxílio de espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) a 505 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações de glicose de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante do kit enzimático. O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco, porém, na ausência da amostra, oriunda da reação enzimática.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e analisados os principais resultados obtidos com a realização desse trabalho.

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BIOCATALISADOR IMOBILIZADO

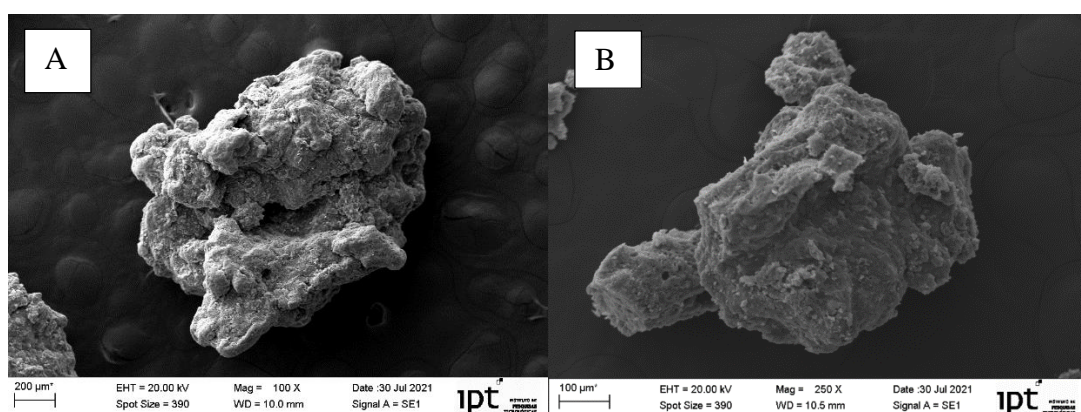
Neste tópico, serão analisadas as características físicas do suporte de imobilização mediante análises de MEV, BET e BJH e de FT-IR para o biocatalisador adsorvido, fisicamente e imobilizado covalentemente, no biopolímero PHB.

As imagens de MEV referentes à morfologia de amostras de partículas do suporte PHB puro e funcionalizado, após a etapa do pré-tratamento e antes do processo de imobilização, são mostradas nas Figuras 3-A e 3-B, respectivamente. Pode-se observar que com base na morfologia exibida pela Figura 3-A, a amostra apresentou superfície bastante rugosa em toda a sua extensão.

Os valores relacionados às áreas específicas, bem como o tamanho e volume de poros das partículas de PHB puro e funcionalizado estão dispostos na Tabela 2. Notou-se que a área específica do biopolímero, determinada pelo método de BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER; 1938), reduziu cerca de 1,2 vezes após o processo de funcionalização. A redução da área específica ao se funcionalizar o suporte pode estar associada à inserção de grupos funcionais na superfície capazes de ocupar os interstícios presentes no suporte antes do processo de funcionalização, assim como ocorre para a sílica, pela formação das ligações covalentes com os grupos silanóis da sua superfície (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

O tamanho de poros, obtido pelo método de BJH (BARRET; JOYNER; HALLEND, 1951), apresentou valores próximos para as partículas de PHB puro (39,61 Å) e funcionalizado (38,41 Å) (Tabela 2). Assim, os suportes utilizados neste trabalho podem ser classificados como materiais mesoporosos, pois o tamanho de poro está compreendido entre 20 Å e 500 Å (JUSZCZAK; FORTUNA; WODNICKA, 2002). Por outro lado, o volume de poros reduziu aproximadamente 1,3 vezes para o PHB funcionalizado. O grau de reticulação é reportado como um dos fatores que causa a redução de porosidade no material obtido, o que pode ocorrer também com o PHB (BERGER *et al.*, 2004; GONSALVES; ARAÚJO, 2011).

Figura 3 - Micrografias eletrônicas de amostras de partículas de PHB



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 2 - Caracterização de partículas de PHB puro e funcionalizado, obtida pelos métodos BET e BJH

Suporte	Área específica (m ² /g)	Tamanho de poro (Å)	Volume de poro (cm ³ /g)
PHB Puro	7,96	39,61	2,14 x 10 ⁻³
PHB Funcionalizado	6,54	38,41	1,59 x 10 ⁻³

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

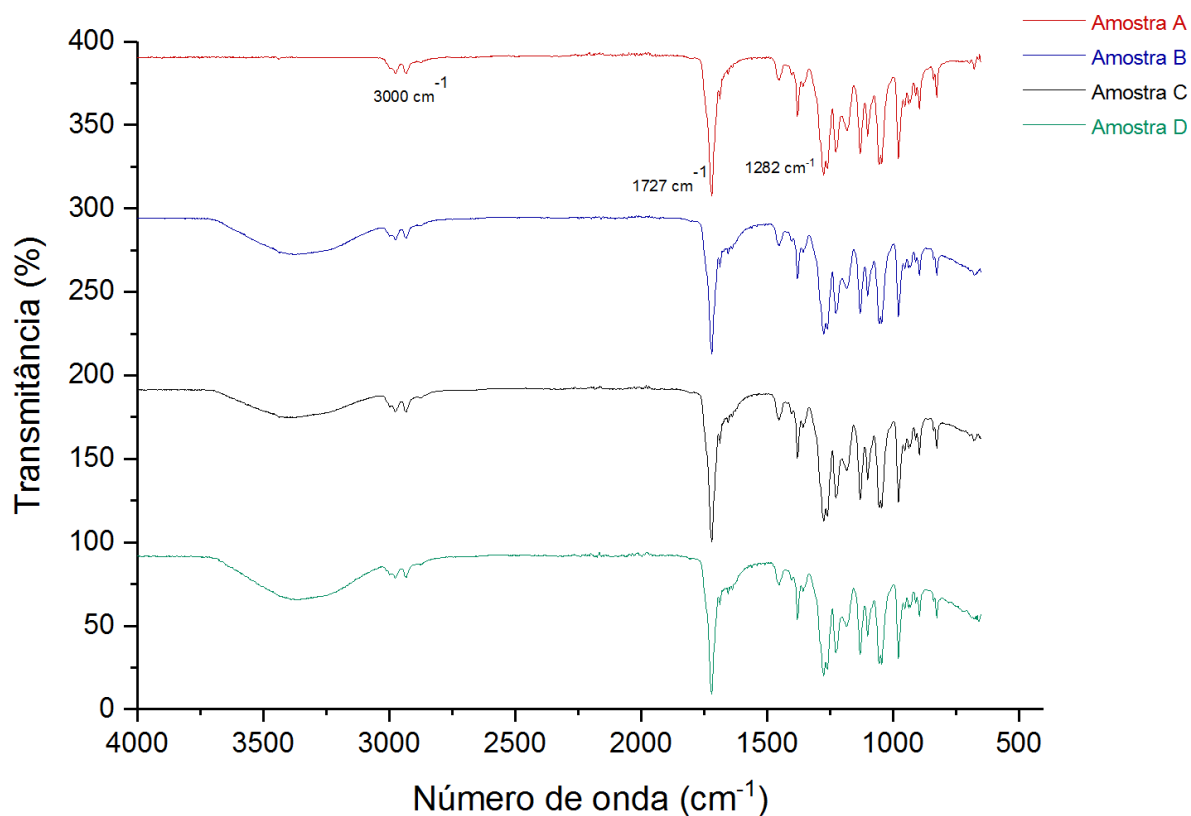
A partir da análise de FT-IR, foram obtidos os espectros de infravermelho para o PHB puro na ausência da enzima (amostra A) e PHB puro contendo a enzima (amostra B), e para os suportes PHB funcionalizado (amostra C) e funcionalizado contendo a FTase microbiana imobilizada (amostra D), que são apresentados na Figura 4.

Observa-se três bandas visíveis em ambos os espectros referentes aos grupos funcionais característicos do PHB: radicais CH₂ (3000 cm⁻¹), estiramento da ligação C=O (1727 cm⁻¹) e C-O do éster (1282 cm⁻¹) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). A série de bandas localizadas entre 1300 e 1000 cm⁻¹ corresponde ao estiramento simétrico e assimétrico das ligações C-O no grupo éster (BINHAYEEDYNG *et al.*, 2020).

Nos espectros das amostras de PHB puro (B) e PHB funcionalizado (D) contendo a FTase imobilizada, nota-se uma banda em 1630 cm⁻¹, que corresponde à banda de amida I, produzida por vibrações C=O. Uma acentuada banda de amida II era esperada entre 1600 e 1500 cm⁻¹ (devido à deformação N-H e estiramento da vibração C-N), o que não ocorreu devido à provável sobreposição ocasionada pela banda de amida I. As bandas de amida são tipicamente presentes em proteínas, o que comprova a presença da enzima

imobilizada no suporte (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; SOCRATES, 2004).

Figura 4 - Espectro de infravermelho por transformada de Fourier das amostras **A** (PHB puro na ausência da enzima), **B** (PHB puro contendo a enzima imobilizada), **C** (PHB funcionalizado na ausência da enzima) e **D** (PHB funcionalizado contendo a enzima imobilizada)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

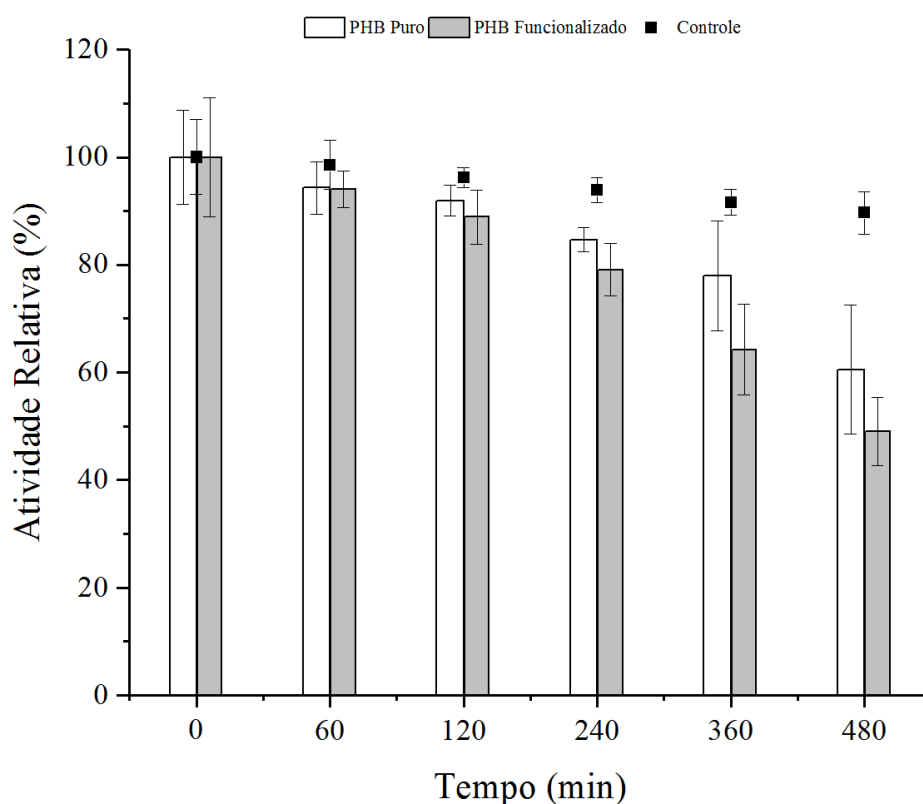
Ainda com relação aos espectros das amostras de PHB puro (B) e PHB funcionalizado (D) contendo a FTase imobilizada, a banda em torno de 3300 cm⁻¹ pode ser ocasionada pelo estiramento dos grupos N-H (aminas) da enzima, porém o alargamento desde 3700 cm⁻¹ até 3000 cm⁻¹ revela a possibilidade de sobreposição do estiramento O-H, causado pela presença de água nas amostras (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

5.2 PERFIL CINÉTICO DE IMOBILIZAÇÃO DA FTASE EXTRACELULAR EM PHB PURO E FUNCIONALIZADO

Conforme descrito no tópico 4.1, inicialmente o suporte foi pré-tratado, de modo que o PHB, nas formas pura e funcionalizada, estivessem adequados para o processo de imobilização. Simultaneamente, as condições de imobilização foram avaliadas e pré-definidas com base no estudo feito por Faria (2019) visando obter biocatalisadores heterogêneos estáveis para mediar a síntese de fruto-oligossacarídeos.

Os ensaios de imobilização, detalhados no tópico 4.3, foram executados, com o propósito de entender o comportamento da FTase extracelular imobilizada em PHB nas formas pura e funcionalizada. Sendo assim, são mostrados a seguir (Figura 5), os perfis cinéticos de imobilização obtidos para a temperatura de 35 °C, que revelaram o comportamento da atividade de transfrutossilacção (A_t) da enzima solúvel, presente no sobrenadante, durante 8 horas de imobilização.

Figura 5 - Perfil cinético de imobilização de FTase extracelular em PHB, puro e funcionalizado, em função do tempo: monitoramento da atividade de transfrutossilacção no sobrenadante. Condições reacionais: (pH: 5,5, temperatura: 35 °C, velocidade de agitação: 175 rpm, 10:1 caldo de cultura/ g de suporte). A atividade máxima de transfrutossilacção ($12,26 \pm 1,15 \text{ U mL}^{-1}$) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A atividade de transfrutoseilação (A_t), observada para o sobrenadante, seguiu uma tendência de queda ao longo das 8 horas de imobilização tanto para a FTase imobilizada em PHB na forma pura quanto funcionalizada (Figura 5). Tal fato aponta que houve interação entre a enzima e os suportes e assim, tem-se a imobilização conforme almejado. Quanto à atuação da atividade de transfrutoseilação (A_t) para a enzima solúvel, representada pela amostra controle, teve como ponto de partida uma atividade relativa de $100 \pm 7 \%$, reduzindo-se para $94 \pm 2 \%$ após 4 horas de imobilização, e após as 8 horas alcançou $90 \pm 4 \%$. Com isso, notou-se uma redução moderada no início do experimento, seguida pela tendência em se manter constante. Isso pode ser justificado pela baixa estabilidade das enzimas solúveis quando extraídas de seu ambiente natural, e ainda, ao fato de a enzima extracelular encontrar-se desprotegida do micélio, estando mais suscetível a condições adversas do meio (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER; KARGI, 2002; SCHÜÜRMAN *et al.*, 2014).

Apesar do comportamento de adsorção enzimática no suporte puro ter sido relativamente similar ao da enzima covalentemente imobilizada no suporte funcionalizado, notou-se que, para a imobilização da FTase em PHB funcionalizado, houve uma queda mais acentuada nos valores de A_t (%) do sobrenadante, principalmente a partir de 6 horas de imobilização. Pois, ao contrário da imobilização no suporte puro, efetuada pelo método da adsorção física, em que a enzima foi espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável (ZHOU *et al.*, 2012), a técnica da ligação covalente adotada para o suporte funcionalizado, promoveu uma aceleração no processo de fixação do biocatalisador ao suporte, mediante ativação da superfície do polímero. Essa ativação implica em modificar grupos funcionais do suporte, papel desempenhado pelo glutaraldeído nesse caso, de modo a produzir intermediários reativos (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013), e assim tem-se a reação da molécula de glutaraldeído com o suporte e a FTase, permitindo que a enzima seja covalentemente imobilizada (SOUZA *et al.*, 2017).

Quanto à temperatura adotada para a obtenção dos perfis cinéticos de imobilização, esta variável foi definida com base no estudo realizado por Faria (2019), em que a FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 teve sua imobilização em sílica gel favorecido em temperaturas relativamente elevadas, tendo como melhor resultado o processo de adsorção física a $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os ensaios realizados também possibilitaram a determinação dos parâmetros de imobilização enzimática, como: (i) rendimento de imobilização (RI) e (ii) atividade

recuperada (AR) para ambos os suportes (puro e funcionalizado). Para os cálculos de RI foram consideradas a atividade de transfrutossilacção inicial e final do caldo fermentado e, para a obtenção de AR, utilizou-se além destas, a atividade de transfrutossilacção presente no biocatalisador heterogêneo (derivado enzima-suporte). Os resultados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de imobilização para o PHB puro e funcionalizado após 8 horas de imobilização

	Rendimento de imobilização (RI) (%)	Atividade recuperada (AR) (%)
PHB Puro ⁽¹⁾	41 ± 6	17 ± 3
PHB Funcionalizado ⁽¹⁾	55 ± 4	11 ± 2

⁽¹⁾ os ensaios de imobilização foram conduzidos a 35 °C, pH 5,5 e 175 rpm, na proporção 1:10 (massa de suporte: volume de caldo de cultura)

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Fundamentado pela Tabela 3, observou-se que, ao fim de 8 horas de imobilização, houve um ganho de rendimento de imobilização da FTase imobilizada em PHB funcionalizado quando comparado ao valor obtido para a enzima adsorvida em PHB puro. Em contrapartida, apesar de valores próximos para a enzima imobilizada em ambas as formas do suporte (puro e funcionalizado), a atividade recuperada foi ligeiramente superior para a FTase adsorvida ao biopolímero na forma pura. Tem-se alguns efeitos nas enzimas imobilizadas, diretamente ligados ao método de imobilização aplicado, capazes de alterar a atividade catalítica e seletividade. Dentre eles estão a distorção da enzima, caso ocorram interações múltiplas entre a enzima e o suporte, o bloqueio do sítio ativo, ou podem ocorrer problemas difusionais (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Foi observado que a soma da redução da área específica e porosidade (43,5%) pode justificar a redução de AR (35,3%) do PHB funcionalizado ao ser comparado ao PHB puro.

Algumas investigações de imobilização de lipases em PHB, por adsorção física e ligação covalente, foram realizadas por Mendes (2009), para a síntese de biodiesel. Tem-se a imobilização de cinco tipos de lipases de origem microbiana, por adsorção física, com variação do PHB (pó e granular), e foram obtidos rendimentos de imobilização de 100 % para três dessas enzimas, e em torno de 60 % para duas delas imobilizadas em PHB na forma granular, revelando a influência da geometria do suporte nos parâmetros de imobilização. Para as atividades recuperadas (AR), considerando o polímero em

grânulo, foram encontrados valores similares (entre 8 % e 11 %) ao da imobilização da FTase em PHB puro (14%). Avaliou ainda, pelo método da ligação covalente, tendo o glutaraldeído como agente de ativação no suporte, a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) em PHB e obteve uma recuperação de atividade de 23 %.

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

Faria (2019) explorou a imobilização da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301, por adsorção física, em sílica gel para a produção de fruto-oligossacarídeos e observou rendimento de imobilização significativo de 85 ± 6 %, a uma temperatura de 35 °C, considerando um tempo relativamente curto de 6 horas de imobilização, mas suficiente para inferir que o suporte já estivesse saturado com a presença da enzima ao fim do processo. Para a atividade recuperada foi obtido um valor de 10 %.

Portanto, tomando-se como base os resultados obtidos, e considerando uma análise conjunta dos parâmetros de imobilização, bem como de fatores operacionais, definiu-se as condições de imobilização da FTase microbiana a 35 °C, pH 5,5, 175 rpm ao longo de 8 h de processo para os biocatalisadores suportados em PHB puro e funcionalizado.

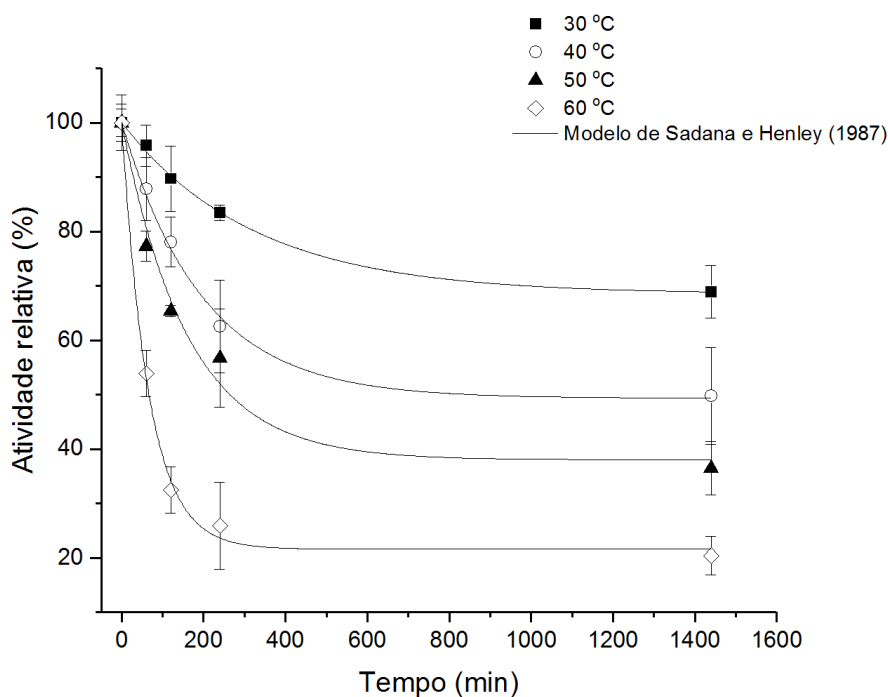
5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA IMOBILIZADA

Posteriormente à investigação do processo de imobilização da FTase extracelular em PHB puro e funcionalizado, foram realizados os estudos de caracterização das propriedades bioquímica da enzima imobilizada. Para tal, a imobilização ocorreu à temperatura de 35 °C, na velocidade de agitação de 175 rpm ao longo de 8 horas de processo.

5.3.1 Estabilidade térmica da FTase extracelular imobilizada em PHB puro e funcionalizado

A partir dos experimentos definidos no Tópico 4.5.2, foi possível avaliar a estabilidade térmica da enzima FTase extracelular imobilizada nos suportes PHB puro e funcionalizado para uma faixa de temperatura compreendida entre 30 °C e 60 °C ao longo de 24 h de incubação do biocatalisador na ausência de substrato. As Figuras 6 e 7 mostram a atividade de transfrutossilação remanescentes após o tratamento térmico da enzima imobilizada nos suportes PHB puro e funcionalizado, respectivamente. O modelo não-linear de Sadana e Henley (1987) foi ajustado aos dados experimentais para estimar os valores das constantes de desnaturação térmica de primeira ordem (k_D , em min^{-1}) para as diferentes temperaturas de incubação avaliadas.

Figura 6 - Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB puro ao longo de 24 horas de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m v^{-1}) em tampão tris-acetato (pH 5,5) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. A atividade máxima de transfrutossilação ($6,67 \pm 0,22 \text{ U g}^{-1}$) foi definida como 100 % da atividade relativa

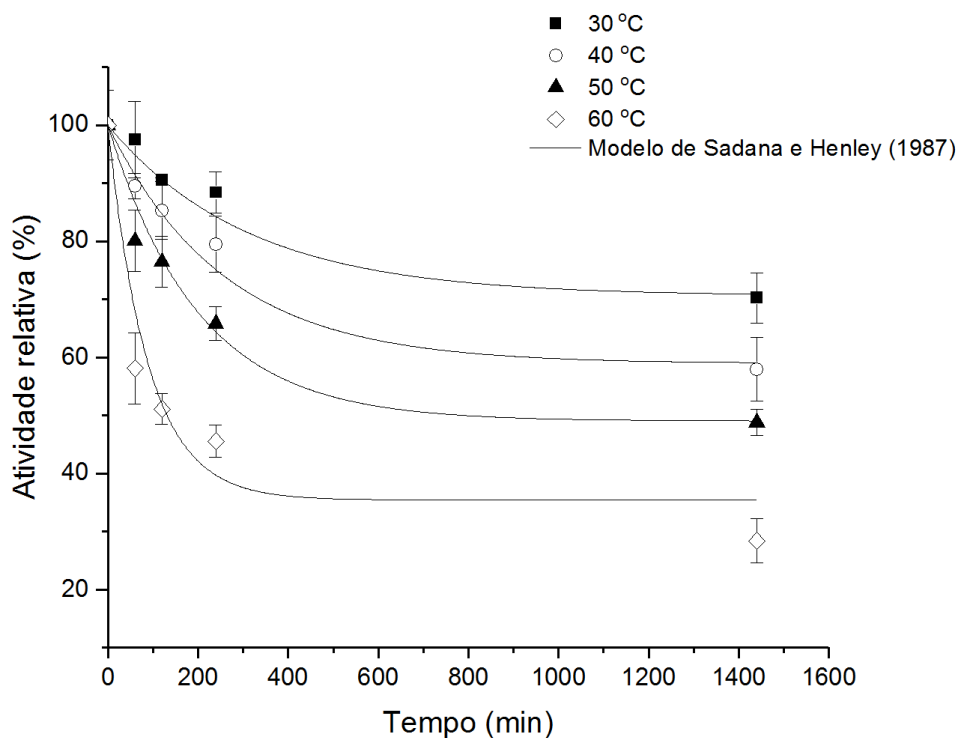


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A Figura 6 mostra as atividades de transfrutoseilação relativas após o pré-tratamento térmico da FTase extracelular adsorvida em PHB puro. A maior retenção de A_t foi observada para as enzimas incubadas a 30 °C, que após 24 horas de incubação, apresentaram atividade residual de 68 ± 5 %. Notou-se ainda que, para o mesmo período, a atividade residual expressou valores em torno de 50 ± 8 %, 36 ± 5 % e 20 ± 3 % para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, respectivamente. Faria *et al.* (2021) obteve valores de retenção de atividade enzimática inferiores, de aproximadamente 18 %, ao se incubar FTase solúvel de *A. oryzae* IPT-301, nas mesmas condições experimentais, por um período de 17 horas.

Na Figura 7 tem-se as atividades de transfrutoseilação relativas após o pré-tratamento térmico da FTase extracelular imobilizada em PHB funcionalizado.

Figura 7 - Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB funcionalizado ao longo de 24 horas de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m v⁻¹) em tampão tris-acetato (pH 5,5) 0,2 mol L⁻¹, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. A atividade máxima de transfrutoseilação ($8,12 \pm 0,49$ U g⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa

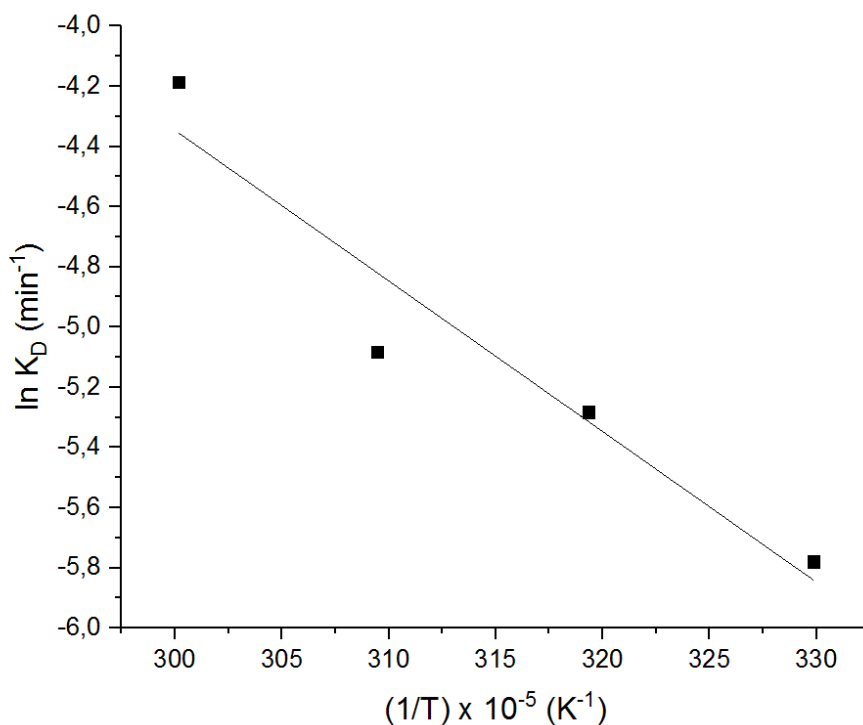


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Assim como ocorreu para o PHB puro, os maiores valores para a retenção de A_t foram observados para as enzimas incubadas a 30 °C, que após 24 horas de incubação, apresentaram atividade residual de aproximadamente $70 \pm 4 \%$. Constatou-se ainda que, para o mesmo período, os valores da atividade residual foram de aproximadamente $58 \pm 5 \%$, $49 \pm 2 \%$ e $28 \pm 3 \%$ para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, respectivamente.

A energia de ativação para a desnaturação térmica (E_D , em kJ mol^{-1}) da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado foi determinada pela linearização da Equação de Arrhenius (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Determinação da energia de ativação para a desnaturação térmica (E_D). A linearização da Equação de Arrhenius [$\ln(k_D)$ em função da (T^{-1})] foi utilizada para estimar E_D da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB puro

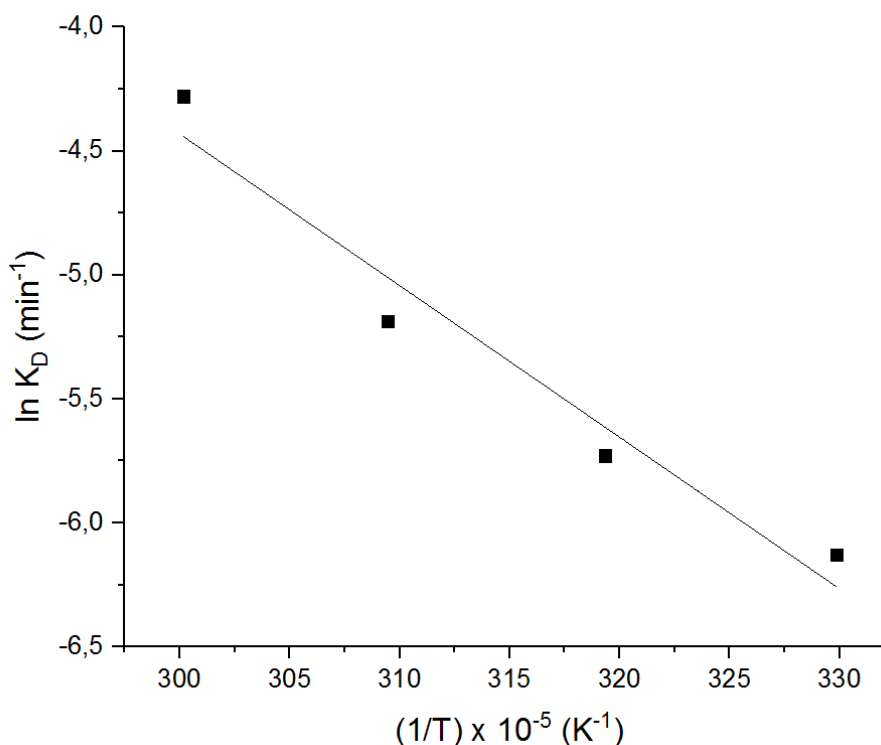


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O ajuste mostrado na Figura 8 exibiu um coeficiente de correlação (R^2) de 92 % e a energia de ativação para a desnaturação térmica da enzima imobilizada em PHB puro foi obtida pela Equação 15, sendo igual a:

$$\ln K_D = 10,66 - 5004 \frac{1}{T} \quad (15)$$

Figura 9 - Determinação da energia de ativação para a desnaturação térmica (E_D). A linearização da Equação de Arrhenius [$\ln(k_D)$ em função da (T^{-1})] foi utilizada para estimar E_D da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB funcionalizado com glutaraldeído



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O ajuste mostrado na Figura 9 apresentou um coeficiente de correlação (R^2) de 95 % e energia de ativação para a desnaturação térmica da enzima imobilizada em PHB funcionalizado foi obtida pela Equação 16, sendo igual a:

$$\ln K_D = 13,91 - 6116,13 \frac{1}{T} \quad (16)$$

Os parâmetros termodinâmicos da FTase solúvel e imobilizada em PHB, puro e funcionalizado, foram calculados a partir das curvas de desnaturação térmica e estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos para a FTase extracelular solúvel (S) e imobilizada em PHB, puro (IP) e funcionalizado (IF), obtidos para diferentes temperaturas de incubação

Parâmetro	FTase	Temperatura (°C)			
		30	40	50	60
R ²	S ^(*)	0,99	0,87	0,72	0,98
	IP	0,99	0,99	0,95	0,98
	IF	0,98	0,97	0,92	0,68
k _D (min ⁻¹)	S ^(*)	5,66 x 10 ⁻³	6,08 x 10 ⁻³	10,12 x 10 ⁻³	17,65 x 10 ⁻³
	IP	3,09 x 10 ⁻³	5,08 x 10 ⁻³	6,21 x 10 ⁻³	15,21 x 10 ⁻³
	IF	2,18 x 10 ⁻³	3,25 x 10 ⁻³	5,59 x 10 ⁻³	13,86 x 10 ⁻³
t _{1/2} (min)	S ^(*)	122,46	114,00	68,49	39,27
	IP	224,31	136,44	111,61	45,57
	IF	317,95	213,27	123,99	50,01
Fator de estabilidade (FE)	IP	1,8	1,2	1,6	1,2
	IF	2,6	1,9	1,8	1,3
E _D (kJ mol ⁻¹)	S ^(*)			32,6	
	IP			41,6	
	IF			50,8	
ΔH _D (kJ mol ⁻¹)	S ^(*)	30,12	30,04	29,96	29,88
	IP	39,08	38,99	38,91	38,83
	IF	48,32	48,24	48,16	48,07
ΔG _D (kJ mol ⁻¹)	S ^(*)	97,64	100,76	102,69	104,42
	IP	99,17	101,23	104,01	104,83
	IF	100,05	102,39	104,29	105,09
ΔS _D (kJ mol ⁻¹)	S ^(*)	- 0,22	- 0,22	- 0,22	- 0,22
	IP	- 0,19	- 0,19	- 0,20	- 0,19
	IF	- 0,17	- 0,17	- 0,17	- 0,17

(*) Os valores de k_D e E_D da FTase solúvel (S) foram obtidos a partir do ajuste dos modelos de Sadana e Henley (1987) e de Arrhenius, respectivamente, aos dados experimentais de atividade enzimática, disponíveis nas Figuras 17 e 18 do Apêndice B.

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tem-se o tempo de meia-vida (t_{1/2}) definido como o tempo necessário à perda de 50 % da atividade enzimática inicial a uma dada temperatura (SAQIB, *et al.*, 2010). Ao analisá-lo, baseado nos resultados expostos na Tabela 4, percebeu-se que o tempo de meia-vida da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado decresceu progressivamente com o aumento da temperatura de incubação da enzima, o que indica o processo de desnaturação irreversível do biocatalisador. Em uma comparação entre os

tempos de meia-vida da enzima solúvel e imobilizada, tanto em PHB puro quanto funcionalizado, foi observado o aumento de $t_{1/2}$ com a imobilização e, ainda, um maior valor para o parâmetro ao se imobilizar a FTase por ligação covalente, verificada no suporte funcionalizado. Tal ocorrência aponta maior estabilidade da FTase imobilizada em PHB funcionalizado, quando comparada à imobilização em PHB puro, pois um tempo de meia-vida superior é um indicativo de que o biocatalisador pode suportar a temperatura por um período maior e, portanto, apresentar maior termoestabilidade (GRIFFIN *et al.*, 1984; SAQIB, *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2021).

Quanto ao fator de estabilidade (FE), verificou-se que a FTase imobilizada em PHB funcionalizado apresentou os maiores valores para esse parâmetro e, portanto, confirmou sua alta estabilidade quando imobilizada, por ligação covalente no suporte em relação ao biocatalisador solúvel. Para uma temperatura de incubação de 30 °C, a enzima se mostrou 2,6 vezes mais estável quando imobilizada no suporte funcionalizado. No entanto, verificou-se uma redução do FE com o aumento da temperatura de incubação, fato este atribuído à desnaturação da proteína (FERREIRA *et al.*, 2018; SAQIB *et al.*, 2010). Faria *et al.* (2021) estudaram a estabilidade térmica da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada, por adsorção física, em sílica gel, e obtiveram um fator de estabilidade 2,5 vezes maior que o da enzima solúvel, a 30 °C.

A energia de ativação para a desnaturação térmica (E_D) refere-se à quantidade mínima de energia que deve ser fornecida à enzima solúvel (estado nativo) para se desnaturar (modificação para conformação irreversível) e, portanto, valores relativamente elevados desse parâmetro indicam alta termoestabilidade enzimática (FARIA *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2018; SAQIB *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2021). Observou-se que os valores de E_D aumentaram ao se imobilizar a enzima em PHB puro (41,6 kJ mol⁻¹) e em PHB funcionalizado (50,8 kJ mol⁻¹), quando comparada ao resultado obtido para a enzima solúvel (32,6 kJ mol⁻¹). Portanto, o processo de imobilização favoreceu a termoestabilidade do biocatalisador, sendo que a enzima imobilizada no suporte funcionado se mostrou 1,2 vezes mais estável em relação à sua adsorção no suporte puro.

A variação de entalpia de ativação para a desnaturação térmica (ΔH_D), assim como E_D , é um importante parâmetro termodinâmico associado ao total de energia requerida para desnaturação enzimática (MARANGONI, 2003). Valores elevados e positivos de ambos os parâmetros indicam elevada estabilidade térmica da enzima (FARIA *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2015). De acordo com a Tabela 4, os

maiores valores de (ΔH_D) foram obtidos para a FTase imobilizada em PHB funcionalizado para todas as temperaturas avaliadas, o que mostra um aumento de termoestabilidade do biocatalisador quando imobilizado covalentemente no suporte.

A variação de energia de Gibbs de ativação para a desnaturação térmica (ΔG_D), por descrever as contribuições das energias entálpica e entrópica, pode ser considerado como o parâmetro termodinâmico mais preciso e confiável para estudos de termoestabilidade enzimática (SAQIB *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015). De acordo com Marangoni (2003), Damodaran (2005) e Aguiar-Oliveira e Maugeri (2011), os maiores valores de ΔG_D indicam maior resistência da enzima à desnaturação, uma estrutura conformacional mais estável e uma menor tendência de desdobramento da estrutura proteica. Observou-se que todos os valores de ΔG_D foram positivos visto que, no equilíbrio, a concentração da enzima no estado nativo é maior que no estado desnaturado e, portanto, o processo não é espontâneo durante a transição de estado (FONSECA *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2020; FARIA *et al.*, 2021).

A desnaturação térmica da enzima causa a ruptura da estrutura protéica e gera um sistema desordenado, ocasionando o aumento da entropia (GONÇALVES *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Desse modo, a desnaturação depende da variação de entropia de ativação para a desnaturação térmica (ΔS_D), parâmetro este que expressa a quantidade de energia por grau de desordem envolvida na transição de um estado nativo para um estado desnaturado do biocatalisador (MARANGONI, 2003; SOUZA *et al.*, 2015). De acordo com a Tabela 4, os valores de ΔS_D foram negativos para a FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado para todas as temperaturas avaliadas, o que indica a transição para o estado mais ordenado da enzima (RASHID & SIDDIQUI, 1998). Ademais, o aumento da temperatura pode enfraquecer as interações polares das enzimas e fortalecer suas interações hidrofóbicas. Tal fato pode explicar os valores negativos para ΔS_D , visto que a resistência da enzima ao desdobramento por causa de interações hidrofóbicas mais fortes supera a tendência de a enzima se desintegrar devido à interações polares enfraquecidas em altas temperaturas (SIDDIQUI *et al.*, 1997).

Portanto, todos os parâmetros listados na Tabela 4 indicaram que a imobilização da FTase extracelular em PHB puro e funcionalizado resultou em maiores tempos de meia-vida e estabilidade térmica da enzima em relação à sua forma solúvel.

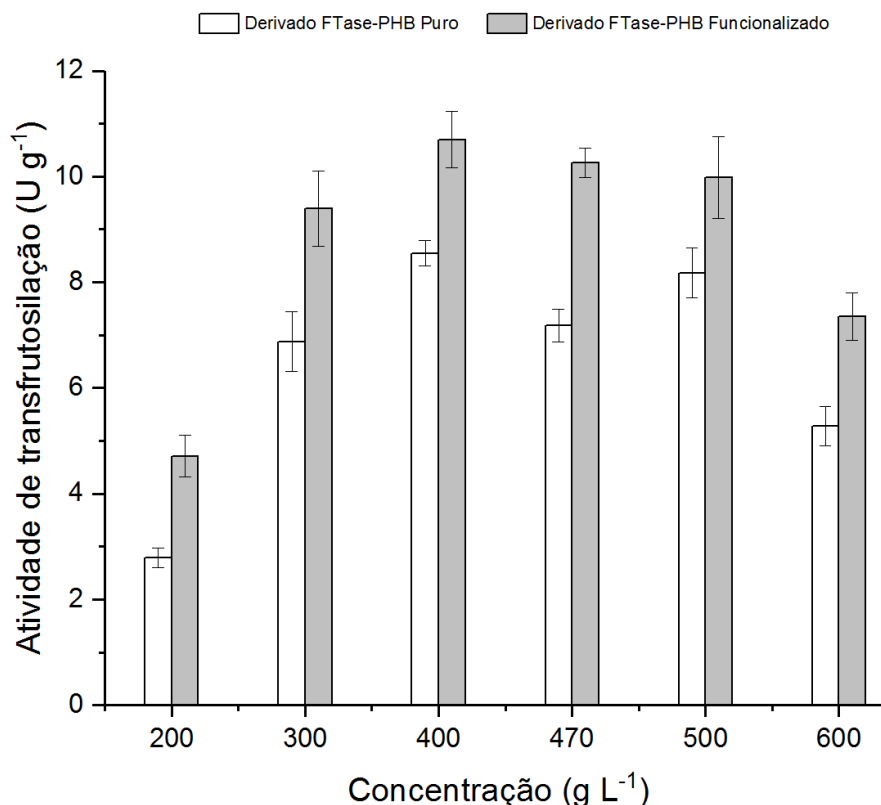
Alguns relatos na literatura mostram resultados de estudos de termoestabilidade de enzimas imobilizadas em PHB por diferentes técnicas de imobilização. Deepak *et al.* (2009) imobilizaram Nattokinase de *Bacillus subtilis* em nanopartículas de

polihidroxibutirato (PHB) e a enzima imobilizada apresentou estabilidade térmica maior que a enzima solúvel, preservando a atividade residual em 100 % quando submetida a temperaturas de 30 °C a 70 °C, ao passo que a enzima solúvel atingiu retenção de 100 % de atividade residual apenas nos intervalos de temperatura de 30 °C a 50 °C, exibindo perda de atividade em temperaturas acima de 50 °C. Cabrera-Padilla *et al.* (2012) imobilizaram lipase de *Candida rugosa* em poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)-PHBV, por adsorção física, e observaram que a temperatura ótima da enzima solúvel (37 °C), atingiu uma faixa de 37 °C a 45 °C para a enzima imobilizada, de modo a evidenciar o aumento da estabilidade térmica após a imobilização. A investigação de Miranda *et al.* (2014) a respeito da imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em partículas mesoporosas de PHB, por adsorção física, teve como resultado um aumento no tempo de meia-vida em até 2,5 vezes para o biocatalisador imobilizado e incubado a 45 °C. Binhayeeding *et al.* (2020) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em PHB por uma combinação de técnicas de imobilização, envolvendo a adsorção física e reticulação com glutaraldeído, e observaram que o biocatalisador imobilizado reteve mais de 80 % da atividade residual após 2 horas de incubação nas temperaturas de 30 °C a 60 °C, com um tempo de meia-vida de 25,97 h, e, nas mesmas condições, a enzima solúvel reteve aproximadamente 74 % da atividade residual e um tempo de meia-vida de 18,37 h, para a temperatura de 40 °C. Os autores mostraram que a imobilização tornou a enzima até 1,4 vezes mais estável quando comparada com a estabilidade térmica da enzima solúvel.

5.3.2 Efeito da concentração de substrato na atividade de transfrutossilação e obtenção dos parâmetros cinéticos

A avaliação do efeito da concentração de substrato na atividade de transfrutossilação foi realizada mediante o protocolo experimental descrito no Tópico 4.5.1. Avaliou-se diferentes concentrações de sacarose no meio reacional e a sua influência no comportamento da FTase imobilizada nos suportes PHB puro e funcionalizado. Os resultados estão dispostos na Figura 10.

Figura 10 - Influência da concentração de substrato na atividade de transfrutossilção da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB. Os maiores valores de atividades foram de $8,55 \pm 0,24 \text{ U g}^{-1}$ e $10,7 \pm 0,53 \text{ U g}^{-1}$ para o derivado FTase PHB-puro e derivado FTase-PHB funcionalizado, respectivamente. Condições experimentais: a reação ocorreu a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 190 rpm, pH 5,5, para as concentrações de sacarose de 20, 30, 40, 47, 50 e 60 % (m v^{-1}) em tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A partir da Figura 10 pode-se inferir que, para o derivado FTase-PHB puro, o maior valor da atividade de transfrutossilção foi obtido para a concentração de sacarose de 400 g L^{-1} e a queda no valor de A_t observada a partir de 470 g L^{-1} indica o início da saturação dos sítios ativos do biocatalisador e inibição pelo substrato (FARIA *et al.*, 2021). Em contrapartida, notou-se o menor valor de A_t para a concentração de sacarose em 200 g L^{-1} , sugerindo a insuficiência de substrato para a ocorrência da reação com eficácia (FARIA *et al.*, 2021).

No trabalho desenvolvido por Cunha *et al.* (2019), que avaliou os efeitos da concentração de sacarose na atividade de transfrutossilção da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301, os maiores valores de A_t para a enzima solúvel foram obtidos para uma concentração de substrato compreendida entre 296 g L^{-1} e 592 g L^{-1} . Os estudos de Faria *et al.* (2021) mostraram que, após a imobilização da FTase extracelular de

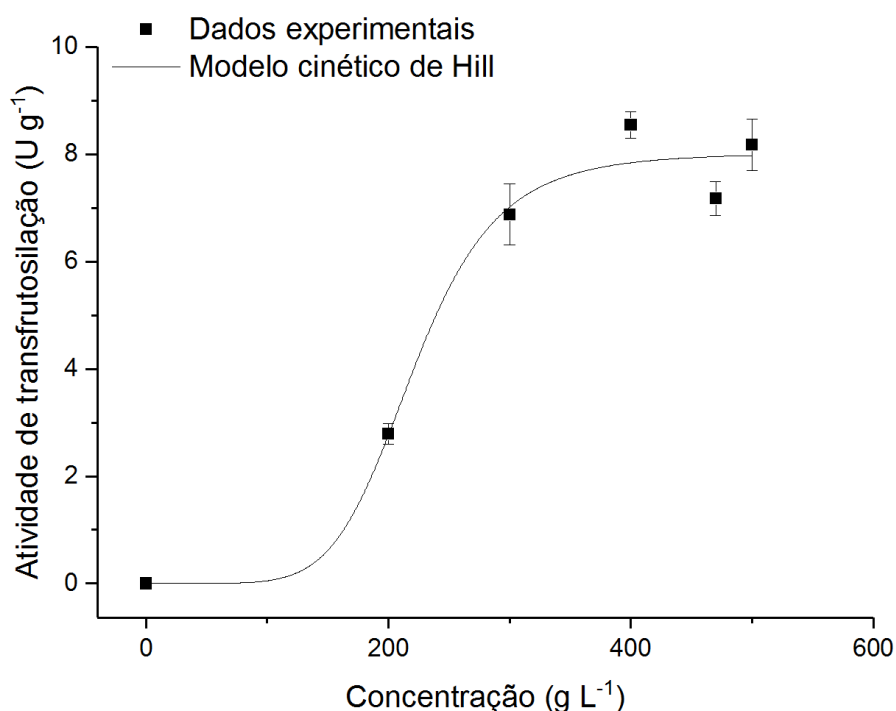
Aspergillus oryzae IPT-301 em sílica gel, por adsorção física, as concentrações de sacarose que forneceram os maiores valores de A_t se mantiveram entre 400 g L⁻¹ e 500 g L⁻¹, o que sugere que o processo de imobilização não alterou as concentrações de substrato capazes de obter os máximos valores de A_t .

O derivado FTase-PHB funcionalizado exibiu valores de A_t superiores aos do biocatalisador imobilizado em PHB puro para todas as concentrações avaliadas. Contudo, o maior valor de A_t foi obtido para a concentração de substrato de 400 g L⁻¹. Além disso, assim como ocorreu para a enzima adsorvida em PHB puro, o aumento da concentração de sacarose promoveu a queda de A_t , sendo mais acentuada para a concentração de 600 g L⁻¹. Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) também reportaram inibição pelo substrato em concentrações acima 500 g L⁻¹ na atividade enzimática da FTase extracelular de *Rhodotorula* sp. imobilizada por adsorção em suporte constituído por nióbio-grafite. Similarmente, Alvarado-Huallanco e Maugeri (2011) apresentaram efeitos de inibição pelo substrato para a FTase solúvel de *Rhodotorula* sp. para concentrações de sacarose acima de 70 % (m v⁻¹).

O ajuste do modelo de Hill aos dados experimentais de atividade de transfrutossilacção da FTase imobilizada em PHB puro foi realizado para a obtenção dos parâmetros cinéticos e a representação gráfica é mostrada pela Figura 11. O coeficiente de determinação encontrado foi de $R^2 = 0,98$, o que demonstra alta acuracidade para o ajuste do modelo aos valores de A_t .

Os parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Hill para a FTase extracelular adsorvida em PHB puro são mostrados na Tabela 5. A concentração de sacarose na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima pode ser representada pelo valor de $K_{0,5}$ (g L⁻¹) (DIAS, 2020). E quanto menor for o seu valor, maior será a afinidade entre o substrato e o sítio ativo da enzima. O valor de $K_{0,5}$ exibido na Tabela 5 ($221,14 \pm 13,00$ g L⁻¹) apresenta a mesma ordem de grandeza do $K_{0,5}$ encontrado por Faria *et al.* (2021), de $204,2 \pm 4,00$ g L⁻¹, ao imobilizar a FTase extracelular em sílica gel.

Figura 11 - Ajuste do modelo cinético de Hill aos dados experimentais de atividade de transfrutoseilação da enzima FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB puro



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Outro parâmetro cinético mostrado na Tabela 5 é o $V_{m\acute{a}x}$, que descreve a velocidade máxima da reação em que a enzima está completamente saturada com o substrato. O valor obtido para a FTase imobilizada em PHB puro, de $8,023 \pm 0,45 \text{ U g}^{-1}$ foi maior que o reportado por Faria *et al.* (2021) ($1,45 \pm 0,03 \text{ U g}^{-1}$) ao imobilizar a FTase extracelular em sílica gel, considerando o mesmo modelo para o ajuste dos dados. Cunha *et al.* (2019) reportou $V_{m\acute{a}x}$ de $16,23 \text{ U mL}^{-1}$, para o ajuste do modelo de Michaelis- Menten aos dados de A_t da FTase extracelular de *A.oryzae* IPT-301.

Com relação ao coeficiente de Hill (n), o valor apresentado na Tabela 5 é de $6,38 \pm 2,35$, o que corresponde a uma cooperatividade positiva entre os sítios ativos da enzima e as moléculas de substrato, o que significa que após a reação da primeira molécula de substrato com um sítio ativo, há o aumento da afinidade dos demais sítios ativos da enzima com o substrato. Tal ocorrência pode ser verificada em enzimas com mais de um sítio catalítico e múltiplas subunidades (WEISS, 1997).

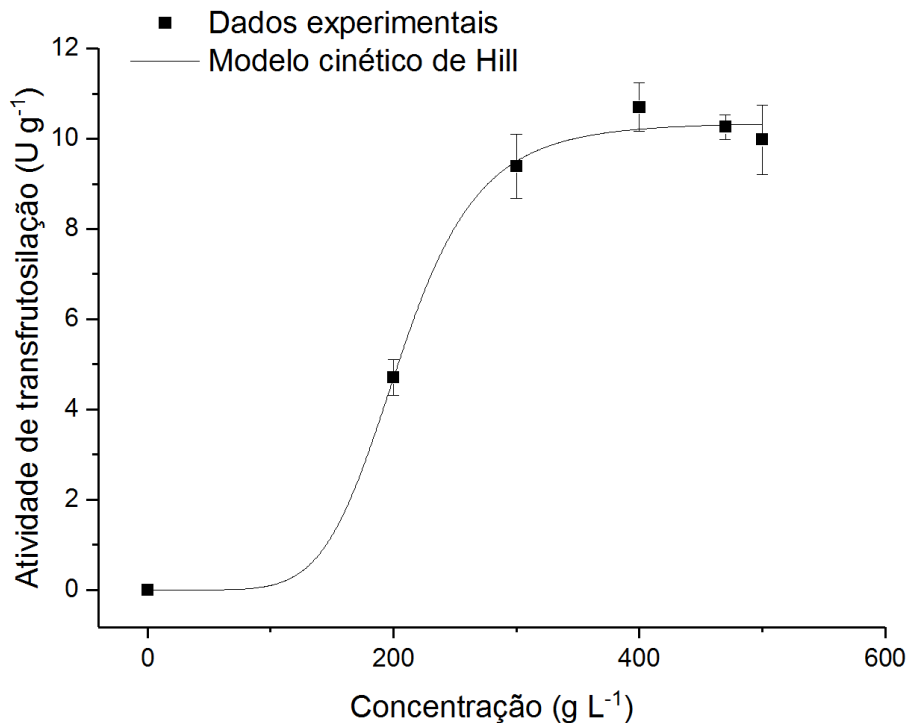
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos para a FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB puro

Parâmetro cinético	Modelo de Hill
$V_{\text{máx}}$ (U g ⁻¹)	8,023 ± 0,45
$K_{0,5}$ (g L ⁻¹)	221,14 ± 13,00
n	6,38 ± 2,35

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A cinética enzimática da atividade de transfrutoseilação da FTase imobilizada em PHB funcionalizado também foi estudada por meio do ajuste do Modelo de Hill aos dados experimentais para a obtenção dos parâmetros cinéticos, cuja representação gráfica é mostrada pela Figura 12. O coeficiente de determinação foi de $R^2 = 0,99$, o que indica que o modelo é capaz de explicar 99 % das variações da atividade de transfrutoseilação para o biocatalisador imobilizado em PHB funcionalizado.

Figura 12 - Ajuste do Modelo cinético de Hill aos dados experimentais de atividade de transfrutoseilação da enzima FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB funcionalizado



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O modelo cinético de Hill ajustado para os dados da FTase extracelular imobilizada em PHB funcionalizado forneceu os parâmetros cinéticos que estão exibidos na Tabela 6. A concentração de sacarose necessária para atingir metade da velocidade máxima ($K_{0,5}$) foi de $205,9 \pm 4,72 \text{ g L}^{-1}$, um valor da mesma ordem de grandeza que o encontrado para o biocatalisador imobilizado em PHB puro ($221,14 \pm 13,00 \text{ g L}^{-1}$).

Observou-se que o valor de $V_{\text{máx}}$ ($10,35 \pm 0,25 \text{ U g}^{-1}$) foi maior que o obtido para a FTase imobilizada em PHB puro ($8,023 \pm 0,45 \text{ U g}^{-1}$), o que sugere o aumento da taxa máxima de reação que ocorre quando a FTase imobilizada em PHB funcionalizado está completamente saturada com a sacarose.

O valor do parâmetro n de $6,39 \pm 1,43$, assim como obtido para o PHB puro como suporte, correspondeu a uma cooperatividade positiva entre os sítios ativos da enzima e as moléculas de sacarose.

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos para a FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB funcionalizado

Parâmetros cinéticos	Modelo de Hill
$V_{\text{máx}}$ (U g^{-1})	$10,35 \pm 0,25$
$K_{0,5}$ (g L^{-1})	$205,9 \pm 4,72$
n	$6,39 \pm 1,43$

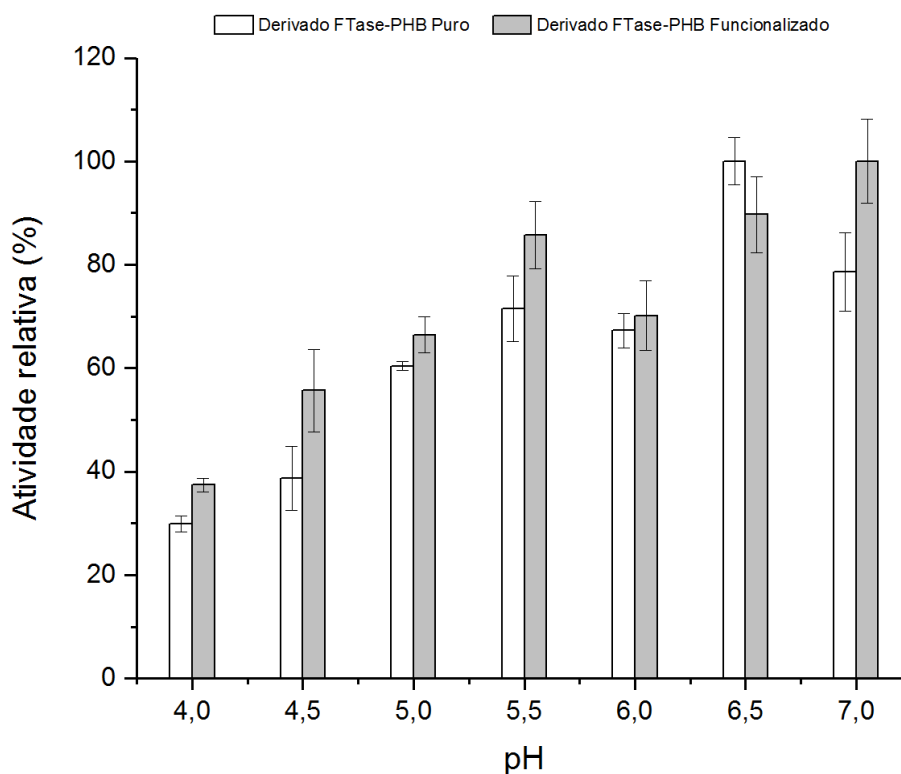
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O modelo cinético de Hill apresenta um bom ajuste aos dados experimentais referentes a estudos enzimáticos que envolvem reações com transferência de grupos frutossil (GHAZI *et al.*, 2007). Isso é mostrado pelos resultados da imobilização da FTase em PHB puro e funcionalizado e em sílica gel nos estudos de Faria *et al.* (2021). Por outro lado, Cunha *et al.* (2019), ao estudar a cinética da FTase solúvel de *A. oryzae* IPT-301, mostrou que o modelo cinético de Michaelis-Menten forneceu o melhor ajuste aos dados experimentais.

5.3.3 Estabilidade da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado frente ao pH

Na Figura 13 estão dispostos os resultados do experimento descrito no Tópico 4.5.3, em que foi avaliado o efeito do pH de incubação na atividade de transfrutossilacção da FTase imobilizada nos suportes PHB puro e funcionalizado.

Figura 13 - Estabilidade enzimática da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB puro e funcionalizado após 24 h de incubação a 4 °C para diferentes valores de pH. A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m v⁻¹) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. As atividades máximas de transfrutossilacção foram 9,00 ± 0,58 U g⁻¹ e 10,5 ± 0,85 U g⁻¹, para o derivado FTase-PHB puro e derivado FTase-PHB funcionalizado, respectivamente, e definidas como 100 % da atividade relativa



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A FTase imobilizada em PHB funcionalizado exibiu maior estabilidade que o biocatalisador imobilizado em PHB puro, quando submetida a diferentes pH de incubação (Figura 13), exceto para o pH de 6,5, em que houve inversão no comportamento do biocatalisador. Notou-se que, para o derivado FTase-PHB puro, os maiores valores de atividade relativa, entre 67 % e 100 %, foram obtidos para uma faixa de pH compreendida entre 5,5 e 7,0. Ressalta-se ainda que, o comportamento da enzima imobilizada no biopolímero funcionalizado demonstrou valores de atividade relativa superiores, compreendidos entre 70 % e 100 %, também para o intervalo de pH entre 5,5 e 7,0. Faria *et al.* (2021) reportaram maior estabilidade da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica gel para uma faixa de pH compreendida entre 5,0 e 6,5, com

atividade relativa superior a 95 % em pH 6,0. Silva *et al.* (2021) avaliaram a estabilidade da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 para valores de pH inseridos no intervalo de 3,5 a 8,5 e obtiveram maior estabilidade em pH 5,5, com atividade relativa de 100%. Cunha *et al.* (2019), em estudos prévios de caracterização das propriedades bioquímicas da FTase extracelular solúvel produzidas pelo mesmo micro-organismo, reportaram os maiores valores de atividade relativa no intervalo de pH compreendido entre 5,0 a 6,5, com atividade próxima a 100 % no pH de 6,0.

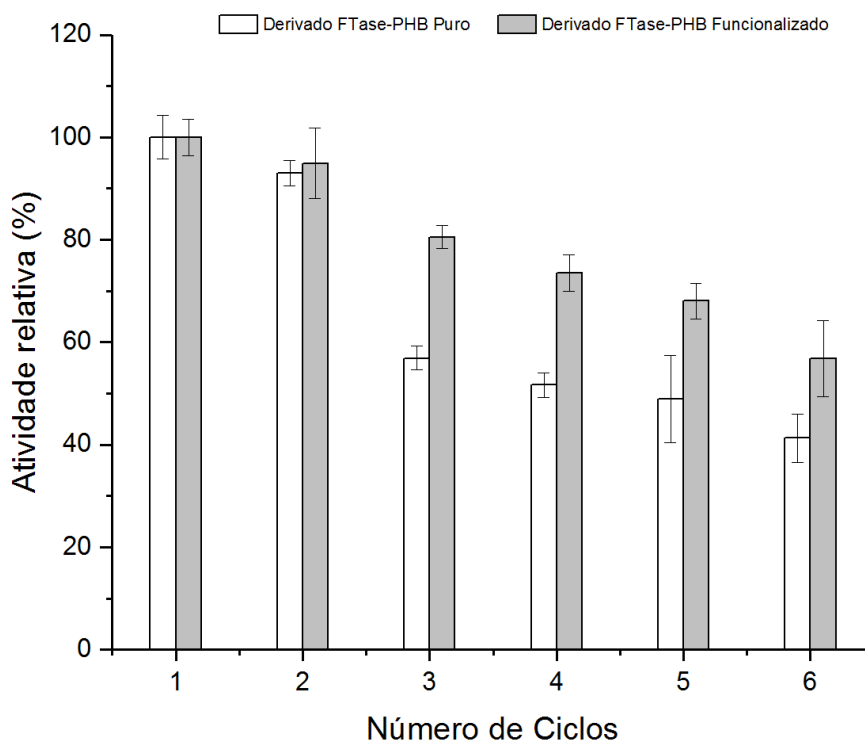
Estudos de estabilidade frente ao pH da FTase extracelular imobilizada, produzidas por diferentes fontes microbianas, também foram reportados por outros autores. Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) reportaram que a FTase extracelular de *Rhodotorula* sp., após ser submetida ao processo de imobilização por adsorção em minério de nióbio, apresentou alta atividade e estabilidade para valores de pH de 4,5 e 6,0. Onderková, Bryjak e Polakovič (2007) estudaram a estabilidade da FTase de *Aureobasidium pullulans* CCY-27-1-94 imobilizada em carreador acrílico, e após 1 hora de incubação, o biocatalisador apresentou atividade em pH de 3,0 a 6,0, com valor de *A_t* relativa de 85 %.

O processo de imobilização protege os grupos reativos da estrutura da proteína dos efeitos do pH (VERMA; KUMAR; KUMAR, 2019). Portanto, enzimas imobilizadas são mais robustas, estáveis e resistentes à mudanças do meio reacional (BRADY; JORDAN, 2009; MENDES *et al.* 2011a). De acordo com Xu *et al.* (2015), uma ampla faixa de estabilidade frente ao pH favorece o armazenamento e a aplicação industrial de enzimas. Nesse sentido, a ampla faixa de estabilidade ao pH apresentada pelos derivados FTase-PHB puro e FTase-PHB funcionalizado, torna os biocatalisadores atrativos para a aplicação na produção de fruto-oligossacarídeos em larga escala.

5.3.4 Estabilidade operacional da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado

A estabilidade operacional durante o ciclo da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado foi avaliada e os resultados estão dispostos na Figura 14.

Figura 14 - Estabilidade operacional da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em PHB puro e funcionalizado avaliada durante ciclos reacionais consecutivos em batelada. A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m v⁻¹) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 5,5), com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. As atividades máximas de transfrutosilação para o derivado FTase-PHB puro e derivado FTase-PHB funcionalizado foram $6,29 \pm 0,14$ U g⁻¹ e $8,67 \pm 0,63$ U g⁻¹, respectivamente, e definidas como 100 % da atividade relativa



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Nota-se que, para todos os ciclos avaliados, os valores de A_t relativa para a FTase adsorvida no biopolímero puro, mostraram-se menores quando comparados aos da enzima imobilizada em PHB funcionalizado, que apresentou maior retenção de atividade. A diferença entre os valores se torna expressiva a partir do terceiro ciclo, em que A_t foi de $56,89 \pm 2,33$ % e de $80,53 \pm 2,0$ % para a FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado, respectivamente. No sexto ciclo, o biocatalisador imobilizado em PHB puro reteve $41,29 \pm 3,24$ % de A_t , ao passo que a enzima imobilizada covalentemente em PHB funcionalizado apresentou uma retenção de $56,83 \pm 4,38$ % em relação à atividade inicial.

Desse modo, infere-se a ocorrência de maior estabilidade operacional para a FTase imobilizada em PHB funcionalizado, podendo ser justificada pelo método de imobilização aplicado, a ligação covalente que, quando utilizada para a imobilização de

enzimas em suportes altamente ativados, pode promover o enrijecimento de sua estrutura tridimensional, o que dificulta a dessorção da enzima do suporte (MENDES *et al.* 2011a). A ligação covalente é intermediada pelo glutaraldeído, também conhecido como reagente bifuncional, é responsável por formar um braço espaçador na superfície do suporte cujas extremidades se ligam à enzima e ao suporte (BINHAYEEDING *et al.*, 2020). Por outro lado, a adsorção física, técnica utilizada para imobilizar a FTase em PHB puro, apresenta limitações como a possibilidade de arraste do biocatalisador devido às fracas interações intermoleculares (Van der Waals, forças de hidrogênio e hidrofóbicas) existentes entre a enzima e o suporte, o que resulta em uma menor estabilidade operacional (FARIA *et al.*, 2021), fato este verificado para a FTase adsorvida no suporte puro. Apesar da redução da atividade enzimática, apresentada pela FTase imobilizada em ambos os suportes (Figura 14), principalmente por aquele envolvendo adsorção física, ressalta-se que o biocatalisador pode ser utilizado para a produção de fruto-oligossacarídeos por se mostrar estável e preservar a atividade de transfrutoseilação ao longo de vários ciclos reacionais, característica necessária para a redução de custos em processos enzimáticos (GUISÁN, 2013).

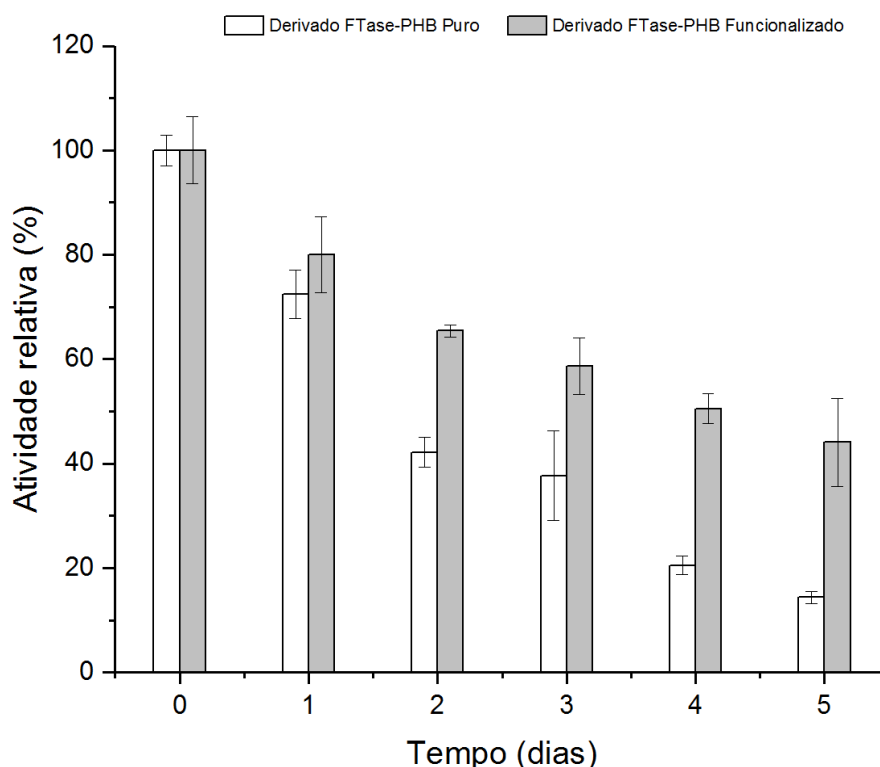
Binhayeeding *et al.* (2020) reportaram alta estabilidade operacional, com retenção de atividade superior a 50 % após quatorze ciclos para a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em PHB por uma combinação de técnicas de imobilização, adsorção física e reticulação com glutaraldeído, para a aumentar a produção de aciglicerol. Nos estudos de Cabrera-Padilla *et al.* (2012), em que a lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada em PHBV, por adsorção física, o biocatalisador reteve 50 % da atividade após doze ciclos de reação. Miranda *et al.* (2014) relataram que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada em partículas mesoporosas de PHB e o biocatalisador reteve aproximadamente 70% da atividade inicial após cinco ciclos consecutivos de reações de esterificação. Silva *et al.* (2014) investigaram a estabilidade operacional da lipase do pâncreas de porco (LPP) imobilizada, por adsorção física, em partículas de PHB e o biocatalisador reteve cerca de 63% da atividade inicial após seis ciclos consecutivos para a síntese de butirato de butila. Ramos *et al.* (2015) obtiveram retenção em torno de 93% da atividade inicial após seis ciclos consecutivos de reações de esterificação, para a lipase de *Geotrichum candidum* imobilizada, por adsorção física, em partículas de PHB. Faria *et al.* (2021) avaliaram a estabilidade operacional da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica gel mesoporosa, cujo biocatalisador apresentou cerca de 45 % da atividade inicial após cinco ciclos consecutivos reacionais consecutivos.

5.3.5 Estabilidade ao armazenamento da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado

A estabilidade ao armazenamento foi determinada visando avaliar o comportamento da FTase imobilizada nos suportes PHB, puro e funcionalizado, após a incubação do biocatalisador imobilizado a 4 °C, na ausência de substrato, conforme protocolo experimental descrito no Tópico 4.5.5. Os resultados estão apresentados na Figura 15.

Verificou-se uma maior estabilidade ao armazenamento da FTase imobilizada em PHB funcionalizado ao ser confrontada com o biocatalisador adsorvido em PHB puro. Assim, após 24 horas (primeiro dia) de incubação, a enzima imobilizada em PHB funcionalizado reteve $80 \pm 7,25$ % da atividade de transfrutossilacção inicial, ao passo que a FTase imobilizada em PHB puro apresentou uma A_t relativa de $72,41 \pm 4,64$ %. Ao longo dos ensaios de armazenamento, as atividades relativas da FTase, imobilizada nos suportes puro e funcionalizado, apresentaram queda, porém, de forma menos acentuada para o derivado FTase-PHB funcionalizado ($58,61 \pm 5,41$ %) após o terceiro dia de incubação. Para o mesmo período, o derivado FTase- PHB puro reteve $37,69 \pm 8,59$ % da atividade de transfrutossilacção inicial. Ressalta-se ainda que, após o quinto dia de armazenamento, foram obtidas retenções de atividade de $14,36 \pm 1,14$ % e $44,07 \pm 8,48$ % para o biocatalisador imobilizado nos suportes puro e funcionalizado, respectivamente. Silva *et al.* (2021), estudaram a estabilidade ao armazenamento da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 sob as mesmas condições experimentais e constataram que a enzima solúvel reteve apenas 45,6 % de sua atividade inicial nas primeiras 9 horas de armazenamento. Após este período, a A_t continuou diminuindo até atingir aproximadamente 35 % da atividade inicial após 96 horas de incubação.

Figura 15 - Estabilidade ao armazenamento da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada nos suportes PHB puro e funcionalizado. A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m v⁻¹) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 5,5), com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. As atividades máximas de transfrutoseilação para o derivado FTase-PHB puro e derivado FTase-PHB funcionalizado foram 6,44 ± 0,18 U g⁻¹ e 7,86 ± 0,5 U g⁻¹, respectivamente, e definidas como 100 % da atividade relativa



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

De acordo com Horn *et al.* (2006), a capacidade de armazenamento da enzima imobilizada, para aplicação futura, é um dos fatores mais significativos para se avaliar a usabilidade da enzima. Assim, os biocatalisadores imobilizados que apresentam maiores valores de estabilidade ao armazenamento promovem a otimização do tempo e custos operacionais quando aplicados em processos de larga escala.

Dentre os relatos sobre estabilidade ao armazenamento, encontra-se o estudo de Dantas (2017), que imobilizou a lipase de *Thermomyces lanuginosus* em partículas de poliestireno por retenção física em matriz e obteve 89 % da atividade inicial, após 39 dias de incubação a 6 °C. A lipase de *Candida rugosa*, estudada por Binhayeeding *et al.* (2020), imobilizada em PHB por adsorção física, seguida de reticulação com glutaraldeído apresentou alta estabilidade ao armazenamento, com retenção de 80 % da atividade inicial após 30 dias de estocagem a 4 °C. Estes resultados reafirmam que, à

medida que a estabilidade ao armazenamento aumenta, fato que é facilitado pela imobilização, o uso do biocatalisador na indústria torna-se mais eficiente (NAJADA, *et al.*, 2019).

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos, infere-se que a FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 foi adequadamente imobilizada nos suportes PHB puro, por adsorção física, e PHB funcionalizado, por ligação covalente.

Os estudos de caracterização física dos suportes puro e funcionalizado, como demonstrado nos espectros de FT-IR indicam a presença da FTase imobilizada em ambos os suportes.

A partir da determinação dos perfis cinéticos de imobilização da FTase tanto em PHB puro, quanto funcionalizado definiu-se um tempo de 8 horas para a imobilização da enzima.

Quanto à estabilidade térmica, notou-se que foi superior para a enzima imobilizada em PHB funcionalizado, quando comparada ao PHB puro. Isso é evidenciado pelos parâmetros termodinâmicos como o tempo de meia-vida, que foi 2,6 vezes maior que o da enzima solúvel, quando submetido à temperatura de 30 °C e observou-se ainda um aumento na energia de ativação para a desnaturação térmica para a FTase imobilizada em PHB funcionalizado, quando comparada ao suporte puro.

A concentração de substrato capaz de fornecer os maiores valores da atividade de transfrutossilação foi de 400 g L⁻¹, para a FTase imobilizada em ambos os suportes. O modelo cinético ajustado aos dados da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado foi o modelo de Hill.

O estudo de estabilidade da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado frente ao pH de incubação revelou uma faixa de valores entre 5,5 e 7,0, em que as atividades de transfrutossilação foram maiores para ambos os suportes.

Além destes, investigou-se a estabilidade operacional, que foi maior para a FTase imobilizada em PHB funcionalizado quando comparada ao PHB puro, principalmente a partir do terceiro ciclo, em que A_t foi de $56,89 \pm 2,33$ % para o derivado FTase-PHB puro e $80,53 \pm 2,0$ % para PHB funcionalizado.

Ademais, obteve-se também uma maior estabilidade ao armazenamento da FTase imobilizada em PHB funcionalizado ao ser contrastada com o biocatalisador adsorvido em PHB puro.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade desse trabalho, são propostas as seguintes sugestões:

- a) Otimizar as variáveis de imobilização (temperatura, pH, velocidade de agitação e carga enzimática) nos estudos de adsorção e ligação covalente da FTase nos suportes PHB puro e funcionalizado;
- b) Avaliar o uso de diferentes agentes funcionalizantes para o suporte PHB de modo a aumentar os parâmetros de imobilização (rendimento e atividade recuperada);
- c) Estudar a estabilidade ao armazenamento da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado por meio da avaliação de diferentes agentes estabilizantes;
- d) Estudar a aplicação da FTase imobilizada em PHB puro e funcionalizado em reatores de leito fixo para a produção contínua de FOS;
- e) Estudar processos de separação e purificação da enzima FTase extracelular para o aumento da carga enzimática durante o processo de imobilização.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Characterization of the Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 3, 2010.
- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rodothorula* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 363-372, 2011.
- ALVARADO-HUALLANCO, M. B.; MAUGERI-FILHO, F. Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 12, p. 1654–1662, 2010.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.
- ANTOSOVÁ, M. *et al.* Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, p. 58-63, 2008.
- ARICA, M.Y.; ALTINTAS, B., BAYRAMOĞLU, G. Immobilization of laccase onto spacerarm attached non-porous poly (GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. **Bioresour Technol**, 2009.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering**. 2. ed. New York: McGraw Hill, 1986. 984 p.
- BARRET, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isothermas. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, p. 373-379, 1951.
- BARBOSA, O. *et al.* Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochem**, v.47, p.1220-1227, 2012.
- BERNER, L.A.; O'DONNELL, J.A. Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods. **International Dairy Journal**, v.8, p.355-362. 1998.
- BERGER, J. *et al.* Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.
- BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Human Press, 1997.

BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v.15, p.170-175, 2004.

BINHAYEEDING, N. *et al.* Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acyglycerol production. **Process Biochemistry**, 2020.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

BOMMARIUS, A.S.; PAYE, M.F. Stabilizing biocatalysts. **Chemical Society Reviews**, v.42, p. 6534-6565, 2013.

BRADY D., JORDAN J. Advances in enzyme immobilization. **Biotechnol Lett**. 2009.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-39, 1938.

CABRERA-PADILLA, Y. R. *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): A new eco-friendly support. **Journal of Industrial Microbiology**, v.39, p.289-298, 2012.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biotacalisadores imobilizados. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 36, n. 36, p.47-57, 2006.

CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 268–282, 1999.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, p. 399-409, 2015.

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.

CHAPLIN, M; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.

CHAUBEY, A.*et al.* *Arthrobacter* sp. lipase immobilization on magnetic sol–gel composite supports for enantioselectivity improvement. **Process Biochem**, v.44, p. 154-160, 2009.

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

COWAN, D.A.; FERNANDEZ-LAFUENTE R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme Microb Technol**, v. 49, p. 326-346, 2011.

- CRUZ, J. *et al.* Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, n. 1, p. 7-14, 2012.
- CUERVO-FERNANDEZ. R. *et al.* Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 75, p. 87-93, 2007.
- CUNHA, J. DE S. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de Frutooligossacarídeos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2017.
- CUNHA, J.S. *et al.* Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n.2, p. 657-668, 2019.
- DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- DAMODARAN, S. Protein: denaturation. In: Hi YH, Sherkat F(eds) **Handbook of food science, technology and engineering**, 1st edn. CRC Press, Boca Raton, pp 1–14, 2005.
- DANTAS, A. **Imobilização e caracterização da lipase NS-401116 em poliestireno.** 2017, 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2017.
- DATTA, S. *et al.* Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v.1, p. 1-9, 2013.
- DEEPAK, V. *et al.* Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6644-6646, 2009.
- DEREWENDA, U. *et al.* Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, p. 1532-1541, 1992.
- DIAS, G. S. **Implementação de reator de leito fixo empacotado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para produção de Frutooligossacarídeos.** 2020. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2020.
- DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 3. ed. Academic Press. New York. p.1116. 1979.
- DRIDI, F. *et al.* Thermolysin entrapped in a gold nanoparticles/polymer composite for direct and sensitive conductometric biosensing of ochratoxin A in olive oil. **Sensors and Actuators B**, v. 221, p. 480–490, 2015.

DWEVEDI, A. **Enzyme Immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment**. Switzerland: Springer International Publishing. p.132. 2016.

ERDEMIR S.; YILMAZ M. Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization. **J Mol Catal B: Enzym**, v. 58, p. 29-35, 2009.

FANG, Y. & H. *et al.* Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors. **BMB reports**, v. 44, p. 87-95, 2011.

FARIA, L. L. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica-gel para produção de Frutooligossacarídeos**. 2019. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2019.

FARIA, L.L. *et al.* Biochemical characterization of extracelular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on sílica gel for the production of fructooligossacarídeos. **Biotechnology letters**, v.43, p.43-59, 2021.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnol Adv**, v.8, p. 1808-1825, 2013.

FERNANDÉZ-LORENTE, G. *et al.* Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme Microb Technol**, v. 41, p. 565-569, 2007.

FERREIRA, M. M. **Avaliação de diferentes estratégias de imobilização, caracterização das propriedades catalíticas e determinação dos parâmetros termodinâmicos para a lipase produzida por *Geotrichum candidum*, visando seu emprego na produção de ácidos graxos concentrados**. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2017.

FERREIRA, M.M. *et al.* Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55-63, 2018.

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

FONSECA, L. C. *et al.* Effects of the solvent composition on the stability of protein in aqueous solutions. **Química Nova**, v. 29, p. 543-548, 2006.

FORTES, R.C. Os frutooligossacarídeos, a inulina e suas implicações na indústria de alimentos. **Nutrição Brasil**, v.4. n.1, p.52-61, 2006.

FLORES-MALTOS, D.A. *et al.* Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 259-267, 2014.

FLORES-MALTOS, D.A. *et al.* Production of a Transfructosylating Enzymatic Activity Associated to Fructooligosaccharides. In: **Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability**. 2019.

GANAIE, 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. 2014.

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

GARCIA, R.L. *et al.* Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Braz. J. Chem. Eng.** 38, 273–285, 2021.

GARCIA-GALAN C. *et al.* Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Adv Synth Catal**, v. 353, p. 2885-2904, 2011.

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

GHAZI, I. *et al.* Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 1, p. 204–211, 2007.

GONÇALVES, M.C.P. **Imobilização de frutossiltransferase microbiana em gel de alginato e sua caracterização para a produção de Frutooligossacarídeos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2019.

GONÇALVES, M.C.P. *et al.* Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, p. 1-10, 2020.

GONSALVES, A. A; ARAÚJO, C. R. M. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, p. 1215-1223, 2011.

GRAY, C.J. *et al.* Enzymatic reactions on immobilised substrates. **Chemical Society Reviews**, v.42, p. 6378-6405, 2013.

GRAND VIEW RESEARCH. **Enzymes market size worth \$17,2 billion by 2027 CAGR 7.1%**. Grand View Research. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-enzymes-market>. Acesso em: 10 de novembro de 2021.

GRIFFIN, H. D. *et al.* A microfibril generating factor from the enzyme complex of *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 296-300, 1984.

GUIDINI, C. Z. *et al.* Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochem Eng J**, v. 52, p. 137-143, 2010.

GUISÁN, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme Microb Technol**, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUISÁN, J. M. Immobilization of enzymes and cells. 3. ed. **Humana Press**, New York, 2013.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chem Soc Ver**, v.38, p.453-468, 2009.

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.

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

HODGSON, R.J. *et al.* Protein-doped monolithic silica columns for capillary liquid chromatography prepared by the sol-gel method: Applications to frontal affinity chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 2780-2790, 2004.

HORN, S. J., M. *et al.* Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*, **Biocatal. Biotransfor**, v. 24, p. 39-53, 2006.

HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in mesoporous silicates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, p. 8582-8594, 2008.

ILLANES A. *et al.* Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresour Technol**, v. 115, p. 48-57, 2012.

IUBMB. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. ExploEnz. Disponível em: <http://www.enzyme-database.org/>. Acesso em julho, 2020.

JAY, J.; LOESSNER, M.; GOLDEN, D. **Modern Food Microbiology**. New York: Springer US, 2005.

JAYALAKSHMI, J.; SADIQ, M.; SIVAKUMAR. Microbial enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose in agricultural harvest. **Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc**, v. 23, p. 84-88, 2021.

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

- JUSZCZAK, L.; FORTUNA, T.; WODNICKA, K. Characteristics of cereal starch granules surface using nitrogen adsorption. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 103-110, 2002.
- KAMIMURA, E. S. *et al.* Immobilization of fructosyltransferase from *Pichia pastoris* in blend of alginate and gelatin. **New Biotechnology**, v. 25, n. September, p. S149, 2009.
- KOURKOUTAS, Y. *et al.* Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p. 377-397, 2004.
- KUMAR, D. *et al.* Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 51-61, 2013.
- 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.
- KRAJEWSKA B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microb Technol**, v. 35, p. 126-139, 2004.
- LYU, X. *et al.* Immobilization of Enzymes by Polymeric Materials. **Catalysts**. 2021,11, 1211.
- MABEL, M.J.; *et al.* Physicochemical characterization of fructooligosaccharides and evaluation of their suitability as a potential sweetener for diabetics. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 56-66, 2008.
- MACARIO A. *et al.* Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous Mesoporous Mat.**, v.118, p. 334-340, 2009.
- MANECKE G. Immobilization of enzymes by various synthetic polymers. **Biotechnol Bioeng Symp**, v. 3, p. 185-187, 1972.
- MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. Wiley, New Jersey. 2003.
- MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb Technol**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.
- MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, 2013.

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

MENDES, A. A. *et al.* Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503–511, 2012.

MENDES A. A. *et al.* Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v. 38, p. 1055-1066, 2011b.

MESQUITA, M. V. N. *et al.* Imobilização enzimática em matrizes poliméricas. **Boletim Informativo Geum**, v. 9, n. 2, p. 38-50, 2018.

MILETIĆ, N. *et al.* Macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. **J Mol Catal B: Enzym**, v. 56, p. 196-201, 2009.

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

MIRANDA, J. S. *et al.* Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 392– 403, 2014.

MOHANTY, A. K. *et al.* Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction. In: Mohanty, A. K.; Misra, M.; Drzal, L. T. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites. **Boca Raton: Taylor & Francis**, 2005.

MURAMATSU, M. *et al.* **Production method of branched fructooligosaccharides.** US Patent: 5,334,516. 2 aug. 1994.

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

NAJADA, A. R. AL. *et al.* Immobilisation of α -amylase on activated amidrazone acrylic: a new approach for the enhancement of enzyme stability and reusability. **Scientific Reports**, v.9, 2019.

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

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

OLIVEIRA, R. L. *et al.* Fructooligosaccharides production by an *Aspergillus aculeatus* commercial enzyme preparation with fructosyltransferase activity covalently immobilized on Fe₃O₄-chitosan-magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 922-929, 2020.

ONDERKOVÁ, Z.; BRYJAK, J.; POLAKOVIČ, M. Properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* immobilized on an acrylic carrier. **Chem. Pap.**, v. 61, p. 359–363, 2007.

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

PASSOS, L.M.N; PARK, Y.K. Fructooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.385-390, 2003.

PEDROCHE, J. *et al.* Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. **Enzyme Microb Technol**, v.40, p.1160-1166, 2007.

PERNA, R. F. *et al.* Effects of Triton X-100 and PEG on the Catalytic Properties and Thermal Stability of Lipase from Free and Immobilized on Glyoxyl-Agarose. **The Open Biochemistry Journal**, v. 11, p. 66 -76, 2017.

PERNA, R. F. *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.

PINTO, G.F; MENEZES, R.R. **Cinetica Enzimática**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2009.

PLATKOVÁ, Z. *et al.* Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, v. 60, n. 6, p. 469–472, 2006.

PUNEKAR, N.S. **Enzymes: Catalysis, kinetics and mechanisms**. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018.

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

RASHID, M. H.; & SIDDIQUI, K. S. Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified βglucosidases from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 109-115, 1998.

- RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**, v.50, n.8, 2005.
- REECE, J. B. *et al.* **Biologia de Campbell**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- REIS P., WITULA T., HOLMBERG K. Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme. **Microporous Mesoporous Mat.**, v. 110, p. 355-362, 2008.
- REIS, W. S. M.; FERREIRA, R. D. M.; PEREIRA, E. B. Immobilisation of comercial lipase onto diferente supports: characterization and application in esterification reaction. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 6, 2020.
- REGULY, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária - UFPEL, 2000.
- REPORTS AND DATA. **Fructooligosaccharides (FOS) market size, share and industry analysis by source (sucrose, inulin), by form (solid, liquid), application (infant formulation, food & beverages, animal feed, dietary supplements, pharmaceuticals) and region, segment forecasts to 2027**. Reports and data. Disponível em: <https://www.reportsanddata.com/report-detail/fructo-oligosaccharides-fos-market>. Acesso em 15 de janeiro de 2021.
- ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. S1, p. S13, 2005.
- ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v.137 (sup 3), p.S 830-S837, 2007.
- ROSEVEAR, A.; Immobilized Biocatalysts: a critical review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 34B, p. 127-150, 1984.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n. 1, p. 01-16, 2006.
- SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 717-723, 1987.
- SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M. J. *et al.* Manufacturing of short-chain Fructooligosaccharides: from laboratory to industrial scale. **Food Engineering Reviews**, v. 12, p. 49-172, 2020.
- SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v.40, p.1085-1088, 2005.
- SANTOS-MORIANO, P. *et al.* Levan versus fructooligosaccharide synthesis using levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.119, p. 18-25, 2015.

SANTOS, A. M. P.; OLIVEIRA, M. G.; MAUGERI, F. Modelling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3142-3148, 2007.

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

SCHÜÜRMAN, J. *et al.* Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes toward industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, 8031-8046, 2014.

SERRA E. *et al.* Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. **Microporous Mesoporous Mat**, v. 114, p. 201-213, 2008.

SHELDON, R.A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advances in Synthesis and Catalysis**, v.349, 1289-1307, 2007.

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

SIDDIQUI, K. S. *et al.* Thermostabilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, v.19, p. 325-330, 1997.

SILVA, J.C. **Seleção de microrganismos produtores de frutossiltransferase e estudo das propriedades bioquímicas da frutossiltransferase de *Penicillium* sp.** 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2009.

SILVA, N. C. A. *et al.* Immobilisation of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavour. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 139-149, 2014.

SILVA, M. B. P. O. *et al.* Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, 24, 2021.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P. Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. **Food Technology and Biotechnology**, v.48, p.435–450, 2010.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Industrial Enzymes. In: **Industrial Biorefineries & White Biotechnology**, p. 473-497, 2015.

- SIVIERI, K. *et al.* Prebiotic effect of fructooligosaccharide in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME® model). **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 8, p. 894–901, 2014.
- SOCOL, C. R.; FRANÇA, L. R.; RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria**. São Paulo: Blucher, 2016.
- SOCRATES, George. **Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts**. 3. ed. Chicester, England: John Wiley & Sons Ltd, 2004.
- SOUZA, P. M. *et al.* Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17-21, 2015.
- SOUZA, L. T. D. A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, v. 4, p. 529-568, 2017.
- SPIEGEL, L.E. *et al.* Safety and benefits so fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, 85-89, 1994.
- TIAN, F.; KARBOUNE, S.; HILL, A. Synthesis of fructooligosaccharides and oligolevans by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system, **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 230-238, 2014.
- 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.
- VEGA, R.; ZÚNIGA-HANSEN, M.E. The effect os processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. **Food chemistry**, v.173, p.784–789, 2015.
- VERMA, R.; KUMAR, A.; KUMAR, S. Synthesis and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of thermostable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* X1. **Process Biochem**, v. 80, p. 72–79, 2019.
- XU, Q. *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, v.50, p. 1237–1246. 2015.
- WANG, T. Synthesis of Neofructooligosaccharides. **Organic Chemistry Insights**, v. 5, p. 1– 6, 2015.
- WEISS, J.N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **FASEB Journal**, v.11, n. 11, p. 835-841, 1997.

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 2. ed. New York: Ellis Horwood, 1985.

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

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

YUN, J.W.; SONG, S. K. Continuous production of fructooligosaccharides using fructosyltransferase immobilized on ion exchange resin. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.1, p. 18-21, 1996.

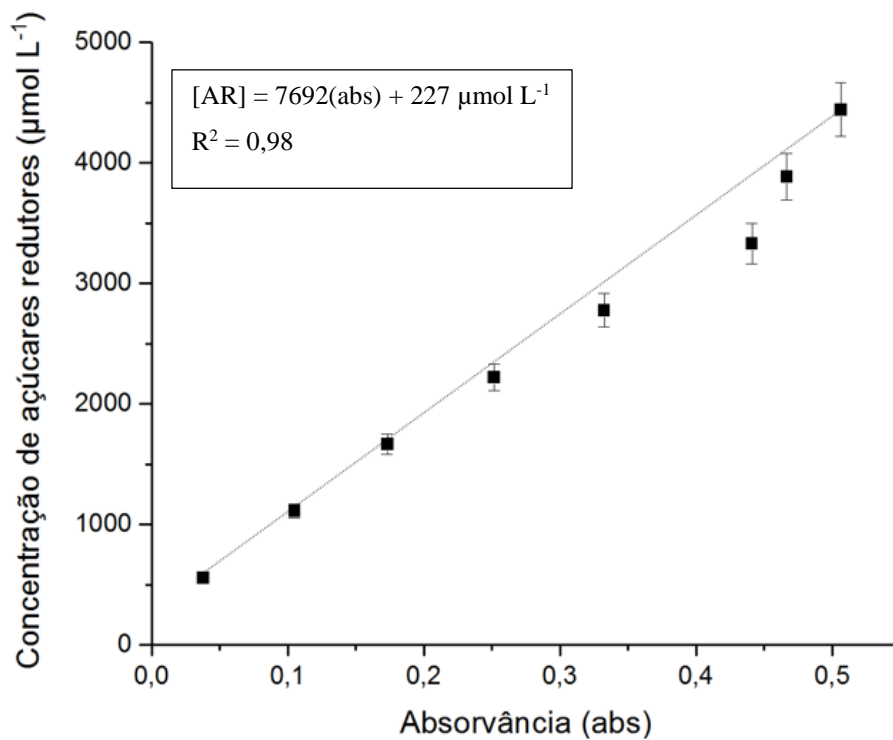
ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Org). **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. 2. ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014, v. 1, p.41-84.

ZHANG, J. *et al.* Enhancing fructooligosaccharides production by genetic improvement of the industrial fungus *Aspergillus niger* ATCC 2061. **Journal of Biotechnology**, v. 249, p. 25-33, 2017.

ZHOU, Z. *et al.* Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous Mesoporous Mat.**, v. 154, p. 133-141, 2012.

APÊNDICE A - Curva de calibração

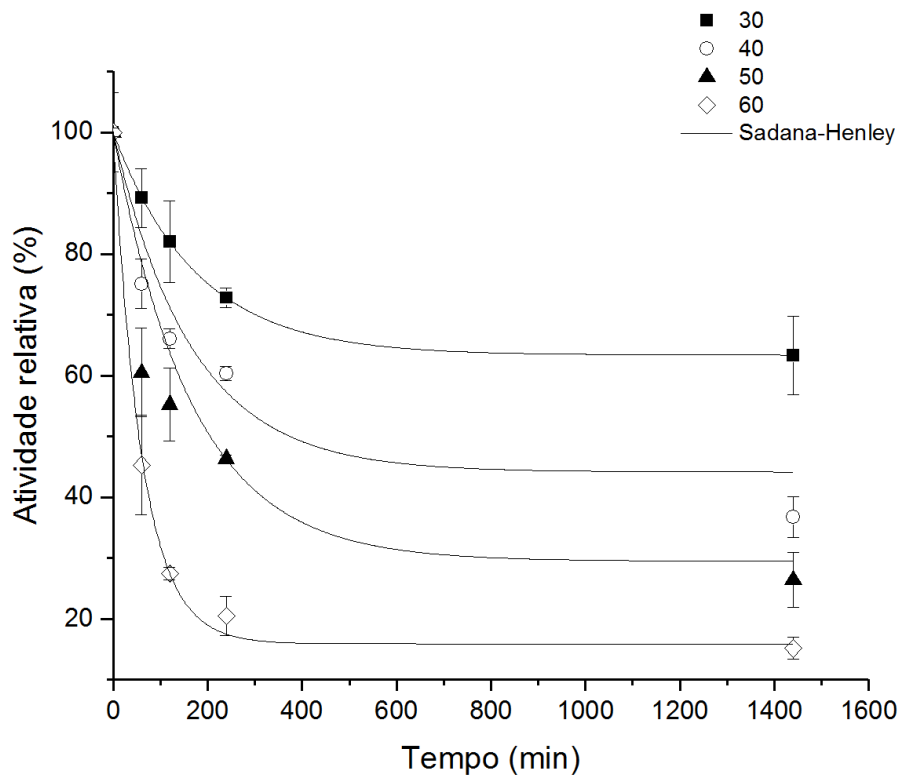
Figura 16 - Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicífico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

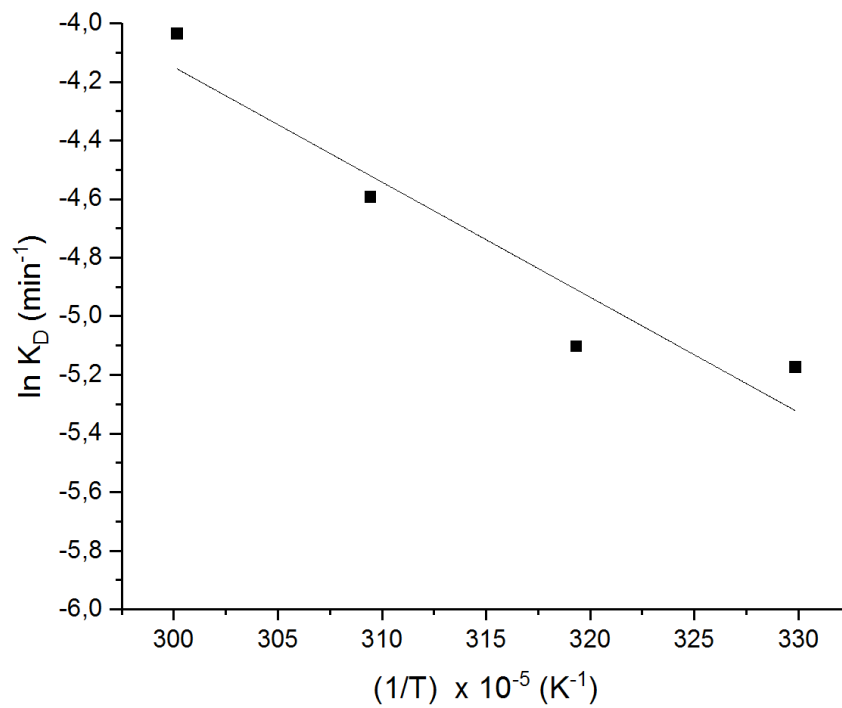
APÊNDICE B – Perfil de estabilidade térmica e determinação da energia de ativação para a desnaturação térmica (E_D) da FTase solúvel

Figura 17 - Perfil de estabilidade térmica da FTase solúvel de *A. oryzae* IPT-301 ao longo de 24 horas de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). A reação enzimática ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 47 % (m v⁻¹) em tampão tris-acetato (pH 5,5) 0,2 mol L⁻¹, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. A atividade máxima de transfrutoseição (13,20 ± 0,85 U mL⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 18 - Determinação da energia de ativação para a desnaturação térmica (E_D). A linearização da Equação de Arrhenius [$\ln(k_D)$ em função da (T^{-1})] foi utilizada para estimar E_D da FTase solúvel de *A. oryzae* IPT-301



Fonte: Elaborado pela autora (2021).