

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ROVILSON JOSÉ DA ROCHA

**IMOBILIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus*
oryzae IPT-301 EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

Poços de Caldas/MG

2021

ROVILSON JOSÉ DA ROCHA

IMOBILIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melina Savioli Lopes
Coorientador: Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales

Poços de Caldas/MG

2021

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

Rocha, Rovilson José da.

Imobilização de frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em bagaço de cana-de-açúcar para a produção de fruto-oligossacarídeos / Rovilson José da Rocha. - Poços de Caldas, MG, 2021.

100 f. : il. -

Orientador(a): Melina Savioli Lopes.

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

Bibliografia.

1. imobilização. 2. *Aspergillus*. 3. frutossiltransferase. 4. bagaço de cana-de-açúcar. 5. fruto-oligossacarídeos. I. Lopes, Melina Savioli, orient. II. Título.

ROVILSON JOSÉ DA ROCHA

**IMOBILIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus oryzae*
IPT-301 EMBAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS**

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

Aprovada em: 17 de dezembro de 2021.

Profa. Dra. Melina Savioli Lopes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

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

Prof. Dr. Rafael Firmani Perna
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por Michelle da Cunha Abreu Xavier, Usuário Externo, em 17/12/2021, às 22:18, 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 Melina Savioli Lopes, Professor do Magistério Superior, em 18/12/2021, às 09:29, 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 Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior, em 22/12/2021, às 10:13, 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 0652590 e o código CRC A285AC7A.

Dedico aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela saúde, pois sem isso nada mais seria possível.

À minha família que sempre esteve ao meu lado e apoiou todas as minhas decisões.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a. Melina Savioli Lopes, por todo apoio, compreensão, participação na análise e discussão de resultados, ensinamentos e principalmente incentivo técnico.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales e ao Prof. Dr. Rafael Firmani Perna pela confiança depositada em mim na execução do projeto concebido por ambos os pesquisadores e também pela participação efetiva no processamento, análise e discussão de resultados, ensinamentos e principalmente incentivo técnico.

Ao Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT/SP, em especial, aos pesquisadores MSc. Elda Sabino da Silva e Alfredo Eduardo Maiorano, pelo fornecimento das cepas microbianas e infraestrutura analítica disponível.

À UNIFAL – MG, que se tornou minha segunda casa, e aos professores do PPGEQ que colaboraram solidamente com meu desenvolvimento profissional e pessoal.

A todos os colaboradores da Instituição que, direta ou indiretamente, participaram deste processo.

A todos os mestrandos do PPGEQ, que mais que colegas de jornada, transformaram-se em amigos que levarei para a vida toda.

Em especial ao Richard Silveira Pereira e à Marina Souza, pela companhia e apoio durante as jornadas extenuantes no laboratório. Ambos foram peças fundamentais para que eu pudesse conciliar as atividades no laboratório com a minha jornada de trabalho externa.

Ao CNPq pelo incentivo financeiro (Processo 421540/2018-4) e também à CAPES (recurso PROAP).

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

“Que ninguém se engane, só consigo a simplicidade através de muito trabalho”

(LISPECTOR, 1995, p. 21)

RESUMO

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são açúcares nutracêuticos de baixa caloria que apresentam excelentes propriedades funcionais e benefícios à saúde e nutrição humana. Industrialmente, os FOS podem ser obtidos pela reação de transfrutossilacção das moléculas de sacarose, catalisada por enzimas microbianas como a frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9). O uso da FTase solúvel implica em baixa estabilidade (térmica, operacional, de armazenamento e frente ao pH), contudo, com a imobilização, é possível aumentar a estabilidade da enzima e possibilitar sua recuperação e reutilização. Neste trabalho foi realizada a caracterização física do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (área específica – BET; volume e distribuição de poros – BJH), a imobilização por adsorção física (35 °C, 175 rpm, pH 5,5 e 8 h) da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 no bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e obtenção dos parâmetros de imobilização (rendimento e atividade recuperada). Em seguida foi realizada a caracterização (FTIR) do derivado enzima-suporte obtido do processo de imobilização e a avaliação das suas propriedades bioquímicas que envolveu: a avaliação da influência da temperatura e pH na atividade de transfrutossilacção – planejamento experimental; a avaliação da influência da concentração de substrato na atividade de transfrutossilacção; os ensaios de estabilidade (térmica, frente ao pH de incubação, operacional e de armazenamento). Através da caracterização física do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi obtida uma área específica de 1,306 m².g⁻¹, uma área específica dos poros de 0,846 m².g⁻¹, tamanho de poros de 20,408 Å e volume específico de poros (entre 17 e 3000 Å) de 0,431×10⁻³ cm³.g⁻¹. O rendimento de imobilização foi de 46,61 ± 3,77 % e a atividade recuperada foi de 11,20 ± 1,85 %. A análise comparativa do derivado enzima-suporte e suporte por FTIR indicou a imobilização enzimática. Os resultados do planejamento de experimentos indicaram que à temperatura de 51,37 °C e pH de 5,49 a atividade enzimática da FTase imobilizada foi máxima. A melhor concentração de sacarose para a reação enzimática foi de 600 g.L⁻¹ e os modelos cinéticos de Michaelis-Menten e de Hill foram ajustados satisfatoriamente aos dados experimentais. Os ensaios de estabilidade frente ao pH de incubação mostraram que a FTase foi estável (atividades relativas superiores a 56 %) na faixa de pH entre 4,5 e 8,5. Os ensaios de estabilidade térmica mostraram que a imobilização aumentou a termoestabilidade da FTase, com um fator de estabilidade máximo de 3,47 à 30 °C, o que representa um ganho de cerca de 9 h no tempo de meia vida da enzima. A análise dos parâmetros termodinâmicos associados também indicou que a termoestabilidade enzimática foi aumentada após a imobilização. Os ensaios de estabilidade operacional mostraram que a enzima pode ser reutilizada por 2 ciclos reacionais consecutivos sem perda de atividade. O derivado enzima-suporte não apresentou perda na atividade enzimática nos 5 primeiros dias de armazenamento (atividades retidas próximas a 100 %), contudo, após 10 e 15 dias de armazenamento foram obtidas atividades de transfrutossilacção equivalentes a 87 % e 74 % da atividade inicial, respectivamente. Após 30 dias de armazenamento, o derivado enzima-suporte reteve apenas 17 % da atividade enzimática inicial. Concluiu-se que a imobilização da FTase no bagaço de cana-de-açúcar foi satisfatória, mediante obtenção de um biocatalisador estável e ativo, o que justifica a futura implementação em diferentes configurações de reatores.

Palavras-chave: imobilização; *Aspergillus*; frutossiltransferase; bagaço de cana-de-açúcar; fruto-oligossacarídeos.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are low-calorie nutraceutical sugars that have excellent functional properties and benefits for human health and nutrition. Industrially, FOS can be obtained by the transfructosylation reaction of sucrose molecules, catalyzed by microbial enzymes such as fructosyltransferase (FTase, EC 2.4.1.9). The use of soluble FTase implies low stability (thermal, operational, storage and pH), however, with immobilization, it is possible to increase the stability of the enzyme and enable its recovery and reuse. In this work, the physical characterization of in natura sugarcane bagasse was carried out (specific area - BET; pore volume and distribution - BJH), immobilization by physical adsorption (35 °C, 175 rpm, pH 5.5 and 8 h) extracellular FTase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in in natura sugarcane bagasse and obtaining immobilization parameters (yield and recovered activity). Then, the characterization (FTIR) of the enzyme-support derivative obtained from the immobilization process and the evaluation of its biochemical properties was carried out, which involved: the evaluation of the influence of temperature and pH on the transfructosylation activity – experimental design; evaluation of the influence of substrate concentration on transfructosylation activity; stability tests (thermal, compared to incubation, operational and storage pH). Through the physical characterization of in natura sugarcane bagasse, a specific area of 1.306 m².g⁻¹, a specific pore area of 0.846 m².g⁻¹, a pore size of 20.408 Å and a specific volume of pores (between 17 and 3000 Å) of 0.431×10⁻³ cm³.g⁻¹. The immobilization yield was 46.61 ± 3.77 % and the recovered activity was 11.20 ± 1.85 %. Comparative analysis of enzyme-support and support derivatives by FTIR indicated enzymatic immobilization. The results of the design of experiments indicated that at a temperature of 51.37 °C and pH of 5.49, the enzymatic activity of immobilized FTase was maximum. The best sucrose concentration for the enzymatic reaction was 600 g.L⁻¹ and the Michaelis-Menten and Hill kinetic models were satisfactorily fitted to the experimental data. The stability tests against the incubation pH showed that FTase was stable (relative activities above 56 %) in the pH range between 4.5 and 8.5. The thermal stability tests showed that immobilization increased the thermostability of FTase, with a maximum stability factor of 3.47 at 30 °C, which represents a gain of about 9 h in the half-life of the enzyme. The analysis of associated thermodynamic parameters also indicated that enzymatic thermostability was increased after immobilization. Operational stability assays showed that the enzyme can be reused for 2 consecutive reaction cycles without loss of activity. The enzyme-support derivative showed no loss of enzymatic activity in the first 5 days of storage (retained activities close to 100 %), however, after 10 and 15 days of storage, transfructosylation activities equivalent to 87 % and 74 % of the initial activity were obtained, respectively. After 30 days of storage, the enzyme-support derivative retained only 17 % of the initial enzyme activity. It was concluded that the immobilization of FTase in sugarcane bagasse was satisfactory, by obtaining a stable and active biocatalyst, which justifies the future implementation in different reactor configurations.

Keywords: immobilization; *Aspergillus*; fructosyltransferase; sugarcane bagasse; fructooligosaccharides.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Reação de transfrutoseilação da sacarose pela FTase.....26
- Figura 2 – Representação das estratégias de imobilização enzimática33
- Figura 3 – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e do derivado enzima-suporte. Amostra A (derivado enzima-suporte) e Amostra B (suporte *in natura*)....52
- Figura 4 – Perfil cinético de adsorção da FTase extracelular em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Condições experimentais: 40:1 caldo de cultura/g de suporte; pH: 5,5; temperatura: 35 °C; velocidade de agitação: 175 rpm; tamanho de partícula: 425 – 600 µm. A máxima atividade enzimática ($12,52 \pm 2,02 \text{ U.mL}^{-1}$) foi definida como 100 % da atividade relativa.....55
- Figura 5 – Gráfico de Pareto para os fatores pH e temperatura do meio reacional na atividade enzimática da FTase imobilizada59
- Figura 6 – Superfície de resposta da atividade enzimática da FTase imobilizada para os fatores temperatura e pH.....62
- Figura 7 – Curvas de contorno da atividade enzimática da FTase imobilizada para os fatores temperatura e pH.....63
- Figura 8 – Influência da concentração de sacarose na atividade de transfrutoseilação da FTase imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Condições experimentais: concentração de substrato: 470 g L^{-1} ; temperatura: 50 °C; velocidade de agitação: 175 rpm; pH: 5,5. A máxima atividade enzimática ($5,86 \pm 0,64 \text{ U.g}^{-1}$) foi definida como 100 % da atividade relativa.....64
- Figura 9 – Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten para a FTase imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*66
- Figura 10 – Ajuste do modelo cinético de Hill para a FTase imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*66
- Figura 11 – Estabilidade enzimática da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* 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 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. A atividade máxima de transfrutoseilação do derivado enzima-suporte ($6,07 \pm 0,28 \text{ U.g}^{-1}$) foi definida como 100 % da

atividade relativa	69
Figura 12 – Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular solúvel de <i>A. oryzae</i> IPT-301 ao decorrer 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 transfrutossilação (9,29 ± 0,99 U.mL ⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa	72
Figura 13 – Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar in natura ao decorrer 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 transfrutossilação (5,74 ± 0,02 U.g ⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa.....	73
Figura 14 – Ajuste do modelo de Arrhenius para obtenção dos parâmetros termodinâmicos da FTase solúvel	76
Figura 15 – Ajuste do modelo de Arrhenius para obtenção dos parâmetros termodinâmicos da FTase imobilizada no bagaço de cana-de-açúcar in natura	76
Figura 16 – Estabilidade operacional da FTase de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar in natura 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. A atividade máxima de transfrutossilação (7,33 ± 0,74 U g ⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa.....	81
Figura 17 – Estabilidade de armazenamento da FTase de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar in natura. 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. A atividade máxima de transfrutossilação para o derivado enzima-suporte (4,62 ± 0,51 U g ⁻¹) foi	

definida como 100 % da atividade relativa	83
Figura 18 – Curva de calibração para o método DNS	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas com relação à reação química catalisada.....	23
Tabela 2 – Microrganismos potencialmente produtores de FTase EC 2.4.1.9.....	24
Tabela 3 – Principais substratos e produtos das reações enzimáticas promovidas pelas FTases.....	25
Tabela 4 – Principais considerações para a seleção do suporte e técnica de imobilização de enzimas	35
Tabela 5 – Principais estudos de imobilização de FTase extracelular de <i>A. oryzae</i> IPT-301	38
Tabela 6 – Matriz do planejamento de experimentos DCCR 2 ²	42
Tabela 7 – Caracterização das partículas do bagaço de cana-de-açúcar pelos métodos BET e BJH.....	50
Tabela 8 – Parâmetros de imobilização.....	56
Tabela 9 – Matriz do planejamento experimental e respostas.....	58
Tabela 10 – Efeitos, erro padrão e p-valor dos efeitos na atividade enzimática da FTase imobilizada (modelo completo).....	59
Tabela 11 – Análise de variância dos fatores na atividade enzimática da FTase imobilizada	60
Tabela 12 – Efeitos, erro padrão e p-valor dos efeitos na atividade enzimática da FTase imobilizada (modelo reparametrizado)	61
Tabela 13 – Parâmetros cinéticos estimados	67
Tabela 14 – Parâmetros do modelo de Sadana e Henley ajustados para a FTase solúvel (S) e imobilizada (I).....	74
Tabela 15 – Parâmetros termodinâmicos para a FTase solúvel (S) e imobilizada (I)	77
Tabela 16 – Obtenção do fator do método GOD-PAP® (f) para o cálculo da concentração de glicose.....	100

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS)	20
3.2	ENZIMAS.....	22
3.2.1	Frutotransferase (FTase EC 2.4.1.9).....	24
3.2.2	Reação de transfrutoseilação da sacarose	25
3.3	CINÉTICA ENZIMÁTICA	27
3.3.1	Principais fatores que influenciam na cinética enzimática.....	29
3.3.1.1	Temperatura	29
3.3.1.2	Potencial hidrogeniônico (pH).....	30
3.3.1.3	Concentração de substrato	31
3.4	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	31
3.4.1	Adsorção física	33
3.5	SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO.....	34
3.5.1	Bagaço de cana-de-açúcar	36
3.6	ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO DA FTASE EXTRACELULAR DE <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i> IPT-301 EM DIFERENTES SUPORTES.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO E DO DERIVADO ENZIMA-SUPORTE (BET, BJH, FTIR)	39
4.2	CULTIVO CELULAR SUBMERSO.....	39
4.3	IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR MICROBIANA.....	40
4.3.1	Ensaio de imobilização	40
4.3.2	Parâmetros de imobilização enzimática	41
4.3.2.1	Rendimento de Imobilização (RI)	41
4.3.2.2	Atividade Recuperada (AR)	41
4.3.2.3	Fator de estabilidade (FE).....	42
4.4	ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS	

DO DERIVADO ENZIMA-SUORTE	42
4.4.1 Influência do pH e da temperatura do meio reacional na atividade enzimática	42
4.4.2 Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos	43
4.5 ENSAIOS DE ESTABILIDADE DO DERIVADO ENZIMA-SUORTE.....	43
4.5.1 ENSAIOS DE ESTABILIDADE FRENTE AO PH DE INCUBAÇÃO	44
4.5.2 Ensaio de estabilidade térmica da FTase imobilizada.....	44
4.5.3 Ensaio de estabilidade operacional da FTase imobilizada	46
4.5.4 Ensaio de estabilidade de armazenamento da FTase imobilizada	46
4.6 ENSAIOS ANALÍTICOS.....	46
4.6.1 Determinação da atividade enzimática	46
4.6.2 Determinação da concentração de açúcares redutores	47
4.6.3 Determinação da concentração de glicose	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO E DO DERIVADO ENZIMA-SUORTE	50
5.1.1 Análise de área específica do suporte (BET)	50
5.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).51	51
5.2 PERFIL CINÉTICO DE IMOBILIZAÇÃO DA FTASE EXTRACELULAR EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	54
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	58
5.3.1 Influência do pH e temperatura do meio reacional na atividade da FTase imobilizada	58
5.3.2 Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos da FTase imobilizada.....	64
5.4 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA.....	68
5.4.1 Estabilidade frente ao pH de incubação da FTase extracelular imobilizada	68
5.4.2 Estabilidade térmica da FTase extracelular imobilizada	71
5.4.3 Estabilidade operacional e avaliação do reuso da FTase imobilizada...80	80
5.4.4 Estabilidade de armazenamento da FTase imobilizada	83

6	CONCLUSÕES.....	85
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO DNS	99
	APÊNDICE B – METODOLOGIA DE CÁLCULO DO FATOR (F) GOD-PAP®.	
	100

1 INTRODUÇÃO

Pautas como o aumento na qualidade de vida e saúde nutricional da população têm ganhado destaque no cenário atual e, por conta disso, os cuidados relacionados aos alimentos que são ingeridos têm aumentado cada vez mais (CUNHA *et al.*, 2019). A busca por substituintes à sacarose, enquanto adoçante, é um exemplo prático desta tendência (CHOUKADE; KANGO, 2021). Desde a década de 1980, um número expressivo de adoçantes alternativos à sacarose têm sido disponibilizados à população e neste nicho de mercado os fruto-oligossacarídeos (FOS) recebem destaque desde seu surgimento (CHOUKADE; KANGO, 2021; CUNHA *et al.*, 2019). Este destaque é evidenciado pelo aumento crescente de pesquisas sobre a produção de FOS e alto número de patentes registradas na última década (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2020), assim como a tendência do mercado mundial de FOS, a qual prevê um crescimento expressivo a uma taxa prevista de 10,4 % ao ano entre os anos de 2021 e 2027, com estimativa de se alcançar U\$\$ 3,88 bilhões em 2027 (REPORTS AND DATA, 2020).

FOS são oligômeros de frutose que apresentam excelentes propriedades funcionais que surgem pelo fato de estas substâncias não serem hidrolisadas pelas enzimas presentes no sistema digestivo humano, atingindo o trato intestinal sem alterações em sua identidade química e servindo como substrato para o crescimento da flora bacteriana benéfica (CATENZA; DONKOR, 2021; CEZAR *et al.*, 2017). Existem numerosos efeitos benéficos à saúde e nutrição humana associados à sua ingestão, tais como: são edulcorantes com baixo valor calórico que podem ser consumidos seguramente por portadores de diabetes, não são cariogênicos, promovem o aumento seletivo das bifidobactérias no cólon (DOMINGUEZ *et al.*, 2014) prevenindo o câncer de cólon (GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014) e também são capazes de aumentar a absorção de minerais pelo organismo (FLORES-MALTOS *et al.*, 2019).

A nível comercial, os FOS são comumente obtidos por meio de processos enzimáticos, por reação de transfrutossilacção das moléculas de sacarose (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; MAIORANO *et al.*, 2020; MORENO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2021). Neste âmbito, estes processos merecem destaque por conta da eficiência na obtenção do produto final (KUMAR; DUBEY, 2019).

As frutossiltransferases (FTases, EC 2.4.1.9) são enzimas que catalisam a transferência de grupos frutossil na molécula de sacarose, via ligações glicosídicas β -2,1, por meio de reações de transfrutossilção, formando novos oligossacarídeos como a kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose, que constituem os FOS (IUBMB, 2020; MAIORANO *et al.*, 2008). Estas enzimas podem ser obtidas a partir de fungos, por fermentação submersa ou em estado sólido, sendo excretadas como uma biomolécula extracelular ou estar aderida interna ou externamente nas células microbianas como uma enzima micelial (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; IUBMB, 2020). A motivação para a utilização da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 está relacionada aos estudos de Cuervo Fernandez *et al.* (2007) e Cuervo Fernández *et al.* (2004), que avaliaram 17 cepas microbianas e comprovaram que o *Aspergillus oryzae* IPT-301 é uma fonte potencial produtora de FTases com altas atividades de transfrutossilção.

Em bioprocessos, é possível utilizar tanto a enzima em sua forma solúvel quanto imobilizada (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2020), contudo a aplicação da enzima imobilizada proporciona vantagens operacionais, aumentando a sua estabilidade frente ao pH, temperatura, presença de agentes que provocam desnaturação enzimática e possibilita a recuperação e reutilização do biocatalisador (CANILHA; CARVALHO, 2006; SOUZA *et al.*, 2017). Uma das técnicas de imobilização mais simples e com menor custo conhecidas é a imobilização por adsorção, que ocorre mediante ligação entre a enzima e o suporte sólido, devido à interações iônicas, adsorção física, ligação hidrofóbica, forças de atração de van der Waals ou mesmo uma combinação dessas interações (BRÍGIDA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2017).

O Brasil é atualmente um dos maiores produtores mundiais de sacarose (substrato na produção de FOS), detendo mais de 20 % da produção mundial e o grande volume de cana-de-açúcar processado no país (equivalente a cerca de 640 mil toneladas no ano de 2020) traz consigo um enorme volume de resíduo inerente, o bagaço (suporte para imobilização da FTase). Cada tonelada de matéria prima processada pela indústria sucroalcooleira gera em torno de 320 kg de bagaço (UNICA, 2020). O bagaço de cana-de-açúcar é um potencial material de suporte que apresenta algumas vantagens quando comparado aos suportes inorgânicos, como o baixo custo e a biodegradabilidade (QUEIROZ *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2017). Este material apresenta características hidrofóbicas, e sua composição consiste em celulose,

hemicelulose e lignina, o que o torna um material atrativo para imobilização enzimática, por conta da vasta possibilidade de pontos reativos (BRÍGIDA *et al.*, 2008; ROCHA; ALMEIDA; DA CRUZ, 2017).

A ampla disponibilidade de matéria prima para a produção de FOS, a possibilidade de se utilizar o principal resíduo da indústria sucroalcooleira como suporte para a imobilização de enzimas e a tendência de crescimento do mercado mundial de biocatalisadores industriais, em que se espera atingir US\$ 19 bilhões até o ano de 2025 (REPORTS AND DATA, 2020) acentuam a relevância do tema de pesquisa estudado. Apesar de existirem diversos estudos na literatura utilizando bagaço de cana-de-açúcar como suporte para imobilização de enzimas, não foram encontrados relatos de trabalhos envolvendo a imobilização de FTases microbianas em bagaço de cana-de-açúcar, o que incentiva a exploração do tema e obtenção de resultados inéditos. Neste contexto, este trabalho visou a obtenção um biocatalisador heterogêneo ativo e estável para a produção de FOS a partir da imobilização da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 em bagaço de cana-de-açúcar.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Imobilizar, por adsorção física, a enzima frutossiltransferase (FTase) extracelular de *A. oryzae* IPT-301 em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, visando obter um biocatalisador heterogêneo ativo e estável para a produção de fruto-oligossacarídeos (FOS).

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o material de suporte, bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, utilizado para a imobilização da FTase por meio de: área específica – BET; tamanho e volume de poros – BJH; espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier – FTIR.
- b) Imobilizar, por adsorção física, a enzima FTase extracelular produzida por cultivo celular submerso, em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*;
- c) Determinar os perfis cinéticos de imobilização enzimática visando obter um derivado enzima-suporte com elevada atividade de transfrutossilação;
- d) Determinar os parâmetros de imobilização: rendimento e atividade recuperada para a enzima adsorvida em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*;
- e) Otimizar a temperatura e o pH do meio reacional para o biocatalisador heterogêneo (complexo enzima-suporte), por meio de um Planejamento de Experimentos do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).
- f) Avaliar a influência da concentração de substrato no meio reacional na atividade de transfrutossilação e obter os parâmetros cinéticos da enzima com base em modelos reportados na literatura.
- g) Avaliar as estabilidades térmica, frente ao pH de incubação e de armazenamento da FTase imobilizada e obter os parâmetros termodinâmicos associados;
- h) Controlar o desempenho do biocatalisador imobilizado em ciclos de bateladas consecutivas para a avaliação da sua estabilidade operacional.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

FOS são considerados oligossacarídeos de ocorrência natural cuja principal origem é a vegetal, podendo ser encontrados em plantas como aspargos, beterraba, cebolas, alcachofras, trigo de centeio, mel, dentre outras fontes (MUSSATTO; MANCILHA, 2007; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005). É consenso que “fruto-oligossacarídeos” ou “FOS” é uma nomenclatura designada apenas aos oligômeros de frutose que são compostos principalmente de 1-kestose (GF₂)¹, nistose (GF₃) e 1^F-frutofuranosilnistose (GF₄), nos quais as unidades de frutose (F) estão ligadas na posição β-(2→1) da molécula de sacarose e é essa a peculiaridade que os distingue dos demais oligossacarídeos (GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014; HARTEMINK; VAN LAERE; ROMBOUTS, 1997; KUMAR; DUBEY, 2019; YAMASHITA; KAWAI; ITAKURA, 1984; YUN, 1996).

Os FOS podem ser classificados em dois grandes grupos, de acordo com o seu processo de obtenção. O primeiro é resultado da hidrólise enzimática da inulina que produz unidades lineares de frutose com grau de polimerização que pode variar de 2 a 6 e o segundo é obtido através da transfrutoseilação enzimática da sacarose, que origina oligossacarídeos lineares e ramificados com grau de polimerização que pode variar de 2 a 4 unidades de frutose e que possuem em sua composição resíduos de glicose (HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988). A Meiji Seika Corporation foi a primeira empresa bem sucedida na produção comercial de FOS, no ano de 1984, utilizando *Aspergillus niger* como fonte para a obtenção do enzima utilizada no bioprocessamento (YUN, 1996).

Na maioria dos países, os FOS são considerados ingredientes e não aditivos alimentares. São também considerados fibras dietéticas e, nos Estados Unidos, possuem o status GRAS (Generally Recognized as Safe) (PASSOS; PARK, 2003). Na região da Ásia-Pacífico os FOS são um dos alimentos funcionais mais popularizados, sendo este também o maior mercado comercial deste produto (REPORTS AND DATA, 2020). Estima-se que ainda na década de 1990, pouco após

¹ G: Glicose; F(n): número (n) de unidades de frutose (F).

a sua disponibilidade comercial, mais de 400 toneladas de FOS tenham sido comercializadas nesta região (PASSOS; PARK, 2003; YUN, 1996).

É previsto que o mercado global de FOS atinja US\$ 3,88 bilhões até o ano de 2027. As propriedades funcionais e os benefícios à saúde promovidos pelos FOS resultam em uma aceitação ampla na aplicação em formulações infantis e suplementos dietéticos, impulsionando o crescimento da indústria. Atualmente a Europa é vista como líder no setor, apoiando a expansão do mercado e da indústria nesta região. Este domínio é atribuído, principalmente, ao alto índice de obesidade, ao aumento do número de pacientes diabéticos e à presença de grande número de fabricantes de fórmulas infantis no continente europeu, o que está apoiando a expansão do mercado nesta região (REPORTS AND DATA, 2020).

Existem vários estudos que comprovam os efeitos benéficos à saúde e nutrição humana associados à ingestão de FOS (PASSOS; PARK, 2003), dentre os principais destacam-se: a aplicação como adoçantes de baixa caloria na substituição da sacarose para portadores de diabetes ou indivíduos em condições de obesidade; a prevenção de cáries dentárias; a redução nos níveis de colesterol total e de lipídeos; o aumento na absorção de cálcio e magnésio pelo organismo (ALMÉCIGA-DÍAZ *et al.*, 2011); a redução da pressão arterial em portadores de hipertensão; a redução da absorção de carboidratos e lipídeos; a melhoria do metabolismo de diabéticos (CAETANO *et al.*, 2016; YAMASHITA; KAWAI; ITAKURA, 1984); o aumento da digestão e metabolização da lactose; o aumento da síntese de vitaminas (principalmente as do complexo B); a diminuição do crescimento de bactérias nocivas e toxinas; a redução do potencial de patologias como doenças autoimunes, câncer, acne, cirrose hepática, constipação, intoxicação alimentar, diarreia associada à utilização antibióticos, problemas digestivos, alergias e intolerâncias a alimentos e gases intestinais (CAETANO *et al.*, 2016; YUN, 1996), dentre outros.

As moléculas de FOS são resistentes a ponto de escapar da digestão enzimática gastrointestinal, atingindo o cólon com sua identidade química preservada. Por este motivo, a ingestão de FOS provoca um efeito bifidogênico ao estimular seletivamente a proliferação de bifidobactérias, um grupo de bactérias benéficas naturalmente encontradas no cólon, através da fermentação microbiana das moléculas de FOS (CAETANO *et al.*, 2016) e também ao prevenir o câncer de cólon (GANAI; LATEEF; GUPTA, 2014). O produto final da fermentação microbiana intestinal das moléculas de FOS são os ácidos graxos de cadeia curta, que também

podem favorecer o crescimento de bactérias benéficas à saúde humana, como *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, ao mesmo tempo que reduz ou evita a proliferação de populações microbianas patogênicas, como *Clostridium spp.* e *Escherichia coli*, por exemplo (CAETANO *et al.*, 2016).

Apesar de todos estes benefícios, é importante atentar-se à quantidade consumida. A ingestão em doses equivalentes a 20-30 g por dia pode desencadear o início de um desconforto intestinal severo (PASSOS; PARK, 2003).

3.2 ENZIMAS

Enzimas são proteínas capazes de catalisar os processos químicos mais complexos sob condições experimentais e reacionais mais brandas, atuando em substratos específicos e apresentando condições específicas de temperatura e pH para serem ativas, sendo também conhecidas como biocatalisadores (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; GUIBAN *et al.*, 2006; SHULER; KARGI, 2002).

De maneira geral, as enzimas apresentam alta especificidade, versatilidade, eficácia e promovem altas taxas de reação quando comparadas com as reações na presença de catalisadores químicos em condições mais brandas, atuando na redução da energia de ativação da reação catalisada pela ligação do substrato e formando um complexo enzima-substrato (SHULER; KARGI, 2002).

.Por serem biodegradáveis e atóxicas, as enzimas podem ser consideradas excelentes catalisadores para uma indústria química mais sustentável (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; GUIBAN *et al.*, 2006).

As enzimas podem ser classificadas quanto à sua origem (intracelulares ou extracelulares), quanto ao modo de ação (endoenzimas ou exoenzimas), e também quanto à reação química catalisada. O último critério de classificação apresentado é o que mais traz informações acerca do biocatalisador (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Com relação à “reação química catalisada”, as enzimas podem ser classificadas como segue na Tabela 1 (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; IUBMB, 2020). A Comissão de Enzimas (E. C.) da União Internacional de Biologia Molecular (IUBMB) estabeleceu em 1961 as normas de classificação e nomenclatura de enzimas.

Tabela 1 – Classificação das enzimas com relação à reação química catalisada

Classe	Nomenclatura IUBMB	MECANISMO DE AÇÃO
Oxirredutases	EC 1	Oxidação ou redução do substrato pela transferência de hidrogênio ou elétrons ou pelo uso de grupos aceptores.
Transferases	EC 2	Remoção ou transferência de grupos de substratos para moléculas aceptoras.
Hidrolases	EC 3	A água participa da clivagem de ligações covalentes do substrato.
Liasas	EC 4	Remoção de grupos dos seus substratos formando duplas ligações ou conversão de grupos adicionados às duplas ligações.
Isomerases	EC 5	Promoção da isomerização do substrato.
Ligases	EC 6	Catálise da ligação covalente em duas moléculas em conjunto com a quebra de uma ligação altamente energética (ligação pirofosfato do ATP, por exemplo).
Translocases ^(*)	EC 7	Catálise do movimento de íons ou moléculas através de membranas ou sua separação dentro das membranas.

Fonte: do autor, baseado em (IUBMB, 2020).

(*) Nova classificação introduzida pela IUBMB em 2018.

Em se tratando da produção de FOS, as enzimas podem ser tanto de origem vegetal quanto de origem fúngica, contudo, o rendimento na produção utilizando enzimas originadas de plantas é relativamente baixo e a produção em massa da enzima é limitada pelo fator sazonalidade. Este é o principal motivo pelo qual a produção industrial de FOS depende principalmente de enzimas originadas de fungos (YUN, 1996).

A frutossiltransferase (FTase EC 2.4.1.9) e a β -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26) são duas enzimas de origem microbiana conhecidas por catalisar a produção de FOS a partir da sacarose. A FTase possui apenas atividade de transfrutossilção, e FFase catalisa as reações hidrolítica e de transfrutossilção (GANAIE; GUPTA; KANGO, 2013).

3.2.1 Frutosiltransferase (FTase EC 2.4.1.9)

A frutosiltransferase é uma enzima pertencente ao grupo das transferases (BRENDA, 2020; IUBMB, 2020; KEGG, 2020). Uma série de microrganismos reportados como potenciais produtores de FTase constam na Tabela 2.

Tabela 2 – Microrganismos potencialmente produtores de FTase EC 2.4.1.9

Microrganismos	
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533
<i>Aspergillus japonicus</i> FCL 119T	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Aspergillus japonicus</i> JN19	<i>Lactobacillus reuteri</i> 121
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.106
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Aspergillus oryzae</i> CRF 202	<i>Leuconostoc citreum</i> CW2
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Leuconostoc citreum</i> CW28
<i>Aureobasidium pullulans</i> CFR77	<i>Paenibacillus macerans</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i> KCCM12017	<i>Paenibacillus macerans</i> EG-6
<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Paenibacillus macerans</i> EG-7
<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Penicillium citrinum</i> FERM P-15944
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20604	<i>Talaromyces purpureogenus</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Thermothelomyces heterothallicus</i>

Fonte: adaptado de BRENDA (2020).

Perna *et al.* (2018) relataram que, apesar de várias publicações na literatura apresentarem dados sobre a produção de FTases e suas fontes microbianas, há escassez de trabalhos sobre sua produção em escala piloto. O artigo publicado objetivou a produção de frutosiltransferase por *Aspergillus oryzae* IPT-301 (fungo previamente testado para produção de FTase no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT-SP)), via fermentação submersa em reator em batelada com meio de crescimento contendo sacarose como principal fonte de carbono.

Maiorano *et al.* (2020) concentraram esforços na avaliação dos efeitos de diferentes velocidades de agitação e taxas de aeração no rendimento da produção de frutosiltransferase por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em um biorreator de tanque agitado objetivando a maximização da produção enzimática.

A FTase é capaz de transferir unidades de frutosil da sacarose para uma série de compostos de frutosil que funcionam como cosubstratos nas reações subsequentes. Com isso, novos oligossacarídeos compostos por unidades de glicose e frutose são sintetizados (IUBMB, 2020; PAZUR, 1952).

Os principais substratos e produtos de reações catalisadas pela FTase EC 2.4.1.9 podem ser observados abaixo, na Tabela 3:

Tabela 3 – Principais substratos e produtos das reações enzimáticas promovidas pelas FTases

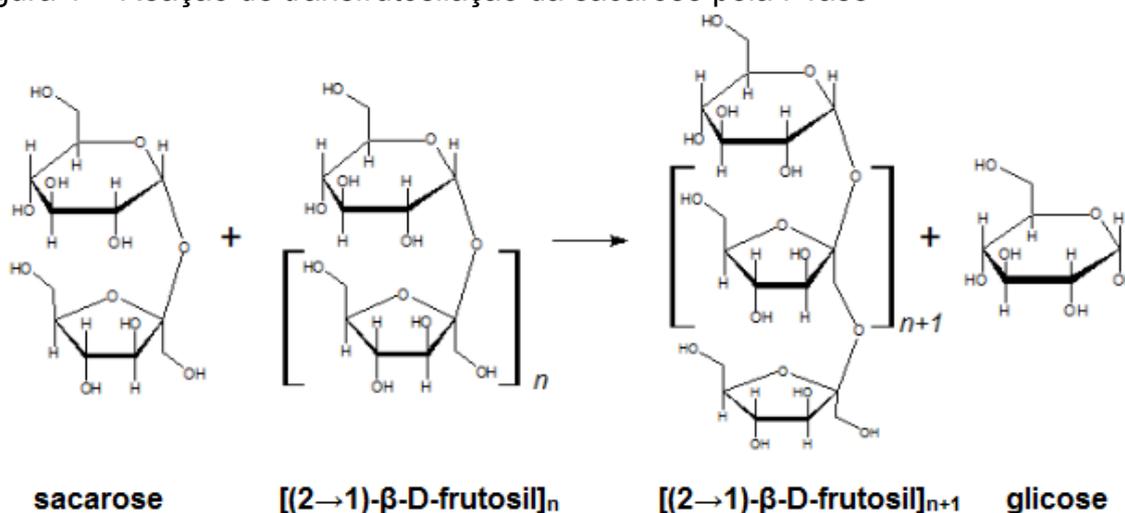
Principais Substratos	Principais Produtos
3 sacarose + sacarose	3 alfa-D-glicose + (2→1-β-D-frutossil) _{n+1}
rafinose + [(2→1)-β-D-frutossil] _n	glicose + [(2→1)-β-D-frutossil] _{n+1}
sacarose + (2,1-β-D-frutossil) _n	α-D-glicose + [(2→1)-β-D-frutossil] _{n+1}
sacarose + (2,1-β-D-frutossil) _n	D-glicose + [(2→1)-β-D-frutossil] _{n+1}
sacarose + H ₂ O	α-D-glicose + β-D-frutose
sacarose + H ₂ O	D-frutose + D-glicose
sacarose + rafinose	glicose + 1-kestose
sacarose + sacarose	cestose + nistose + FOS
sacarose + sacarose	[(β-D-frutose-(2→1)) _n]-α-D-glicose + α-D-glicose
sacarose + sacarose	[(β-D-Fruf-(2→1)) ₅]-α-D-Glup + α-D-glicose
sacarose + [(2→1)-β-D-frutossil] _n	glicose + [(2→1)-β-D-frutossil] _{n+1}
sacarose + [(β-D-Fruf-(2→1)) _n]-α-D-Glup	alfa-D-glicose + [(β-D-Fruf-(2→1)) _{n+1}]-α-D-Glup

Fonte: adaptado de BRENDA (2020).

3.2.2 Reação de transfrutosilação da sacarose

A reação de transfrutosilação da sacarose está esquematizada na Figura 1. Nesta reação ocorre a clivagem da ligação β-(2→1), que conecta o grupo glicosil ao grupo frutossil, catalisada pela FTase. A enzima atua transferindo o grupo frutossil para uma molécula aceptora, levando à formação de FOS e à liberação de glicose. As moléculas aceptoras podem ser a sacarose ou outras moléculas de FOS (ANTOŠOVÁ *et al.*, 2008; GANAIE; GUPTA; KANGO, 2013; PAZUR, 1952; YUN, 1996).

Figura 1 – Reação de transfrutoseilação da sacarose pela FTase



Fonte: Cunha (2017, p. 25).

Definições distintas para a atividade de transfrutoseilação são encontradas na literatura. Cuervo Fernandez *et al.* (2007) e Ottoni *et al.* (2012) definiram a atividade de transfrutoseilação como a quantidade de enzima que produz um micromol de FOS por minuto nas condições experimentais adotadas. Ganaie, Lateef e Gupta (2014) a definiram como a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de glicose por minuto. Estudos de Chen e Liu (1996), Hayashi *et al.* (1990), Kurakake, Onoue e Komaki (1996) e Vega, Zúniga-Hansen (2011) sugerem que a atividade de transfrutoseilação seja definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de glicose por minuto. Cunha *et al.* (2019), Gonçalves *et al.* (2020) e Faria *et al.* (2021), em consonância com os trabalhos de Cuervo Fernandez *et al.* (2007) e Ottoni *et al.* (2012), utilizaram a definição para a atividade de transfrutoseilação como a quantidade de enzima que produz um micromol de frutose transfrutoseilada por minuto nas condições experimentais adotadas.

A atividade de transfrutoseilação pode ser obtida com base na Equação (1) (FARIA, 2019; SOCCOL; FRANÇA, 2016):

$$A_T = \frac{[F_t]V_R}{t_R V_{enzimático}} \quad (1)$$

em que: $[F_t]$ representa a concentração de frutose transfrutoseilada (em $\mu\text{mol.L}^{-1}$); V_R o volume do meio reacional (em L); t_R o tempo de reação (em min) e $V_{enzimático}$, o volume do caldo fermentado utilizado na reação enzimática (em mL).

A concentração de frutose transfrutossilada pode ser obtida indiretamente pelo seguinte balanço de massa (CHEN; LIU, 1996; CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020):

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

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

$$[F_t] = [G] - [F] = 2[G] - [AR] \quad (4)$$

em que: $[AR]$ representa a concentração de açúcares redutores; $[F]$ a concentração de frutose; $[G]$ a concentração de glicose e $[F_t]$ a de frutose transfrutossilada, todas dadas em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

3.3 CINÉTICA ENZIMÁTICA

O estudo da cinética enzimática é realizado com o intuito de avaliar a influência das condições de processo (temperatura, pH, concentração de substrato, de enzima, presença ou ausência de ativadores e inibidores) na velocidade das reações promovidas pelas enzimas (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2010; FARIA *et al.*, 2021).

Uma série de modelos matemáticos e empíricos que correlacionam estes fatores estão propostos na literatura, cada qual com suas premissas, para a previsão da cinética enzimática. Um modelo matemático para a cinética enzimática único foi desenvolvido pela primeira vez por VCR Henri em 1902 e por L. Michaelis e ML Menten em 1913. A cinética simples de reações catalisadas por enzimas é frequentemente referida como cinética de Michaelis-Menten ou cinética de saturação (AGUIAR DE OLIVEIRA, 2007; ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010; SHULER; KARGI, 2002).

O modelo de Michaelis-Menten é apresentado na Equação (5) (FARIA *et al.*, 2021; SHULER; KARGI, 2002):

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S]+k_m} \quad (5)$$

em que: V é a velocidade de reação; k_m é a constante de Michaelis-Menten; V_{max} é a velocidade máxima de reação e $[S]$ a concentração de substrato.

A constante de Michaelis-Menten descreve a afinidade existente entre a enzima e o substrato e representa também a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima de reação (V_{max}) (FARIA *et al.*, 2021; SHULER; KARGI, 2002).

O modelo de Michaelis-Menten, conforme Equação (5), apresenta uma relação de primeira ordem entre a velocidade de formação do complexo enzima-substrato ([ES]) e a concentração de enzimas e outra relação de primeira ordem em relação à concentração de substrato. Uma das premissas deste modelo é que a etapa de formação e dissociação do complexo [ES] ocorre com alta velocidade, desprezando-se, portanto, a ocupação dos sítios ativos pelo complexo [ES] (FARIA *et al.*, 2021; SHULER; KARGI, 2002).

Os parâmetros do modelo cinético de Michaelis Mentem (k_m e V_{max}) podem ser obtidos com o auxílio de ferramentas computacionais e softwares por meio de regressões não lineares (SHULER; KARGI, 2002).

O modelo cinético de Michaelis-Menten não é universal e por isso algumas reações enzimáticas não são muito bem representadas por ele. Isto implica na necessidade de correções, adicionando ao modelo mais parâmetros, que correlacionem fatores como a presença de inibidores, cooperatividade ou presença de sítios alostéricos (ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010)

As correções no modelo de Michaelis-Menten são necessárias, por exemplo, quando a ligação entre o substrato e o sítio ativo da enzima não são desprezíveis, ou seja, afetam a cinética da reação. Este fenômeno é comum em enzimas com múltiplos sítios ativos, conhecidas como enzimas alostéricas e é conhecido como cooperatividade (WEISS, 1997).

Um modelo que considera a cooperatividade é o modelo de Hill (FARIA *et al.*, 2021; WEISS, 1997), representando pela Equação (6):

$$V = \frac{V_{max}[S]^n}{[S]^n + (k_{1/2})^n} \quad (6)$$

em que: $k_{1/2}$ é a concentração de substrato cuja velocidade de reação equivale à metade de V_{max} , indicando a afinidade entre a enzima e o substrato e n é o coeficiente de Hill (WEISS, 1997).

O coeficiente de Hill (n) é o parâmetro que representa a cooperatividade da ligação entre enzima e substrato. A cooperatividade é positiva quando n assume valores superiores a 1, indicando a presença de mais de um sítio ativo na enzima e quando n equivale a 1, a Equação (6) se transforma no modelo de Michaelis- Menten (Equação (5)) (WEISS, 1997).

3.3.1 Principais fatores que influenciam na cinética enzimática

3.3.1.1 Temperatura

A taxa de reação enzimática aumenta conforme a temperatura aumenta, porém, essa relação apresenta um limite. Acima de uma determinada temperatura, a atividade da enzima diminui, devido ao fenômeno de desnaturação térmica enzimática. Cada enzima apresenta uma condição de temperatura específica na qual a taxa de reação é máxima (SHULER; KARGI, 2002).

A desnaturação térmica é um dos principais causadores de queda na atividade enzimática. Por este motivo, a avaliação da estabilidade térmica da enzima é um ponto chave para a caracterização de um sistema de bioconversão (CATANA *et al.*, 2007). Esta avaliação é feita com base em alguns parâmetros, sendo eles: constantes de ativação e desativação térmica; energias de ativação e desnaturação térmica; tempo de meia vida da enzima livre e imobilizada; fator de estabilidade; variação entalpia de desnaturação térmica; variação da entropia de desnaturação térmica e variação da energia de Gibbs para desnaturação térmica (FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2021; SAQIB *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015).

A desnaturação térmica enzimática ocorre quando há uma transição de um estado de menor energia para um estado de maior energia. Para que a transição ocorra irreversivelmente é necessário fornecer à enzima uma quantidade mínima de energia, na forma de calor, denominada energia de desnaturação (E_D). A variação da entalpia de desnaturação térmica (ΔH_D) expressa a quantidade total de energia necessária para desnaturar a enzima a uma dada temperatura, estando diretamente

relacionada à energia térmica de desnaturação. Valores elevados e positivos de E_D e ΔH_D^* estão associados à alta termoestabilidade da enzima (SOUZA *et al.*, 2015). A variação da energia de Gibbs de desnaturação térmica (ΔG_D), que inclui as contribuições entálpica e entrópica, também é um parâmetro útil na avaliação da estabilidade térmica da enzima. Um valor menor ou negativo desse parâmetro está associado a um processo espontâneo no qual a enzima torna-se menos estável e sofre desnaturação com maior facilidade. Por outro lado, um aumento em ΔG_D indica um aumento da termoestabilidade da enzima devido ao aumento na resistência à degradação (FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2021; SAQIB *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015).

A extensão da desnaturação térmica da enzima também depende da variação de entropia de desnaturação térmica (ΔS_D), que expressa a quantidade de energia por unidade de temperatura envolvida na transição de um estado ativo para um desnaturado (FARIA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2015)

3.3.1.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

Certas enzimas possuem grupos iônicos em seus sítios ativos que devem estar em uma forma adequada (ácida ou básica) para serem funcionais. Variações no pH do meio reacional provocam alterações na forma iônica do sítio ativo e também podem alterar a estrutura tridimensional da enzima, afetando diretamente a taxa de reação enzimática. Por conta disso, enzimas são ativas apenas em uma determinada faixa de pH. Existem também alguns casos nos quais o substrato contém grupos iônicos e o pH do meio afeta a afinidade do substrato pela enzima (SHULER; KARGI, 2002).

A natureza hidrofílica ou hidrofóbica dos suportes justifica algumas alterações das propriedades catalíticas das enzimas, como o pH ótimo de reação. A obtenção de biocatalisadores heterogêneos, após a imobilização, com pH ótimo de reação pode ser diferente do encontrado para a enzima solúvel (SOUZA *et al.*, 2017). Um exemplo prático deste fenômeno foi reportado para lactase de levedura imobilizada em suporte de vidro revestido com zircônia. Na sua forma solúvel, a enzima apresentou pH de reação ótimo entre 6 e 7 enquanto na forma imobilizada a faixa de pH ótima para reação caiu para 3 a 4. A redução do pH de reação ideal permitiu a aplicação desta lactase na hidrólise de lactose em soro de leite ácido, aplicação na qual a enzima

solúvel não poderia ser empregada (MARCONI, 1989).

3.3.1.3 Concentração de substrato

Geralmente o aumento da concentração de substrato, aumenta a velocidade da reação enzimática. Esta relação é válida até um certo ponto. Quando a concentração de substrato é excessivamente alta, pode haver inibição das enzimas, fenômeno conhecido como inibição pelo substrato (SHULER; KARGI, 2002).

3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. No caso das enzimas, a imobilização consiste no confinamento da proteína em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso e em solventes orgânicos, e pode ser usada isolada ou em combinação com outras técnicas de estabilização de proteínas. A imobilização é considerada uma das ferramentas mais eficientes para alterar a especificidade, seletividade, atividade e estabilidade das enzimas (MATEO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2017). Problemas relacionados à instabilidade e inadequação para uso de biocatalisadores na presença de alguns solventes e/ou condições de pH, temperatura ou a presença de agentes que ocasionam a desnaturação enzimática podem ser contornados por meio da imobilização (CANILHA; CARVALHO, 2006).

A possibilidade de utilização em processo contínuo, o aumento da estabilidade e a recuperação do biocatalisador, ao final do processo, são consideradas as principais vantagens proporcionadas pela imobilização (CANILHA; CARVALHO, 2006), contudo a reutilização industrial de enzimas por vários ciclos reacionais é de longe o principal objetivo da imobilização (GUISAN *et al.*, 2006). Uma vantagem econômica significativa surge com a recuperação do biocatalisador, por evitar o transporte das proteínas para as etapas seguintes do processo (BRADY; JORDAAN, 2009). Devido à ampla variação nas características das enzimas a serem imobilizadas e também das condições de processo, é difícil definir quais os melhores suportes e técnica de imobilização a serem utilizados. Não existe uma metodologia universal para a seleção do suporte e do método de imobilização mais adequado (CANILHA; CARVALHO,

2006). A seleção do suporte e do método de imobilização é feita avaliando as várias características e recursos exigidos para a aplicação da enzima em relação às propriedades, limitações e características da imobilização e do suporte combinadas (BICKERSTAFF, 1997).

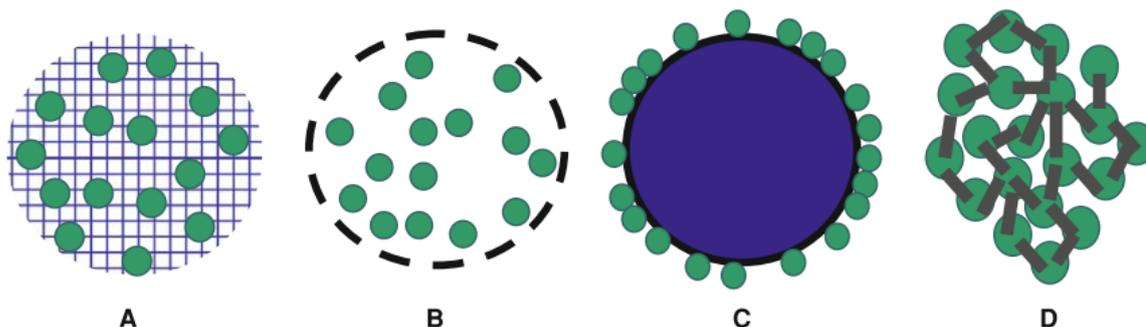
Enzimas podem ser imobilizadas por confinamento dentro de uma membrana porosa ou por fixação a uma superfície sólida e o derivado enzima-suporte deve ser suficientemente robusto e estável para ser retido por meios físicos simples dentro reator onde o biocatalisador pode ser colocado em contato com o substrato (ROSEVEAR, 1984).

Os principais métodos de imobilização podem ser divididos em quatro grandes grupos (CANILHA; CARVALHO, 2006):

- a) Aprisionamento em matrizes porosas (géis ou suportes pré-formados): normalmente envolve a sintetização *in situ* da matriz porosa em torno das enzimas a serem imobilizados (CANILHA; CARVALHO, 2006);
- b) Contenção por barreiras (aprisionamento em fase ou em barreiras pré-formadas): também é conhecida como encapsulamento e também envolve a utilização de membranas pré-formadas ou a formação *in situ* da membrana em torno das enzimas a serem imobilizadas (CANILHA; CARVALHO, 2006);
- c) Ligação às superfícies sólidas (adsorção natural ou ligação química): pode ser realizado por meio de interações iônicas, de adsorção, ou covalentes entre grupos reativos do suporte e do biocatalisador (CANILHA; CARVALHO, 2006);
- d) Auto agregação ou automobilização (natural ou artificial): os biocatalisadores são ligados entre si sem a necessidade do uso de um suporte (CANILHA; CARVALHO, 2006).

A Figura 2 representa esquematicamente estas quatro principais classes de técnicas de imobilização:

Figura 2 – Representação das estratégias de imobilização enzimática



Fonte: Brady e Jordaan (2009, p. 1640).

Legenda:

- a) Aprisionamento.
- b) Encapsulamento.
- c) Suporte sólido.
- d) Auto-imobilização.

As enzimas são representadas pelos círculos verdes.

Em sua forma solúvel as enzimas são sensíveis a alguns tipos de solventes e fatores como agitação, temperatura e pH. A utilização de enzimas solúveis apresenta dificuldades relacionadas ao alto custo de produção e purificação dos produtos de interesse, além da perda de atividade e inibição devidas às condições do processo. Além disso, a biocatálise homogênea pode causar contaminação do produto desejado (FARIA *et al.*, 2021; KRAJEWSKA, 2004), gerar alteração de *flavor* e ser um fator de riscos alergênicos, quando presentes em produtos finais como alimentos e medicamentos (BICKERSTAFF, 1997; FARIA, 2019). Outra desvantagem presente num processo de biocatálise homogênea é que, devido à incapacidade de recuperação, sempre é necessária uma nova batelada de biocatalisador para outro ciclo reacional (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005).

3.4.1 Adsorção física

As proteínas são macromoléculas de superfície ativa e a maior parte dessa classe de biomoléculas são grandes moléculas anfifáticas. Essa característica intrínseca faz com que as proteínas tenham superfície ativa, o que pode levá-las a se adsorver em algumas superfícies (HLADY; BUIJS, 1996).

A imobilização da enzima por adsorção ocorre através da ligação entre uma enzima e um suporte sólido. A depender da natureza da superfície do adsorvente, a ligação à enzima pode ser resultante de interações iônicas, adsorção física, ligação

hidrofóbica, forças de atração de Van der Waals ou mesmo uma combinação dessas interações (BRÍGIDA *et al.*, 2008).

Embora seja uma técnica simples de imobilização e apresente baixo custo, a adsorção física possui algumas desvantagens. Dentre elas destaca-se a baixa energia de ligação entre enzima e suporte, o que pode ocasionar dessorção da enzima na presença do substrato. A dessorção também pode ser ocasionada quando o derivado enzima-suporte é submetido a variações de temperatura, pH e força iônica (BRÍGIDA *et al.*, 2008). Existem algumas técnicas que visam reduzir a dessorção da enzima, entre elas a modificação química do suporte, a redução do diâmetro dos poros e a reticulação da enzima no interior dos poros (REIS; WITULA; HOLMBERG, 2008).

Mesmo que as enzimas imobilizadas por adsorção sejam suscetíveis à dessorção, esta técnica de imobilização está entre as mais utilizadas na obtenção de biocatalisadores insolúveis (BRÍGIDA *et al.*, 2008; GUIBAN *et al.*, 2006).

A adsorção provoca pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, devido ao fato de que, nesta técnica, a imobilização é espontânea e ocorre em uma orientação preferencial e energeticamente favorável (ZHOU *et al.*, 2012).

A eficiência da adsorção de determinada enzima, na superfície de um suporte, está relacionada a diversos parâmetros, dentre eles as características físicas e morfológicas do suporte e também a concentração da enzima (carga enzimática). A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com o aumento da carga enzimática até atingir a saturação do adsorvente (DEREWENDA *et al.*, 1992).

Geralmente o processo de imobilização por adsorção é conduzido sob temperatura constante para que as isotermas de adsorção possam ser obtidas. Essas isotermas podem seguir os modelos de Langmuir ou Freundlich para adsorção (DEREWENDA *et al.*, 1992).

3.5 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

Quanto à sua morfologia, os suportes podem ser considerados porosos, não porosos e em gel (MATEO *et al.*, 2007). É sabido que materiais porosos apresentam elevadas áreas superficiais. Este fator faz com que haja uma grande área disponível para a imobilização de enzimas. Além da área superficial, o diâmetro dos poros deve ser levado em consideração, haja vista que podem não ser suficientemente grandes

para acomodar a enzima, permitir o acesso do substrato ou mesmo a dessorção do produto (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A escolha do suporte deve considerar uma série de características, tanto do processo, quanto da enzima e do próprio suporte e a relação entre estes três pilares. Os principais fatores envolvem a estabilidade mediante variações de temperatura e pH, os parâmetros do processo em geral, a funcionalidade química, a resistência mecânica, a retenção da atividade enzimática inicial, o custo, a compatibilidade (CANILHA; CARVALHO, 2006), dentre outros.

O livro editado por Bickerstaff (1997) fornece em seu primeiro capítulo um guia que relaciona os principais fatores a serem levados em consideração na seleção do suporte e da técnica para imobilização, como consta na Tabela 4.

Uma série de materiais inorgânicos ou naturais (orgânicos), pode ser utilizada como suporte para imobilização. Entre os inorgânicos têm-se, por exemplo: minerais, como areia e celite; manufaturados como óxidos metálicos; cerâmicas; géis de sílica, etc. e dentre os orgânicos têm-se: polímeros naturais, polímeros sintéticos, materiais fibrosos (CANILHA; CARVALHO, 2006; FARIA, 2019).

Tabela 4 – Principais considerações para a seleção do suporte e técnica de imobilização de enzimas

(continua)

Propriedade	Pontos a serem considerados
Física	Compressibilidade de partículas, área superficial disponível, forma (grânulos, fibras), porosidade, volume de poro, permeabilidade, densidade, espaço para aumento de biomassa, fluxo e queda de pressão
Química	Hidrofilicidade (afinidade do suporte pela água), inércia em relação à enzima ou célula, grupos e funções disponíveis para modificação, regeneração e reutilização do suporte
Estabilidade	Armazenamento, atividade enzimática residual, produtividade celular, regeneração da atividade enzimática, manutenção da atividade celular e estabilidade mecânica da matéria do suporte
Resistência	Ataque por microrganismos, inibição por produtos químicos, pH, temperatura, solventes orgânicos, proteases e mecanismos de defesa celular

Tabela 4 – Principais considerações para a seleção do suporte e técnica de imobilização de enzimas

(conclusão)

Propriedade	Pontos a serem considerados
Segurança	Biocompatibilidade, toxicidade de reagentes e ou componentes, saúde e segurança para trabalhadores do processo e usuários dos produtos finais, especificações do órgão fiscalizador responsável competente para aplicações alimentares, farmacêuticas e médicas
Econômica	Disponibilidade e custo de suporte, produtos químicos, equipamentos especiais, reagentes, habilidade técnica necessária, impacto ambiental, preparação química em escala industrial, viabilidade para aumento de escala, processamento contínuo, vida útil efetiva, reutilização do suporte
Reacional	Fluxo, arraste da enzima ou célula e produtividade biocatalítica, cinética de reação, reações laterais, limitações de difusão na transferência de massa, substratos e produtos

Fonte: adaptado de Bickerstaff (1997).

3.5.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O alto custo de alguns suportes comerciais disponíveis promove a busca por substitutos mais baratos, dentre eles os suportes de resíduos agroindustriais lignocelulósicos, como serragem, palha, casca e palha de arroz e resíduos fibrosos (fibra de coco ou mesmo o bagaço de cana-de-açúcar) (BRÍGIDA *et al.*, 2008).

Devido à alta atividade agrícola, o Brasil produz resíduos agroindustriais em grandes quantidades (QUEIROZ *et al.*, 2018). Cada tonelada de cana-de-açúcar processada gera em média 320 kg de bagaço. A produção de cana-de-açúcar no Brasil aumenta ano após ano, tendo atingido aproximadamente 640 milhões de toneladas na safra que ocorreu entre 2019 e 2020 (UNICA, 2020), o que representa uma geração de bagaço de cana-de-açúcar equivalente a mais de 560 mil toneladas por dia.

O alto volume de resíduo gerado por esta produção é uma das motivações para o desenvolvimento de estudos que foquem na utilização de resíduos agroindustriais

em aplicações mais nobres (QUEIROZ *et al.*, 2018). Destaca-se aqui sua utilização como suporte para imobilização de enzimas (AMIN *et al.*, 2018).

O bagaço de cana-de-açúcar apresenta na sua composição, em % (m.m⁻¹), base seca, celulose (35,2 ± 0,9), hemicelulose (24,5 ± 0,6), lignina (22,2 ± 0,1) e cinzas (20,9 ± 4,3) (REZENDE *et al.*, 2011). Esta composição química torna este tipo de suporte atrativo para imobilização de enzimas em virtude da vasta possibilidade de pontos reativos, além das suas características hidrofóbicas, que mantém a água afastada superfície do suporte, mas não a enzima (QUEIROZ *et al.*, 2018).

Não somente a imobilização de enzimas, mas também a aplicação para a produção de etanol de segunda geração, são alternativas à destinação do bagaço de cana-de-açúcar que apresentam grande relevância do ponto de vista ambiental e econômico, pois proporcionam a reutilização dos resíduos e a geração de produtos de alto valor agregado (BRÍGIDA *et al.*, 2008).

Gonçalves *et al.* (2015) imobilizaram β-D-frutofuranosidase de *Fusarium graminearum* no bagaço de cana-de-açúcar, visando a produção de FOS. Em seu trabalho, utilizaram um pré-tratamento do suporte com polietilenoimina (PEI). A imobilização foi conduzida por 16 horas a 25 °C. Os pesquisadores avaliaram a eficiência da imobilização apenas comparando a atividade da β-D-frutofuranosidase retida em cada suporte com a atividade da enzima livre. Como resultado obtiveram retenção de cerca de 66 % da atividade inicial da β-D-frutofuranosidase com o ensaio de atividade realizado para o complexo β-D-frutofuranosidase/bagaço de cana-de-açúcar.

3.6 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO DA FTase EXTRACELULAR DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM DIFERENTES SUPORTES

A Tabela 5 apresenta os principais estudos de imobilização de FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em diferentes suportes.

Tabela 5 – Principais estudos de imobilização de FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301

Suporte	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)	Referência
Sílica-gel	85 ± 6	13 ± 0,94	(ARAÚJO <i>et al.</i> , 2021; (FARIA <i>et al.</i> , 2021)
Sabugo de Milho	51,53 ± 5,61	0,87 ± 0,27	(ROCHA ., 2021)
Polihidroxibutirato	41 ± 0,9	14 ± 0,5	(ARAÚJO <i>et al.</i> , 2021)
Farelo de soja	68 ± 0,04	36 ± 2,87	(ARAÚJO <i>et al.</i> , 2021)

Fonte: do autor.

Faria *et al.* (2021) e Araújo *et al.* (2021) imobilizaram FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica-gel, farelo de soja e polihidroxibutirato, a 35 °C, 175 rpm e pH 5,5. Para a obtenção dos resultados apresentados na Tabela 5, os pesquisadores selecionaram as frações entre 63-200 µm para a sílica-gel e 0,300-0,850 µm para o farelo de soja. Ambos os materiais foram secos em estufa a 60 °C por 24 horas, previamente aos ensaios de imobilização. O polímero polihidroxibutirato, foi submetido a um pré-tratamento específico. Rocha *et al.* (2021) selecionaram a fração entre 150-200 µm do sabugo de milho para os ensaios de imobilização, que foram realizados a 30 °C, 175 rpm e pH 5,5. A fração peneirada também foi submetida à secagem prévia em estufa a 60 °C por 24 horas, para os ensaios de imobilização. A duração dos ensaios de imobilização para estes três suportes foi de 8 horas.

Aguiar de Oliveira (2007) estudou a imobilização por adsorção da FTase extracelular de *Rhodotorula sp.* em suporte sólido ácido inorgânico composto por nióbio e grafite. Foi utilizada a fração entre 177-208 µm nos ensaios de imobilização que foram conduzidos a 5 °C por 18 h sob agitação suave. Uma eficiência de imobilização de 97,76 % foi alcançada e os resultados de atividade recuperada não foram disponibilizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO E DO DERIVADO ENZIMA-SUPORTE (BET, BJH, FTIR)

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, doado pela Usina Monte Alegre – Adecoagro (Monte Belo – MG), foi utilizado para a imobilização da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301. O material foi submetido ao peneiramento (peneiras Thermoceram® 8" x 2") e a sua fração, com faixa granulométrica compreendida entre 425-600 µm (36-25 mesh), foi selecionada para os ensaios de imobilização e submetido à secagem em estufa a 60 °C por 24 h.

Para a determinação da área específica, utilizou-se o método de Brunauer-Emmett-Teller (BET), baseado na fisissorção de nitrogênio a 77 K (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938) e para a obtenção do volume e distribuição de poros do material foi utilizado o método BJH (BARRETT; JOYNER; HALENDA, 1951). As amostras foram previamente secadas a 60 °C por 2 h e submetidas em analisador Micromeritics Gemini VII Surface Area and Porosity 3.03, número de série 795.

A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para caracterizar as ligações químicas e estruturas das amostras do suporte na ausência e presença da enzima (imobilizada). Utilizou-se o espectrômetro Agilent Technologies Cary 630, operado para uma faixa de 600 a 4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} . As análises foram realizadas pelo Laboratório de Fotólise, Fotocatálise e Especificação Química – LaFFEQ da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

4.2 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 sacarose refinada comercial (União®) 15,0 % (m.v⁻¹), extrato de levedura (Synth®) 0,5 % (m.v⁻¹), nitrato de sódio (NaNO₃) (Dinâmica®) 0,5 % (m.v⁻¹), fosfato monopotássico (KH₂PO₄) (Synth®) 0,2 % (m.v⁻¹), sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O) (Dinâmica®) 0,05 % (m.v⁻¹), cloreto de

manganês tetra-hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Synth[®]) 0,03 % (m.v⁻¹) e sulfato de ferro hepta-hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Synth[®]) 0,001 % (m.v⁻¹). Foram distribuídos 50 mL do meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, vedados com algodão e esterilizados em autoclave por 15 min a 120 °C e 2,0 atm.

Após a esterilização, foram inoculados 0,5 mL da suspensão de esporos (1×10^7 esporos.mL⁻¹) e o cultivo celular submerso foi conduzido em agitador orbital do tipo *Shaker* (Tecna[®], modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm por 64 horas (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020). Ao término do cultivo, o conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi filtrado em papel do tipo Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm. O permeado (caldo filtrado), contendo a FTase solúvel, foi imediatamente utilizado para os ensaios de imobilização, devido a rápida perda de atividade enzimática (CUNHA *et al.*, 2019).

4.3 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR MICROBIANA

4.3.1 Ensaios de imobilização

A imobilização de FTase extracelular em bagaço de cana-de-açúcar foi realizada conforme método adaptado de Faria *et al.* (2021). Um volume de 20 mL de caldo filtrado, contendo a enzima solúvel, foi adicionado em frasco Erlenmeyer contendo 0,5 g do suporte. Os ensaios, realizados em triplicata, foram conduzidos em Banho Dubnoff a 35 °C, 175 rpm, pH 5,5 por um período de 8 horas. Sob as mesmas condições experimentais, monitorou-se a atividade enzimática da amostra controle, constituída apenas por caldo filtrado contendo a enzima solúvel, na ausência do suporte.

Ao decorrer dos ensaios de imobilização, nos tempos de 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8 h, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante para monitorar as atividades enzimáticas de transfrutoseilação ao longo do processo. Ao término dos experimentos, procedeu-se com a filtração a vácuo, utilizando bomba TE-058 (Tecna[®]) e papel filtro Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm. O derivado enzima-suporte obtido foi imediatamente submetido aos ensaios de atividade enzimática para o cálculo dos parâmetros de imobilização, ensaios de caracterização bioquímica e de estabilidade. Após os ensaios de atividade enzimática, o derivado enzima-suporte foi novamente filtrado a vácuo. A torta obtida foi conduzida à estufa de secagem a 60 °C

por, pelo menos, 24 h até obtenção de massa seca constante para determinação da atividade enzimática.

4.3.2 Parâmetros de imobilização enzimática

4.3.2.1 Rendimento de Imobilização (RI)

Com base neste parâmetro foi avaliado o percentual de enzima adsorvido no suporte, obtido pela Equação (7) (FARIA *et al.*, 2021; SOCCOL; FRANÇA, 2016):

$$RI = \frac{A_{T_i} - A_{T_f}}{A_{T_i}} \times 100 \quad (7)$$

em que: RI é o rendimento de imobilização (em %); A_{T_i} é a atividade de transfrutossilação (em $U \cdot mL^{-1}$) do sobrenadante antes do processo de imobilização e A_{T_f} é a atividade de transfrutossilação (em $U \cdot mL^{-1}$) do sobrenadante ao final do processo de imobilização.

4.3.2.2 Atividade Recuperada (A_R)

A atividade recuperada é baseada na atividade de transfrutossilação do derivado enzima-suporte (A_{T_D} , dada em $U \cdot g^{-1}$). Este parâmetro indica o quanto de atividade inicial no caldo, com a enzima ainda na sua forma solúvel, pode ser reaproveitada pelo derivado enzima-suporte, sendo obtida pela Equação (8) (FARIA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2017):

$$A_R = \frac{A_{T_D}}{A_{T_i} - A_{T_f}} \times f_c \times 100 \quad (8)$$

em que: A_R é dado em porcentagem (em %) e f_c é o fator de conversão (em $g \cdot mL^{-1}$) para tornar a A_R adimensional, tendo sido calculado por meio da Equação (9):

$$f_c = \frac{m_{suporte}}{V_{caldo}} \quad (9)$$

em que: $m_{suporte}$ é a massa de suporte utilizada no processo de imobilização (em g) e V_{caldo} , o volume de caldo utilizado no processo de imobilização (20 mL).

4.3.2.3 Fator de estabilidade (FE)

O fator de estabilidade (FE) pode ser calculado pela relação entre o tempo de meia-vida da enzima imobilizada e solúvel (SOUZA *et al.*, 2017), conforme a Equação (10):

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ imobilizada}}{t_{1/2} \text{ solúvel}} \quad (10)$$

em que: $t_{1/2} \text{ imobilizada}$ e $t_{1/2} \text{ solúvel}$ são os tempos de meia vida para a enzima imobilizada e solúvel, respectivamente.

4.4 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DO DERIVADO ENZIMA-SUPORTE

4.4.1 Influência do pH e da temperatura do meio reacional na atividade enzimática

O delineamento experimental foi obtido empregando-se um delineamento fatorial completo (DCCR) de 2^2 com três repetições no ponto central. Foram selecionados para o estudo: pH (4,5 a 6,5) e temperatura do meio reacional (40 °C a 60 °C), cada um em cinco níveis. Foram adicionados ao delineamento experimental pontos axiais, para a composição de um modelo de segunda ordem (Tabela 6). Os níveis dos fatores foram selecionados com base no trabalho de Faria *et al.* (2021). O modelo de superfície de resposta foi ajustado a uma variável de resposta, a atividade de transfrutoseilação absoluta (em $U \cdot g^{-1}$). A função de resposta de segunda ordem para os dois fatores foi ajustada conforme modelo descrito na Equação (11), a um nível de significância de 5 % (p valor < 0,05).

Tabela 6 – Matriz do planejamento de experimentos DCCR 2^2

Ensaio	Variáveis codificadas	Variáveis reais
--------	-----------------------	-----------------

	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)	pH
1	-1	-1	43	4,8
2	1	-1	57	4,8
3	-1	1	43	6,2
4	1	1	57	6,2
5	-1,41	0	40	5,5
6	1,41	0	60	5,5
7	0	-1,41	50	4,5
8	0	1,41	50	6,5
9	0	0	50	5,5
10	0	0	50	5,5
11	0	0	50	5,5

Fonte: do autor.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 pH + \beta_{12} T pH + \beta_{11} T^2 + \beta_{22} pH^2 \quad (11)$$

em que: T e pH representam os fatores temperatura (°C) e pH, respectivamente; β_0 , β_1 , β_2 , β_{12} , β_{11} e β_{22} representam os parâmetros estimados para o modelo estatístico.

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

A influência da concentração de substrato na cinética enzimática foi realizada conduzindo-se os ensaios de atividade em triplicata e utilizando a FTase extracelular imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar. Para isso, o meio reacional foi preparado com as seguintes concentrações de sacarose comercial União®: 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 (FARIA *et al.*, 2021).

Ao meio reacional, foram adicionados 0,5 g de suporte contendo a enzima imobilizada e os ensaios de atividade enzimática foram conduzidos.

A partir dos resultados experimentais obtidos, os parâmetros de reação foram estimados por meio de ajustes de modelos cinéticos de Michaelis e Menten e Hill aos dados experimentais mediante auxílio de ferramenta computacional.

4.5 ENSAIOS DE ESTABILIDADE DO DERIVADO ENZIMA-SUPORTE

4.5.1 Ensaios de estabilidade frente ao pH de incubação

A enzima imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar foi incubada, na ausência de substrato, em tampão tris acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ com diferentes valores de pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5), durante 24 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao término da incubação, as atividades de transfrutossilacção foram determinadas.

4.5.2 Ensaios de estabilidade térmica da FTase imobilizada

Os efeitos da estabilidade térmica foram avaliados incubando a enzima imobilizada, na ausência de substrato, nas temperaturas de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 1 h, 2 h, 4 h e 24 h em banho termostatizado. Ao término do ensaio, determinou-se a atividade de transfrutossilacção da FTase imobilizada para a obtenção da constante de desnaturação térmica de primeira ordem; da energia de ativação para a desnaturação térmica; do tempo de meio-vida e das variações de entalpia, da energia de Gibbs e da entropia de ativação para a desnaturação térmica.

O modelo de desativação térmica enzimática de dois parâmetros proposto por Sadana e Henley (1987), que prevê um mecanismo de desativação de uma única etapa e exibe cinética de desativação de ordem diferente de um e atividade residual diferente de zero do estado final da enzima (Equação (12)), foi utilizado para determinar a constante de desativação térmica (SADANA; HENLEY, 1987).

$$\left(\frac{A_T}{A_{T_0}}\right) = (1 - \alpha) e^{-(k_a t)} + \alpha \quad (12)$$

em que: A_T é a atividade de transfrutossilacção para um determinado tempo de incubação a uma determinada temperatura; A_{T_0} é a atividade de transfrutossilacção do derivado enzima-suporte ao final da imobilização e antes da incubação e α um dos parâmetros do modelo de desnaturação térmica enzimática de Sadana e Henley (1987) que representa a razão entre as atividades específicas do estado final e inicial.

A energia de desativação térmica da enzima foi obtida utilizando a Equação de Arrhenius, descrita na Equações (13) e (14) (SHULER; KARGI, 2002):

$$k_a = A_a \times e^{(-E_a/RT)} \quad (13)$$

$$k_d = A_d \times e^{(-E_D/RT)} \quad (14)$$

em que: k_a representa a constante de ativação térmica; k_d a constante de desativação térmica; A_a e A_d são os fatores de frequência ou constantes de Arrhenius; E_a e E_d são as energias necessárias para promover a ativação e desnaturação térmicas (kJ.mol⁻¹), respectivamente; R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta (K) (MIRANDA *et al.*, 2014; SHULER; KARGI, 2002).

O tempo de meia vida da enzima ($t_{1/2}$), que é o tempo necessário para reduzir a atividade enzimática pela metade do seu valor original, (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005), foi calculado utilizando a Equação (15) (PERNA *et al.*, 2017).

$$t_{1/2} = -\frac{1}{k_d} \ln\left(\frac{\frac{1}{2}-\alpha}{1-\alpha}\right) \quad (15)$$

A entalpia de ativação de desnaturação (ΔH_D^*), que expressa a quantidade total de energia necessária para desnaturar a enzima a uma dada temperatura, foi calculada utilizando a Equação (16) (FARIA *et al.*, 2021; SAQIB *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015):

$$\Delta H_D^* = E_D - RT \quad (16)$$

A energia livre de Gibbs (ΔG_D^*), que inclui as contribuições entálpica e entrópica foi ser calculado utilizando a Equação (17) (FARIA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2015):

$$\Delta G_D^* = -RT \times \ln\left(\frac{k_d h}{k_B T}\right) \quad (17)$$

em que: h é constante de Planck (11,04 x 10⁻³⁶ J.min⁻¹) e k_B é a constante de Boltzmann (1,38 x 10⁻²³ J.K⁻¹).

A entropia de desativação (ΔS_D^*), que expressa a quantidade de energia por unidade de temperatura envolvida na transição de um estado ativo para um desnaturado (SOUZA *et al.*, 2015), foi calculada utilizando a Equação (18):

$$\Delta S_D^* = \frac{\Delta H_D^* - \Delta G_D^*}{T} \quad (18)$$

4.5.3 Ensaio de estabilidade operacional da FTase imobilizada

A enzima imobilizada foi adicionada ao meio reacional contendo 3,8 mL de sacarose 47 % (m.v⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato a 0,2 mol.L⁻¹ e pH 5,5. Ao final de cada ciclo reacional (1 h), a enzima imobilizada foi separada do meio reacional por filtração a vácuo e reintroduzida em um novo meio reacional. No total foram executados 6 ciclos reacionais consecutivos (FARIA *et al.*, 2021).

4.5.4 Ensaio de estabilidade de armazenamento da FTase imobilizada

Para estes ensaios, o derivado enzima-suporte foi armazenado sob refrigeração à 4 °C em períodos predefinidos (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 30 dias). Ao término do período de incubação, as atividades de transfrutossilacção do derivado enzima-suporte foram determinadas.

4.6 ENSAIOS ANALÍTICOS

4.6.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade de transfrutossilacção foi obtida a partir da concentração de frutose transferida (transfrutossilada) e a frutose transferida foi obtida a partir das concentrações dos açúcares redutores e de glicose. Tanto a concentração dos açúcares redutores ([AR]) quanto a concentração de glicose ([G]) foram obtidas por meio das leituras de absorvância das amostras submetidas aos ensaios de atividade (FARIA, 2019).

Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia estabelecida por Cuervo-Fernandez . (2007). O experimento consistiu em adicionar 0,1 mL da solução enzimática (FTase solúvel, presente no caldo) em meio reacional constituído por 3,7 mL de solução de sacarose refinada comercial (União®) com concentração inicial de 63,6 % (m.v⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5. Para o

ensaio de atividade do derivado enzima-suporte, seguiu-se o mesmo procedimento, porém adicionando 0,5 g do derivado enzima-suporte em meio reacional constituído 7,6 mL da solução de sacarose comercial (União®) com concentração inicial de 63,6 % (m.v⁻¹) e 2,4 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5. Os ensaios de atividade foram conduzidos por 60 minutos em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) com agitação de 190 rpm e sob temperatura controlada de 50 °C (CUERVO FERNANDEZ *et al.*, 2007).

Para cessar a reação, os tubos contendo o meio reacional e a enzima (solúvel ou imobilizada) foram inseridos em banho com água em ebulição por 10 minutos, seguido por resfriamento em banho com água e gelo por 5 minutos

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

Finalizados os ensaios de atividade, as concentrações de açúcares redutores e de glicose presentes no meio reacional foram determinadas com base nos métodos descritos nos Tópicos 4.6.2 e 4.6.3, respectivamente.

Finalmente a atividade de transfrutossilacção (A_T) foi determinada pela Equação (1), após obtida a concentração de frutose transfrutossilada por meio das Equações (19) e (20), respectivamente (CHEN; LIU, 1996; CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020):

$$[F] = [G] - [AR] \quad (19)$$

$$[F_t] = [G] - [F] = 2 \times [G] - AR \quad (20)$$

4.6.2 Determinação da concentração de açúcares redutores

A determinação da concentração de açúcares redutores ($[AR]$) foi realizada utilizando-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS (MALDONADE; CARVALHO; FERREIRA, 2013; MILLER, 1959; VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Para produzir o reagente DNS foi necessário preparar em paralelo duas soluções (Solução A e Solução B). Para um volume final de 1 L, a Solução A foi

preparada com a dissolução de 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Synth[®]) em 200 mL de solução de hidróxido de sódio (Synth[®]) 2 mol.L⁻¹; a Solução B possuiu um volume final de cerca de 500 mL resultantes da adição de 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Dinâmica[®]) em água. A Solução A foi submetida à agitação e aquecimento constantes até a completa dissolução do tartarato duplo de sódio de potássio. Após a dissolução, as Soluções A e B foram homogeneizadas num único béquer. A solução resultante, foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, após o resfriamento, e o menisco aferido originando o reagente DNS (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013), que é estável por até 30 dias quando armazenado em frasco âmbar sob temperatura ambiente (MALDONADE; CARVALHO; FERREIRA, 2013).

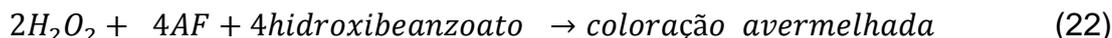
A marcha analítica para a determinação da concentração de açúcares redutores foi realizada utilizando-se uma alíquota de 0,5 mL da solução do DNS e uma alíquota de mesmo volume da amostra em um tubo tipo Falcon[®], e agitação manual para homogeneização. A solução preparada foi inserida em banho de água em ebulição por 15 min. A reação foi cessada inserindo as amostras em banho de gelo por 5 min. A mistura obtida foi diluída com 4 mL de água destilada e a leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Edutec[®], modelo EEQ901A-B) com comprimento de onda de 540 nm. O branco foi preparado substituindo-se a alíquota de 0,5 mL de amostra por água destilada (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Por se tratar de um método colorimétrico, uma curva de calibração foi obtida, utilizando-se Glicose P. A. (Synth[®]) em concentrações que variaram numa faixa de 0,1 a 1,2 g.L⁻¹ (Apêndice A) (MALDONADE; CARVALHO; FERREIRA, 2013).

4.6.3 Determinação da concentração de glicose

A determinação da concentração de glicose foi realizada utilizando-se o kit enzimático GOD-PAP da LABORLAB[®] conforme procedimentos utilizados por Cunha *et al.* (2019), Gonçalves *et al.* (2020), Faria *et al.* (2021), Garcia *et al.* (2021). O método de quantificação de glicose o kit enzimático GOD-PAP é fundamentado nas seguintes reações:





As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (EduTec ®, modelo EEQ901A-B) com comprimento de onda de 505 nm dentro do limite máximo de 30 min após o término do aquecimento, haja vista que este é o tempo limite no qual a coloração final obtida é estável, segundo o fabricante.

A marcha analítica consistiu na adição em tubo da amostra com concentração de glicose desconhecida e do reagente enzimático (solução contendo glicose oxidase, peroxidase, 4-aminofenazona, tampão fosfatos pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato) numa proporção de 20 µL para 2 mL, respectivamente. A solução obtida foi submetida a aquecimento a 37 °C por 5 min.

A quantificação da concentração de glicose foi estimada pelas Equações (23) e (24):

$$[G] = D \times f \quad (23)$$

$$f = \frac{100}{P} \quad (24)$$

em que: D é a absorvância da amostra; P é a média da triplicata das absorvâncias da amostra padrão (fornecida pelo fabricante) e f o fator de conversão (mg.dL⁻¹).

Para a obtenção da média das absorvâncias das amostras do padrão (P), o volume de amostra adicionado ao reagente enzimático foi substituído por um volume equivalente da solução padrão fornecida juntamente com o kit GOD-PAP (solução de glicose 1 g.L⁻¹). O método descrito, assim como a marcha analítica, consta no manual que acompanha o kit Glicose GOD-PAP da LABORLAB®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO E DO DERIVADO ENZIMA-SUPORTE

5.1.1 Análise de área específica do suporte (BET)

Levando-se em consideração que a adsorção é um processo que ocorre na superfície de materiais de suporte, o estudo da morfologia adsorvente possui grande relevância (SCHEUFELE *et al.*, 2015). A área específica do bagaço de cana-de-açúcar foi obtida com base na Teoria de Adsorção Molecular (BET) (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938) e os parâmetros referentes ao tamanho e volume específico de poros foram obtidos com base no método BJH (BARRETT; JOYNER; HALENDA, 1951). Os resultados estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Caracterização das partículas do bagaço de cana-de-açúcar pelos métodos BET e BJH

Área específica (m ² .g ⁻¹)	Área específica dos poros (m ² .g ⁻¹)	Tamanho de poro (Å)	Volume específico de poros (cm ³ .g ⁻¹)
1,306	0,846	20,408	0,431×10 ⁻³

Fonte: do autor.

Todos os resultados da Tabela 7 referem-se à fração do bagaço de cana-de-açúcar compreendida entre 425 e 600 µm.

Pelo método BET foi obtida uma área específica de 1,306 m².g⁻¹ e pelo método BJH foi obtida uma área específica de poros (entre 17 e 3000 Å) de 0,846 m².g⁻¹. Estes resultados indicam que cerca de 64,78 % da área disponível do bagaço de cana-de-açúcar está contida no interior dos poros do material e não na superfície externa.

Isto pode ser visto como um ponto positivo para a imobilização enzimática, uma vez que a enzima pode ter sua estabilidade aumentada quando está protegida no interior da matriz porosa, tornando-se mais resistente às mudanças do ambiente reacional, incluindo variações de temperatura, de pH e presença solventes orgânicos. Contudo, a imobilização por adsorção também pode provocar alterações na estrutura tridimensional da enzima ocasionando diminuição da atividade enzimática devido à

inibição dos sítios ativos. Além disso, as limitações devidas às transferências de massa, externa e interna, também podem ocorrer caso a enzima seja adsorvida majoritariamente no interior da matriz porosa e os poros do material não sejam suficientemente grandes para permitir a difusão, tanto do substrato quanto dos produtos, ocasionando diminuição da taxa de reação (SOUZA *et al.*, 2017).

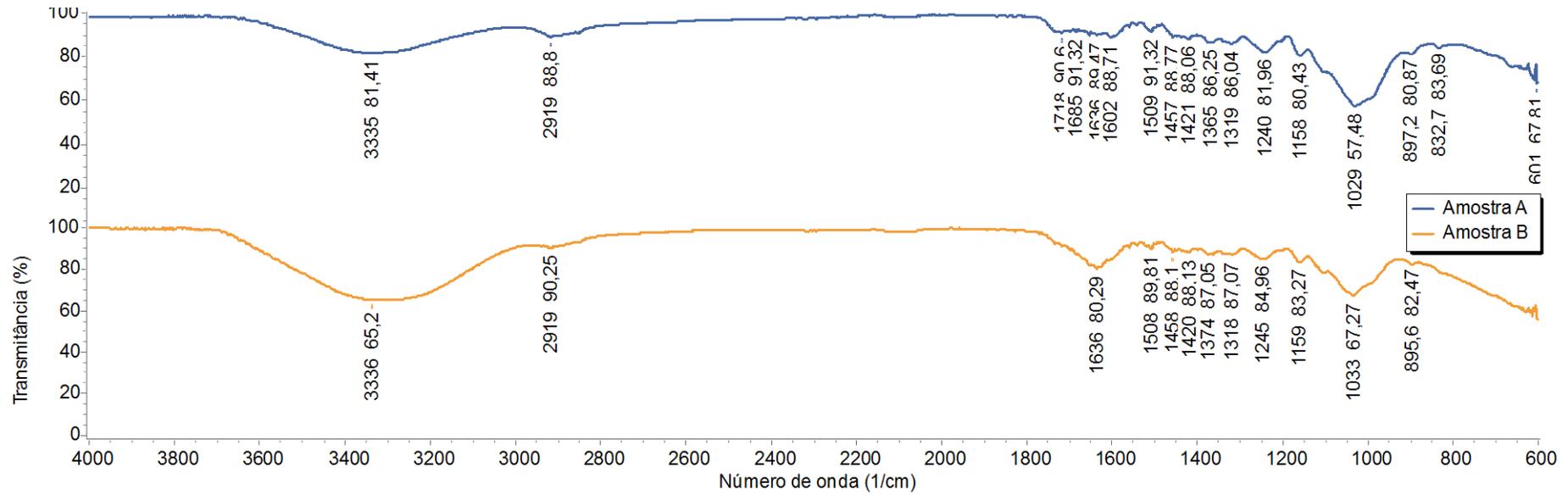
Scheufele *et al.* (2015) obtiveram em seus estudos uma área específica para o bagaço de cana-de-açúcar (diâmetro médio de partícula de 321 μm) equivalente a 2,202 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, volume médio de poros de $6,401\cdot 10^{-3} \text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ e tamanho médio de poros de 16,35 Å, classificando o material analisado como microporoso (diâmetro de poro < 20 Å). Contudo, os valores obtidos na análise realizada para a fração entre 425 e 600 μm (objeto deste estudo) resultou num tamanho médio de poros de 20,408 Å e para Juszcak; Fortuna e Wodnicka (2002), materiais que apresentam partículas com tamanho de poro na faixa de 20 Å a 500 Å são classificados como mesoporosos.

5.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier é uma ferramenta importante na identificação de grupos funcionais de compostos orgânicos. Esta técnica baseia-se nas vibrações dos átomos de uma molécula. O espectro foi obtido passando a radiação através da amostra e determinando a fração da radiação com um comprimento de onda específico que é absorvida. A energia na qual os picos em um espectro de absorção aparecem corresponde à frequência de vibração da parte de uma molécula presente na amostra (STUART, 2004).

A Figura 3 apresenta o espectro infravermelho resultante da análise de FTIR para o material de suporte de imobilização (bagaço de cana-de-açúcar *in natura*) e para o derivado enzima-suporte.

Figura 3 – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e do derivado enzima-suporte. Amostra A (derivado enzima-suporte) e Amostra B (suporte *in natura*)



Fonte: do autor

O espectro infravermelho do bagaço de cana-de-açúcar apresentado na Figura 3 possui duas regiões que apresentam banda de transmitância: 3750 a 2750 cm^{-1} e 1850 a 400 cm^{-1} .

Na primeira região dois picos foram identificados, tendo o primeiro apresentado uma banda de alta intensidade e o segundo uma banda com intensidade mediana. A banda mais intensa apresentou um pico 3336 cm^{-1} , o qual está associado ao estiramento dos grupos hidroxila (O-H) presentes na celulose, hemicelulose e lignina, principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar. O segundo pico, identificado em 2919 cm^{-1} está associado ao estiramento de hidrocarbonetos do tipo C-H_n presentes nos compostos lignocelulósicos (YANG *et al.*, 2007).

Na segunda região foram identificadas diferentes bandas de transmitância. Este padrão de transmitância é característico de materiais lignocelulósicos (XU *et al.*, 2013). As bandas em 1636 e 1508 cm^{-1} estão associadas ao estiramento de ligações C=C em anéis de benzeno. A banda em 1458 cm^{-1} está associada ao dobramento angular do CH₂ em grupos metil nos principais componentes da lignocelulose. A banda observada em 1420 cm^{-1} está associada à flexão assimétrica do CH₃ em grupos metil constituintes da celulose e da hemicelulose. A banda em 1374 cm^{-1} está relacionada a flexão da ligação C-H na lignocelulose. A banda em 1245 cm^{-1} está associada à vibração da ligação C-O em anéis aromáticos. A banda em 1159 cm^{-1} está relacionada ao estiramento assimétrico de ligações C-O-C na celulose e hemicelulose. A banda em 1033 cm^{-1} está associada ao estiramento e deformação da ligação C-O de álcoois, que apresenta maior intensidade na celulose e hemicelulose. O pico em 897 cm^{-1} está associado à ligação glicosídica presente na celulose e hemicelulose.

Os demais picos presentes a partir da região de 700 cm^{-1} podem ser associados aos ruídos e ligações C-H e C-C em compostos aromáticos relacionados à lignina (SILVA, 2017; STUART, 2004; XU *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2007).

Faria *et al.* (2021) obtiveram espectro FTIR para a FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel, no qual foram identificados picos nas regiões de 3300 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} . Os pesquisadores atribuíram ao pico na região de 3300 cm^{-1} um possível alongamento do grupo amino (N-H) e ao pico na região de 1630 cm^{-1} os modos de flexão O-H da água adsorvida e várias vibrações dos grupos amida e apontaram que estas atividades no espectro confirmam a presença de grupos

orgânicos de materiais enzimáticos na superfície da sílica-gel após imobilização por adsorção.

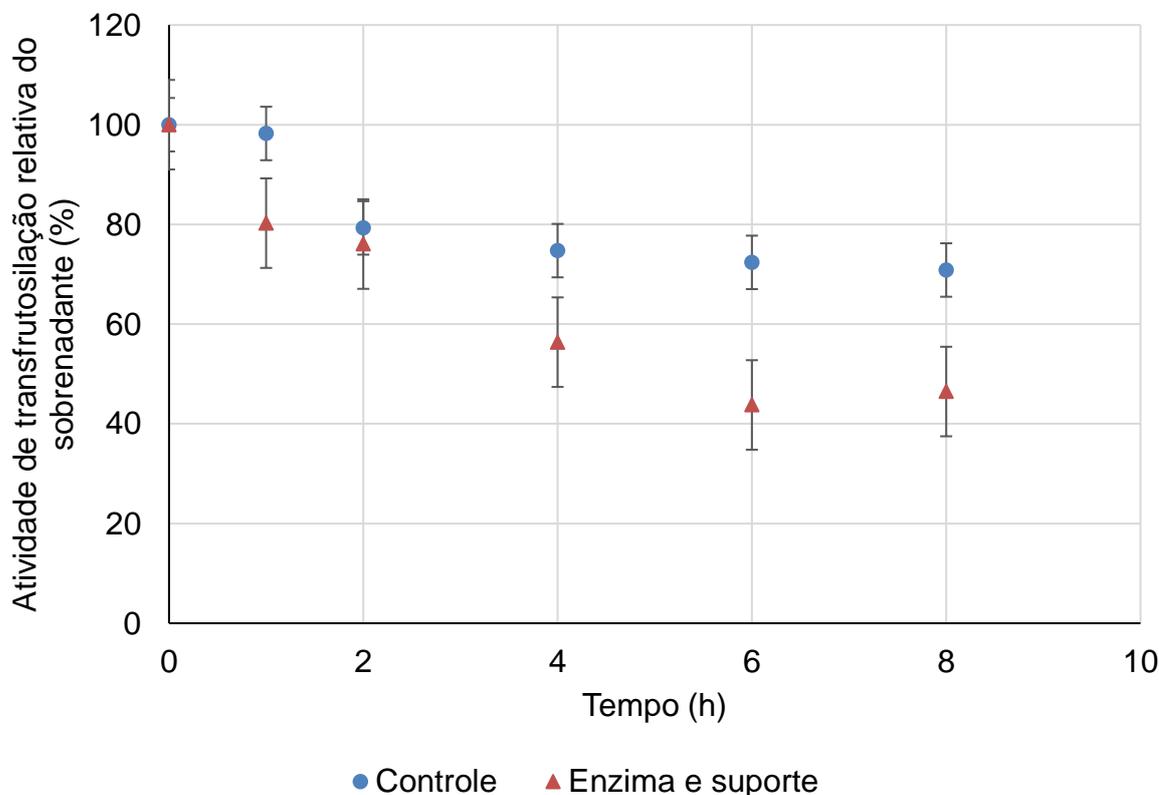
Foi observado que o espectro obtido para o derivado enzima-suporte apresenta praticamente picos com mesma intensidade e bandas, quando comparado ao espectro obtido para o bagaço de cana-de-açúcar, exceto pela região contida entre 1700 e 1600 cm^{-1} e os picos identificados em 832,7 e 601 cm^{-1} , que também podem estar associados aos grupos funcionais presentes na enzima. Os resultados obtidos apresentaram espectro infravermelho do derivado enzima-bagaço de cana-de-açúcar com regiões ativas similares ao espectro obtido por Faria *et al.* (2021) para o derivado enzima-sílica-gel.

A região ativa do espectro em 3330 cm^{-1} , identificada por Faria *et al.* (2021) como um possível alongamento do grupo amino (N-H), pode ter sido sobreposta ao pico de 3336 cm^{-1} característico do bagaço de cana-de-açúcar. Esta sobreposição pode ter impedido a identificação de um grupo orgânico do material enzimático presente no derivado enzima-suporte.

5.2 PERFIL CINÉTICO DE IMOBILIZAÇÃO DA FTase EXTRACELULAR EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A Figura 4 representa o perfil cinético de adsorção da FTase de *A. oryzae* IPT - 301 em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* em função da atividade de transfrutoseilação (A_T) do sobrenadante.

Figura 4 – Perfil cinético de adsorção da FTase extracelular em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Condições experimentais: 40:1 caldo de cultura/g de suporte; pH: 5,5; temperatura: 35 °C; velocidade de agitação: 175 rpm; tamanho de partícula: 425 – 600 μm . A máxima atividade enzimática ($12,52 \pm 2,02 \text{ U.mL}^{-1}$) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: do autor.

Na Figura 4 é possível observar uma queda na atividade de transfrutossilacção da enzima presente no sobrenadante na ausência e na presença do suporte com o decorrer do tempo de imobilização. O decaimento da atividade da FTase solúvel do controle foi de cerca de 30 %, tendo atingido ao final das 8 h de imobilização cerca de 70 % da atividade de transfrutossilacção inicial ($8,87 \pm 0,89 \text{ U.mL}^{-1}$). A FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 apresenta, naturalmente, decaimento em sua atividade enzimática com o passar do tempo (CUNHA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2021). Silva *et al.* (2021) reportaram para esta mesma enzima uma queda de 54,4 % na atividade enzimática da enzima solúvel, após 9 h de monitoramento.

Este decaimento foi consideravelmente menor que o observado nas amostras provenientes do sobrenadante em contato com o bagaço de cana-de-açúcar, no qual a atividade de transfrutossilacção relativa ao final das 8 h de imobilização foi de cerca de 47 % da atividade de transfrutossilacção inicial ($5,82 \pm 0,67 \text{ U.mL}^{-1}$), indicando que a

FTase solúvel, presente no caldo de cultura, foi adsorvida no bagaço de cana-de-açúcar.

Cunha *et al.* (2019) e Faria *et al.* (2021) reportaram em seus trabalhos que a FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 apresenta termoestabilidade à 35 °C, o que também corrobora com a baixa perda de atividade de transfrutoseilação da FTase solúvel. A perda da atividade e redução da atividade enzimática da FTase também pode ocorrer pelo fato de a enzima solúvel estar exposta diretamente às condições do ambiente reacional por um período de tempo considerável sem quaisquer tipos de proteção (FARIA *et al.*, 2021).

Os parâmetros de imobilização (rendimento de imobilização e atividade recuperada) obtidos após os ensaios de imobilização constam na Tabela 8:

Tabela 8 – Parâmetros de imobilização

Parâmetro	Valor médio (%)	Desvio (%)
Rendimento de Imobilização (RI)	46,61	3,77
Atividade recuperada (AR)	11,20	1,85

Fonte: do autor.

O rendimento de imobilização (RI) e a atividade recuperada (A_R) são dois parâmetros essenciais para a análise da eficiência dos suportes para a imobilização de enzimas (SOUZA *et al.*, 2017).

A baixa atividade recuperada média obtida, quando comparada ao rendimento de imobilização, pode estar relacionada ao fato de o suporte *in natura* não ter sido submetido a quaisquer pré-tratamentos de funcionalização. Apesar de simples, pouco dispendiosa, e de proporcionar pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, a adsorção física propicia interações menos intensas quando comparadas às obtidas pelos processos de imobilização por ligações covalentes (SOUZA *et al.*, 2017). Por envolver vários pontos de contato entre a enzima e a superfície do suporte, na imobilização por ligação covalente ocorre um aumento na rigidez da estrutura tridimensional da enzima e a força de ligação dificulta a dessorção enzimática (CANILHA; CARVALHO, 2006; SOUZA *et al.*, 2017). Contudo, visando a redução de custos no processo de imobilização, optou-se por avaliar a imobilização enzimática no bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, por adsorção. Por consequência da intensidade da energia de ligação, pode ter havido a dessorção da enzima, ocasionando perda na atividade de transfrutoseilação do biocatalisador imobilizado e, conseqüentemente,

atividade recuperada mais baixa (SOUZA *et al.*, 2017).

A imobilização enzimática produz diferentes efeitos na atividade e na seletividade do biocatalisador. Se houver interações múltiplas entre a enzima e o suporte, pode ocorrer distorção na estrutura da enzima e em casos mais extremos até mesmo o bloqueio dos sítios ativos. Além disso também é importante levar em consideração fenômenos como o impedimento estérico, a saturação da superfície dos suportes *in natura* devido à sua natureza, as limitações difusionais (transferência de massa interna e externa, devido ao diâmetro dos poros do suporte). Estes fatores podem ocasionar perda na atividade catalítica da FTase imobilizada e, conseqüentemente, redução nos valores do parâmetro atividade recuperada (SOUZA *et al.*, 2017).

Recentemente uma série de estudos envolvendo a imobilização de FTase extracelular de *A. Oryzae* IPT-301 em diferentes suportes (orgânicos e inorgânicos) foi publicada. Faria *et al.* (2021) e Araújo *et al.* (2021) utilizaram sílica-gel como suporte e obtiveram RI e AR de 85 % e 13 %, respectivamente. Araújo *et al.* (2021) também obteve bons resultados utilizando farelo de soja como suporte, tendo obtido RI e AR de 68 % e 36 %, respectivamente. Rocha *et al.* (2021) utilizaram sabugo de milho como suporte e obtiveram RI e AR de 51 % e 0,87 %, respectivamente.

O valor obtido para o RI utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como suporte é compatível com o que foi observado no perfil cinético de imobilização. O maior decaimento da atividade da FTase em contato com o bagaço de cana-de-açúcar, quando comparado às amostras de FTase sem a presença do suporte indicou que a FTase presente no caldo fermentado foi parcialmente adsorvida no bagaço de cana-de-açúcar originando um RI de 46,61 %.

Quando comparado aos materiais utilizados como suporte para a FTase extracelular de *A. Oryzae* IPT-301 anteriormente apresentados, o bagaço de cana-de-açúcar apresentou um RI mais baixo, porém uma AR (11,20 %) que consideravelmente superior à do sabugo de milho e próxima à da sílica-gel, ainda que este último material tenha apresentado um rendimento de imobilização que é quase duas vezes maior que a do bagaço de cana-de-açúcar.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA ENZIMA IMOBILIZADA

5.3.1 Influência do pH e temperatura do meio reacional na atividade da FTase imobilizada

A influência do pH e da temperatura do meio reacional na atividade de transfrutoseilação da FTase imobilizada foi estudada com base em um planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) 2², com três repetições no ponto central. Os ensaios foram conduzidos conforme Tópico 4.4.1 para a obtenção das condições ótimas de reação. A matriz do planejamento experimental, com as variáveis codificadas, reais e respostas obtidas para a atividade de transfrutoseilação está apresentada na Tabela 9:

Tabela 9 – Matriz do planejamento experimental e respostas

Ensaio	Variáveis codificadas (reais)		Respostas
	Temperatura (°C)	pH	Atividade de transfrutoseilação (U.g ⁻¹)
1	-1 (43)	-1 (4,8)	5,04
2	1 (57)	-1 (4,8)	4,97
3	-1 (43)	1 (6,2)	4,78
4	1 (57)	1 (6,2)	5,27
5	-1,41 (40)	0 (5,5)	4,46
6	1,41 (60)	0 (5,5)	4,99
7	0 (50)	-1,41 (4,5)	5,20
8	0 (50)	1,41 (6,5)	4,78
9	0 (50)	0 (5,5)	5,49
10	0 (50)	0 (5,5)	5,45
11	0 (50)	0 (5,5)	5,47

Fonte: do autor.

Após a obtenção das respostas para o planejamento experimental, a análise estatística foi conduzida com o auxílio de ferramenta computacional, adotando um nível de significância de 5 % ($\alpha = 0,05$), e conseqüentemente um nível de confiança de 95 % ($1 - \alpha = 0,95$).

A análise estatística para a atividade de transfrutoseilação gerou a tabela de efeitos que é exposta na Tabela 10.

Tabela 10 – Efeitos, erro padrão e p-valor dos efeitos na atividade enzimática da FTase imobilizada (modelo completo)

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Média	5,469	0,089	>0,001
T (L)*	0,289	0,109	0,045
T (Q)**	-0,667	0,130	0,004
pH (L)	-0,138	0,109	0,260
pH (Q)	-0,403	0,130	0,027
T x pH	0,282	0,154	0,125

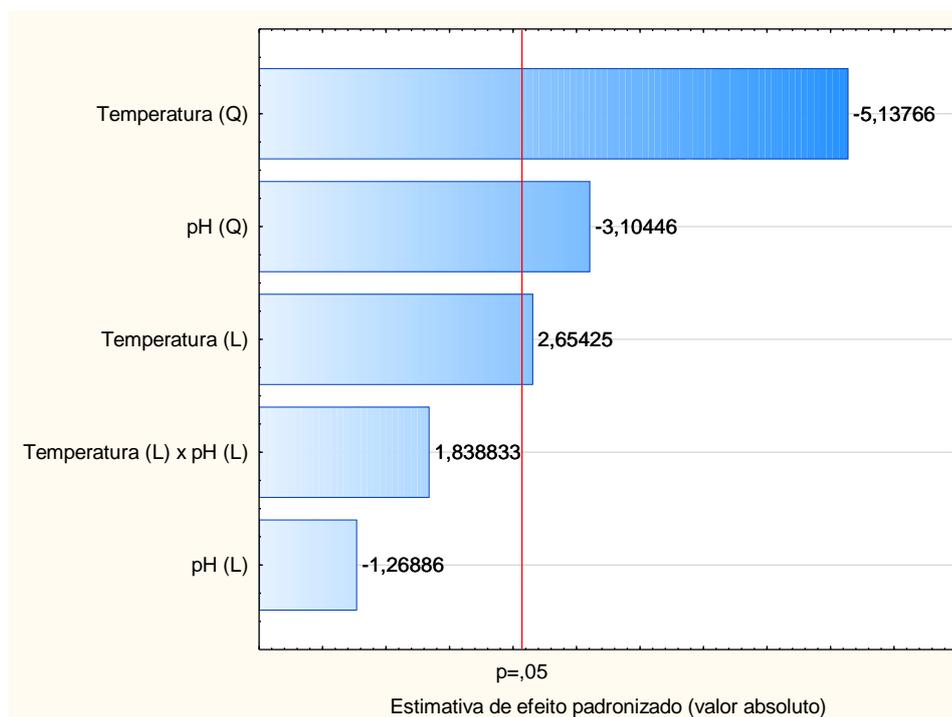
Fonte: do autor.

(*) (L) - Linear

(**) (Q) - Quadrático

O diagrama de Pareto atrelado à tabela de efeitos consta na Figura 5.

Figura 5 – Gráfico de Pareto para os fatores pH e temperatura do meio reacional na atividade enzimática da FTase imobilizada



Fonte: do autor.

A análise dos resultados contidos na Tabela 10 e no diagrama de Pareto da Figura 5 indicaram que os efeitos estatisticamente significativos na variável resposta foram: temperatura quadrática [T (Q)]; temperatura linear [T (L)] e pH quadrático [pH

(Q)], pois estes efeitos apresentaram p-valores inferiores a 0,05 (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Este resultado demonstra que o tanto o pH quanto a temperatura influenciam significativamente na atividade de transfrutossilação.

Com estes resultados foi possível elaborar o modelo estatístico de segunda ordem que relaciona a atividade de transfrutossilação em função do pH e da temperatura, representado pela Equação (25):

$$A_T = 5,469 + 0,144 T - 0,333 T^2 - 0,069 pH - 0,201 pH^2 + 0,141 T pH \quad (25)$$

O ajuste das respostas experimentais ao modelo foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2) e pelo Teste F. De acordo com Rodrigues e Iemma (2009), a aplicação do Teste F ao modelo gerado explica uma quantidade significativa de variação nos dados experimentais.

O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo completo, que leva em consideração tanto os parâmetros significativos (p-valor < 0,05) quanto os não significativos (p-valor > 0,05), foi de 0,89. Isto significa que o modelo gerado para a atividade de transfrutossilação explica 89 % da variabilidade das respostas.

A Tabela 11 representa a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 11 – Análise de variância dos fatores na atividade enzimática da FTase imobilizada

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado
Regressão	5	1,134	1,134	48,070
Resíduos	5	0,118	0,024	
Total corrigido	10	1,091		

Fonte: do autor.

$F_{5;5;0,05} = 5,05$

$F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ podem ser obtidos através da Equação (26) e Equação (27), respectivamente (RODRIGUES; IEMMA, 2009):

$$F_{calculado} = \frac{\text{Soma dos quadrados médios da regressão}}{\text{Soma dos quadrados médios dos resíduos}} \quad (26)$$

$$F_{\text{tabelado}} = F_{v_1, v_2, \alpha} \quad (27)$$

Em que v_1 e v_2 são os graus de liberdade do modelo e dos resíduos, respectivamente e α o nível de significância.

O valor de F calculado foi mais de nove vezes maior que o valor de F tabelado ($F_{5;5,05} = 5,05$). A análise de variância com um menor valor de F_{tabelado} quando comparado ao valor de $F_{\text{calculado}}$, para nível de significância de 5 % validou o modelo descrito pela Equação (25).

Uma alternativa interessante realizada para simplificar o modelo completo, com amplo aval da literatura, consiste em excluir os parâmetros (coeficientes de regressão) com pequena ou nenhuma influência sobre o resultado do ajuste final. O modelo simplificado apresenta um menor número de parâmetros e é denominado modelo reparametrizado ou modelo reduzido (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

É importante frisar que não basta excluir os coeficientes não significativos e manter os demais, os cálculos devem ser refeitos (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Repetindo o procedimento de cálculo foi possível obter os novos parâmetros, conforme descrito na Tabela 12 e o modelo reparametrizado (Equação (28)):

Tabela 12 – Efeitos, erro padrão e p-valor dos efeitos na atividade enzimática da FTase imobilizada (modelo reparametrizado)

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Média	5,469	0,106	>0,001
T (°C) (Linear)	0,289	0,130	0,062
T (°C) (Quadrático)	-0,667	0,155	0,004
pH (Quadrático)	-0,403	0,155	0,036

Fonte: ao autor.

$$A_T = 5,469 + 0,144 T - 0,333 T^2 - 0,201 pH^2 \quad (28)$$

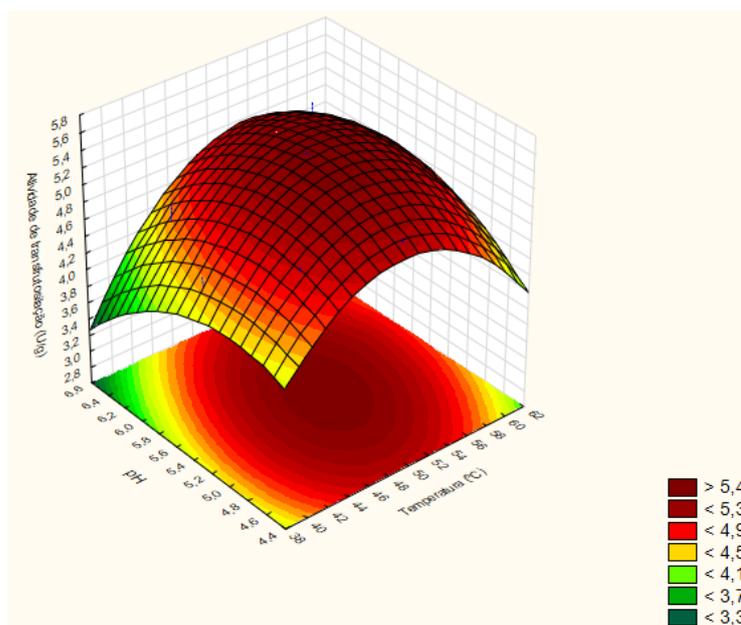
Neste caso, em específico, os parâmetros do modelo foram os mesmos, mas isto não é uma regra geral (RODRIGUES; IEMMA, 2009). O modelo reparametrizado apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,78. Isto significa que o modelo reduzido para a atividade de transfrutossilacção explica 78 % da variabilidade das respostas.

Comparando os coeficientes de determinação do modelo completo (0,89) e reparametrizado (0,78), houve uma queda expressiva na qualidade do ajuste, de cerca de 11 %. Uma nova simulação computacional desprezando apenas o efeito pH (L) \times T (L) foi realizada, gerando um $R^2 = 0,81$. Desprezando apenas o efeito pH (L) o valor de $R^2 = 0,85$. Notoriamente, pelo diagrama de Pareto, o efeito T (L) \times pH (L) possui uma influência maior na resposta quando comparado ao efeito pH (L), ainda que não seja estatisticamente significativa, o que justifica uma menor perda na qualidade do ajuste quando este efeito é considerado na simulação computacional.

Esta análise demonstrou que a reparametrização do modelo, desconsiderando os dois efeitos estatisticamente não significativos [pH (L) \times T (L) e pH (L)] prejudica consideravelmente a qualidade do ajuste e que a reparametrização desconsiderando apenas um dos efeitos não significativos não tem grande relevância para fins práticos, uma vez que o modelo é reduzido em apenas um parâmetro e a qualidade do ajuste é afetada negativamente. Por conta disso optou-se por trabalhar com o modelo completo para a construção da superfície de resposta, curvas de contorno e obtenção dos pontos onde a atividade de transfrutificação da FTase é máxima.

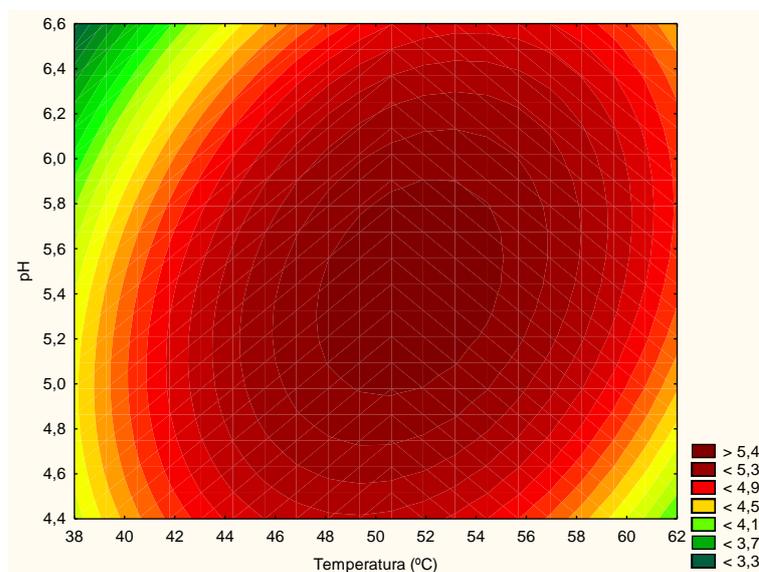
A superfície de resposta e as curvas de contorno geradas para o modelo completo seguem na Figura 6 e na Figura 7, respectivamente.

Figura 6 – Superfície de resposta da atividade enzimática da FTase imobilizada para os fatores temperatura e pH



Fonte: do autor.

Figura 7 – Curvas de contorno da atividade enzimática da FTase imobilizada para os fatores temperatura e pH



Fonte: do autor.

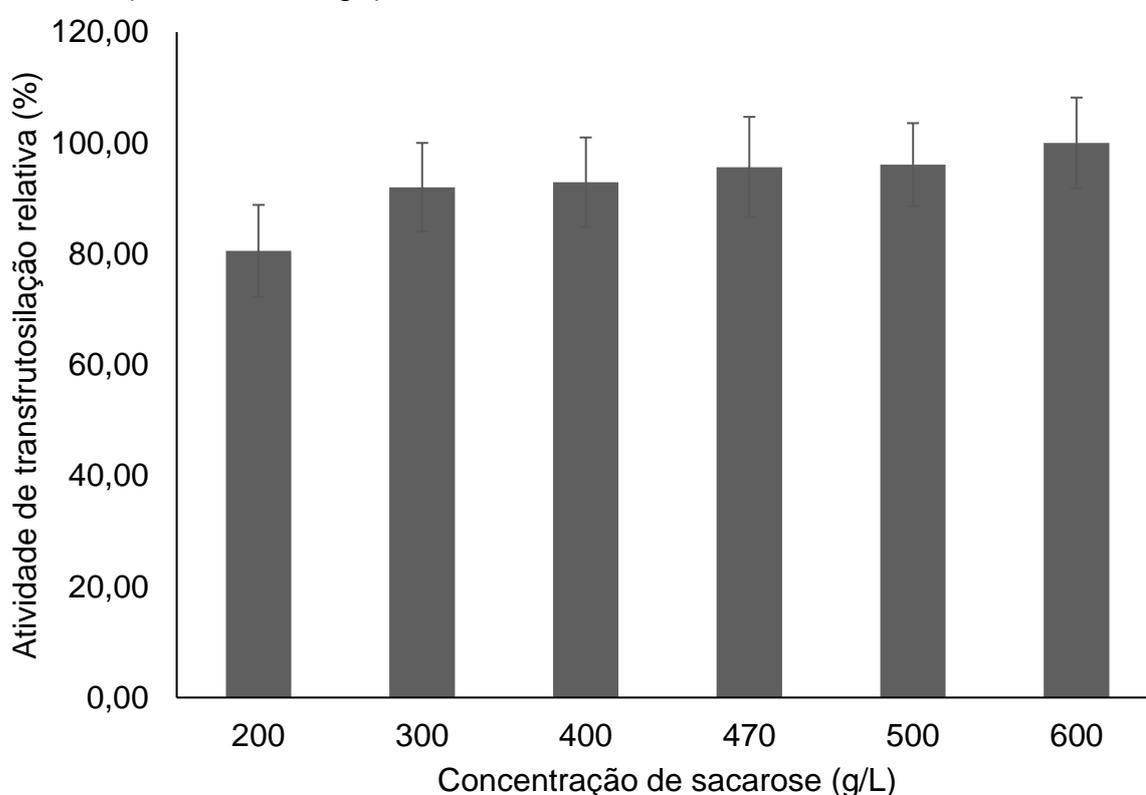
A superfície de resposta permitiu delimitar as melhores condições para a reação de transfrutoseilação da FTase imobilizada no bagaço de cana-de-açúcar, tendo os valores máximos de atividade de transfrutoseilação ($> 5,4 \text{ U.g}^{-1}$) sido obtidos na faixa de temperatura entre 48 e 54 °C e pH entre 5,0 e 5,8. O valor máximo de atividade de transfrutoseilação, segundo o modelo completo e a superfície de resposta, foi de 5,49 obtido à temperatura de 51,37 °C e pH de 5,49.

Cunha *et al.* (2019) (FTase extracelular solúvel de *A. oryzae* IPT-301) e Faria *et al.* (2021) (FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel) obtiveram as condições ótimas para o meio reacional em temperatura de 50 °C e pH de 5,5. Comparadas aos resultados obtidos por estes pesquisadores, pode-se afirmar as condições de reação (T e pH) obtidos neste trabalho são compatíveis com o que já foi pesquisado sobre esta enzima tanto solúvel quanto imobilizada em sílica-gel. Com base nos resultados obtidos por Cunha *et al.* (2019) pode-se ainda afirmar que a imobilização da FTase no bagaço de cana-de-açúcar não produziu efeitos de deslocamento nas faixas de pH na qual a enzima solúvel apresenta atividade máxima.

5.3.2 Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos da FTase imobilizada

Os ensaios de reação enzimática foram conduzidos em conformidade com o procedimento descrito no Tópico 4.4.2. Os resultados estão dispostos na Figura 8.

Figura 8 – Influência da concentração de sacarose na atividade de transfrutossilatação da FTase imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Condições experimentais: concentração de substrato: 470 g L⁻¹; temperatura: 50 °C; velocidade de agitação: 175 rpm; pH: 5,5. A máxima atividade enzimática ($5,86 \pm 0,64$ U.g⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: do autor.

Com base na Figura 8, é possível afirmar que os maiores valores de atividade enzimática da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar foram obtidos para concentrações de sacarose compreendidas entre 300 e 600 g.L⁻¹. A menor atividade de transfrutossilatação foi observada com a concentração de sacarose de 200 g.L⁻¹, sugerindo que nesta concentração a quantidade de substrato foi insuficiente para que a reação enzimática ocorresse de forma satisfatória (FARIA *et al.*, 2021). Hidaka, Hirayama e Sumi (1988) e Jung *et al.* (1989) relataram que para

a FTase de *Aspergillus niger* a atividade de transfrutoseilação é aumentada em concentrações de sacarose superiores a 500 g.L⁻¹. A máxima atividade enzimática foi atingida com a concentração de 600 g.L⁻¹. Contudo, como boa parte dos ensaios de caracterização enzimática envolveu uma análise comparativa entre a enzima solúvel e o derivado enzima-suporte, a concentração de 470 g.L⁻¹ (que promove a máxima atividade de transfrutoseilação para a FTase solúvel de *A. oryzae* IPT-301, segundo Cunha *et al.* (2019) foi padronizada para todos os ensaios. A atividade de transfrutoseilação apresentou uma tendência geral de aumento com o aumento da concentração, tendo apresentado valores de atividade enzimática próximos nas concentrações de 470 e 500 g.L⁻¹ e uma variação muito baixa (desvio padrão de 3,13 %) considerando a faixa de concentração entre 300 e 600 g.L⁻¹.

Faria *et al.* (2021), ao imobilizar FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 em sílica-gel reportou que a concentração ótima para a máxima atividade enzimática foi observada em 470 g.L⁻¹, em conformidade com o trabalho de Cunha *et al.* (2019) que estudaram a mesma enzima, porém em sua forma solúvel. Segundo Faria *et al.* (2021), estes resultados sugerem que a imobilização de FTase por adsorção em sílica-gel não modificou a concentração ideal de substrato para maximizar a atividade enzimática. O mesmo não pode ser dito para a FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada no bagaço de cana-de-açúcar. Apesar de pouca variação na atividade enzimática na faixa compreendida entre 300 e 600 g.L⁻¹, foi observada uma tendência geral de aumento na atividade de transfrutoseilação com o aumento da concentração de sacarose, sugerindo que a imobilização utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como suporte possibilitou o contorno do problema de inibição dos sítios ativos pelo substrato, sugerido por Cunha *et al.* (2019) e Faria *et al.* (2021), a partir da concentração de 470 g.L⁻¹.

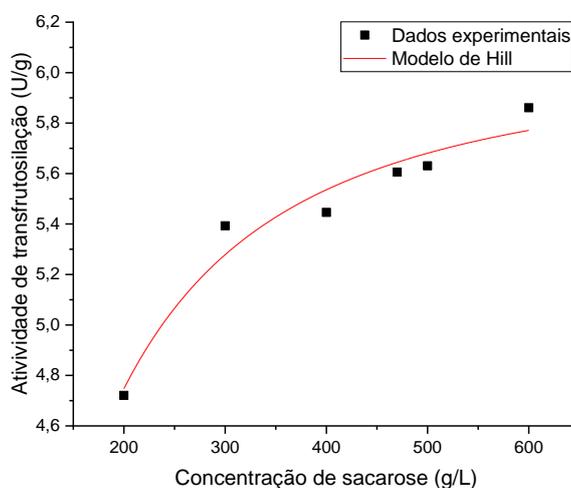
O fato de a inibição pelo substrato não ter sido observada no derivado produzido utilizando o bagaço de cana-de-açúcar e a FTase de *A. oryzae* IPT-301 pode estar atrelado ao favorecimento da atividade enzimática devido à imobilização. Segundo Krajewska (2004) e Souza *et al.* (2017) a utilização de enzimas solúveis pode ocasionar a perda de atividade devido à inibição pelo substrato ou produto e uma das maneiras de contornar esta limitação é a utilização da enzima imobilizada.

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010), que imobilizaram FTase extracelular de *Rhodotorula p.* por adsorção em um suporte de nióbio-grafite também relataram a

inibição cinética causada pelo substrato acima de 500 g.L⁻¹.

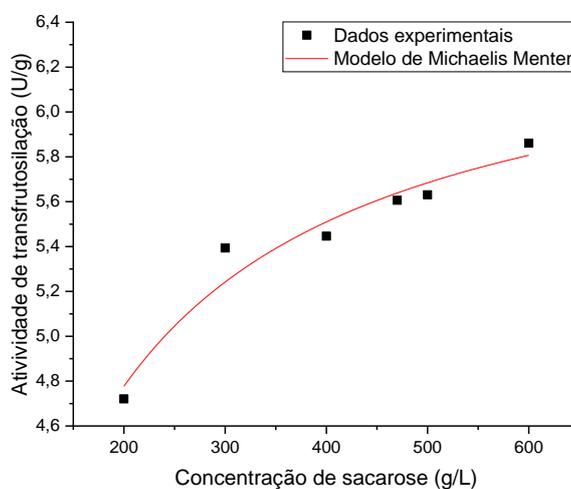
A análise da cinética enzimática da atividade de transfrutoseilação da FTase imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar foi realizada através de uma regressão não linear dos dados experimentais com base nos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e de Hill, com o auxílio de ferramenta computacional. Os ajustes constam na Figura 9 e Figura 10, respectivamente:

Figura 9 – Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten para a FTase imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*



Fonte: do autor.

Figura 10 – Ajuste do modelo cinético de Hill para a FTase imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*



Fonte: do autor.

Com base nos gráficos da Figura 8, da Figura 9 e da Figura 10 é possível afirmar que não foi observada a inibição da enzima pelo substrato (FARIA *et al.*, 2021).

Os parâmetros ajustados para cada um dos modelos cinéticos estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13 – Parâmetros cinéticos estimados

Parâmetros	Modelo cinético	
	Hill	Michaelis-Menten
V_{max}	$6,073 \pm 0,456$	$6,508 \pm 0,156$
k_m	-	$72,505 \pm 10,513$
$k_{1/2}$	$86,645 \pm 27,170$	-
n	$1,524 \pm 0,890$	-
R^2	0,93	0,94

Fonte: do autor.

Os coeficientes de determinação (R^2) para ambos os modelos foram próximos e acima de 0,93, o que significa que os modelos de Michaelis-Menten e de Hill explicam 93 e 95 % das variações da atividade de transfrutoseilação para a FTase imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente, promovendo um ajuste satisfatório dos dados experimentais.

De acordo com o modelo de Michaelis-Menten a concentração de substrato na qual a atividade de transfrutoseilação equivale à metade a atividade de transfrutoseilação máxima é de $72,50 \text{ g.L}^{-1}$, dada pelo parâmetro k_m . Para o modelo de Hill, a concentração de substrato na qual a atividade de transfrutoseilação equivale à metade a atividade de transfrutoseilação máxima é de $86,64 \text{ g.L}^{-1}$, dada pelo parâmetro $k_{1/2}$. As máximas velocidades de reação para cada um dos modelos constam na Tabela 13. A baixa V_{max} pode estar relacionada às limitações de transferência de massa ou obstrução dos poros da matriz do suporte pelas moléculas de sacarose, o que limita a ação dos sítios ativos sobre o substrato (CHIANG *et al.*, 1997).

O coeficiente de Hill obtido ($n = 1,52$) pode representar a presença de mais de um sítio ativo na enzima e uma cooperatividade positiva, indicando que a afinidade dos sítios ativos da enzima com o substrato aumenta após a reação da primeira molécula de sacarose com um sítio ativo (FARIA *et al.*, 2021; WEISS, 1997). Segundo Ghazi *et al.* (2007), o modelo de Hill apresenta bons ajustes para os dados provenientes de reações catalizadas por transferases.

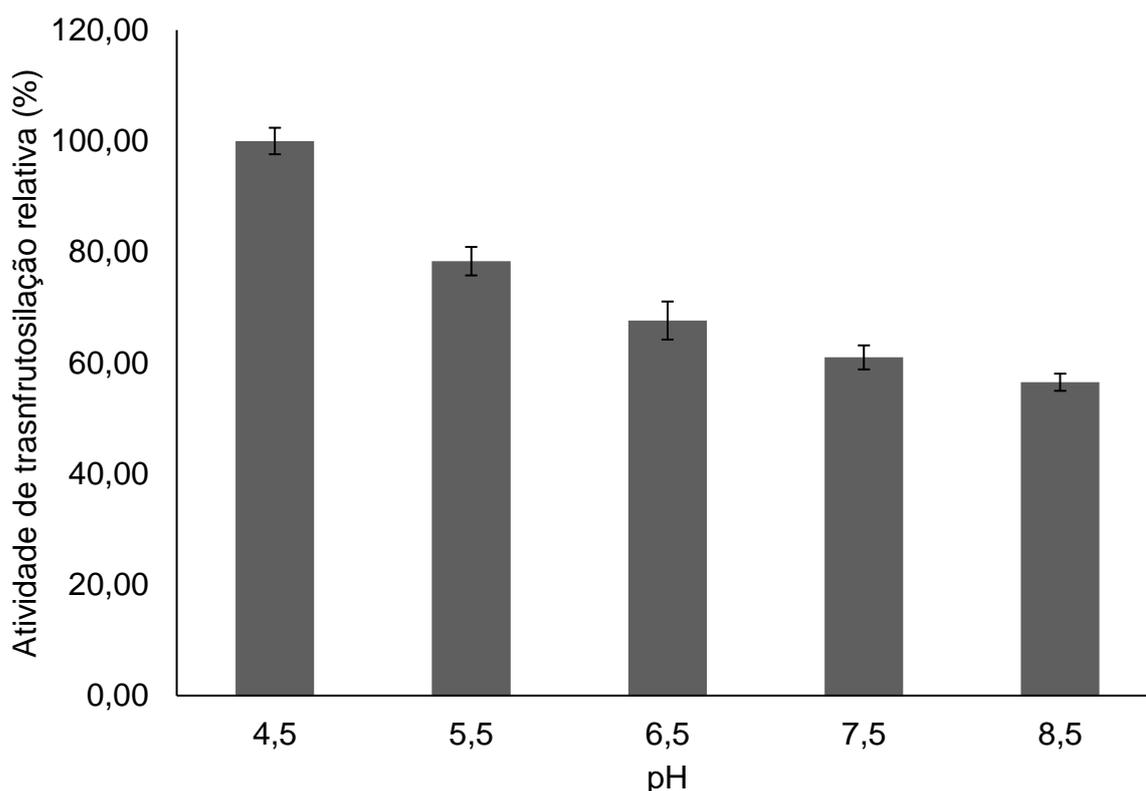
Cunha *et al.* (2019) ajustou satisfatoriamente o modelo de Michaelis-Menten da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 aos dados cinéticos, tendo obtido um coeficiente de determinação superior a 99 %. Faria *et al.* (2021) obteve um coeficiente de determinação de 96 % para o ajuste do modelo de Hill aos dados cinéticos da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT 301 imobilizada em sílica-gel. Estes resultados sugerem que a FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada no bagaço de cana-de-açúcar alterou parcialmente a cinética da reação de transfrutossilação da sacarose, assim como observado por Faria *et al.* (2021) ao estudar a cinética do derivado FTase-sílica-gel. Para o derivado enzima suporte produzido neste trabalho, tanto o modelo cinético de Michaelis-Menten quando o modo de Hill foram ajustados satisfatoriamente aos dados cinéticos, enquanto a enzima solúvel, segundo Cunha *et al.* (2019), apresenta cinética michaeliana.

5.4 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

5.4.1 Estabilidade frente ao pH de incubação da FTase extracelular imobilizada

A estabilidade frente ao pH de incubação na atividade enzimática da FTase imobilizada foi avaliado conforme descrito no Tópico 4.5. Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 11.

Figura 11 – Estabilidade enzimática da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* 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. A atividade máxima de transfrutoseilação do derivado enzima-suporte (6,07 ± 0,28 U.g⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: do autor.

Com base na Figura 11 foi possível observar que a enzima imobilizada apresentou atividades relativas superiores a 56 % na faixa de pH avaliada. A menor atividade de transfrutoseilação relativa ocorreu em pH 8,5, tendo sido equivalente a 56,50 % e a maior ocorreu em pH 4,5, tendo sido equivalente a 100 %.

A maior diferença entre as atividades relativas numa faixa estreita (1 unidade) de pH foi observada entre as amostras provenientes da incubação em pH de 4,5 e de 5,5, tendo sido equivalente a cerca de 22 %. Entre os ensaios após incubação em pH de 5,5 e de 6,5 a queda foi de 11 %. Entre os ensaios após incubação em pH de 6,5 e de 7,5 a queda foi de 6 % e de apenas 4 % entre os ensaios após incubação em pH de 7,5 e de 8,5. Estes resultados apontaram que, conforme o pH de incubação foi aumentado, a FTase imobilizada no bagaço de cana-de-açúcar apresentou uma

retenção de atividade enzimática menor e que na faixa de pH acima de 6,5 a diminuição da atividade enzimática retida é menos acentuada que na faixa de pH que vai de 4,5 a 6,5.

Isto demonstra que a FTase apresenta maior estabilidade na faixa ácida de pH, tomando como parâmetro a atividade enzimática retida. Contudo apresenta um comportamento parecido, com baixas perdas na retenção de atividade, após incubação em faixas de pH básicas. As enzimas possuem grupos iônicos em seus sítios ativos que devem estar em uma forma adequada para serem funcionais e as variações de pH do meio em que são inseridas resultam em mudanças na forma iônica do sítio ativo, o que afeta diretamente a atividade enzimática (SHULER; KARGI, 2002; SOUZA *et al.*, 2017). O pH de incubação de 4,5 pode ter afetado positivamente a estrutura iônica dos sítios ativos da FTase imobilizada no bagaço de cana-de-açúcar e, por consequência, ter favorecido a atividade enzimática. Este favorecimento pode ter sido menor com o aumento do pH e, por consequência, ter afetado negativamente a atividade enzimática do derivado enzima-suporte. Este resultado pode vir a ser uma ferramenta útil no que diz respeito às melhores condições de armazenamento do derivado enzima-suporte para preservação da atividade enzimática.

Os valores de atividade relativa obtidos (acima de 56,50 %) sugerem uma boa estabilidade da FTase imobilizada no bagaço de cana-de-açúcar *in natura* na faixa de pH de incubação que vai de 4,5 a 8,5, levando-se em consideração o fato de que enzimas estáveis em uma ampla faixa de pH têm como principal vantagem a redução de custos com armazenamento e são promissoras para a aplicação industrial (XU *et al.*, 2015).

Cunha *et al.* (2019) e Faria *et al.* (2021) obtiveram para a FTase extracelular solúvel de *A. oryzae* IPT-301, nos pHs de 4,5, 5,5 e de 6,5 atividades de transfrutoseilação relativas menores que as apresentadas nos gráficos da Figura 11, o que demonstra que a imobilização da FTase em bagaço de cana-de-açúcar foi capaz de aumentar a estabilidade da enzima frente às variações de pH. Este resultado era esperado uma vez que com a imobilização as enzimas tornam-se mais robustas e mais resistentes a mudanças do ambiente reacional, incluindo influências do pH (SOUZA *et al.*, 2017). A imobilização proporciona proteção dos grupos iônicos dos sítios ativos da enzima sobre os efeitos do pH (BRADY; JORDAAN, 2009).

Faria *et al.* (2021) também identificou melhoria na estabilidade da FTase

extracelular imobilizada em sílica-gel comparada com a FTase extracelular solúvel de *Aspergillus oryzae* IPT-301, frente às variações de pH. Os pesquisadores identificaram que a incubação do derivado enzima-suporte no pH de 4,5 foi a que mais afetou negativamente a atividade enzimática. Com base neste resultado é importante apontar que a imobilização da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 em bagaço de cana-de-açúcar foi capaz de produzir um biocatalisador heterogêneo mais resistente ao pH de 4,5 do que o obtido por estes pesquisadores.

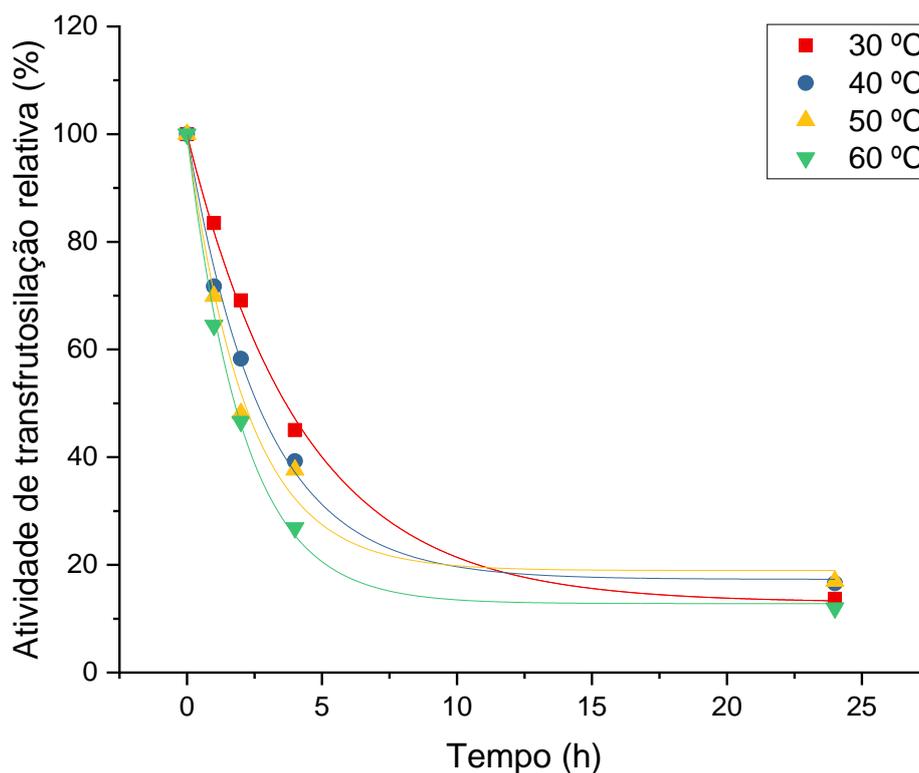
A maior contribuição para um bom desempenho do derivado enzima-suporte é dada pelo suporte e apesar de existirem diversos materiais que podem ser aplicados na imobilização enzimática, cada um deles apresenta características peculiares no que diz respeito à origem (orgânica ou inorgânica), área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, dentre outras. Como consequência, a partir de uma mesma enzima derivados enzima-suporte com características distintas podem ser produzidos (SOUZA *et al.*, 2017), assim como relatado para o derivado FTase-sílica e FTase-bagaço de cana-de-açúcar.

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010), ao imobilizarem FTase de *Rhodotorula sp.* por adsorção em minério de nióbio identificaram que o derivado enzima-suporte apresentou elevada atividade enzimática, consequentemente boa estabilidade, em valores de pH de 4,5 e 6,0. Onderková, Bryjak e Polakovič (2007), ao imobilizarem FTase de *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-94 em um suporte acrílico, também identificaram uma elevada atividade enzimática após incubarem o derivado enzima-suporte em soluções com valores de pH de entre 3 e 6.

5.4.2 Estabilidade térmica da FTase extracelular imobilizada

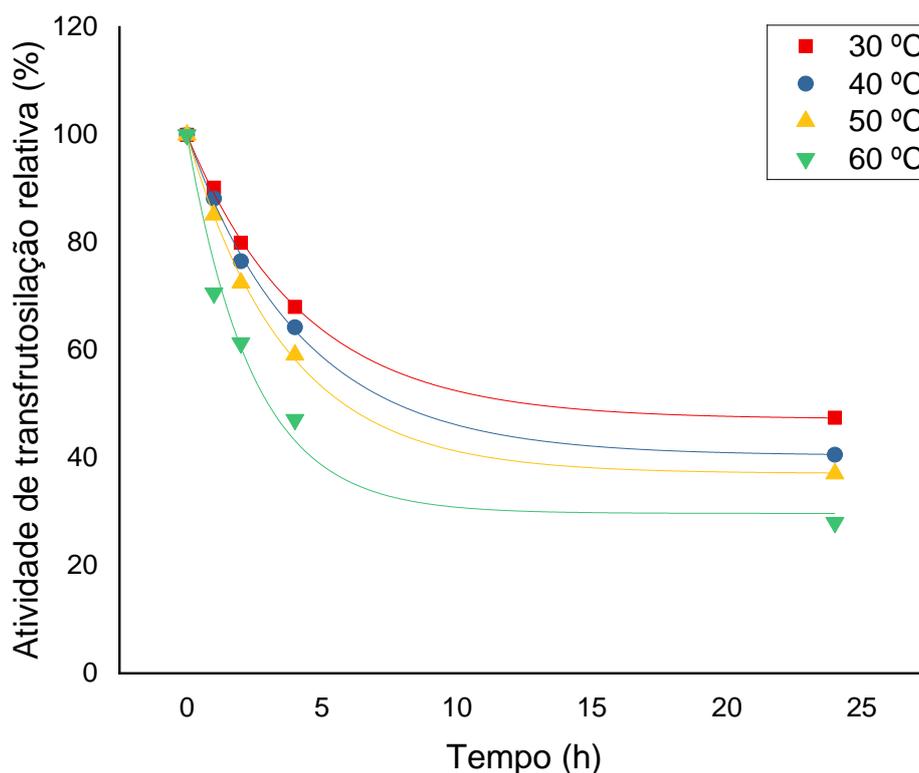
A estabilidade térmica da FTase extracelular solúvel e imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi avaliada conforme Tópico 4.5.2. Os dados experimentais obtidos e o ajuste das curvas de desativação térmica realizados com base no modelo de Sadana e Henley (Equação (12)) para cada uma das temperaturas, para a FTase solúvel e imobilizada constam na Figura 12 e na Figura 13, respectivamente.

Figura 12 – Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular solúvel de *A. oryzae* IPT-301 ao decorrer 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 transfrutossilagem (9,29 ± 0,99 U.mL⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: do autor.

Figura 13 – Perfil de estabilidade térmica da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* ao decorrer 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 ($5,74 \pm 0,02$ U.g⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: do autor.

A FTase imobilizada apresentou retenção da atividade de transfrutoseilação maior do que a da FTase solúvel para todas as temperaturas avaliadas, ao final das 24 h de incubação. A maior retenção de atividade de transfrutoseilação foi observada para enzimas incubadas a 30 °C. Sob esta temperatura a FTase imobilizada apresentou atividade residual de em torno de 47 % após 24 h de incubação, enquanto a FTase solúvel apresentou atividade enzimática residual equivalente a cerca de 14 %, no mesmo período de incubação. Ao término do período incubação, a enzima imobilizada apresentou retenções de atividade da ordem de 40 %, 37 % e 28 % a 40 °C, 50 °C e 60 °C, respectivamente, enquanto a FTase solúvel apresentou, para

estas mesmas temperaturas, atividades enzimáticas residuais entre 13 e 16 %. Os resultados obtidos são de grande importância, especialmente à temperatura de 50 °C, que é a temperatura na qual os ensaios de reação enzimática foram conduzidos, pois é notório que a imobilização foi capaz de aumentar a estabilidade térmica da enzima. Faria *et al.* (2021) obtiveram um comportamento similar para a FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica-gel, também tendo apontado que a imobilização enzimática proporcionou um ganho na retenção de atividade quando comparada à enzima solúvel. Oliveira *et al.* (2020), que imobilizaram por ligação covalente uma preparação enzimática (Pectinex Ultra SP-L) em quitosana, demonstraram que, na faixa de temperatura de 40 a 60 °C, as enzimas imobilizadas foram capazes de reter entre 74,5 e 85,2 % da atividade enzimática após 3 h de incubação, tendo esta retenção sido superior à observada para as enzimas em sua forma solúvel. Onderková, Bryjak e Polakovič (2007) imobilização FTase de *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-94 em um carreador acrílico, tendo observado para o derivado enzima-suporte formado uma retenção da atividade de transfrutoseilação próxima a 100% após 1 hora de incubação sob temperaturas entre 20 e 50 °C.

Os parâmetros ajustados por meio da regressão não linear do modelo de Sadana e Henley (Equação (12)), realizada com o auxílio de ferramenta computacional constam na Tabela 14.

Tabela 14 – Parâmetros do modelo de Sadana e Henley ajustados para a FTase solúvel (S) e imobilizada (I)

Parâmetro	Temperatura (°C)			
	30	40	50	60
I				
α	0,472 ± 0,0071	0,404 ± 0,0084	0,371 ± 0,0081	0,297 ± 0,039
k_d	0,231 ± 0,0077	0,235 ± 0,0081	0,272 ± 0,0086	0,412 ± 0,060
R^2	0,99	0,98	0,98	0,97
S				
α	0,130 ± 0,019	0,173 ± 0,023	0,189 ± 0,037	0,128 ± 0,015
k_d	0,234 ± 0,012	0,356 ± 0,025	0,450 ± 0,055	0,483 ± 0,023
R^2	0,99	0,99	0,98	0,99

Fonte: do autor.

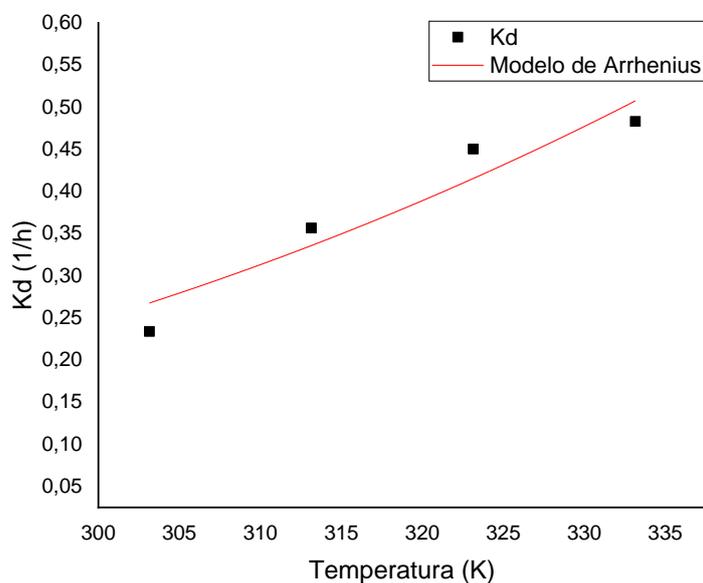
O perfil das curvas de desativação térmica da Figura 12 e da Figura 13, os coeficientes de determinação (R^2) da Tabela 14 e os baixos desvios para os parâmetros ajustados, indicam que o modelo de Sadana e Henley apresentou um ajuste satisfatório aos dados experimentais.

O aumento da temperatura, tanto para a FTase solúvel quando imobilizada, acarretou um aumento na constante de desnaturação térmica. As reações enzimáticas podem ser divididas em duas etapas, sendo a primeira conhecida como “ativação por temperatura” e a segunda conhecida como “inativação por temperatura” ou “desnaturação térmica”. A desnaturação da enzima pela temperatura é consideravelmente mais alta que a ativação térmica, pois a energia de ativação térmica é menor que a energia de desnaturação térmica. Um aumento na temperatura favorece tanto a ativação quanto a desnaturação, contudo favorece de maneira mais acentuada a última. Por conta disso, de acordo com a equação de Arrhenius, quanto maior a temperatura, maior a constante de desativação térmica (k_d) da enzima (SHULER; KARGI, 2002).

O parâmetro α da equação de Sadana e Henley (1987) representa a razão entre a atividade específica do estado final e a inicial da enzima e descreve o nível de estabilização da atividade enzimática. Este modelo considera uma atividade específica diferente de zero no estado final da enzima e como o estado final da FTase após 24 h de incubação tem alguma atividade residual, a cinética clássica de inativação de primeira ordem não se ajusta (SADANA; HENLEY, 1987). Desta forma foi possível notar pelos valores de α e pelos gráficos da Figura 12 e da Figura 13, tanto para a FTase solúvel quando imobilizada, que ao término das 24 h de imobilização ainda havia atividade enzimática residual e que a atividade residual da FTase imobilizada no bagaço de cana-de-açúcar foi maior que a atividade residual encontrada para a FTase solúvel, em suas respectivas temperaturas.

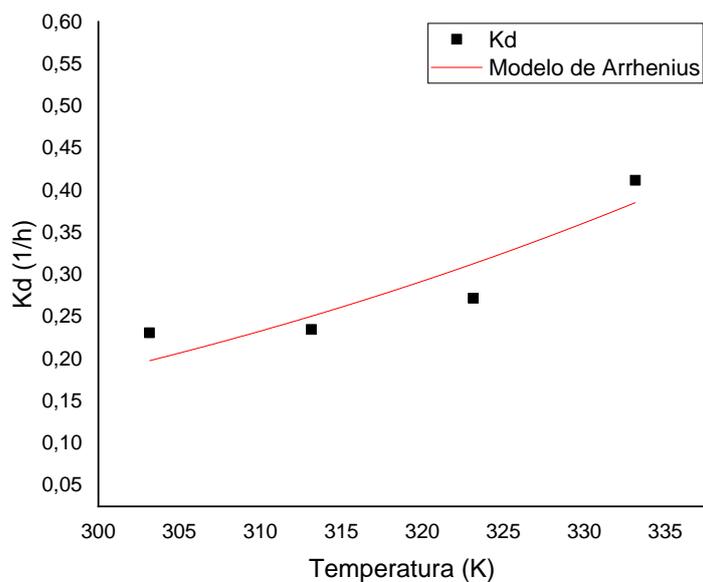
Com os valores obtidos para as constantes de desnaturação térmica foi possível realizar a regressão não linear do modelo de Arrhenius tanto para a FTase solúvel (Figura 14) quanto para a FTase imobilizada (Figura 15). Os ajustes encontram-se abaixo:

Figura 14 – Ajuste do modelo de Arrhenius para obtenção dos parâmetros termodinâmicos da FTase solúvel



Fonte: do autor.

Figura 15 – Ajuste do modelo de Arrhenius para obtenção dos parâmetros termodinâmicos da FTase imobilizada no bagaço de cana-de-açúcar *in natura*



Fonte: do autor.

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos para a regressão não linear do modelo de Arrhenius para a FTase solúvel e imobilizada foram de 0,86 e 0,82, respectivamente, demonstrando um ajuste satisfatório do modelo.

Os parâmetros ajustados foram utilizados na construção dos modelos de desativação térmica da FTase solúvel e imobilizada, conforme Equações (29) e (30):

$$(k_d)_{FTase\ solúvel} = 326,88 \times e^{(-17915/RT)} \quad (29)$$

$$(k_d)_{FTase\ imobilizada} = 325,92 \times 10^7 \times e^{(-18668/RT)} \quad (30)$$

Finalmente, com as constantes de desativação térmica (Tabela 14) e energias de desativação térmica obtidas por meio regressão não linear do modelo de Arrhenius, foi possível obter para a FTase solúvel e imobilizada: tempo de meia vida ($t_{1/2}$), fator de estabilidade (FE) e as variações de entalpia (ΔH_D), da energia de Gibbs (ΔG_D) e da entropia (ΔS_D) de ativação para a desnaturação térmica enzimática. Os valores são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Parâmetros termodinâmicos para a FTase solúvel (S) e imobilizada (I)

Parâmetro	Temperatura (°C)							
	30		40		50		60	
	(S)	(I)	(S)	(I)	(S)	(I)	(S)	(I)
k_d (h ⁻¹)	0,234	0,231	0,356	0,235	0,450	0,272	0,483	0,412
$t_{1/2}$ (h)	3,657	12,708	2,603	7,763	2,129	5,818	1,764	3,005
FE	3,475		2,983		2,733		1,703	
E_D (kJ.mol ⁻¹)	17,915	18,667	17,915	18,667	17,915	18,667	17,915	18,667
ΔH_D (kJ.mol ⁻¹)	15,395	16,147	15,311	16,063	15,228	15,980	15,145	15,897
ΔG_D (kJ.mol ⁻¹)	77,949	77,978	79,507	80,589	81,502	82,853	83,915	84,353
ΔS_D (kJ.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	-0,206	-0,204	-0,206	-0,205	-0,207	-0,205	-0,206	-0,205

Fonte: do autor.

Com base nos valores dos parâmetros da Tabela 15 foi observado que o tempo

de meia vida ($t_{1/2}$) foi maior para a FTase imobilizada, quando comparada com a FTase solúvel, em todas as temperaturas. O tempo de meia vida é aquele no qual a enzima perde 50 % da sua atividade inicial sob uma determinada temperatura e quanto maior o tempo de meia vida, maior a resistência da enzima à inativação térmica, pois o biocatalisador pode suportar uma determinada temperatura por mais tempo (SOUZA *et al.*, 2015). O tempo de meia vida é um parâmetro importante no que diz respeito à aplicação da enzima em um bioprocessamento, pois quanto maior a meia vida da enzima, maior a termoestabilidade e, conseqüentemente, o ganho econômico (SOUZA *et al.*, 2015). Devido à imobilização enzimática, o aumento foi significativo para todas as temperaturas estudadas, tendo o tempo de meia vida aumentado em mais de 9 h na temperatura de 30 ° C.

A tendência do tempo de meia vida, tanto para FTase imobilizada quanto para a solúvel foi de decaimento com o aumento da temperatura, levando a desnaturação irreversível no biocatalisador (FARIA *et al.*, 2021). O decaimento deste parâmetro foi claramente mais acentuado para o tempo de meia vida da enzima imobilizada quando comparada com a enzima solúvel. Esta tendência indicou que a desnaturação da FTase extracelular ocorre mais rapidamente com o aumento da temperatura e é mais acentuada para a enzima imobilizada quando comparada à enzima solúvel.

Uma análise mais aprofundada da estabilidade térmica enzimática deve levar em consideração um fator que correlacione os tempos de meia vida da enzima imobilizada e solúvel que é o fator de estabilidade (FE) (SOUZA *et al.*, 2015). Com base neste fator, é possível afirmar que a FTase imobilizada apresentou estabilidade de 3,47, 2,98, 2,73 e 1,70 vezes maior do que a estabilidade da enzima solúvel em relação as temperaturas de 30 ° C, 40 ° C, 50 ° C e 60 ° C, respectivamente. Faria *et al.* (2021), ao imobilizarem FTase de *A. oryzae* IPT-301 em sílica-gel obtiveram o máximo fator de estabilidade de 2,5, para a temperatura de 30 ° C. Desta forma, é possível afirmar que a imobilização desta mesma enzima em bagaço de cana-de-açúcar produziu um derivado enzima-suporte com maior termoestabilidade comparado ao derivado FTase-sílica-gel. Aguiar-Oliveira e Maugeri (2011) imobilizaram FTase extracelular de *Rhodotorula sp.* em minério de e obtiveram um fator de estabilidade equivalente a 4 na temperatura de 50 ° C, tendo comprovado o aumento da termoestabilidade da enzima devido à imobilização.

A energia de ativação de desnaturação térmica (E_D) é a quantidade mínima de

energia que deve ser fornecida à enzima para que sejam desnaturadas irreversivelmente. Desta forma, quão maior a energia de ativação de desnaturação térmica, maior a termoestabilidade enzimática (SAQIB *et al.*, 2010). A imobilização proporcionou um aumento de $17,915 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (FTase solúvel) para $18,667 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (FTase imobilizada) na energia de ativação de desnaturação térmica. Isto evidencia a melhoria da termoestabilidade da enzima imobilizada, pois para que a proteína seja desnaturada, será requerida uma quantidade de energia térmica maior (FARIA *et al.*, 2021).

A análise dos parâmetros termodinâmicos obtidos também indicou a melhoria na termoestabilidade da enzima devida à imobilização. A E_D está diretamente relacionado à entalpia para a ativação da desnaturação (ΔH_D), que é um parâmetro termodinâmico associado à quantidade total de energia necessária para desnaturar a enzima (SOUZA *et al.*, 2015). Para todas as temperaturas avaliadas, a variação da entalpia de ativação para a desnaturação térmica (ΔH_D) apresentou valores maiores para a FTase extracelular imobilizada quando comparados com os valores obtidos para a enzima solúvel. Valores mais altos para a variação da entalpia de ativação para a desnaturação térmica (ΔH_D) também sugerem um aumento na termoestabilidade enzimática (GARCIA *et al.*, 2021; SAQIB *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015).

A desnaturação térmica da enzima também depende a entropia de ativação de desnaturação (ΔS_D), que expressa a quantidade de energia por unidade de temperatura envolvida na transição do estado ativo para o estado inativo (SAQIB *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015). Os valores de ΔS_D para a FTase extracelular livre e imobilizada apresentaram resultados negativos em todas as temperaturas avaliadas. Isto demonstra uma redução do grau de aleatoriedade da estrutura da enzima ocasionada pela desnaturação (FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2021; RASHID; SIDDIQUI, 1998). 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 a interações polares enfraquecidas em altas temperaturas (SIDDIQUI *et al.*, 1997).

Entre os parâmetros termodinâmicos associados à desnaturação térmica enzimática a energia livre de Gibbs (ΔG_D) é o parâmetro mais preciso e confiável para

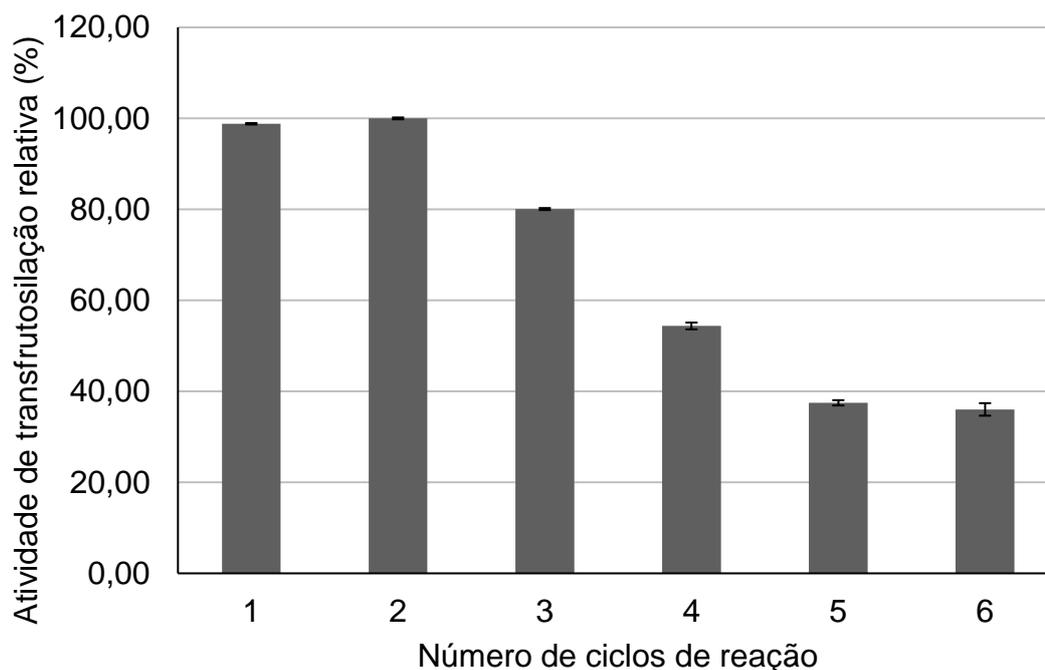
avaliar a avaliação da estabilidade térmica, por considerar simultaneamente as contribuições entálpica e entrópica (SOUZA *et al.*, 2015). Segundo Damodaran (2005), maiores valores de energia de Gibbs (ΔG_D) são indicativos de uma maior termoestabilidade enzimática, proporcionando um aumento na resistência da enzima à desnaturação térmica. Os valores de ΔG_D positivos obtidos indicam que, no equilíbrio, a concentração da enzima no estado ativo é maior que no estado desnaturado e, portanto, o processo não é espontâneo durante a transição de estado (FARIA *et al.*, 2021).

Faria *et al.* (2021) avaliaram a estabilidade térmica do derivado enzima-suporte produzido imobilizando FTase de *A. oryzae* IPT-301 em sílica-gel e também obtiveram resultados satisfatórios, tendo identificado um aumento na termoestabilidade da enzima imobilizada quando comparada à enzima solúvel, avaliando os mesmos parâmetros que foram apresentados nos parágrafos anteriores.

5.4.3 Estabilidade operacional e avaliação do reuso da FTase imobilizada

Os ensaios de estabilidade operacional foram executados para a avaliação do potencial de reutilização do derivado enzima-suporte. O procedimento foi executado de acordo com o exposto no Tópico 4 até o sexto ciclo batelada consecutivo e os resultados estão dispostos na Figura 16.

Figura 16 – Estabilidade operacional da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* 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. A atividade máxima de transfrutoseilação (7,33 ± 0,74 U g⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: do autor.

A análise do gráfico da Figura 16 indicou que nos dois primeiros ciclos de reação a atividade enzimática foi próxima aos 100 %, apresentando queda no terceiro (80 %) e quarto (54 %) ciclos, tendo mantido uma tendência de estabilidade no quinto (37 %) e sexto ciclo (36 %).

Alguns fatores podem explicar a queda na atividade enzimática, como por exemplo a possibilidade de as filtrações à vácuo sucessivas poderem ter ocasionado arraste da enzima e a perda de massa de derivado enzima-suporte durante as transferências ocorridas do meio de filtração para o meio reacional (FARIA *et al.*, 2021; SUGAHARA; VARÉA, 2014).

Os resultados obtidos evidenciam que nos dois primeiros ciclos operacionais consecutivos a FTase imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* pode ser

utilizada sem perdas na atividade e que até o sexto ciclo sua utilização ocorrerá com menor atividade enzimática, apresentando quedas gradativas após cada ciclo reacional. Para o quinto e sexto ciclo o derivado retém 37 e 36 % da atividade enzimática, respectivamente. Isso é um bom indicativo, visto que a enzima solúvel pode ser utilizada uma única vez no processo e sua produção envolve vários custos (SOUZA *et al.*, 2017). O derivado enzima-suporte produzido é capaz de reter atividade enzimática por 6 ciclos batelada consecutivos ao passo que a enzima solúvel retém apenas 45 % da atividade inicial decorridas 9 horas, conforme reportado por Silva *et al.* (2021).

A maior queda de atividade observada após o segundo ciclo operacional sugere que enzimas adsorvidas na superfície externa do suporte podem ter sido inicialmente removidas, enquanto enzimas adsorvidas no interior da matriz porosa permaneceram aderidas (FARIA *et al.*, 2021). Entre os ciclos operacionais 5 e 6 não foi observada uma queda expressiva na atividade enzimática relativa. Uma vez que várias interações, como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, ligações iônicas, podem simultaneamente possibilitar a adsorção da enzima na superfície do suporte (SOUZA *et al.*, 2017), a estabilização da atividade enzimática relativa pode estar associada à dessorção da enzima imobilizada por interações mais fracas, ocorrida entre os ciclos iniciais (de 1 a 4) e nos últimos ciclos (5 e 6) a atividade remanescente ser devida às enzimas que foram imobilizadas por interações mais fortes.

A imobilização é um etapa fundamental para a utilização de enzimas em processos contínuos (CANILHA; CARVALHO, 2006; SOUZA *et al.*, 2017). A possibilidade de reuso do biocatalisador implica em uma vantagem econômica, pois mesmo com quedas no potencial catalítico, a reutilização promove economia de recursos como tempo e insumos para o preparo de uma nova batelada de biocatalisador, culminando com uma redução de custos e se transformando em um atrativo para bioprocessos industriais (FARIA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2017).

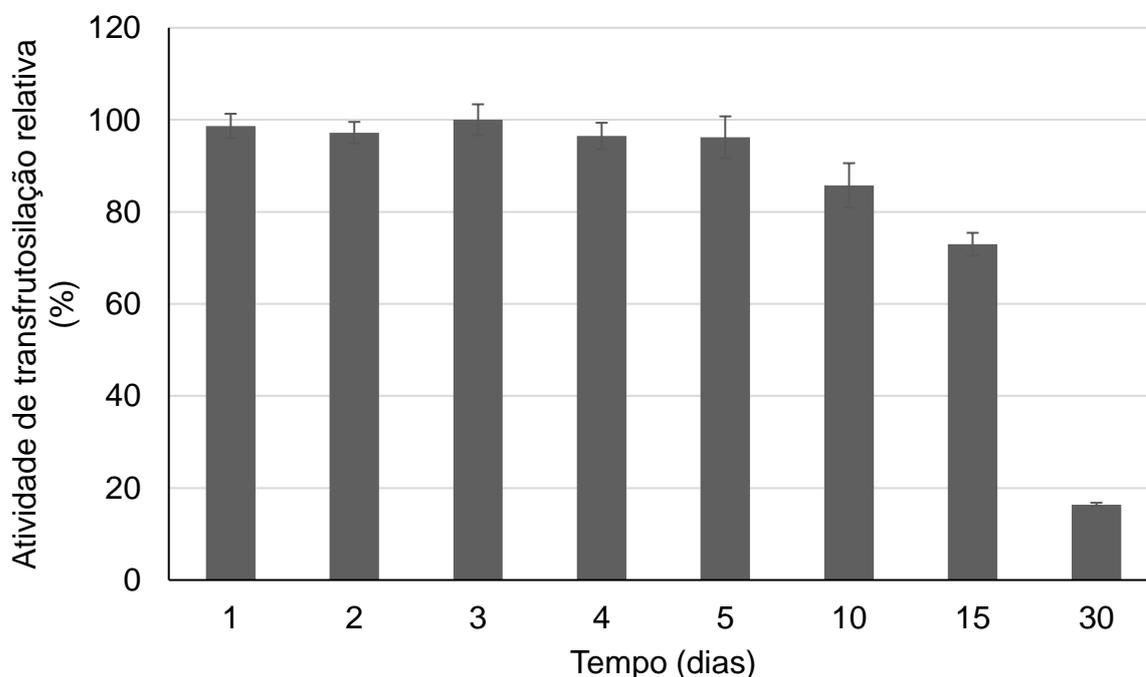
Faria *et al.* (2021) imobilizaram FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 em sílica-gel, obtendo um perfil de estabilidade operacional similar ao apresentado na Figura 16. Os pesquisadores reportaram uma atividade de transfrutoseilação relativa próxima aos 100 % nos dois primeiros ciclos reacionais e de cerca de 45 % nos 3 ciclos de reação seguintes, tendo finalizado o sexto e último ciclo com uma atividade remanescente equivalente a 33 %. Oliveira *et al.* (2020) imobilizaram por ligação

covalente uma preparação enzimática (Pectinex Ultra SP-L) em quitosana, tendo reportado que o derivado enzima-suporte apresentou boa estabilidade operacional, sendo capaz de reter após o terceiro ciclo operacional 73,9 % da atividade de transfrutoseilação inicial.

5.4.4 Estabilidade de armazenamento da FTase imobilizada

O ensaio de estabilidade de armazenamento foi realizado conforme procedimento descrito no Tópico 4.5.4 e os resultados obtidos estão dispostos na Figura 17.

Figura 17 – Estabilidade de armazenamento da FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. 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. A atividade máxima de transfrutoseilação para o derivado enzima-suporte ($4,62 \pm 0,51$ U g⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa



Fonte: do autor.

Os 5 primeiros dias de armazenamento do derivado enzima-suporte não influenciaram fortemente a atividade enzimática do biocatalisador. Os ensaios de

atividade conduzidos resultaram em atividades de transfrutoseilação próximas à 100 %, estando entre 96,1 % (5 dias de armazenamento) e 100 % da atividade inicial (3 dias de armazenamento).

Com o aumento dos intervalos de tempo entre os ensaios de reação foi observada uma queda mais acentuada na atividade enzimática da FTase imobilizada. Após 10 e 15 dias de imobilização, foram obtidas atividades de transfrutoseilação iguais a 87 % e 74 % da atividade inicial, respectivamente. Após 30 dias de armazenamento, o derivado enzima-suporte reteve apenas 17 % da atividade inicial.

A estabilidade de armazenamento mostrou-se elevada para os 15 primeiros dias avaliados. O derivado enzima-suporte apresentou atividades relativas próximas a 100 % nos 5 primeiros dias de armazenamento e retenção de mais de 70 % da atividade enzimática inicial até com 15 dias de armazenamento. Decorridos 30 dias foi observada uma perda significativa da atividade enzimática do derivado enzima-suporte, tornando menos atrativa a sua utilização em um bioprocessos para a produção de FOS.

De acordo com Silva *et al.* (2021), a FTase solúvel de *A. oryzae* IPT-301 apresenta apenas 45,6 % da sua atividade inicial após 9 h de armazenamento. Neste aspecto, é possível afirmar que a imobilização desta mesma enzima no bagaço de cana-de-açúcar aumentou substancialmente a estabilidade de armazenamento.

Oliveira *et al.* (2020) imobilizaram por ligação covalente uma preparação enzimática (Pectinex Ultra SP-L) em quitosana, tendo obtido uma retenção de atividade de transfrutoseilação equivalente a 80,7 % após 45 dias de armazenamento a 4 ° C. Platková *et al.* (2006) imobilizaram FTase extracelular de *Aureobasidium pullulans* em diversos suportes tendo obtido para os derivados produzidos imobilizando a enzima em Dowex Marathon MSA e Amberlite IRA 900 atividades enzimáticas da ordem de 95 e 99 % da atividade inicial, respectivamente, após 30 dias de armazenamento.

6 CONCLUSÕES

Partículas de bagaço cana-de-açúcar, com granulometria entre 425 µm e 600 µm, foram avaliadas como suporte para imobilização da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301.

As partículas de bagaço cana-de-açúcar na granulometria especificada apresentaram área superficial específica BET de 1,31 m².g⁻¹, volume médio de poros entre 17 Å e 3000 Å de 431×10⁻³ cm³.g⁻¹ e diâmetro médio de poros de 20,408 Å.

Os ensaios de imobilização (35 °C, 175 rpm, pH = 5,5, 8 h) indicaram que a FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 foi imobilizada no bagaço de cana-de-açúcar tendo apresentando um rendimento de imobilização médio de 46,61 % e atividade recuperada de 11,20 %.

O estudo cinético da enzima realizado apontou que tanto o modelo michaeliano quanto o modelo de Hill explicam bem a cinética enzimática do derivado enzima-suporte produzido, tendo as maiores taxas de reação sido atingidas com a concentração de sacarose de 600 g.L⁻¹.

Quanto a estabilidade frente ao pH, após incubação por 24 h, a imobilização aumentou a faixa de estabilidade da FTase, quando comparada com a literatura, permanecendo com atividades relativas superiores a 56,5 % em toda a faixa de pH investigada.

A termoestabilidade da FTase também aumentou com o processo de imobilização, de modo que o tempo de meia vida da enzima foi maior em até 3,47 vezes para o estudo de estabilidade térmica à temperatura de 30 °C., o que significa um ganho de tempo de meia vida equivalente à 9 h.

A avaliação da estabilidade operacional do derivado enzima-suporte produzido indicou a viabilidade de reutilização da FTase imobilizada, sem perda significativa da atividade de transfrutoseilação, por até dois ciclos. No terceiro ciclo a perda obtida foi de cerca de 20 % com relação aos ciclos iniciais tendo a atividade relativa no sexto e último ciclo atingido o valor de 36 % da atividade de transfrutoseilação relativa. Este resultado torna o derivado enzima-suporte produzido atrativo, uma vez que a imobilização possibilita a reutilização da enzima.

O derivado enzima-suporte produzido apresentou alta estabilidade de armazenamento por até 5 dias (atividades de transfrutossilacção relativas próximas à 100 % da atividade inicial) e estabilidade de armazenamento considerável por até 15 dias (atividades de transfrutossilacção relativas entre 74 e 87 % da atividade inicial), tendo apresentado no trigésimo dia de armazenamento uma atividade de transfrutossilacção relativa de 17 % da atividade de transfrutossilacção inicial.

Por meio de um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), foram determinadas as melhores condições de reacção para a enzima imobilizada, sendo 51,37 °C e pH de 5,49. Estes valores para as variáveis independentes são os que geraram a melhor resposta para a atividade de transfrutossilacção do derivado enzima-suporte produzido.

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) indicou a imobilização da FTase extracelular no bagaço de cana-de-açúcar.

Neste sentido, foi possível concluir que por meio da imobilização da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 utilizando em bagaço de cana-de-açúcar como suporte foi possível produzir um derivado enzima-suporte ativo e estável das condições de processo adotadas. Os ensaios de caracterização enzimática apresentaram resultados que justificam a implementação do derivado enzima-suporte desenvolvido para ser aplicado em reatores com diferentes configurações. Este trabalho viabilizou a transformação de um resíduo agroindustrial de baixo custo em um derivado enzima-suporte potencial e com maior valor agregado.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Funcionalizar o bagaço de cana-de-açúcar para investigação do efeito do pré-tratamento na atividade recuperada, parâmetros de imobilização e estabilidade enzimática.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 363–372, 2011. DOI: 10.1590/S0104-66322011000300002.
- AGUIAR-OLIVEIRA, Elizama; MAUGERI, Francisco. Characterization of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 6, n. 3, 2010. DOI: 10.2202/1556-3758.1894.
- AGUIAR DE OLIVEIRA, Elizama. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. 2007. [S. l.], 2007.
- ALMÉCIGA-DÍAZ, Carlos J.; GUTIERREZ, Ángela M.; BAHAMON, Isabella; RODRÍGUEZ, Alexander; RODRÍGUEZ, Mauro A.; SÁNCHEZ, Oscar F. Computational analysis of the fructosyltransferase enzymes in plants, fungi and bacteria. **Gene**, [S. l.], v. 484, n. 1–2, p. 26–34, 2011. DOI: 10.1016/j.gene.2011.05.024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2011.05.024>. Acesso em: 6 nov. 2021.
- ALVARADO-HUALLANCO, Mónica B.; MAUGERI-FILHO, Francisco. Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 85, n. 12, p. 1654–1662, 2010. DOI: 10.1002/jctb.2477.
- AMIN, Hala A.; SECUNDO, Francesco; AMER, Hassan; MOSTAFA, Faten A.; HELMY, Wafaa A. Improvement of *Aspergillus flavus* saponin hydrolase thermal stability and productivity via immobilization on a novel carrier based on sugarcane bagasse. **Biotechnology Reports**, [S. l.], v. 17, p. 55–62, 2018. DOI: 10.1016/j.btre.2017.12.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.12.007>. Acesso em: 6 nov. 2021.
- ANTOŠOVÁ, Monika; ILLEOVÁ, Viera; VANDÁKOVÁ, Marcela; DRUŽKOVSKÁ, Alexandra; POLAKOVIČ, Milan. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 135, n. 1, p. 58–63, 2008. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.02.016.
- ARAÚJO, Isabella M.; PRADO, José P. Z.; JÚNIOR, Leandro D. R. S.; XAVIER, Michelle C. A.; MORALES, Sergio A. V.; PERNA, Rafael F. Avaliação dos parâmetros de imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em diversos suportes. In: WENDEQ - I WEB ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA QUÍMICA 2021, **Anais** [...]. [s.l.: s.n.] p. 7. DOI: 10.29327/138535.1-51. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/wendeq2021/345476-avaliacao-dos-parametros-de-imobilizacao-da-enzima-frutossiltransferase-extracelular-de-aspergillus-oryzae-ipt-301/>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- BARRETT, Elliott P.; JOYNER, Leslie G.; HALENDA, Paul P. The Determination of

Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 373–380, 1951. DOI: 10.1021/ja01145a126.

BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Humana Press, 1997. v. 4

BRADY, Dean; JORDAAN, Justin. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 2009. DOI: 10.1007/s10529-009-0076-4.

BRENDA. 2020. Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org/>. Acesso em: 2 jan. 2021.

BRÍGIDA, Ana I. S.; PINHEIRO, Álvaro D. T.; FERREIRA, Andrea L. O.; GONÇALVES, Luciana R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 146, n. 1–3, p. 173–187, 2008. DOI: 10.1007/s12010-007-8072-4.

BRUNAUER, Stephen; EMMETT, P. H.; TELLER, Edward. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 309–319, 1938. DOI: 10.1021/ja01269a023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236116310481>. Acesso em: 6 nov. 2021.

CAETANO, Brunno F. R.; DE MOURA, Nelci A.; ALMEIDA, Ana P. S.; DIAS, Marcos C.; SIVIERI, Kátia; BARBISAN, Luís F. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: Health-promoting benefits of fructooligosaccharides. **Nutrients**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 436, 2016. DOI: 10.3390/nu8070436. Disponível em: <https://doaj.org/article/f700c976fbcf457388d2383476be771b?gathStatlcon=true>. Acesso em: 21 maio. 2021.

CANILHA, Larissa; CARVALHO, Walter De. Biocatalisadore Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biociência & Desenvolvimento**, [S. l.], v. 9, n. 36, p. 48–57, 2006.

CATANA, R.; ELOY, M.; ROCHA, J. R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S.; FERNANDES, P. Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 260–266, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.01.042.

CATENZA, K. F.; DONKOR, K. K. Recent approaches for the quantitative analysis of functional oligosaccharides used in the food industry: A review. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 355, p. 129416, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129416. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129416>. Acesso em: 27 jan. 2022.

CEZAR, Mario; RODRIGUES, Mano; NERI-NUMA, Iramaia Angélica; BUENO, Juliana; PAULINO, Bruno Nicolau; PESSOA, Marina Gabriel; PASTORE, Gláucia Maria. Oligosaccharide biotechnology : an approach of prebiotic revolution on the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 17–37,

2017.

CHEN, Wen Chang; LIU, Chi Hsien. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 153–160, 1996. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00099-2.

CHIANG, Chung Jen; LEE, Wen Chien; SHEU, Dey Chyi; DUAN, Kow Jen. Immobilization of β -fructofuranosidases from *Aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 577–582, 1997. DOI: 10.1021/bp970067z.

CHOUKADE, Ritumbhara; KANGO, Naveen. Production, properties, and applications of fructosyltransferase: a current appraisal. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 1–25, 2021. DOI: 10.1080/07388551.2021.1922352. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1922352>. Acesso em: 6 nov. 2021.

COELHO, Maria Alice Zarur; SALGADO, Andrea Medeiros; RIBEIRO, Bernardo Dias. **Tecnologia Enzimática**. 1. ed. Petrópolis: EPUB, 2008. v. 1 Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=3Bay-65s-WYC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_atb#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 31 dez. 2020.

CUERVO FERNANDEZ, Rubén et al. Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 75, n. 1, p. 87–93, 2007. a. DOI: 10.1007/s00253-006-0803-x.

CUERVO FERNANDEZ, Rubén et al. Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 75, n. 1, p. 87–93, 2007. b. DOI: 10.1007/s00253-006-0803-x.

CUERVO FERNÁNDEZ, Rubén; MARESMA, Beatriz Guilarte; JUÁREZ, Antonio; MARTÍNEZ, Josefina. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 79, n. 3, p. 268–272, 2004. DOI: 10.1002/jctb.967.

CUNHA, Josivan. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de frutooligossacarídeos**. 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1022>. Acesso em: 6 out. 2020.

CUNHA, Josivan S.; OTTONI, Cristiane A.; MORALES, Sergio A. V.; SILVA, Elda S.; MAIORANO, Alfredo E.; PERNA, Rafael F. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* ipt-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 657–668, 2019. a. DOI: 10.1590/0104-6632.20190362s20180572. Disponível em: www.abeq.org.br/bjche. Acesso em: 6 nov. 2021.

DA SILVA, Jean Constantino Gomes. Estudo dos parâmetros cinéticos da pirólise do bagaço de cana-de-açúcar. *[S. l.]*, p. 120, 2017.

DALLA-VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria Da Graça; SOLDI, Valdir. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Química Nova**, *[S. l.]*, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004. DOI: 10.1590/s0100-40422004000400017.

DAMODARAN, Srinivasan. Protein: Denaturation. *In*: HUI, Y. H. (org.). **Handbook of food science, technology, and engineering**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. v. 1p. 116–129. DOI: <https://doi.org/10.1201/b15995>.

DEREWENDA, Urszula; DEREWENDA, Zygmunt S.; BRZOZOWSKI, Andrzej M.; LAWSON, David M. Catalysis at the Interface: The Anatomy of a Conformational Change in a Triglyceride Lipase. **Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 31, n. 5, p. 1532–1541, 1992. DOI: 10.1021/bi00120a034.

DOMINGUEZ, Ana Luísa; RODRIGUES, Lígia Raquel; LIMA, Nelson Manuel; TEIXEIRA, José António. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. **Food and Bioprocess Technology**, *[S. l.]*, v. 7, n. 2, p. 324–337, 2014. DOI: 10.1007/s11947-013-1221-6.

FARIA, Larissa Lemos. **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) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2019. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1343>. Acesso em: 6 out. 2020.

FARIA, Larissa Lemos; MORALES, Sergio Andres Villalba; PRADO, José Pedro Zanetti; DIAS, Giancarlo de Souza; DE ALMEIDA, Alex Fernando; XAVIER, Michelle da Cunha Abreu; DA SILVA, Elda Sabino; MAIORANO, Alfredo Eduardo; PERNA, Rafael Firmani. Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, *[S. l.]*, v. 43, n. 1, p. 43–59, 2021. DOI: 10.1007/s10529-020-03016-7.

FLORES-MALTOS, Abril; MUSSATO, Solange I.; CONTRERAS-ESQUIVEL, Juan C.; RODRÍGUEZ, Raul; TEIXEIRA, Jose A.; AGUILAR, Cristobal N. Green Bio-processes. *In*: **Green Bio-processes**. Singapore: Springer, 2019. p. 345–355. DOI: 10.1007/978-981-13-3263-0. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3263-0>. Acesso em: 6 out. 2020.

GANAIE, Mohd Anis; GUPTA, Uma Shanker; KANGO, Naveen. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, *[S. l.]*, v. 97, p. 12–17, 2013. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.07.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.07.008>. Acesso em: 6 out. 2020.

GANAIE, Mohd Anis; LATEEF, Agbaje; GUPTA, Uma Shanker. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 172, n. 4, p. 2143–2159, 2014. DOI: 10.1007/s12010-013-

0661-9.

GARCIA, R. L.; DIAS, G. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; TARDIOLI, P. W.; PERNA, R. F. Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 273–285, 2021. DOI: 10.1007/s43153-021-00110-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43153-021-00110-9>. Acesso em: 6 out. 2020.

GONÇALVES, Heloísa Bressan; JORGE, João Atilio; HENRIQUE, Luis; GUIMARÃES, Souza. Immobilization of *Fusarium graminearum* β -D-fructofuranosidase Using Alternative Cellulosic Supports: Stabilization and Production of Fructooligosaccharides. **Food Sci. Biotechnol**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 1429–1435, 2015. DOI: 10.1007/s10068-015-0183-z.

GONÇALVES, Maria Carolina P.; MORALES, Sergio A. V.; SILVA, Elda S.; MAIORANO, Alfredo E.; PERNA, Rafael F.; KIECKBUSCH, Theo G. Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 95, n. 9, p. 2473–2482, 2020. DOI: 10.1002/jctb.6429.

GUISAN, M. Jose et al. Immobilization of Enzymes and Cells. In: GUI SAN, Jose M. (org.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 2006. p. 129–141. DOI: 10.1007/978-1-59745-053-9_12. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/226158452>. Acesso em: 6 out. 2020.

HARTEMINK, R.; VAN LAERE, K. M. J.; ROMBOUTS, F. M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 83, n. 3, p. 367–374, 1997. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1997.00239.x.

HAYASHI, Sachio; NONOKUCHI, Masaharu; IMADA, Kiyohisa; UENO, Hideo. Production of a fructosyl-transferring enzyme by *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 395–399, 1990. DOI: 10.1007/BF01578099.

HIDAKA, Hidemasa; HIRAYAMA, Masao; SUMI, Naomi. A Fructooligosaccharide-producing Enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 1181–1187, 1988. DOI: 10.1080/00021369.1988.10868810.

HLADY, Vladimir; BUIJS, Jos. Adsorption on Solid Surfaces. **Current Opinion in Structural Biology**, [S. l.], v. 7, p. 499–542, 1996. DOI: 10.1007/978-3-662-04352-3_10.

IUBMB. 2020. Disponível em: <https://iubmb.org/>. Acesso em: 31 dez. 2020.

JAY, James; LOESSNER, Martin J. M.; GOLDEN, David A. **Modern food microbiology**. 7. ed. New York: Springer, 2005. v. 56

JUNG, Kyung Hoon; YUN, Jong Won; KANG, Kyung Rae; LIM, Jai Yun; LEE, Jae Heung. Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 491–494, 1989. DOI: 10.1016/0141-0229(89)90029-X.

JUSZCZAK, Lesław; FORTUNA, Teresa; WODNICKA, Krystyna. Characteristics of cereal starch granules surface using nitrogen adsorption. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 103–110, 2002. DOI: 10.1016/S0260-8774(01)00190-X.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. 2020. DOI: 10.1093/nar/28.1.27. Disponível em: <https://www.kegg.jp/>. Acesso em: 2 jan. 2021.

KRAJEWSKA, Barbara. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.

KUMAR, Punit; DUBEY, Kashyap Kumar. **Current Perspectives and Future Strategies for Fructooligosaccharides Production Through Membrane Bioreactor**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2019. DOI: 10.1016/b978-0-12-815407-6.00010-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815407-6.00010-1>.

KURAKAKE, M.; ONOUE, T.; KOMAKI, T. Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 45, n. 1–2, p. 236–239, 1996. DOI: 10.1007/s002530050676.

LISPECTOR, Clarice. **A Hora da Estrela**. 23. ed. Rio de Janeiro: ROCCO, 1995.

MAIORANO, Alfredo Eduardo; DA SILVA, Elda Sabino; PERNA, Rafael Firmani; OTTONI, Cristiane Angélica; PICCOLI, Rosane Aparecida Moniz; FERNANDEZ, Rubén Cuervo; MARESMÁ, Beatriz Guilarte; DE ANDRADE RODRIGUES, Maria Filomena. Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 42, n. 12, p. 2619–2629, 2020. DOI: 10.1007/s10529-020-03006-9.

MAIORANO, Alfredo Eduardo; PICCOLI, Rosane Moniz; DA SILVA, Elda Sabino; DE ANDRADE RODRIGUES, Maria Filomena. **Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics** **Biotechnology Letters** Springer, , 2008. DOI: 10.1007/s10529-008-9793-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-008-9793-3>. Acesso em: 17 abr. 2021.

MALDONADE, Iriani R.; CARVALHO, Patrícia G. B.; FERREIRA, Nathalie A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNSEmbrapa - Comunicado Técnico**, 2013. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/81580/1/cot-85.pdf>.

MARCONI, Walter. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. **Reactive Polymers**, [S. l.], v. 11, n. C, p. 1–19, 1989.

DOI: 10.1016/0923-1137(89)90078-X.

MATEO, Cesar; PALOMO, Jose M.; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; GUIBAN, Jose M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MIRANDA, Jéssica S.; SILVA, Natália C. A.; BASSI, Jaqueline J.; CORRADINI, Maria C. C.; LAGE, Flávia A. P.; HIRATA, Daniela B.; MENDES, Adriano A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous polyhydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 251, p. 392–403, 2014. DOI: 10.1016/j.cej.2014.04.087.

MUSSATTO, Solange I.; MANCILHA, Ismael M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 587–597, 2007. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.12.011.

OLIVEIRA, Rodrigo Lira De; SILVA, Marcos Fellipe Da; SILVA, Suzana Pedroza Da; CAVALCANTI, Jorge Vinícius Fernandes Lima; CONVERTI, Attilio; PORTO, Tatiana Souza. Immobilization of a commercial *Aspergillus aculeatus* enzyme preparation with fructosyltransferase activity in chitosan beads: A kinetic/thermodynamic study and fructo-oligosaccharides continuous production in enzymatic reactor. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 122, p. 169–182, 2020. DOI: 10.1016/j.fbp.2020.05.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.05.001>. Acesso em: 6 out. 2020.

ONDERKOVÁ, Z.; BRYJAK, J.; POLAKOVIČ, M. Properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* immobilized on an acrylic carrier. **Chemical Papers**, [S. l.], v. 61, n. 5, p. 359–363, 2007. DOI: 10.2478/s11696-007-0048-x.

OTTONI, C. A.; CUERVO-FERNÁNDEZ, R.; PICCOLI, R. M.; MOREIRA, R.; GUILARTE-MARESMA, B.; DA SILVA, E. Sabino; RODRIGUES, M. F. A.; MAIORANO, A. E. Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 49–59, 2012. DOI: 10.1590/S0104-66322012000100006.

PASSOS, Luciana Maria Liboni; PARK, Yong Kun. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 385–390, 2003. DOI: 10.1590/s0103-84782003000200034.

PAZUR, J. H. Transfructosidation reactions of an enzyme of *Aspergillus oryzae*. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 199, n. 1, p. 217–225, 1952. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)44828-4. Disponível em: <http://www.jbc.org/>. Acesso em: 6 out. 2020.

PERNA, RF; CUNHA, JS; GONCALVES, MCP; BASSO, RC; SILVA, ES;; A.E, Maiorano. 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**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 43–50, 2018.

PLATKOVÁ, Z.; POLAKOVIČ, M.; ŠTEFUCA, V.; VANDÁKOVÁ, M.; ANTOŠOVÁ, M. Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, [S. l.], v. 60, n. 6, p. 469–472, 2006. DOI: 10.2478/s11696-006-0085-x.

QUEIROZ, Monna Lisa B.; DA CONCEIÇÃO, Kennedy C.; MELO, Micael Nunes; SÁNCHEZ, Osmar Calderón; ALVAREZ, Heiddy M.; SOARES, Cleide M. F.; FRICKS, Alini T. Immobilization of horseradish peroxidase on sugarcane bagasse. **Quimica Nova**, [S. l.], v. 41, n. 9, p. 1019–1024, 2018. DOI: 10.21577/0100-4042.20170279. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170279>. Acesso em: 3 jan. 2021.

RASHID, M. H.; SIDDIQUI, K. S. Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified β -glucosidases from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 109–115, 1998. DOI: 10.1016/S0032-9592(97)00036-8.

REIS, Pedro; WITULA, Tomasz; HOLMBERG, Krister. Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme. **Microporous and Mesoporous Materials**, [S. l.], v. 110, n. 2–3, p. 355–362, 2008. DOI: 10.1016/j.micromeso.2007.06.025.

REPORTS AND DATA. **Fructooligosaccharides (FOS) Market Analysis, 2019-2027**. 2020. Disponível em: <https://www.reportsanddata.com/report-detail/fructooligosaccharides-fos-market>. Acesso em: 3 abr. 2021.

REZENDE, Camila Alves; DE LIMA, Marisa; MAZIERO, Priscila; DEAZEVEDO, Eduardo; GARCIA, Wanius; POLIKARPOV, Igor. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–19, 2011. DOI: 10.1186/1754-6834-4-54. Disponível em: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1754-6834-4-54>. Acesso em: 3 jan. 2021.

RF, Perna; PC, Tiosso; LM, Sgobi; AMS, Vieira; MF, Vieira; PW, Tardioli; CMF, Soares; GM, Zanin. Effects of Triton X-100 and PEG on the Catalytic Properties and Thermal Stability of Lipase from *Candida rugosa* Free and Immobilized on Glyoxyl- Agarose. **The open biochemistry journal**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 66–76, 2017. DOI: 10.2174/1874091X01711010066. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29290831/>. Acesso em: 22 ago. 2021.

ROCHA, Rovilson José Da; PEREIRA, Richard Silveira; PRADO, José Pedro Zanetti; MORALES, Sergio Andres Villalba; PERNA, Rafael Firmani; LOPES, Melina Savioli. Imobilização de frutossiltransferase microbiana em bagaço de cana e sabugo de milho para a produção de frutooligossacarídeos. In: WENDEQ - I WEB ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA QUÍMICA 2021, **Anais [...]** [s.l: s.n.] p. 7. DOI:

10.29327/138535.1-49. Disponível em:
<https://www.even3.com.br/anais/wendeq2021/345335-imobilizacao-de-frutosiltransferase-microbiana-em-bagaco-de-cana-e-sabugo-de-milho-para-a-producao-de-frutooligos/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

ROCHA, Martha Suzana Rodrigues dos Santos; ALMEIDA, Renata Maria Rosas Garcia; DA CRUZ, Antonio José Gonçalves. Avaliação Do Potencial Energético De Resíduos Agroindustriais Provenientes De Diferentes Regiões Brasileiras. **Engevista**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 217, 2017. DOI: 10.22409/engevista.v19i1.821.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antônio Francisco. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas - SP: Carita Editora, 2009. v. 1

ROSEVEAR, Alan. Immobilised Biocatalysts - a Critical Review. **Journal of chemical technology and biotechnology. Biotechnology**, [S. l.], v. 34 B, n. 3, p. 127–150, 1984. DOI: 10.1002/jctb.280340302.

SADANA, Ajit; HENLEY, P. James. Single-Step Unimolecular Non-First-Order Enzyme Deactivation Kinetics. **Biotechnnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 30, p. 717–723, 1987. DOI: doi:10.1002/bit.260300604.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, María José; SOTO-JOVER, Sonia; ANTOLINOS, Vera; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, Ginés Benito; LÓPEZ-GÓMEZ, Antonio. Manufacturing of Short-Chain Fructooligosaccharides: from Laboratory to Industrial Scale. **Food Engineering Reviews**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 149–172, 2020. DOI: 10.1007/s12393-020-09209-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09209-0>. Acesso em: 6 out. 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**, [S. l.], v. 40, n. 3–4, p. 1085–1088, 2005. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.03.009.

SAQIB, Abdul A. N.; HASSAN, Madiha; KHAN, Nahida Farooq; BAIG, Shahjahan. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 45, n. 5, p. 641–646, 2010. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.12.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2009.12.011>. Acesso em: 6 out. 2020.

SCHEUFELE, F. B.; RIBEIRO, C.; MÓDENES, A. N.; BERGAMASCO, R.; PEREIRA, N. C. Aplicação do bagaço de cana-de-açúcar como material adsorvente na remoção do corante reativo Azul 5G. *In*: 2015, **Anais [...]**. [s.l.: s.n.] p. 5681–5688. DOI: 10.5151/chemeng-cobeq2014-0891-22778-169487.

SHULER, Michael L.; KARGI, Fikret. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. 2. ed. [s.l.] : Prentice Hall PTR, 2002.

SIDDIQUI, Khawar Sohail; SAQIB, Abdul Aala Najmus; RASHID, Mohammad Hamid;

RAJOKA, Mohammad Ibrahim. Thermostabilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 325–330, 1997. DOI: 10.1023/A:1018342632083.

SILVA, Maria Beatriz Pregnotato de Oliveira 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**, [S. l.], v. 24, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1590/1981-6723.28320.

SOCCOL, Carlos R.; FRANÇA, Luiz R. Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações. *In*: 1. ed. São Paulo - SP: Blucher, 2016. v. 4p. 529–568. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522009000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=. Acesso em: 6 out. 2020.

SOUZA, Livia Teixeira de Andrade; VERÍSSIMO, Lizzy Ayra Alcântara; JOÃO, Benevides Costa Pessela; SANTORO, Marcelo Matos; RESENDE, Rodrigo R.; MENDES, Adriano A. Biotecnologia aplicada a agro&indústria: fundamentos e aplicações. *In*: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2017. p. 529–568.

SOUZA, Paula Monteiro; ALIAKBARIAN, Bahar; FILHO, Edivaldo Ximenes Ferreira; MAGALHÃES, Pérola Oliveira; JUNIOR, Adalberto Pessoa; CONVERTI, Attilio; PEREGO, Patrizia. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 81, p. 17–21, 2015. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.043. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.043>. Acesso em: 6 out. 2020.

STUART, B. .. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications Analytical Techniques in the Sciences**. [s.l.: s.n.].

SUGAHARA, Vanessa Hitomi; VARÉA, Geni da Silva. Immobilization of *Beauveria bassiana* lipase on silica gel by physical adsorption. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 842–850, 2014. DOI: 10.1590/S1516-8913201401358.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-Açúcar**. 2020. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/acucar/>. Acesso em: 26 dez. 2020.

VASCONCELOS, Natália Moura De; PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra; ARAGÃO, Fernando Antônio de Souza. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. **Embrapa**, [S. l.], v. 88, p. 1679–6543, 2013.

VEGA, Roberto; ZÚNIGA-HANSEN, M. E. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 22, p. 10180–10186, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.09.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.025>. Acesso em: 6 out. 2020.

WEISS, James N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 835–841, 1997. DOI: 10.1096/fasebj.11.11.9285481.

XU, Feng; YU, Jianming; TESSO, Tesfaye; DOWELL, Floyd; WANG, Donghai. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. **Applied Energy**, [S. l.], v. 104, p. 801–809, 2013. DOI: 10.1016/j.apenergy.2012.12.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.019>.

XU, Qiangsheng et al. Purification and biochemical characterization of a novel β -fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 50, n. 8, p. 1237–1246, 2015. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.04.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.020>.

YAMASHITA, Kamejiro; KAWAI, Koichi; ITAKURA, Mitsuo. Effects of fructooligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 961–966, 1984. DOI: 10.1016/S0271-5317(84)80075-5.

YANG, Haiping; YAN, Rong; CHEN, Hanping; LEE, Dong Ho; ZHENG, Chuguang. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. [S. l.], 2007. DOI: 10.1016/j.fuel.2006.12.013. Disponível em: www.fuelfirst.com. Acesso em: 16 nov. 2021. Acesso em: 6 out. 2020.

YUN, Jong Won. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 107–117, 1996. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00188-3.

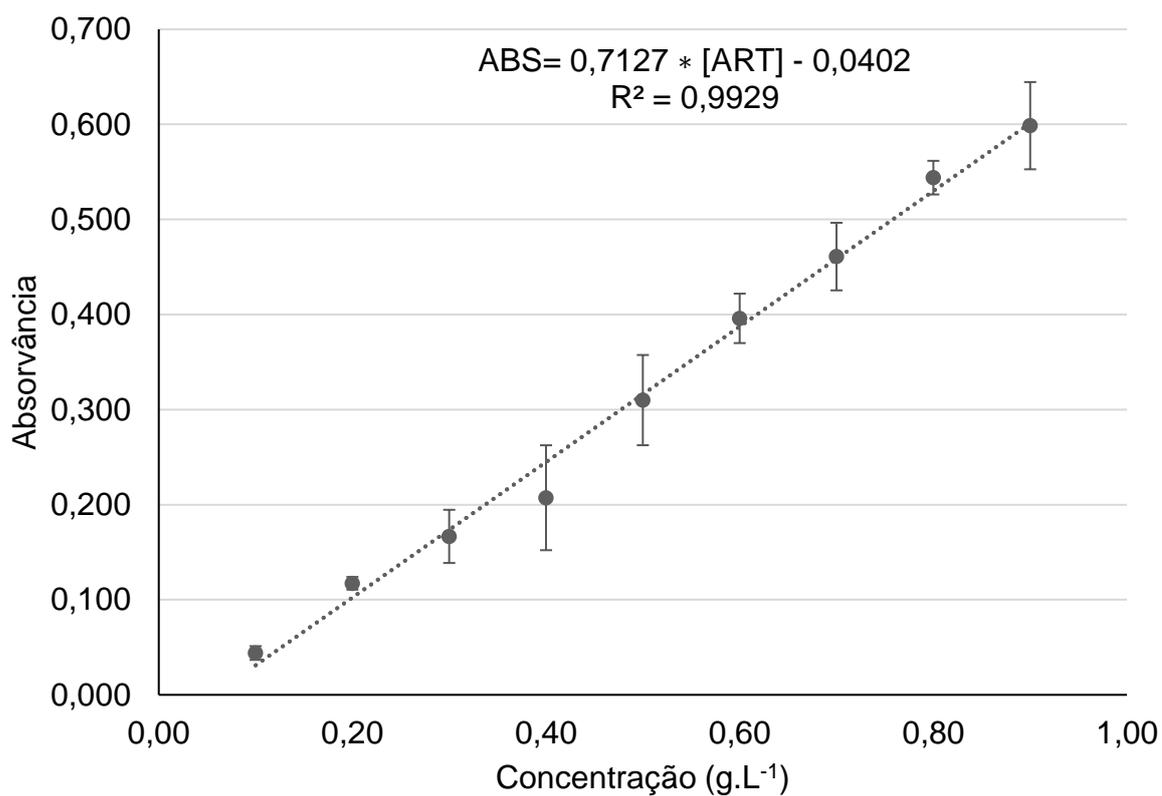
YUN, Jong Won; SONG, Seung Koo. Continuous production of fructooligosaccharides using fructosyltransferase immobilized on ion exchange resin. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 18–21, 1996. DOI: 10.1007/BF02949138.

ZHOU, Zhou; INAYAT, Alexandra; SCHWIEGER, Wilhelm; HARTMANN, Martin. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, [S. l.], v. 154, p. 133–141, 2012. DOI: 10.1016/j.micromeso.2012.01.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.01.003>. Acesso em: 6 out. 2020.

APÊNDICE A – Curva de calibração para o método DNS

O gráfico da Figura 18 apresenta a curva de calibração utilizada para a determinação de açúcares redutores pelo método DNS.

Figura 18 – Curva de calibração para o método DNS



Fonte: do autor.

Os coeficientes da regressão linear acima foram ajustados com o auxílio do software Excel®.

APÊNDICE B – Metodologia de cálculo do fator (f) GOD-PAP®

O cálculo da concentração de glicose descrito no Tópico 4.6.3 depende do fator f . A Tabela 16 exemplifica a determinação do valor de f para um dos kits de reagentes utilizado.

Tabela 16 – Obtenção do fator do método GOD-PAP® (f) para o cálculo da concentração de glicose

AMOSTRA	ABSORVÂNCIA
P1*	0,326
P2*	0,297
P3*	0,437
MÉDIA	0,353
f (g/L)	2,830
f (mmol/L)	15709,655

Fonte: do autor.

* P1, P2, P3 = absorvâncias da solução padrão do kit GOD-PAP®

Para cada novo kit enzimático GOD-PAP®, um novo fator f foi obtido, conforme procedimento descrito no Tópico 4.6.3.