

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ÉRICA DANIELY SANTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM SUPORTES
INORGÂNICOS E SUA APLICAÇÃO COMO BIOCATALISADORES PARA A
PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

Poços de Caldas/MG

2024

ÉRICA DANIELY SANTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM SUPORTES
INORGÂNICOS E SUA APLICAÇÃO COMO BIOCATALISADORES PARA A
PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

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.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna.

Poços de Caldas/MG

2024

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

Santos, Érica Daniely.

Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em suportes inorgânicos e sua aplicação como biocatalisadores para a produção de fruto-oligossacarídeos / Érica Daniely Santos. - Poços de Caldas, MG, 2024.

73 f. : il. -

Orientador(a): Sergio Andres Villalba Morales.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Imobilização. 2. Óxido de titânio. 3. Óxido de alumínio. 4. *Aspergillus oryzae* IPT-301. 5. Fruto-oligossacarídeos. I. Morales, Sergio Andres Villalba, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

ÉRICA DANIELY SANTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Aspergillus Oryzae* IPT-301 EM
SUPPORTES INORGÂNICOS E SUA APLICAÇÃO COMO
BIOCATALISADORES PARA A PRODUÇÃO DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS**

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

Aprovada em: 05 de agosto de 2024.

Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales
Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal do Tocantins-UFT

Profa. Dra. Sara Isabel da Cruz Silvério

Instituição: Universidade do Minho (PT)

Prof. Dr. Marlus Pinheiro Rolemberg

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por Sergio Andres Villalba Morales, Usuário Externo, em 05/08/2024, às 14:51, 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 **1301996** e o código CRC **BF29F1BD**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por toda graça e benção durante esta jornada, e por me conceder saúde necessária para realização do projeto.

Aos meus pais, Clotídio e Rosa, e meus irmãos Reginaldo, Rosineia, José e Fátima, que sempre se puseram a disposição para me auxiliarem, seja de maneira econômica, quanto emocional. Obrigada por confiarem em mim, e por acreditarem em meu potencial.

Ao meu marido, Lucas, quem mais me apoiou durante esta jornada. Agradeço por não me deixar desistir dos meus sonhos, e por sempre ser meu porto seguro quando as coisas nem sempre estão boas. Sem você nada disso seria possível!

Ao meu orientador, Sergio, pela confiança, e que mesmo de longe sempre se fez presente, me fornecendo apoio e conhecimento necessários para meu crescimento e evolução.

Ao meu coorientador, Rafael, que desde 2018 acreditou no meu potencial como pesquisadora. Obrigada pelo suporte durante todos estes anos, e por ser o meu pai na Universidade.

As minhas amigas de pós-graduação: Carol, Crislaine e Elisa, que sempre estiveram presentes, trocando conhecimentos e ajudando quando necessário, e aos amigos de graduação, Andressa, Braulio, Guilherme, Mariana, Lucas e Paula, que permaneceram ao meu lado, tornando tudo mais leve e alegre.

A Bruna, Elisa, Gabriela, Gustavo e Luiz Gustavo, meus alunos de iniciação científica, por todo auxílio durante a realização dos experimentos, e pelos IC's Fábio, Krycia e Samuel, que mesmo não sendo meus alunos, não mediram esforços para me ajudar.

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

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

A professora Sylma, sua discente de mestrado Jéssica e todos que colaboraram com a confecção das peças porosas utilizadas neste trabalho.

Aos técnicos e funcionários da UNIFAL-MG, em especial Vinicius e Jucilene, sempre prestativos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) código de financiamento 001 (Processo: 88887.704186/2022-00).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e auxiliaram para minha formação e no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose, constituídos por unidades de frutose ligadas à sacarose. Esses açúcares apresentam propriedades não cariogênicas, anticancerígenas e contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal. Os FOS podem ser produzidos a partir da reação de transfrutossilacção da sacarose catalisada por enzimas frutossiltransferases (FTase, E.C.2.4.1.9), extracelulares ou presentes em células microbianas. A utilização de células com atividade de transfrutossilacção (A_T) têm se tornado uma alternativa promissora para a produção de FOS, principalmente quando imobilizadas em suportes porosos uma vez que constituem biocatalisadores heterogêneos com alta estabilidade. O desempenho destes biocatalisadores depende das características da célula, das condições de reação e do suporte utilizado. Com isto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a imobilização, por cultivo celular submerso, de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, em óxidos de alumínio e titânio. A imobilização das células microbianas nos óxidos, ocorreu em meio de cultura sintético, pH 5,5, 200 rpm e 30°C. Foram avaliados a capacidade de crescimento das células em função do tempo de cultivo e da atividade de transfrutossilacção para ambos os suportes, além de ensaios de regeneração e reutilização do suporte para a escolha daquele mais adequado para os demais ensaios. Foram realizados ensaios de estabilidade frente ao pH, térmica, de armazenamento e operacional em reator batelada e de leito fixo. Também, foi determinada a influência da concentração de sacarose do meio reacional nos perfis de atividade de transfrutossilacção. A curva de crescimento microbiano mostrou que o melhor tempo de cultivo celular ocorreu em 32 h de processo, para ambos os suportes. O ensaio de regeneração dos óxidos indicou que apenas a titânia - T140 pôde ser reutilizada no processo de cultivo celular, já que não apresentou fraturas, nas diversas etapas, que afetassem sua morfologia. O ensaio de estabilidade frente ao pH indicou o pH ótimo de 5,5 com maior valor de atividade de transfrutossilacção, de $1990,12 \pm 45,5 \text{ U g}^{-1}$. A estabilidade de armazenamento mostrou que a atividade se manteve apenas até o primeiro dia, vindo a cair progressivamente até o tempo de 60 dias. A concentração de sacarose que obteve a maior atividade foi de 480 g L^{-1} , no valor de $262,89 \pm 25,49 \text{ U g}^{-1}$, e os parâmetros termodinâmicos obtidos no ensaio de estabilidade térmica, indicaram uma maior termoestabilidade para célula imobilizada em comparação com a célula *in natura*. Por último, as células imobilizadas em titânia apresentaram atividade enzimática estável no reator batelada durante 20 ciclos de reação consecutivos de 1h, e em reator de leito fixo durante 24 horas sob fluxo contínuo. Esses resultados evidenciam o potencial de aplicação de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em óxido de titânio para produção de FOS, destacando o potencial de regeneração do suporte e a elevada estabilidade operacional do biocatalisador.

Palavras-chave: imobilização; óxido de titânio; óxido de alumínio; *Aspergillus oryzae* IPT-301; fruto-oligossacarídeos.

ABSTRACT

Fructo-oligosaccharides (FOS) are fructose oligomers consisting of fructose units linked to sucrose. These sugars exhibit non-cariogenic, anticancer properties and contribute to the balance of the intestinal microbiota. FOS can be produced from the transfructosylation reaction of sucrose, catalyzed by fructosyltransferase enzymes (FTase, E.C.2.4.1.9), which are extracellular or present in microbial cells. The use of cells with transfructosylation activity (A_T) has become a promising alternative for FOS production, especially when immobilized in porous supports, as they form highly stable heterogeneous biocatalysts. The performance of these biocatalysts depends on the characteristics of the cell, the reaction conditions, and the support used. Therefore, the objective of this study was to evaluate the immobilization, via submerged cell culture, of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells in aluminum and titanium oxides. The immobilization of the microbial cells on the oxides occurred in a synthetic culture medium at pH 5.5, 200 rpm, and 30°C. The cell growth capacity over time and transfructosylation activity for both supports were evaluated, along with regeneration and reuse tests of the support to determine the most suitable one for further experiments. Stability tests were conducted for pH, thermal, storage, and operational conditions in batch and fixed-bed reactors. Additionally, the influence of sucrose concentration in the reaction medium on transfructosylation activity profiles was determined. The microbial growth curve showed that the optimal cell culture time was 32 hours for both supports. The regeneration test for the oxides indicated that only titania (Ti40) could be reused in the cell culture process, as it did not present fractures during the various stages that could affect its morphology. The pH stability test indicated an optimal pH of 5.5 with the highest transfructosylation activity value of $1990.12 \pm 45.5 \text{ U g}^{-1}$. The storage stability showed that the activity was maintained only until the first day, progressively decreasing up to 60 days. The sucrose concentration that yielded the highest activity was 480 g L^{-1} , with a value of $262.89 \pm 25.49 \text{ U g}^{-1}$. The thermodynamic parameters obtained in the thermal stability test indicated greater thermostability for the immobilized cell compared to the free cell. Finally, the cells immobilized on titania exhibited stable enzymatic activity in the batch reactor for 20 consecutive 1-hour reaction cycles and in the fixed-bed reactor for 24 hours under continuous flow. These results highlight the potential application of *A. oryzae* IPT-301 cells immobilized on titanium oxide for FOS production, emphasizing the support's regeneration potential and the high operational stability of the biocatalyst.

Keywords: immobilization; titanium oxide; aluminum oxide; *Aspergillus oryzae* IPT-301; fructo-oligosaccharides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural dos fruto-oligossacarídeos:	17
Figura 2 - Produção de FOS a partir da sacarose pela frutossiltransferase.....	20
Figura 3 - Esquematização de métodos de imobilização celular	23
Figura 4 - Esquematização das etapas da metodologia.....	28
Figura 5 - Suportes porosos de alumina AL30	29
Figura 6 - Suportes porosos de titânia	30
Figura 7 - Erlenmeyers contendo os biocatalisadores.....	32
Figura 8 - Peças porosas após o tratamento térmico nas condições de 550 °C por 1 h e 30 min.....	33
Figura 9 - Imagem do leito catalítico do reator PBR recheado com 3 partículas cúbicas dos biocatalisadores.....	38
Figura 10 - Concentração de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301, imobilizadas em suporte poroso de óxido de alumínio AL30 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm), e atividade de transfrutossililação em função do tempo de cultivo celular	42
Figura 11 - Progressão do pH do meio de cultura de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301, imobilizadas em suporte de óxido de alumínio AL30 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm) em função do tempo de cultivo celular	44
Figura 12 - Concentração de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301, imobilizadas em suporte de óxido de titânio (1,0 x 1,0 x 1,0 cm), e suas atividades de transfrutossililação em função do tempo de cultivo	45
Figura 13 - Progressão do pH do meio de cultura de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301, imobilizadas em suporte de óxido de titânio (1,0 x 1,0 x 1,0 cm) em função do tempo de cultivo celular	47
Figura 14 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Imagens ampliadas em 500x	50
Figura 15 - Estabilidade frente pH de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm).....	51
Figura 16 - Perfis de estabilidade de armazenamento das células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm)	52
Figura 17 - Influência da concentração de substrato nas atividades de transfrutossililação de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm).....	53

Figura 18 - Dados sobre a atividade de transfrutoseilação e seu ajuste ao modelo de Hill para células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm)	54
Figura 19 - Perfil de desativação térmica de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 incubadas durante 36 h sob diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60°C).....	56
Figura 20 - Linearização da Equação de Arrhenius [$\ln(k_D)$ versus (T^{-1})] para determinação da energia de desnaturação térmica (E_D) das células de <i>A. oryzae</i> IPT-301	57
Figura 21 - Estabilidade operacional de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm), durante ciclos reacionais consecutivos em batelada	60
Figura 22 - Estabilidade operacional de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm), durante ciclos reacionais consecutivos em reator PBR	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - FOS (% massa fresca) em plantas e vegetais	18
Tabela 2 - Microrganismos produtores de FTase E.C.2.4.1.9	18
Tabela 3 - Definição de atividade de transfrutossilção por diferentes autores	19
Tabela 4 - Algumas aplicações de células imobilizadas e seus respectivos autores	22
Tabela 5 - Principais e maiores valores encontrados para as curvas de crescimento de AL30, TI30 e TI40.....	48
Tabela 6 - Resultados obtidos das reutilizações da titânia TI40.....	49
Tabela 7 - Resultados obtidos na análise BET.....	50
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Hill para células de <i>A.</i> <i>oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40	54
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Hill para células de <i>A.</i> <i>oryzae</i> IPT-301 por alguns autores da literatura	56
Tabela 10 - Parâmetros termodinâmicos para as células imobilizadas em óxido de titânio e <i>in natura</i>	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS)	17
3.2	CÉLULAS COM ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO	20
3.3	IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS.....	21
3.4	ÓXIDO DE ALUMÍNIO (Al ₂ O ₃).....	24
3.5	ÓXIDO DE TITÂNIO (TiO ₂)	25
3.6	BIORREATORES PARA A PRODUÇÃO DE FOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	SÍNTESE DOS BIOCATALISADORES HETEROGÊNEOS	28
4.1.1	Preparo do material de suporte.....	28
4.1.2	Preparo do inóculo: microrganismo e condições de cultivo.....	30
4.1.3	Preparo do meio de cultivo	31
4.2	CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO	31
4.3	ENSAIO DE REGENERAÇÃO E REUTILIZAÇÃO DO SUPORTE	33
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS BIOCATALISADORES	34
4.5	ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS.....	34
4.6	ENSAIOS DE ESTABILIDADE OPERACIONAL	36
4.7	MÉTODOS ANALÍTICOS	38
4.7.1	Determinação da atividade enzimática.....	38

4.7.2	Quantificação dos açúcares do meio reacional.....	39
4.7.2.1	Determinação da concentração de açúcares redutores	39
4.7.2.2	Determinação da concentração de glicose.....	40
4.7.3	Análise estatística	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	CURVA DE CRESIMENTO MICROBIANO E MONITORAMENTO DO pH DO MEIO DE CULTURA	42
5.2	ENSAIOS DE REGENERAÇÃO E REUTILIZAÇÃO DO SUPORTE	48
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS BIOCATALISADORES	49
5.4	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E DE ESTABILIDADE.....	51
5.5	ESTABILIDADE OPERACIONAL	60
6	CONCLUSÃO	63
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose, prebióticos, de baixo nível calórico, não são cariogênicos, além de poderem ser consumidos, seguramente, por diabéticos (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Maiorano *et al.*, 2008; Nobre *et al.*, 2018). Estes benefícios, acrescido à progressiva demanda por uma alimentação mais saudável, têm incentivado o consumo de FOS pelo mercado de alimentos prebióticos (Castro *et al.*, 2017; Zambelli *et al.*, 2016).

Os FOS podem ser encontrados naturalmente em raízes de determinadas plantas, como alho-poró, aspargos, chicória, farelo de trigo e banana. Podem também ser produzidos via rota enzimática, mediante reação de transfrutossilacção das moléculas de sacarose, utilizando enzimas de origem microbiana denominadas frutossiltransferases (FTase; EC 2.4.1.9) (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2021; Nobre *et al.*, 2018). As FTases são sintetizadas especialmente pelos fungos dos gêneros *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Xanthophyllomyces* (Antosová *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2022). Dentre as diversas linhagens de fungos filamentosos avaliadas, especificamente o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 se destaca como fonte produtora de FTases com elevadas atividades de transfrutossilacção (Cuervo-Fernandez *et al.*, 2007).

Em 2023 o mercado de FOS foi avaliado em US\$3,49 bilhões, e foi reportada uma previsão de aumento para US\$5,67 bilhões até 2028 (Mordor intelligence, 2020). Em pesquisa feita por Fortes e Muniz (2009) constatou-se um consumo médio de FOS de 2-12 g/dia na Holanda, 13,7 mg/kg/dia no Japão e 7-12 g/dia na Espanha sendo que, no Brasil, não se dispõe destes dados. Estes valores e previsões atraem a atenção da indústria para a produção deste açúcar, porém, a utilização de enzimas solúveis traz consigo diversos problemas, como alto custo de produção e purificação e perda de atividade decorrente às condições do processo ou por inibição pelo substrato ou produto (Souza *et al.*, 2017).

Uma alternativa promissora para diminuir estas problemáticas é a produção de FOS catalisada por biocatalisadores heterogêneos estáveis, os quais podem ser obtidos mediante a imobilização de células microbianas ricas em FTase. A utilização de células biocatalíticas resulta em vantagens como o aumento da resistência a

temperaturas elevadas, a substâncias químicas agressivas e tensões de cisalhamento, possibilidade de reutilização e a redução de processos de inibição (Castro *et al.*, 2017).

O material de suporte para a imobilização celular é um dos principais parâmetros que afetam o desempenho destes biocatalisadores (Cabrera-Orozco *et al.*, 2016). Neste trabalho, serão utilizados os óxidos de alumínio e de titânio, visando a regeneração e reuso destes como suporte, e de obter leitos catalíticos que não sofram deformação quando utilizados em reatores de leito fixo. Vale ressaltar que, ambos os suportes, são normalmente utilizados como base na estrutura de outros catalisadores, sendo inédito seus usos como suportes de imobilização de células. O óxido de titânio possui características diferenciadas, como inércia química, baixa toxicidade, abundância, custo relativamente baixo e resistência à corrosão (LÓPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2015). O óxido de alumínio pode proporcionar diversas vantagens, tais como elevada área específica da fase ativa, porosidade apropriada para determinados tipos de reações químicas, e, muitas vezes, pode aumentar de maneira significativa a atividade, seletividade e estabilidade enzimática (Braga *et al.*, 2009; Rotan *et al.*, 2013; Thorat; Dalvi, 2012).

Com base nisso, este trabalho visa estudar a síntese, caracterização bioquímica e aplicação de novos biocatalisadores para a reação de conversão da sacarose em FOS, produzidos mediante a imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em óxidos de alumínio e titânio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral a imobilização de células íntegras de *Aspergillus oryzae* IPT-301 durante o cultivo celular, em suportes inorgânicos de óxido de alumínio e óxido de titânio, sua caracterização bioquímica e do seu desempenho em reatores batelada e de leito fixo (PBR), visando a obtenção de biocatalisadores heterogêneos estáveis para a produção de fruto-oligossacarídeos (FOS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar o crescimento das células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, em partículas de óxido de alumínio e óxido de titânio, durante o cultivo celular em função do tempo de cultivo e da atividade enzimática mediante avaliação das curvas de crescimento microbiano;
- b) determinar as propriedades físicas dos suportes inorgânicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de área superficial específica (BET);
- c) determinar a capacidade de regeneração dos suportes para reuso em novos ciclos de cultivo celular;
- d) avaliar o efeito da concentração de substrato do meio reacional nas atividades de transfrutossilção dos biocatalisadores heterogêneos;
- e) definir os parâmetros cinéticos para os biocatalisadores heterogêneos por meio de ajustes dos dados experimentais a modelos de velocidades de reação enzimáticos reportados na literatura;
- f) determinar as estabilidades térmica, de armazenamento e frente ao pH dos biocatalisadores heterogêneos;
- g) avaliar o desempenho dos biocatalisadores heterogêneos em ciclos de bateladas consecutivas, e suas estabilidades operacionais durante a produção de fruto-oligossacarídeos (FOS);

h) analisar a estabilidade operacional do sistema reacional em fluxo contínuo, por meio do monitoramento dos perfis de atividade de transfrutossilação.

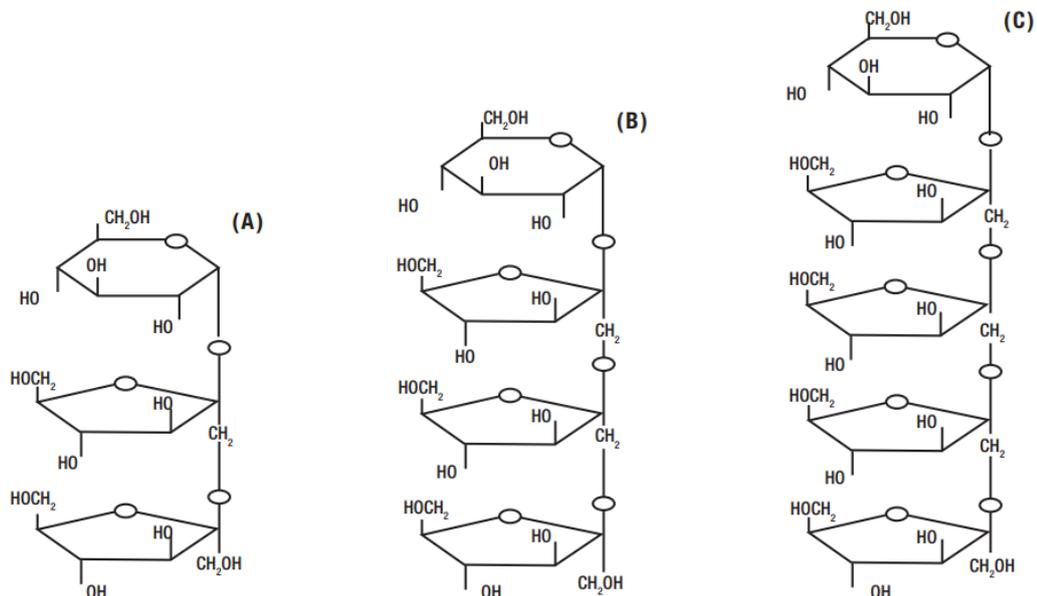
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Os oligofrutoses são oligômeros de D-frutose encontrados principalmente em plantas, na forma de carboidratos de reserva, e pertencentes ao grupo de frutanos (Haully; Moscatto, 2002). Os frutanos possuem três classificações: compostos ramificados, que são polímeros com ligações tipo $\beta(2\rightarrow6)$ e $\beta(2\rightarrow1)$; inulina, polímero linear com ligações glicosídicas $\beta(2\rightarrow1)$; e levanas, polímeros, também lineares, com ligações $\beta(2\rightarrow6)$ (Roberfroid, 1993).

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose, pertencentes ao grupo de frutanos, constituídos por 1-kestose, nistose e 1-frutofuranosilnistose, onde as unidades frutosil estão ligadas na posição $\beta(2\rightarrow1)$ na molécula de sacarose (Chen; Liu, 1996; Romano *et al.*, 2016). A Figura 1 apresenta a estrutura química dos principais FOS.

Figura 1 - Fórmula estrutural dos fruto-oligossacarídeos:



Fonte: Fortes; Muniz (2009, p. 245).

Legenda: (A) 1-kestose;

(B) nistose;

(C) 1-frutofuranosilnistose.

Os FOS são sintetizados em mais de 36.000 espécies de plantas (Tabela 1), que representam 10 famílias (Haully; Moscatto, 2002).

Tabela 1 - FOS (% massa fresca) em plantas e vegetais

Plantas	Parte Comestível	FOS (%)
Alcachofra	Folhas centrais	< 1
Alcachofra Jerusalém	Tubérculo	10 – 15
Alho	Bulbo	3 – 6
Alho-poró	Bulbo	2 – 5
Banana	Fruta	0,6 – 0,7
Cebola	Bulbo	2 – 6
Cevada	Cereal	0,5 – 1,5
Centeio	Cereal	0,5 – 1
Chicória	Raiz	5 – 10
Trigo	Cereal	1 – 4
Yacon	Raiz	3 – 19

Fonte: Adaptado de Haully; Moscatto (2002, p.107).

Além disso, podem ser produzidos por dois processos diferentes: hidrólise enzimática da inulina e pela reação enzimática de transfrutoseilação da sacarose. No primeiro caso efetua-se hidrólise enzimática controlada de moléculas de inulina com a enzima inulinase (Roberfroid, 1993). Já a produção de FOS via reação enzimática de transfrutoseilação, é realizada a partir de enzimas, denominadas frutoseiltransferases (FTases), utilizando sacarose como substrato (Dias *et al.*, 2022; Singh; Singh, 2010).

No ramo industrial, os FOS são sintetizados utilizando sacarose como substrato por ação da enzima frutoseiltransferase (FTase E.C.2.4.1.9) com elevada atividade transfrutoseilante. A FTase pode ser advinda de células de vários microrganismos, alguns deles indicados na Tabela 2, como *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus japonicus* (Fortes; Muniz, 2009; Gonçalves *et al.*, 2020).

Tabela 2 - Microrganismos produtores de FTase E.C.2.4.1.9

Microrganismos	
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Lactobacillus gasserii</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Paenibacillus macerans</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Talaromyces purpureogenus</i>
<i>Aureobasidium sp.</i>	<i>Weissella confusa</i>

Fonte: Adaptado de Brenda (2018).

A definição de atividade de transfrutossilação pode divergir de um autor para outro, sendo algumas delas dispostas na Tabela 3.

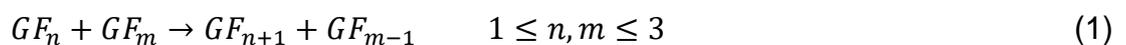
Tabela 3 - Definição de atividade de transfrutossilação por diferentes autores

Autores	Definição
(Chen; Liu, 1996), (Dorta <i>et al.</i> , 2006), (Hayashi <i>et al.</i> , 1990), (Kurakake; Onoue; Komaki, 1996), e (Vega; Zúniga-Hansen, 2011)	Quantidade de enzima que transfere 1 μmol de frutose por minuto
(Park; Oh; Yun, 2001) e (SAngeetha; Ramesh Prapulla, 2005)	Quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto
(L'Hocine <i>et al.</i> 2000) e (Vandáková <i>et al.</i> , 2004)	Quantidade de enzima que produz 1 μmol de 1-kestose por minuto
(Ottoni <i>et al.</i> , 2012)	Quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol da mistura de FOS por minuto, sendo esta composta por 1-kestose, 1- nistose e 1-frutofuranosilnistose

Fonte: Dias (2020, p. 23).

Com base nessas definições, adotou-se, para este trabalho, a definição de Dorta *et al.* (2006), visto que a mesma se trata da transferência da frutose.

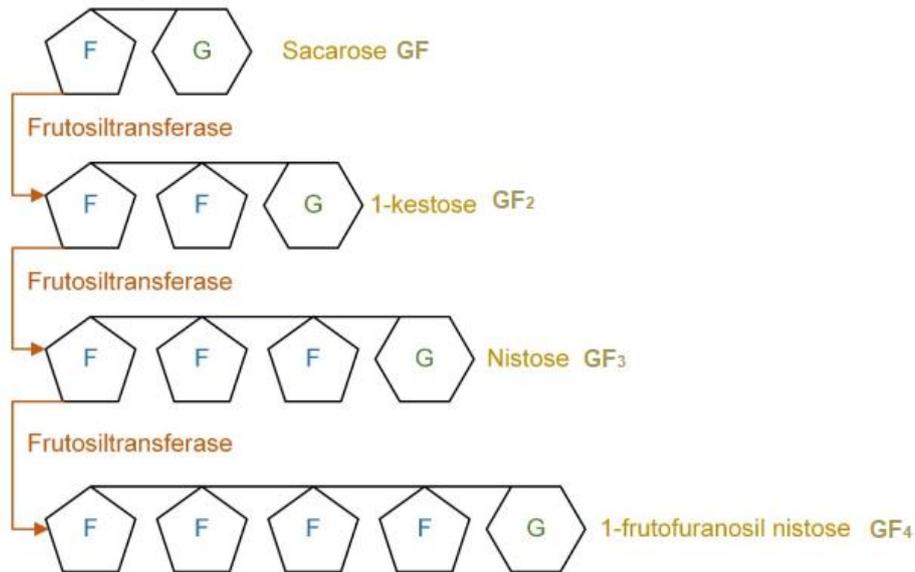
O mecanismo de transfrutossilação consiste em uma reação que transfere o grupo frutossil para uma molécula receptora, sendo esta molécula podendo ser tanto a sacarose quanto o FOS, após romper as ligações β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose, produzindo moléculas de FOS com até 4 unidades de frutose (Equação 1), e como subproduto, uma molécula de glicose (Antošová; Polakovič, 2001; Ganaie *et al.*, 2014; Maiorano *et al.*, 2008; Yun, 1996).



onde G e F se referem às moléculas de glicose e frutose, respectivamente, e os índices n e m o número de unidades frutossil ligados à unidade glicosil. Quando estes

índices assumem valor um, temos a molécula de sacarose (GF) como reagente, e as moléculas 1-kestose (GF_2) e glicose como produtos. Ao tomarem os demais valores, têm-se as moléculas de nistose (GF_3) e 1-frutofuranosilnistose (GF_4), como mostra a Figura 2.

Figura 2 - Produção de FOS a partir da sacarose pela frutossiltransferase



Fonte: Adaptado de Macedo; Vimercati; Araújo (2020, p. 4).

A eficiência no processo de produção de FOS vai depender do microrganismo selecionado para cultivo, e otimização do meio de cultura e das variáveis envolvidas. Para o fungo *A. oryzae* IPT-301, o meio foi otimizado por Ottoni *et al.* (2012), e essas condições vêm sendo utilizadas por diversos autores.

3.2 CÉLULAS COM ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

É possível encontrar na literatura trabalhos sobre células microbianas com atividade de transfrutossilacção, assim como sua imobilização visando a síntese do FOS.

Rawat, Ganaie e Kango (2015) avaliaram a produção de FTase intracelular a partir de diversos fungos com diferentes concentrações de substrato para a produção de FOS, e obtiveram as maiores atividades para o *Aspergillus niger* GNCC 2613 ($121 \pm 2,36 \text{ U mL}^{-1}$), *Aspergillus awamori* MTCC 2879 ($124 \pm 1,84 \text{ U mL}^{-1}$), *Aspergillus*

niger GNCC 2668 ($83,1 \pm 0,69 \text{ U mL}^{-1}$) e *Aspergillus ficuum* MTCC 7591 ($64,7 \pm 0,84 \text{ U mL}^{-1}$).

Nascimento *et al.* (2019) estudaram uma nova cepa, *Aspergillus carbonário* PC-4, para a produção de células FTase, variando fontes de carbono e de nitrogênio de baixo custo. Os resultados obtidos mostraram que a coroa do abacaxi foi a melhor fonte de carbono utilizada, com atividade de $14,6 \text{ U mL}^{-1}$ após 5 dias de cultivo, enquanto nitrato de amônio e proteína de soja foram as melhores fontes de nitrogênio para a produção de FTase, com $24,0 \text{ U mL}^{-1}$ e $24,9 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente, de atividade.

Ribeiro *et al.* (2023) também imobilizaram células de *A. oryzae* IPT-301 por reticulação com glutaraldeído, e obtiveram melhores resultados para a imobilização realizada nas condições de 200 rpm e 45 min. O biocatalisador foi inserido em reator de leito fixo (PBR) e os maiores valores de atividade foram encontrados nas condições de 50°C , vazão entre 3 mL^{-1} e 5 mL^{-1} e concentrações de sacarose entre 473 g L^{-1} e 500 g L^{-1} . Além disso, chegaram a uma atividade constante durante 12 h de reação no PBR em fluxo contínuo, de aproximadamente 75 U g^{-1} . Imobilizando o mesmo fungo com glutaraldeído, Garcia *et al.* (2021), após 12 ciclos de operação em batelada, obtiveram, para a célula imobilizada, 88,9 % da atividade de transfrutoseilação inicial, apresentando uma maior estabilidade em comparação com as células livres, que mantiveram apenas 50,3 % para o mesmo ensaio.

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS

A utilização de microrganismos em sua forma livre pode apresentar diversos problemas como o alto custo de sua produção e purificação, baixa estabilidade operacional, impossibilidade de reutilização, entre outros fatores (Gonçalves *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2017). A imobilização consiste no confinamento físico das células em um espaço definido, onde suas atividades catalíticas são mantidas em processos de atuação contínua ou descontínua, propiciando sua reutilização (Covizzi *et al.*, 2007). Com isso, o processo de imobilização de células têm sido uma alternativa para produções, que utilizam microrganismos, em escala industrial, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Algumas aplicações de células imobilizadas e seus respectivos autores

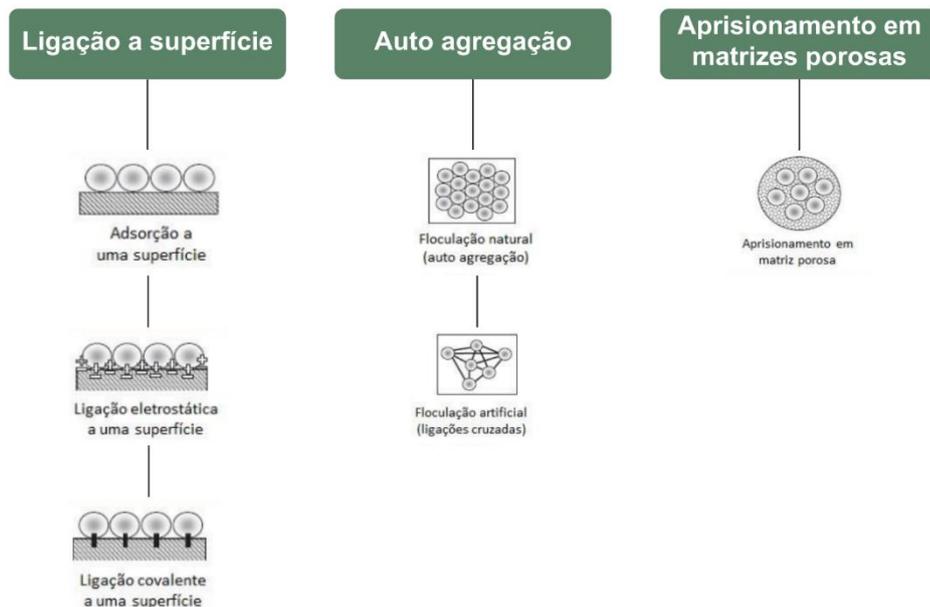
Célula de	Utilização	Autor
<i>Aspergillus niger</i>	Produção de ácidos orgânicos	Papagianni, 2007
<i>Escherichia coli</i>	Produção de insulina recombinante, bioetanol e outras proteínas terapêuticas	Lee, 1996
<i>Lactobacillus spp</i>	Produção de ácido láctico e produtos derivados da fermentação láctica	John; Nampoothiri; Pandey, 2006
<i>Pseudomonas putida</i>	Biodegradação de poluentes e biorremediação	Timmis, 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Produção de etanol	Basso; Basso; Rocha, 2011
<i>Zymomonas mobilis</i>	Produção de etanol a partir de glicose e frutose	Rogers; Jeon; Lee; Lawford, 2007

Fonte: Autor (2024).

Uma maior densidade de células microbianas no suporte promove a síntese de metabólitos e melhora a eficiência da fermentação, além de facilitar a recuperação dos produtos metabólicos de interesse (Covizzi *et al.*, 2007).

Existem diversos métodos e suportes de imobilização, e a escolha correta dessas variáveis interferem na eficiência do processo. Dentre os métodos de imobilização celular os mais utilizados são: ligação a superfície, auto agregação e aprisionamento em matrizes porosas (Kourkoutas *et al.*, 2004; Queissada; Silva, 2020). Alguns métodos de imobilização celular estão esquematizados na Figura 3:

Figura 3 - Esquematização de métodos de imobilização celular



Fonte: Adaptado de Kourkoutas *et al.* (2004, p. 379).

Na imobilização por ligação a superfície, tem-se a adesão celular ao suporte de imobilização, facilitada por meio de ligações iônicas ou covalentes entre as células e o material utilizado (Kourkoutas *et al.*, 2004). É uma técnica relativamente fácil de se realizar, podendo ser efetuada naturalmente ou induzida artificialmente a partir de agentes de ligação, como por exemplo, o glutaraldeído e o aminosilano (Rocha, 2020).

A técnica de autoagregação envolve a habilidade das células de se unirem para formar uma estrutura maior ou a tendência de células em suspensão de se agruparem rapidamente em aglomerados e sedimentarem, sem depender da presença de um suporte (Kourkoutas *et al.*, 2004).

Por fim, o método de aprisionamento em matrizes porosas envolve a inserção de células em uma estrutura porosa, onde sua movimentação é restringida pela presença de outras células ou pela formação do material poroso diretamente na cultura celular. Pode-se utilizar uma grande variedade de materiais macro ou microporosos, como cerâmica, vidro sinterizado e carvão ativado, além de polímeros naturais como colágeno, ágar e alginato, e polímeros sintéticos, como acrilamida, poliuretano e polivinil. Logo, a eficácia da imobilização depende do tipo de célula e do material empregado como suporte (Kourkoutas *et al.*, 2004; Rocha, 2020).

A imobilização de células tem sido cada vez mais estudada e aprimorada, visto seus efeitos ao processo, como o aumento da viabilidade e da atividade - mesmo

armazenadas por certo período de tempo, melhora na resistência ao meio, caso haja, por exemplo, algum composto tóxico ao microrganismo, além da diminuição de custos na sua utilização em escala industrial, visto que a maior parte da produção, principalmente alimentícia, fazem uso de enzimas como catalisadores.

O suporte é o principal contribuinte para o excelente desempenho da imobilização, e estes podem ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Geralmente, os critérios fundamentais para um material ser classificado como um suporte adequado incluem: alta área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições de operação, capacidade de regeneração, custo, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, e uma alta densidade de grupos reativos em sua superfície, entre outros fatores (Souza *et al.*, 2017). Pensando nisto, os materiais escolhidos para a execução deste projeto foram os suportes inorgânicos, óxido de alumínio e óxido de titânio.

Faria *et al.* (2020) realizaram a imobilização da célula extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica-gel, e chegaram aos maiores valores de atividade de transfrutoseilação às condições reacionais de pH igual 5,5, e temperaturas entre 45 e 60 °C. Os ensaios também indicaram uma maior estabilidade térmica e frente ao pH das células imobilizadas comparada com a solúvel, além da sua capacidade de reuso em 6 ciclos reacionais em batelada consecutivos.

3.4 ÓXIDO DE ALUMÍNIO (Al₂O₃)

O óxido de alumínio, conhecido como alumina, é um composto com a fórmula molecular Al₂O₃ e é encontrado em diversas formas cristalinas. Sua principal fonte na natureza é o minério de bauxita, do qual a alumina é extraída através do processo Bayer, utilizado para refinar o alumínio (Sartori, 2015).

A alumina é um material cerâmico que possui características distintas, como baixa toxicidade, inércia química, abundância e, conseqüentemente, custo relativamente baixo. Além disso, tem uma alta temperatura de fusão, o que influencia na temperatura de sinterização, resultando em uma boa resistência mecânica e estabilidade dos materiais produzidos.

Por razões como essas, a alumina se destacou e foi escolhida entre muitos outros materiais para estudar a viabilidade de seu uso como matéria-prima na produção de suportes porosos para imobilização enzimática.

3.5 ÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂)

O óxido de titânio, conhecido também como titânia, é um material abundante na Terra e pode ser encontrado em três fases polimórficas distintas: rutilo, anatase e brookita, com estruturas tetragonal e ortorrômbica (FUJISHIMA, ZHANG; TRYK, 2008). O rutilo, sendo o mais comum e estável entre elas, será utilizado neste estudo, embora a anatase também possa ser empregada, uma vez que se transforma irreversivelmente em rutilo. Segundo Viana (2011), essa transformação ocorre durante a queima a temperaturas a partir de 800 C, entretanto, há divergências na literatura sobre esse ponto.

Dados experimentais variam de 350°C a 1175°C para a mudança de fase, conforme estudado por Saleiro (2010), enquanto Pinheiro (2012) relata que geralmente é aceito que a mudança ocorre a 850°C. Apesar das diferentes interpretações, neste trabalho, a temperatura de sinterização será consideravelmente maior, esta de 1500 °C, o que confirma que a titânia das peças porosas produzidas está na fase rutilo.

Além disso, o óxido de titânio foi escolhido devido ao seu destaque em pesquisas sobre cerâmicas avançadas e suas características favoráveis para a conformação de peças porosas, como a alta temperatura de fusão, que influencia na temperatura de sinterização, resultando em boa resistência e estabilidade.

3.6 BIORREATORES PARA A PRODUÇÃO DE FOS

A produção de FOS pode ser realizada em reatores em batelada ou em reatores contínuos, incluindo os de leito fixo (PBR) ou de leito fluidizado (FBR) (Lorenzoni *et al.*, 2015; Zambelli *et al.*, 2016).

Geralmente, reatores em batelada são empregados em escala reduzida, experimentação de novos processos, produção de produtos de alto valor agregado e em processos que não são facilmente adaptáveis para operações contínuas. Esses

reatores têm a capacidade de alcançar altas conversões em reações, apesar de terem custos operacionais elevados e poderem apresentar variação nos produtos entre os lotes. Em muitos reatores batelada, a conversão do reagente em produto aumenta à medida que o reagente permanece no reator por mais tempo, até que o equilíbrio da reação seja alcançado ou até que o reagente seja totalmente consumido. (Fogler, 2014).

Nobre *et al.* (2018) utilizaram um fermentador de bancada autoclavável de 2 L para produção de FOS a partir de uma nova cepa isolada do fungo *Aspergillus ibericus*. Após 38 h de processo, obteve-se uma produção de FOS de 0,64 g g⁻¹ de sacarose inicial, com um teor de 118 g L⁻¹ de FOS e pureza de 56%.

Não foram encontrados na literatura estudos que reportem a produção de FOS em batelada, utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301.

Os reatores de leito fixo (PBR) são compostos por uma pilha imóvel de partículas dentro de uma coluna, pela qual uma solução de reagente é bombeada. Esses reatores são preferidos em comparação com outros tipos de reatores devido à sua tecnologia mais simples, ao alto volume do leito, à facilidade de operação e à capacidade de escalonamento (Lorenzoni *et al.*, 2015). Além disso, de acordo com Santana *et al.* (2018), o uso de reatores contínuos de leito fixo (PBR) oferece outras vantagens em comparação com os de batelada, como a facilidade de separação entre o biocatalisador e o substrato, a possibilidade de operar por longos períodos e um bom controle dos parâmetros de reação.

Jung *et al.* (2011) realizaram um estudo sobre a produção de FOS utilizando *Aureobasidium pullulans* imobilizado em alginato de cálcio em um reator de leito empacotado, e chegaram a uma produtividade de 180 g de FOS L⁻¹ h⁻¹. Além disso, relataram que foi possível manter a atividade inicial por mais de 100 dias, sem necessidade de recarregar as células imobilizadas.

O estudo realizado por Lorenzoni *et al.* (2015) comparou a produção de FOS em reatores de leito fixo (PBR) e leito fluidizado (FBR). Os resultados indicaram que, sob as mesmas condições operacionais, a produção de FOS no PBR foi maior do que no FBR. Concluiu-se que, devido ao PBR transferir maiores quantidades de unidades de frutossil em comparação com o FBR, esse modelo é mais eficiente para a produção contínua de FOS e possui potencial para escalonamento.

Dias *et al.* (2022) avaliaram o desempenho de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator PBR para a síntese de FOS, e obtiveram o maior valor de atividade

de transfrutoseilação, esta de 660 U g^{-1} , nas condições reacionais de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, com fluxo volumétrico de 15 mL min^{-1} , com 25 min de reação utilizando uma concentração de sacarose de 470 g L^{-1} . Verificou-se, também, que as células apresentaram atividade constante durante 12 h de funcionamento do PBR em fluxo contínuo, com vazão de 5 mL min^{-1} .

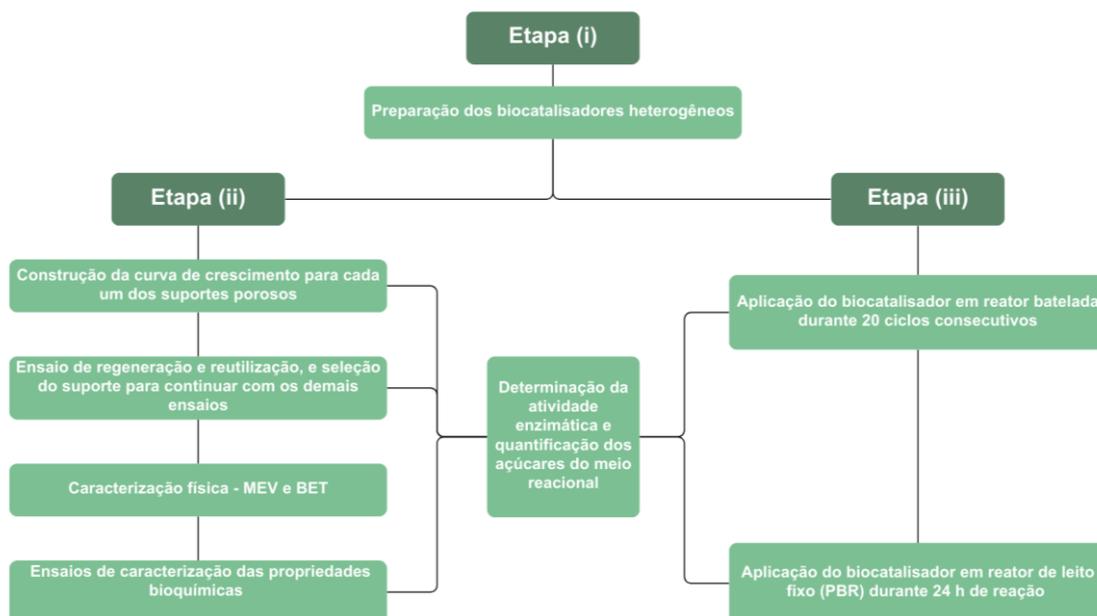
4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste trabalho consistiu em três etapas: (i) Preparação dos biocatalisadores heterogêneos a partir da imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em óxidos de alumínio e titânio; (ii) caracterização bioquímicas dos biocatalisadores e (iii) ensaios de estabilidade operacional dos biocatalisadores em reatores batelada e de leito fixo.

4.1 SÍNTESE DOS BIOCATALISADORES HETEROGÊNEOS

A Figura (4) apresenta a estrutura dos ensaios realizados nesse projeto, que incluem as etapas (i), (ii) e (iii).

Figura 4 - Esquematização das etapas da metodologia



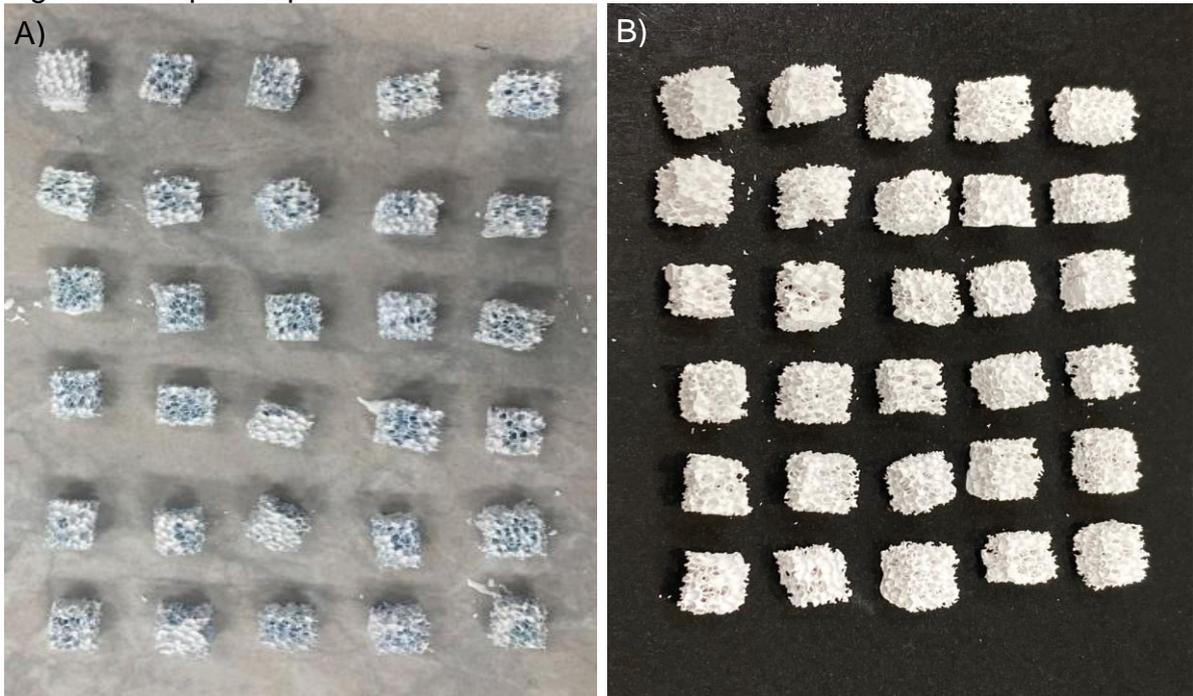
Fonte: Autora (2024).

4.1.1 Preparo do material de suporte

Para a imobilização das células microbianas, os suportes utilizados foram o óxido de alumínio (Al_2O_3) e óxido de titânio (TiO_2), que foram produzidos e cedidos pelo Laboratório das Engenharias da Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas/MG.

Os suportes porosos de Alumina foram obtidos a partir da técnica de réplica, descrita em pesquisa desenvolvida por Faria (2019). Foram utilizadas esponjas de poliuretano com porosidade de 30ppi (ppi = poros por polegada) para produção da sua estrutura. Após a obtenção dos suportes a verde (antes do tratamento térmico), estes foram tratados termicamente até a temperatura de 1600 °C. A Figura 5 mostra as peças de alumina, identificada como AL30, antes e pós o tratamento térmico.

Figura 5 - Suportes porosos de alumina AL30



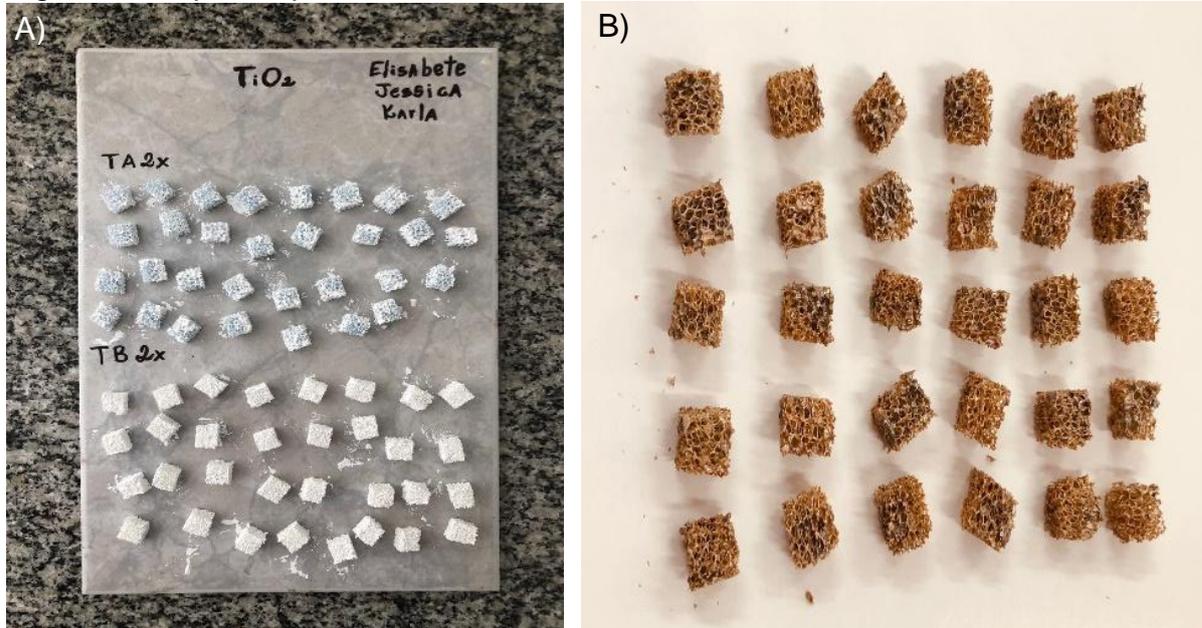
Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) AL30 antes do tratamento térmico;
B) AL30 após o tratamento térmico.

A produção do óxido de titânio foi realizada de maneira similar da alumina, a partir da técnica de réplica, descrita por Faria (2019). Adicionalmente, as peças de titânia foram produzidas utilizando dois moldes com porosidades diferentes. Após a produção da peça a verde, estas foram submetidas ao tratamento térmico, até 1500°C. As peças foram produzidas com duas porosidades, sendo elas de 30ppi (maior tamanho de poros), identificadas como peças TI30 e de 40 ppi (menor tamanho de poros), que são as peças TI40, tendo como molde esponjas de poliuretano com 1 cm de aresta. A porosidade foi baseada na esponja de poliuretano, em decorrência de seus resultados promissores encontrados utilizando-a como suporte de

imobilização celular. A Figura 6 mostra as peças de titânia antes e pós o tratamento térmico.

Figura 6 - Suportes porosos de titânia



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) TI30 e TI40 antes do tratamento térmico;
B) TI30 após o tratamento térmico.

4.1.2 Preparo do inóculo: microrganismo e condições de cultivo

A fim de produzir células contendo a enzima FTase, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). Os esporos liofilizados do microrganismo foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 70 μ L foram inoculadas em meio sólido, preparado em placa de Petri, contendo (em %, $m v^{-1}$): ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0, glicerina (Isofar®) 2,5, extrato de levedura (Synth®) 0,5 e glicose (Dinâmica®) 2,5. Após incubação por 7 dias a 30 °C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371), os esporos produzidos foram coletados, por meio de raspagem, utilizando alça de Drigalski, em 10 mL de solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95 % ($m v^{-1}$) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1 % ($v v^{-1}$), em bancada de fluxo laminar vertical (Pachane®, modelo PCR). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isolar®) 20,0 % ($m v^{-1}$), cujo volume foi variável, de modo a

ajustar a concentração de esporos para, aproximadamente, 1×10^7 esporos mL⁻¹, quantificado com auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®), seguido de armazenamento sob refrigeração a -6 °C (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020).

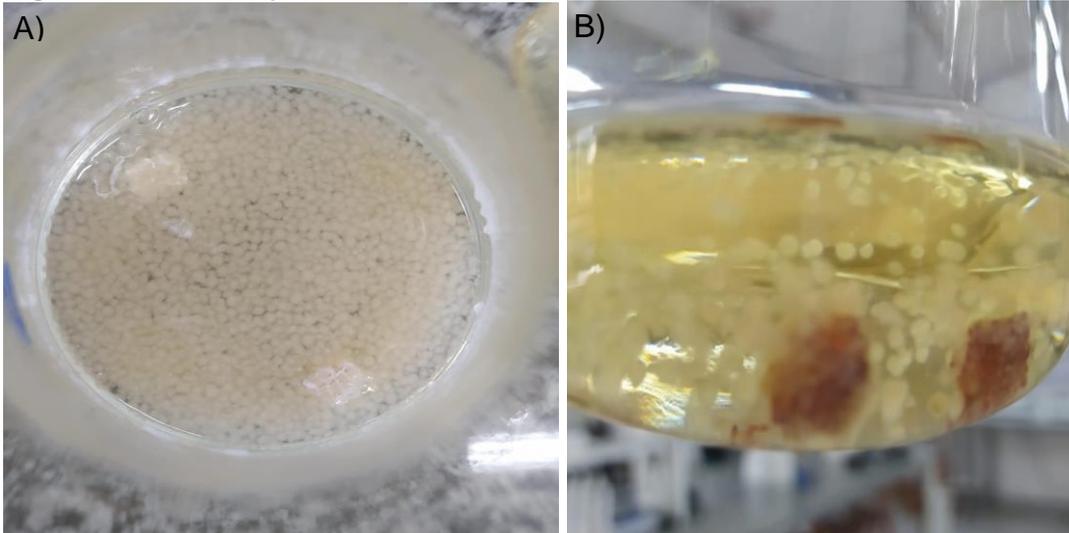
4.1.3 Preparo do meio de cultivo

Para o cultivo do microrganismo e produção das células microbianas com atividade biocatalítica, preparou-se meio de cultivo sintético (pH 5,5) constituído por (em % m v⁻¹): sacarose (Synth®) 15,0, extrato de levedura (Synth®) 0,5; NaNO₃ (Dinâmica®) 0,5; KH₂PO₄ (Synth®) 0,2; MgSO₄.7H₂O (Dinâmica®) 0,05; MnCl₂.4H₂O (Synth®) 0,03 e FeSO₄.7H₂O (Synth®) 0,001. Este meio de cultura foi distribuído em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio em cada juntamente com 3 peças dos suportes porosos de alumina ou de titânia, sendo autoclavados a 120 °C e 1 atm durante 20 min (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2021; Ottoni *et al.*, 2012).

4.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

Após a esterilização do meio de cultivo e depois de seu resfriamento à temperatura ambiente, inoculou-se 500 µL de suspensão, esta contendo cerca de 1×10^7 esporos mL⁻¹, em cada Erlenmeyer, dentro de uma banca de fluxo laminar vertical (Pachane®, modelo PCR). O cultivo celular submerso foi conduzido durante 48 horas em agitador orbital (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm, com coleta de amostras em intervalos de tempo pré-determinados (Figura 7).

Figura 7 - Erlenmeyers contendo os biocatalisadores



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) biocatalisador de AL30;
B) biocatalisador de TI40.

O meio de cultura, juntamente com o biocatalisador, foi filtrado à vácuo em funil de Buchner em papel do tipo Whatman nº1. As células microbianas imobilizadas, retidas no papel (torta), foram lavadas abundantemente com água destilada e levadas para ensaio de atividade. A concentração efetiva de células imobilizadas nos suportes porosos ($g_{célula} g_{suporte}^{-1}$) foi obtida por meio da razão entre as massas celular seca e de suporte contido no meio de cultivo (Equação 2):

$$C = \frac{g_{célula}}{g_{suporte}} \quad (2)$$

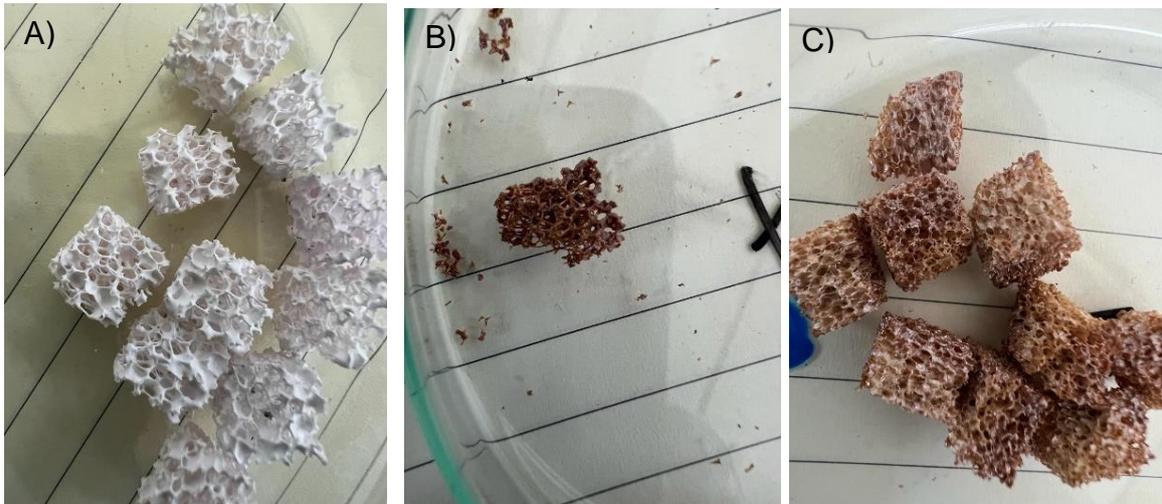
onde $g_{célula}$ é a massa seca, obtida após os ensaios de atividade enzimática mediante secagem das células imobilizadas em estufa por 5 h a 60 °C, e $g_{suporte}$ é a massa do suporte, representada pela massa inicial das peças porosas antes do cultivo. Os valores médios de concentração celular com seus respectivos desvios padrão foram plotados, juntamente com os valores de atividade enzimática, em função do tempo de cultivo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O meio de cultura que foi coletado, pelo método de filtração à vácuo, teve seus respectivos valores de pH medidos, com um pHmetro digital (Tecnal®, Modelo TEC-7). Os valores médios de pH com seus devidos desvios padrão foram plotados em função do tempo de cultivo.

4.3 ENSAIO DE REGENERAÇÃO E REUTILIZAÇÃO DO SUPORTE

Para o ensaio de regeneração, fez-se um tratamento térmico com todos os 3 tipos de peças (alumina, titânia TI40 e titânia TI30) contendo biomassa, utilizando uma mufla (Fornitec®, modelo F2 - DM). Após vários ensaios, o processo foi otimizado, sendo a mufla programada para a temperatura de 550 °C durante 1 h e 30min.

Figura 8 - Peças porosas após o tratamento térmico nas condições de 550 °C por 1 h e 30 min



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) alumina AL30;
B) titânia TI30;
C) titânia TI40.

Após retirada dos suportes da estufa, os mesmos foram lavados com álcool etílico PA, seguido de lavagem com água destilada. Os suportes foram secos em estufa durante 24 h a 60 °C. Em seguida, foram utilizados novamente para um novo cultivo celular e imobilização de células, sendo, após término do cultivo, submetidos à reação enzimática para determinação de sua atividade de transfrutoseilação. Os ensaios foram realizados em triplicata e o processo se repetiu duas vezes, ou seja, os suportes passaram por este tratamento térmico e reutilização por duas vezes consecutivas. A partir desses dados e dos resultados obtidos nas curvas de crescimento microbiano, foi realizada uma análise para escolha de apenas um dos suportes porosos para continuar com os experimentos posteriores.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS BIOCATALISADORES

Os suportes porosos de óxido de alumínio e óxido de titânio foram caracterizados mediante as técnicas MEV, para determinação da sua morfologia, e BET, para caracterização de sua área superficial.

Para a análise MEV, foi utilizado um microscópio eletrônico (Zeiss EVO MA-10, Alemanha), com tensão de aceleração de 20 kV e distâncias de 10 mm e 21 mm. As amostras do material de suporte foram depositadas sobre uma fita de carbono em um porta-amostras (stub) e recobertas por uma fina película de liga de ouro-paládio por meio do processo de sputtering, com o uso de um mini Sputter Coater modelo POLARON EMITECH SC7620. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT-SP. Para esta análise, apenas a titânia TI40 foi analisada.

Já a análise BET foi realizada no Laboratório de Materiais da Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas - MG. A Fisissorção de Nitrogênio (B.E.T), foi feito no equipamento Micromeritics ASAP 2020 na temperatura de 77 K. A densidade foi medida através da picnometria a Hélio em ensaios de quintuplicata, através do equipamento Micromeritics AccuPyc 1330 com taxa de equilíbrio de gás $5,0 \times 10^{-3}$ psig min⁻¹.

4.5 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS

Os ensaios realizados para a caracterização bioquímica incluem: ensaios de estabilidade frente ao pH, de armazenamento, térmica e de concentração de substrato. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para o ensaio de estabilidade frente ao pH, as células imobilizadas foram armazenadas em solução tampão tris acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ sob pH variável (4,5 até 6,5, com uma variação de 0,5), na ausência de substrato, por 24 h sob refrigeração de 4 °C. Ao término da incubação suas atividades de transfrutossilação foram determinadas sob condições experimentais padrão.

Os ensaios de estabilidade de armazenamento foram realizados com as células imobilizadas ao decorrer de 1 (24 h), 3, 5, 10, 20, 30 e 60 dias de armazenamento. O biocatalisador heterogêneo foi armazenado em solução tampão tris acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$

¹, pH 5,5, na ausência de substrato, sob refrigeração a 4 °C, e suas atividades de transfrutoseilação foram determinadas, após retirada nos tempos pré-determinados, sob condições experimentais estabelecidas.

Foi analisado a influência da concentração de substrato, a partir dos perfis de atividade enzimática para a célula imobilizada, que foram determinados a 50 °C em meio reacional composto por 1,2 mL de tampão tris acetato 0,2 mol L⁻¹ e 3,7 mL de solução de sacarose comercial em diferentes concentrações: 100, 200, 300, 400, 480, 500, 600, 700 e 800 g L⁻¹. Ao meio reacional foram adicionadas 3 unidades da peça porosa com célula imobilizada e então a atividade enzimática foi determinada sob condições experimentais estabelecidas. Os parâmetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$, $K_{0,5}$ e n) foram estimados a partir de análises de regressão não linear mediante ajuste do modelo de Hill, apresentado pela Equação 3, aos dados experimentais de atividade enzimática.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]^n}{[S]^n (K_{0,5})^n} \quad (3)$$

onde n representa o coeficiente de Hill, V é a taxa de reação em U g⁻¹, $K_{0,5}$ é a concentração de substrato em g L⁻¹, onde a velocidade de reação é metade da velocidade máxima, $[S]$ é a concentração de substrato em g L⁻¹ e $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de reação em U g⁻¹ (Weiss, 1997).

Por fim, para o ensaio de estabilidade térmica, as células *in natura* e imobilizadas foram incubadas em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5, na ausência de substrato, para uma faixa de temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C em intervalos de tempos distintos (2h, 4h, 8h, 16h e 36 h), em banho termostatizado. As amostras foram retiradas, resfriadas a temperatura ambiente e as atividades enzimáticas de transfrutoseilação foram obtidas sob condições padrão.

A estimativa da constante de desativação térmica k_D (min⁻¹) foi realizada por meio do ajuste do modelo de Sadana e Henley (1987), de acordo com a Equação 4, aos dados de atividade residual em função do tempo de incubação (Araújo *et al.*, 2022; Perna *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2021).

$$\frac{A_T}{A_0} = (1 - \alpha)e^{-(k_D t)} + \alpha \quad (4)$$

onde $\frac{A_T}{A_0}$ é a atividade residual (adimensional), A_T é a atividade de transfrutossilagem para um determinado tempo de incubação a uma determinada temperatura ($U\ g^{-1}$), A_0 é a atividade de transfrutossilagem decorrente da enzima-suporte ao final da imobilização e antes da incubação ($U\ g^{-1}$), 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, e t o tempo de reação (min).

A partir dos valores encontrados de k_D , foi possível determinar a energia de ativação de desnaturação térmica, E_D ($kJ\ mol^{-1}$), para as células *in natura* e imobilizadas, realizando a linearização da Equação de Arrhenius (Equação 5).

$$k_D = A_T e^{-\frac{E_D}{RT}} \quad (5)$$

O tempo de meia-vida, ($t_{\frac{1}{2}}$, em min), as variações de entalpia de ativação de desnaturação térmica (ΔH_D , em $kJ\ mol^{-1}$), Energias de Gibbs de ativação de desnaturação (ΔG_D , em $kJ\ mol^{-1}$) e variações de entropia de ativação de desnaturação térmica (ΔS_D , em $kJ\ mol^{-1}\ K^{-1}$) foram calculados utilizando as Equações (6) – (9), respectivamente, onde h é a constante de Plank ($11,04 \times 10^{-36}\ J\ min$), k_D é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}\ J\ K^{-1}$), R é a constante universal dos gases ideais ($8,314\ J\ mol^{-1}\ K^{-1}$) e T refere-se aos valores experimentais de temperatura (K) (Faria *et al.*, 2020; Saqid *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2015).

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k_D} \quad (6)$$

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

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

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

4.6 ENSAIOS DE ESTABILIDADE OPERACIONAL

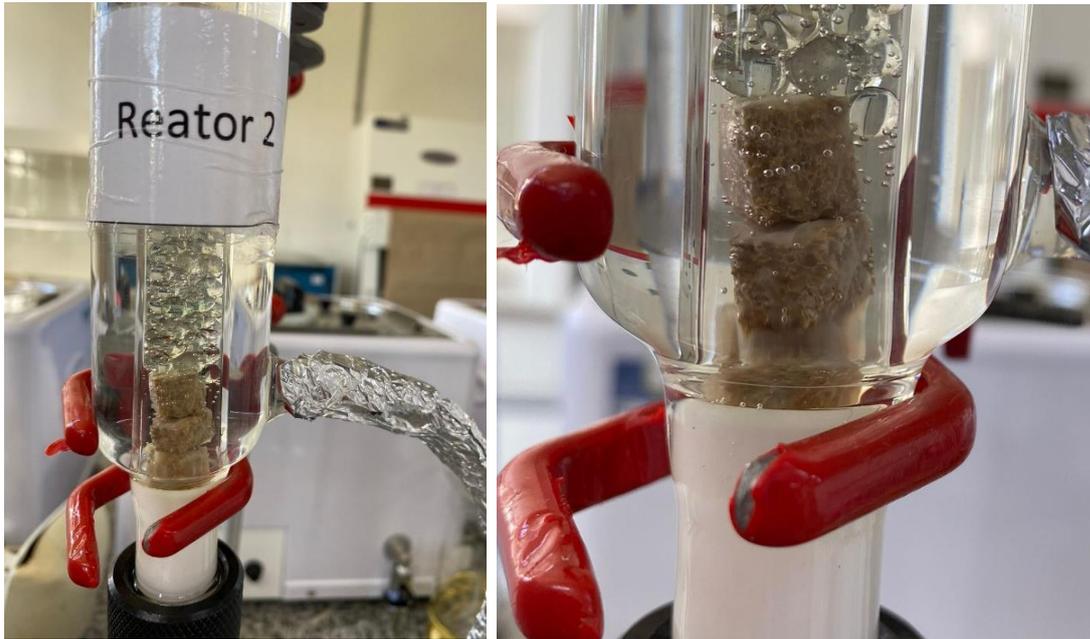
Para o ensaio de estabilidade operacional em reator batelada, a biomassa catalítica imobilizada, cerca de 3 unidades, foi adicionada em meio reacional contendo

3,7 mL de solução de sacarose comercial na concentração definida no ensaio da influência da concentração de substrato, e 1,2 mL de tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5. A reação enzimática foi determinada sob condições padrão. Ao término de cada ciclo batelada, correspondente a 1 h de reação, o biocatalisador heterogêneo foi removido do meio reacional e, então, reintroduzido em um novo e similar meio reacional. O processo se repetiu até 20 ciclos batelada, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e 190 rpm. As atividades enzimáticas da biomassa imobilizada foram avaliadas considerando o número de ciclos reacionais.

Para a aplicação do biocatalisador em reator de leito fixo, a reação enzimática foi conduzida em reator cilíndrico de boro silicato com suporte nas bases para fixação das partículas do biocatalisador heterogêneo (biomassa catalítica imobilizada). O reator foi carregado com 3 partículas do biocatalisador (Figura 9) e a temperatura da reação de 50°C foi controlada utilizando banho termostatizado, que permitiu a recirculação de água por meio de jaqueta de vidro, que envolve o reator. Uma bomba peristáltica foi anexada ao sistema e utilizada para transportar o substrato/reagente através do reator, com vazão de 1 mL min^{-1} . O reagente era constituído de uma solução de sacarose 48% (m v^{-1}) e tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5. Na saída do reator, as amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos (5, 10, 20, 30, 120, 240, 480, e 1440 min) para a quantificação de frutose transfrutossilada produzida em regime de fluxo contínuo durante 24 h e posterior obtenção das atividades de transfrutossilagem. Após a reação, o biocatalisador foi mantido em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 h, até estabilização da sua massa, para determinação de massa seca. Os ensaios foram feitos em triplicata, e as condições do reator (temperatura, vazão e concentração de substrato) foram selecionadas segundo estudos de Dias *et al.* (2022) e Ribeiro *et al.* (2023), que avaliaram as melhores condições para funcionamento do reator.

Vale ressaltar que houve formação de caminhos preferenciais visíveis no leito catalítico, como mostra a Figura 9. Isso se dá pela conformação e tamanho das peças no PBR, visto que as mesmas possuem 1 cm de arestas, e o leito 1,2 cm, além de não serem flexíveis, o que impossibilita, assim, organizar as peças de maneira que preencha todo o leito. As esferas de vidro foram adicionadas ao meio a fim de evitar arraste do biocatalisador durante o ensaio.

Figura 9 - Imagem do leito catalítico do reator PBR recheado com 3 partículas cúbicas dos biocatalisadores



Fonte: Autora (2024).

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas de transfrutossilação foram determinadas conforme procedimento descrito por Cunha *et al.* (2019), Garcia *et al.* (2021) e Gonçalves *et al.* (2020). Para isso, 3 suportes porosos contendo biomassa imobilizada foram incubados com 3,7 mL de solução de sacarose 48% (m v^{-1}) e 1,2 mL de tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5. A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Lab-Line®, modelo 3540) a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 190 rpm por 60 min e interrompida pela imersão do meio reacional em água fervente por 10 min, seguido por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min para inativação enzimática. Em seguida, o meio reacional foi filtrado à vácuo e a concentração de açúcares redutores (AR) e glicose (G) foram quantificadas. A atividade de transfrutossilação (A_T) foi calculada pela Equação (10).

$$A_t = \frac{F_T V_R}{t_R m_{seca}} \quad (10)$$

onde F_T é a concentração molar de frutose transfrutossilada (em $\mu\text{mol L}^{-1}$), V_R é o volume do meio reacional (em L), t_R o tempo de reação (em min) e m_{seca} a massa seca efetiva de células microbianas imobilizadas nos suportes porosos de óxidos de alumínio e titânio (em g).

Uma unidade (1U) de atividade de transfrutossilação pode ser definida como a quantidade de enzima que transfere um micromol ($1 \mu\text{mol}$) de frutose (F_T) por minuto, sob condições experimentais estabelecidas (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Dorta *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020).

4.7.2 Quantificação dos açúcares do meio reacional

Para quantificação das concentrações de glicose (G) e de açúcares redutores (AR), serão utilizados os métodos colorimétricos GOD/PAP® (kit enzimático glicose-oxidase) e DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (Miller, 1959), respectivamente. As concentrações de frutose liberada (F) e frutose transfrutossilada (transferida) (F_T) no meio reacional foram determinadas pelas Equações (11) e (12) (Chen; Liu, 1996; Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020).

$$[F] = [AR] - [G] \quad (11)$$

$$[F_T] = [G] - [F] \quad (12)$$

4.7.2.1 Determinação da concentração de açúcares redutores

Para a quantificação da concentração de açúcares redutores (AR), presentes no meio reacional, utilizou-se o método 3,5-dinitrosalicílico (DNS) adaptado de Miller (1959), conforme descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013). A solução DNS (Reagente A) foi preparada pela dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) (Dinâmica®) em 200,0 mL de solução 2 mol L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®). Paralelamente, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (Reagente B) constituída por 600 g L^{-1} de tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Dinâmica®). Após a dissolução, ambas as soluções (A e B) foram misturadas e o volume final da mistura aferido para 1,0 L em balão volumétrico.

A quantificação dos ARs foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 0,5 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 0,5 mL da solução final de DNS (Reagentes A + B) sob agitação vigorosa. A reação foi conduzida em banho maria a 100 °C por 10 min e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 4,0 mL de água destilada. Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Bel®, modelo UV-M51) a 540 nm, visando obter as absorbâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos ARs mediante auxílio da curva de calibração obtida para o método DNS. Para a obtenção do branco, o mesmo procedimento analítico foi realizado, porém, substituindo a amostra, proveniente da reação enzimática de transfrutoseilação, por água destilada.

4.7.2.2 Determinação da concentração de glicose

Para a quantificação da concentração de glicose (G), presente no meio reacional, utilizou-se o método GOD-PAP® (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Ganaie *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Vega; Zúniga-Hansen, 2011). O método consiste em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato. A oxidação da glicose pela glicose oxidase produz peróxido de hidrogênio, oxidado por meio da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem coloração rosácea ou vermelha (Bobbio, F.; Bobbio, P., 2005; Wong, C.; Wong, K.; Chen, 2008). O kit enzimático utilizado no presente trabalho foi da marca Laborlab®.

A quantificação da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em eppendorfs, de 10 µL da amostra, oriunda da reação enzimática, em 1 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min. A coloração final foi analisada com auxílio de espectrofotômetro (Bel®, modelo UV-M51) a 505 nm, obtendo assim, as absorbâncias e, consecutivamente, calculada as concentrações de glicose, utilizando o “*fator f*” obtido a partir da amostra padrão fornecida pelo fabricante. Para a obtenção do branco, o mesmo procedimento analítico foi realizado, porém, sem adição da amostra.

4.7.3 Análise estatística

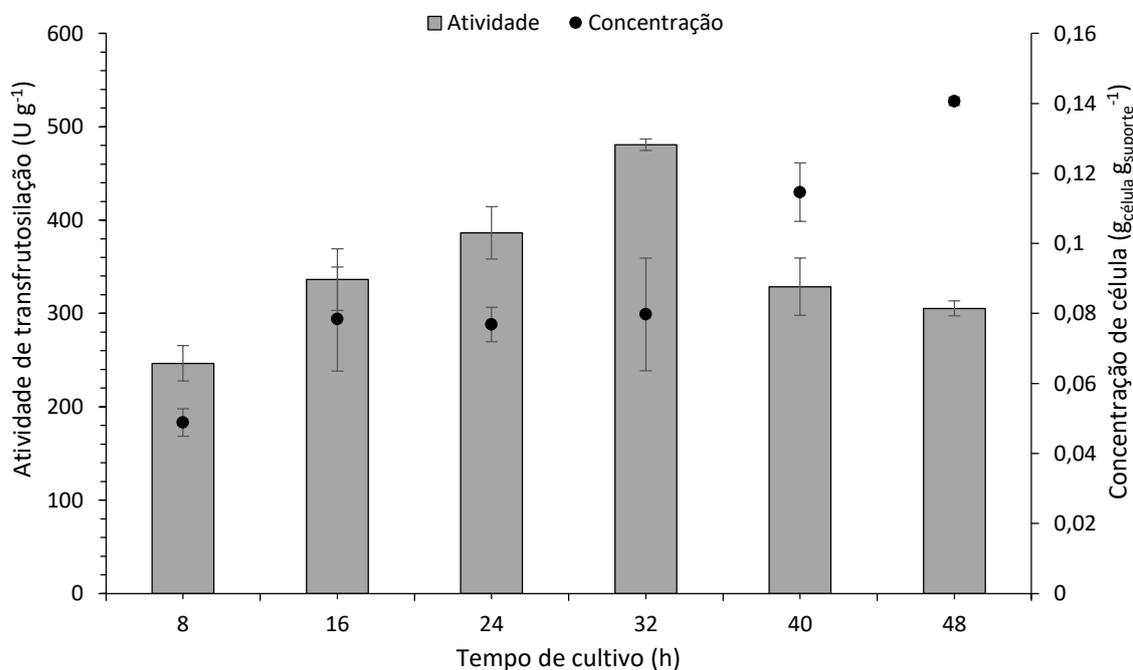
Os ensaios foram realizados em triplicata e o tratamento dos dados experimentais foram submetidos ao teste de Tukey pela metodologia ANOVA, a um nível de significância de 5%. O teste de Tukey avaliou a diferença significativa entre os dados experimentais, verificando-os um a um.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CRESIMENTO MICROBIANO E MONITORAMENTO DO pH DO MEIO DE CULTURA

A curva de crescimento do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizado em óxido de alumínio e a atividade de transfrutossilção em função do tempo estão representados na Figura 10:

Figura 10 - Concentração de células de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em suporte poroso de óxido de alumínio AL30 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm), e atividade de transfrutossilção em função do tempo de cultivo celular



Fonte: Autora (2024).

Uma curva de crescimento microbiano indica o crescimento de um determinado microrganismo inserido a um meio rico em nutrientes apropriados para o mesmo. Durante esse processo, os microrganismos percorrem quatro fases de crescimento: fase lag, fase log (logarítmica), fase estacionária e fase de declínio ou de morte (Black, J.; Black, L., 2021).

A partir da análise da Figura 10, observou-se a fase lag do início até o tempo de 24h. A partir de então, tem-se a fase de crescimento exponencial (fase log), até o final do processo em 48 h, que tem ocorrência após as células se ajustarem ao ambiente, onde a máxima concentração de células imobilizadas, para este mesmo tempo, foi de $0,14 \pm 0,001$ g_{célula} g_{suporte}⁻¹. Na fase lag de uma curva de crescimento, o

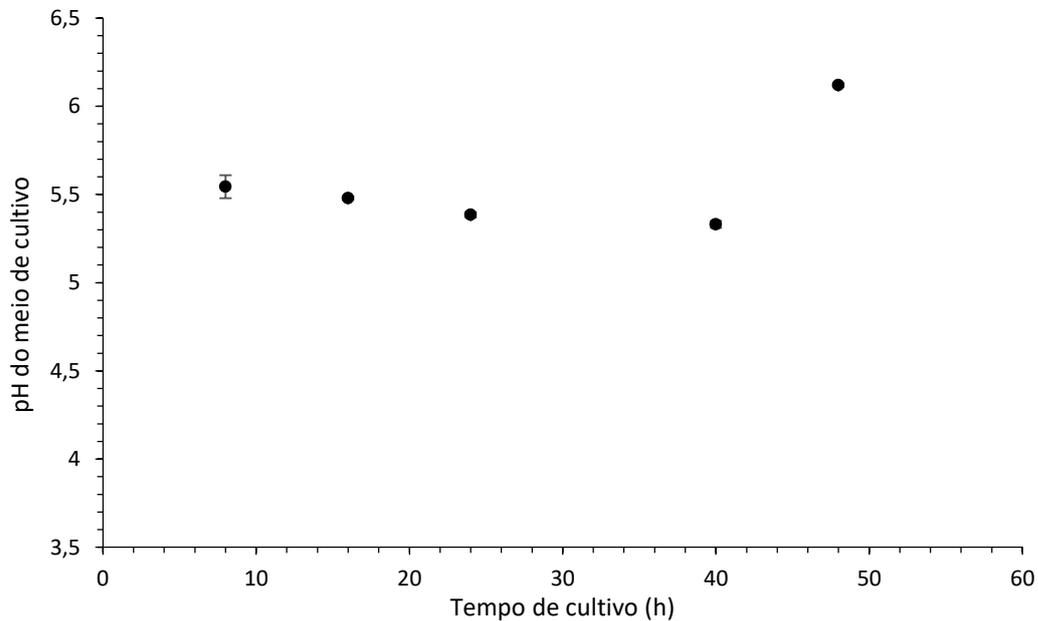
organismo não aumenta significativamente em número, mas há metabolismo ativo (Black, J.; Black, L., 2021). Após a fase de adaptação (fase lag), as células se multiplicam rapidamente, resultando em um aumento exponencial na massa celular e na densidade populacional ao longo do tempo. Esse crescimento é equilibrado, com todos os componentes da célula crescendo na mesma taxa (Shuler; Kargi, 2002).

Apesar dos pontos de 16 h, 24 h, e 32 h serem estatisticamente iguais, pode-se notar que não houve ocorrência da fase estacionária do crescimento celular, visto que após esses tempos, têm-se que há um aumento da concentração nos pontos subsequentes, sendo seu pico no último ponto da curva, este de 48 h. Com isso, pode-se afirmar que não é possível identificar na curva a fase de morte celular, visto que não há queda na concentração de células durante todo o processo. A fase estacionária indica a diminuição da velocidade de crescimento, onde o número de novos indivíduos é o mesmo ao número de indivíduos que morrem. Isto pode ocorrer, devida a quantidade de nutrientes disponíveis tornar-se insuficiente para a população microbiana presente ao meio. Já a fase de morte celular indica que a quantidade de organismos que morrem é superior aos do que surgem (Alterthum, 2020).

Com relação à atividade de transfrutossilação, observa-se seu aumento gradativo até alcançar o maior valor, que foi de $480,75 \pm 6,23 \text{ U g}^{-1}$ para o tempo de cultivo celular de 32 h. Após esse tempo, as atividades começam a cair gradativamente.

Também foi monitorado o pH do caldo de cultivo durante todo o processo, como mostra a Figura 11, que se inicia com o valor de 5,5 antes das coletas, e se mantém praticamente constante até o tempo de 40 h, apresentando um leve aumento no último ponto do experimento ($6,12 \pm 0,01$). Este aumento na basicidade do meio pode estar relacionado as peças porosas de alumina, visto que, em alguns pontos, a mesma se desfez e liberou resíduos no meio líquido de cultivo.

Figura 11 - Progressão do pH do meio de cultura de células de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em suporte de óxido de alumínio AL30 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm) em função do tempo de cultivo celular

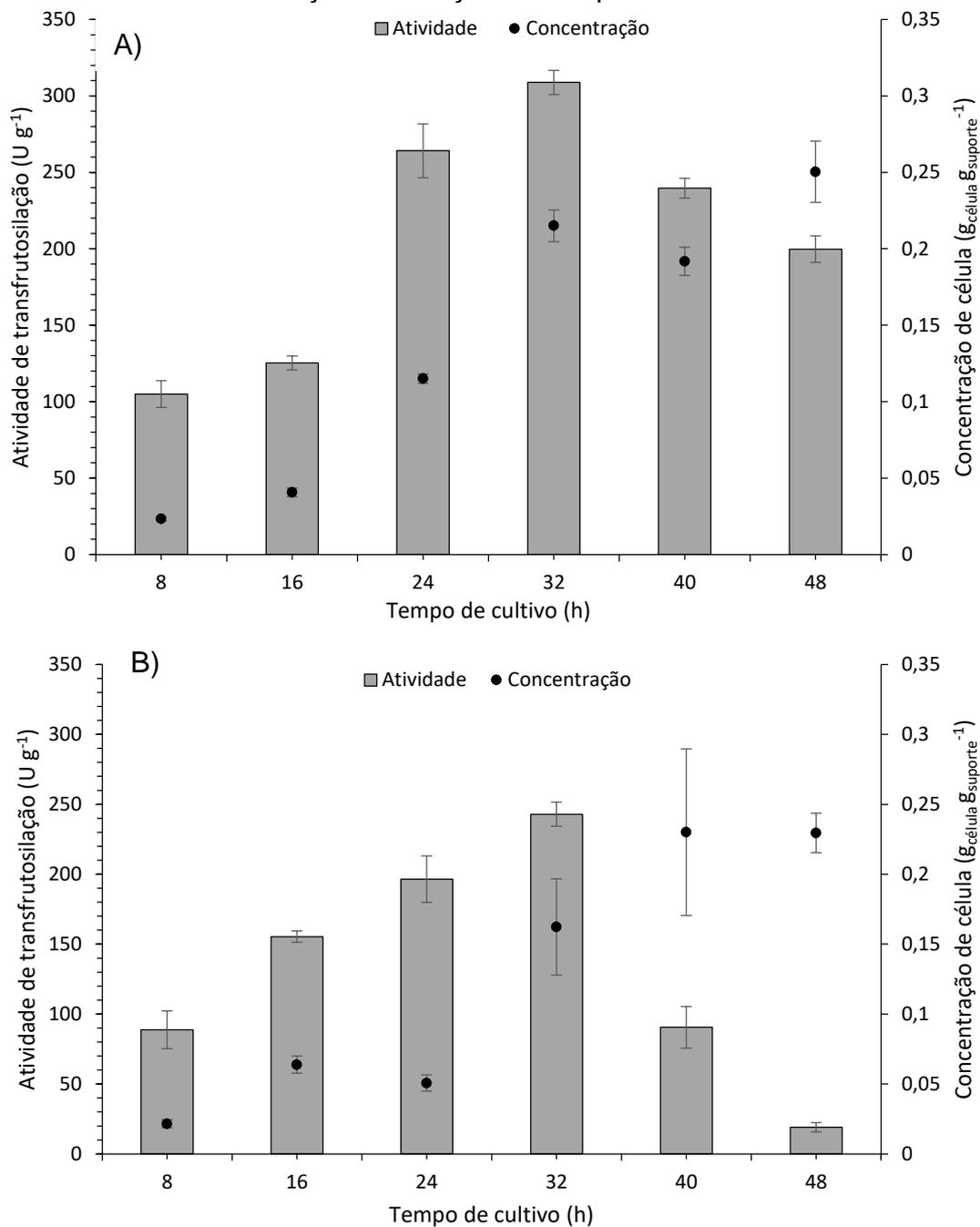


Fonte: Autora (2024).

Os suportes porosos de óxido de titânio, utilizados para a produção da curva de crescimento microbiano, possuíam duas porosidades diferentes. Com isso, duas curvas foram produzidas para o mesmo suporte, variando apenas a sua porosidade, em função do tempo de cultivo.

A Figura 12 apresenta o perfil da curva de crescimento para o suporte de titânia TI30 (A), para a titânia TI40 (B), e suas atividades de transfrutoseilação em função do tempo de cultivo.

Figura 12 - Concentração de células de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em suporte de óxido de titânio (1,0 x 1,0 x 1,0 cm), e suas atividades de transfrutossilação em função do tempo de cultivo



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) TI30;

B) TI40.

Na Figura 12 – (A), para o TI30, observa-se a fase lag do início do processo até o tempo de 16 h, seguido pela fase de crescimento exponencial até o final do ensaio, no tempo de 48 h. Com isso, a máxima concentração de células imobilizadas no suporte TI30 foi de $0,25 \pm 0,02$ g célula g suporte⁻¹, no tempo de 48 h. Não é possível

identificar as fases estacionária e de morte celular. Para a atividade de transfrutossilagem, assim como ocorre com a AL30, há um aumento de atividade até o tempo de 32 h, onde este foi o maior valor observado, de $308,85 \pm 7,88 \text{ U g}^{-1}$, seguido pela diminuição do mesmo até o último tempo do cultivo.

Na Figura 12 – (B), para a peça de TI40, têm-se a fase lag do início até o tempo de 24 h, seguido pela fase de crescimento exponencial no ponto de 32 h. A partir desse tempo, até o último ponto da curva, observa-se a fase estacionária, visto que os pontos não possuem diferença significativa, verificado pelo teste de Tukey (5%). A máxima concentração alcançada foi no tempo de 40 h. com valor de $0,23 \pm 0,06 \text{ g}_{\text{célula}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$. Assim como nas análises das curvas de crescimento anteriores, para a TI40 também não é possível observar as fases lag e de morte celular.

O fato de não ser possível identificar a fase lag para todos os suportes, pode ser justificado pelo fato do novo meio onde o microrganismo foi inserido, apresentar mais nutrientes que o seu meio original. Sendo assim, o cultivo de microrganismos em meio mais rico que o original leva, na maior parte das vezes, a uma redução ou extinção da fase lag (Black, J.; Black, L., 2021). Já para a fase de morte celular, considera-se que o tempo de 48 h de cultivo celular submerso não seja suficiente para sua identificação.

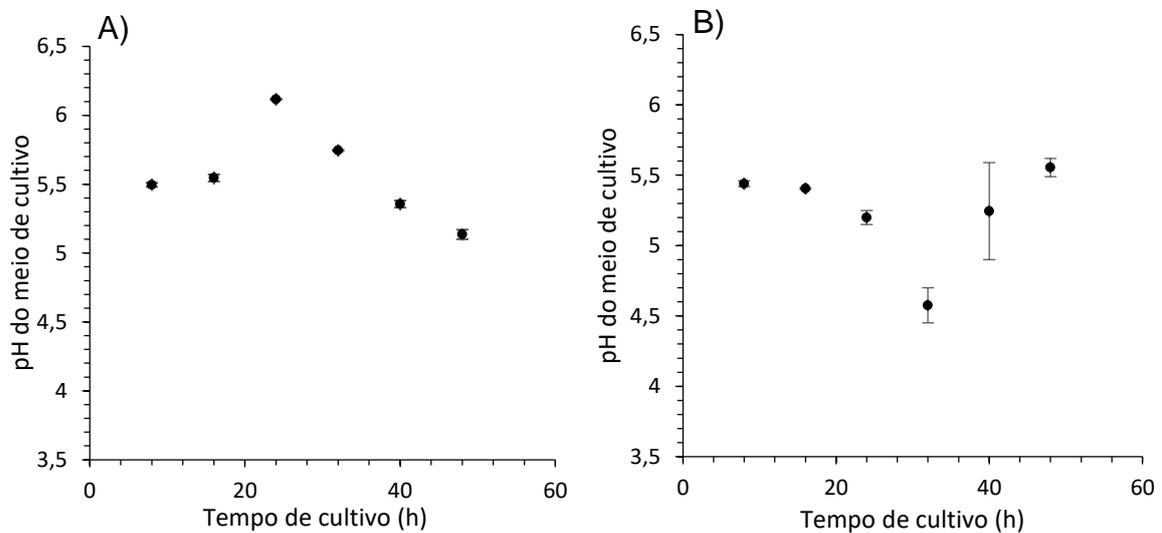
Castro *et al.* (2017) imobilizaram células de *A. pullulans* em materiais sintéticos e encontraram concentrações maiores, cerca de $2,16 \pm 0,09 \text{ g}_{\text{célula}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$, para os suportes de espuma de poliuretano reticulada, lã de vidro e fibra de poliéster. Para a espuma de poliuretano reticulada, obtiveram a quantidade máxima de FOS de $108,17 \pm 8,83 \text{ g L}^{-1}$.

Mussato *et al.* (2009) encontraram para a imobilização do *Aspergillus japonicus*, em materiais sintéticos, valores de concentração de células imobilizadas iguais a 1,13, 0,48 e 1,25 $\text{g}_{\text{célula}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ para esponja de aço inoxidável, espuma de poliuretano e fibra vegetal, respectivamente. Para estes valores, o tempo de cultivo foi de 48 h. Relataram, também, que para ambos os suportes, o tempo que alcançou maiores concentrações de FOS foi de 24 h, onde a fibra vegetal produziu $116,3 \text{ g L}^{-1}$, a esponja de aço inoxidável $111,8 \text{ g L}^{-1}$ e a esponja de poliuretano $110,3 \text{ g L}^{-1}$.

Com relação ao pH do meio de cultivo, apresentado na Figura 13 (A) e (B), a titânia TI30 apresentou um leve aumento de pH, sendo o maior deles de $6,11 \pm 0,005$ no tempo de 24 h. Assim como encontrado no suporte de alumina, o pH alcançou uma basicidade em alguns pontos, visto que ambos os suportes apresentaram resquícios

de suas peças no meio de cultivo, em função de fraturas durante o processo. Para a titânia TI40, o pH do meio se manteve praticamente constante, alcançando um pico de acidez no ponto de 32 h ($4,58 \pm 0,13$), ponto este que apresentou o maior valor de atividade de transfrutoseilação e também marca o fim da fase log para a curva em questão. Ao fim da fase log e início da fase estacionária, têm se a produção de metabólitos secundários, que podem causar um aumento de pH do meio.

Figura 13 - Progressão do pH do meio de cultura de células de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em suporte de óxido de titânio (1,0 x 1,0 x 1,0 cm) em função do tempo de cultivo celular



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) TI30;

B) TI40.

Barbosa (2022) produziram uma curva de crescimento microbiano com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja de poliuretano, e, ao verificar o pH durante o cultivo, chegaram a resultado parecido com o encontrado para a TI40, onde o menor valor chegou próximo à 5,0. Isso pode ser relacionado à liberação de aminoácidos pelo microrganismo ao digerir os nutrientes de seu interesse do meio de cultivo.

As peças porosas de titânia TI30 apresentaram resultados análogos às peças de alumina, visto que estas foram produzidas a partir do mesmo molde, ou seja, possuem porosidades iguais (30 ppi).

A Tabela 5 apresenta os principais resultados das curvas de crescimento e de atividade de transfrutoseilação, para ambos os suportes, a fim de comparação.

Tabela 5 - Principais e maiores valores encontrados para as curvas de crescimento de AL30, TI30 e TI40

Parâmetro	AL30	TI30	TI40
Atividade de transfrutossilação (U g⁻¹)	480,75 em 32 h	308,85 em 32 h	242,93 em 32 h
Concentração de célula imobilizada (g_{célula} g_{suporte}⁻¹)	0,14 em 48 h	0,25 em 48 h	0,23 em 40 h

Fonte: Autora (2024).

Realizando um comparativo com as Figuras 10 e 12 (A) e (B) e analisando a Tabela 5, nota-se que em todos os casos, os maiores valores de atividade de transfrutossilação foram no tempo de 32 h. Apesar das maiores concentrações de célula serem a partir de 40 h, após esse tempo há uma queda gradativa nas atividades, em ambos os suportes. Com isso, o tempo ótimo de cultivo celular para as peças porosas e, o que será utilizado para todos os cultivos dos próximos ensaios, foi de 32 h.

5.2 ENSAIOS DE REGENERAÇÃO E REUTILIZAÇÃO DO SUPORTE

Após o tratamento térmico de regeneração dos suportes de alumina e titânia, foi possível perceber que todos obtiveram uma condição mais delicada e quebradiça. Ao se produzir um novo cultivo com essas peças, apenas a titânia TI40 não se desfez durante o processo. Com isso, se confirmou que os estudos para os demais ensaios seriam apenas com a titânia TI40, visto sua resistência à fratura.

Este novo cultivo com a titânia TI40, apresentou os seguintes valores de atividade de transfrutossilação (Tabela 6). Após este cultivo, as mesmas peças foram submetidas a outro tratamento térmico, com as condições ideais de queima, e novamente os suportes foram utilizados para outro cultivo celular, repetindo este processo até a 3ª regeneração e reutilização.

Tabela 6 - Resultados obtidos das reutilizações da titânia TI40

Parâmetro	1ª Reutilização	2ª Reutilização	3ª Reutilização
Atividade de transfrutossilagem (U g ⁻¹)	371,58 ± 48,04	325,94 ± 77,13	37,16 ± 12,34
Concentração de células (g _{células} g _{suporte} ⁻¹)	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,1 ± 0,04

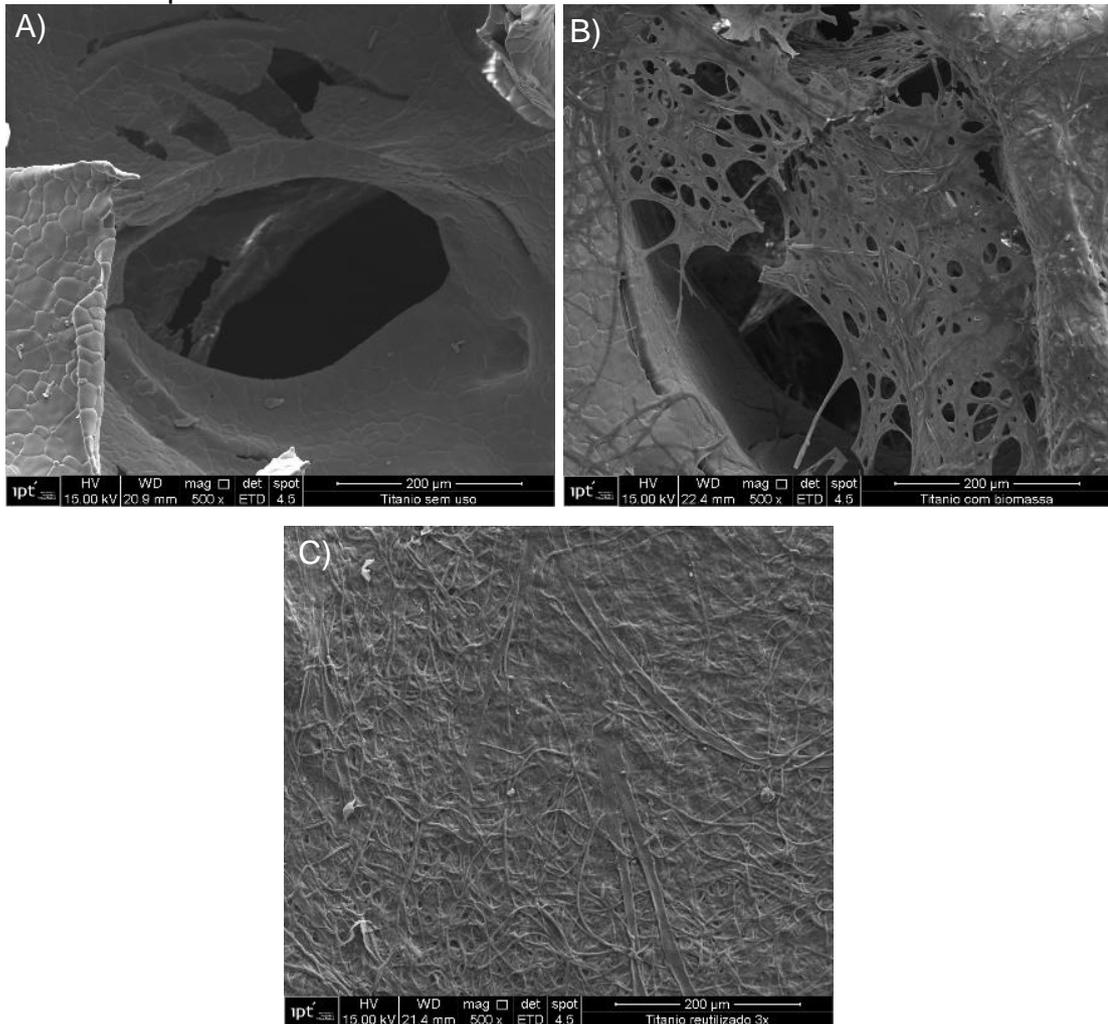
Fonte: Autora (2024).

A partir da análise da Tabela 6 pode-se observar que, tanto a atividade de transfrutossilagem quanto a concentração de células imobilizadas, para a primeira e segunda reutilização, obteve-se valores muito próximos, o que evidencia a eficácia na reutilização do suporte poroso em pelo menos dois ciclos de cultivo após total eliminação da matéria orgânica. Nota-se, porém, que a cada tratamento térmico nos suportes, estes vão se tornando mais frágeis e quebradiços, além da queda de atividade a partir da terceira reutilização. Este resultado é um grande diferencial no reaproveitamento de suportes para a imobilização de células, o qual é um procedimento oneroso e inclusive impossível em suportes orgânicos, e não tem sido reportado para produção enzimática de FOS.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS BIOCATALISADORES

Foi realizada a caracterização física de imagem do microrganismo imobilizado no suporte de titânia TI40 após 32 h de cultivo. A Figura 14 (A) mostra o suporte antes da imobilização, onde é possível visualizar seus poros de maneira clara. Na Figura 14 (B) e (C) têm-se o suporte utilizado pela primeira vez e o suporte regenerado e reutilizado, respectivamente, com célula imobilizada após 32 h de cultivo, indicando que ambos possibilitaram o crescimento celular em seus poros. É possível perceber que a imobilização não alterou a textura do corpo poroso.

Figura 14 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Imagens ampliadas em 500x



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) TI40 antes da imobilização;

B) TI40 contendo biomassa;

C) TI40 após a regeneração e reutilização, contendo biomassa.

Os resultados da análise de Fisissorção de Nitrogênio para os suportes, dispostos na Tabela 7, mostraram que ambos os suportes não apresentam diferenças significativas na sua área superficial, volume de poros e tamanho de poros.

Tabela 7 - Resultados obtidos na análise BET

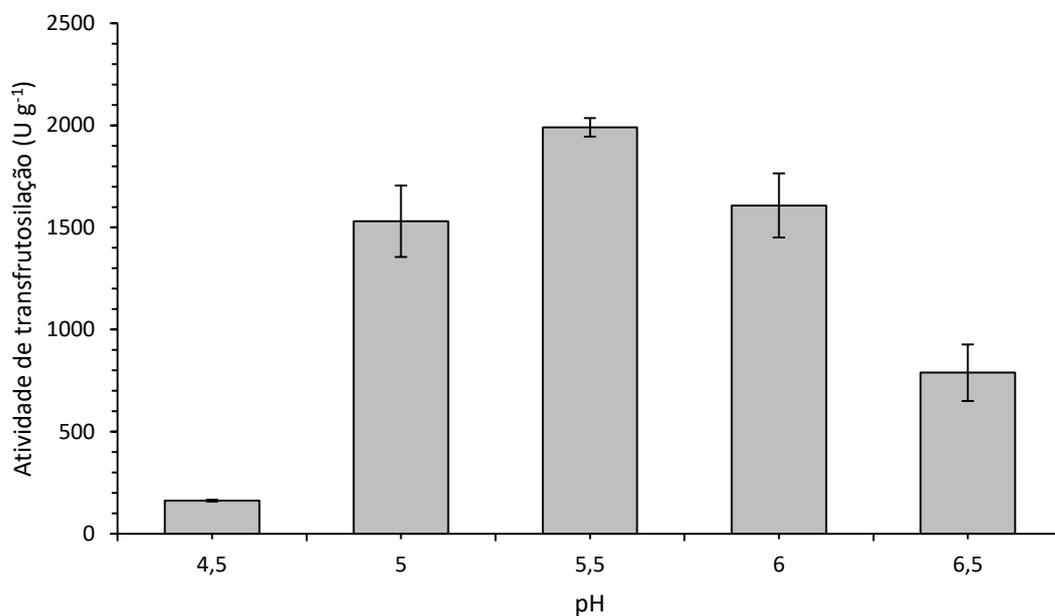
Parâmetro	AL30	TI30	TI40
Área superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	0,7022	0,4814	0,2041
Volume de poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	$5,15 \times 10^{-4}$	$1,83 \times 10^{-4}$	$0,3 \times 10^{-4}$
Tamanho de poro (Å)	20,965	21,146	20,677

Fonte: Autora (2024).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E DE ESTABILIDADE

O efeito do pH de armazenamento na atividade de transfrutoseilação de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 é mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Estabilidade frente pH de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm)



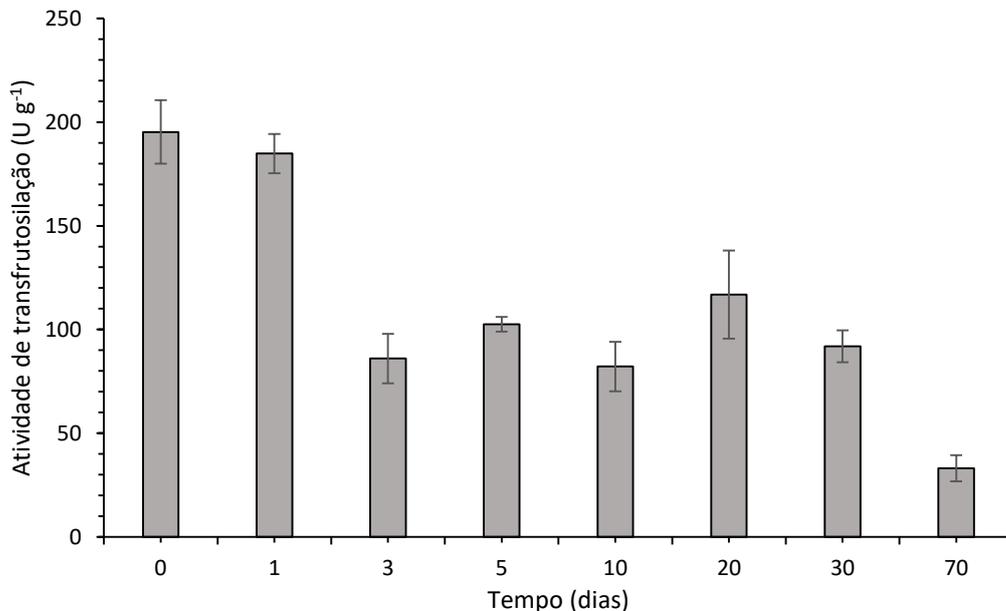
Fonte: Autora (2024).

Observou-se que as células imobilizadas em titânia apresentaram maiores valores de atividade de transfrutoseilação para uma faixa de pH contida entre 5,0 e 6,0, o que está de acordo com os valores reportados na literatura, para este fungo. O valor de máxima atividade, $1990,12 \pm 45,5 \text{ U g}^{-1}$, foi identificado no pH 5,5.

Garcia *et al.* (2021) investigaram a FTase micelial *in natura* de *Aspergillus oryzae* IPT-301, e avaliaram a atividade de transfrutoseilação, após armazenamento por 24 h, na ausência de substrato, em uma faixa de pH de 3,0 a 8,0. Constataram que o biocatalisador reticulado com glutaraldeído, demonstrou estabilidade em pHs entre 4,5 e 7,5. Gonçalves *et al.* (2020), utilizando o mesmo microrganismo, examinaram sua estabilidade encapsulada em esferas de alginato, demonstrando que ele permaneceu estável em pHs entre 5,5 e 7,5.

A Figura 16 apresenta o perfil de estabilidade de armazenamento das células imobilizadas em TI40, no período de 70 dias, em pH 5,5.

Figura 16 - Perfis de estabilidade de armazenamento das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm)

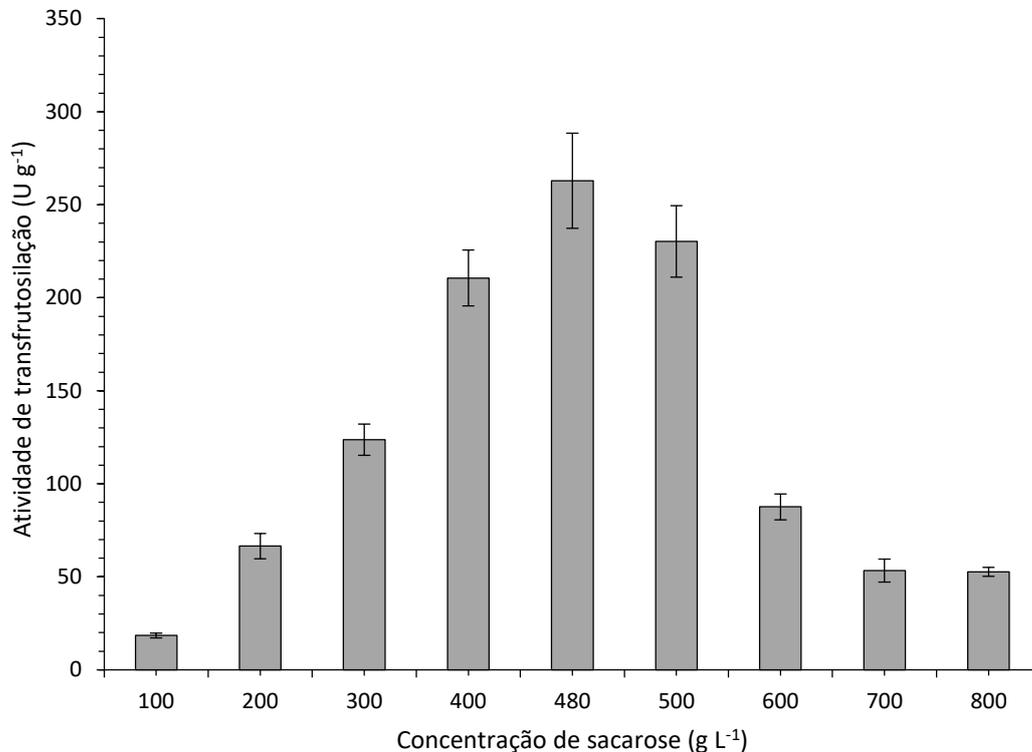


Fonte: Autora (2024).

Pode-se notar que para os tempos de 0 e 1 dia, as atividades de transfrutoseilação permanecem, estatisticamente, iguais, com valores de $195,25 \pm 15,3$ U g⁻¹ e $182,84 \pm 9,5$ U g⁻¹, respectivamente. Entretanto, o valor de atividade do dia 1 para o dia 3 ($85,99 \pm 11,9$ U g⁻¹) teve uma queda, de 53 %, se mantendo constante até o dia 30, e caindo novamente no último dia. Houve uma retenção de 17 % na atividade inicial até o último ponto, este de 70 dias. Faria *et al.* (2020) realizaram o ensaio de armazenamento durante 5 dias, e obtiveram que a FTase imobilizada em PHB e em GLU-PHB reteve uma atividade de $14,36\% \pm 1,14\%$ e $44,07\% \pm 8,48\%$, respectivamente. Segundo Silva *et al.* (2021), a FTase solúvel advinda de *A. oryzae* IPT-301 retém 45,9 % da sua atividade inicial, em apenas 9 h de armazenamento. Com isso, confirma-se que com a imobilização da célula em óxido de titânio, há uma maior estabilidade de armazenamento.

A influência da concentração de sacarose do meio reacional na atividade de transfrutoseilação de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em TI40 está disposto na Figura 17.

Figura 17 - Influência da concentração de substrato nas atividades de transfrutoseilação de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm)



Fonte: Autora (2024).

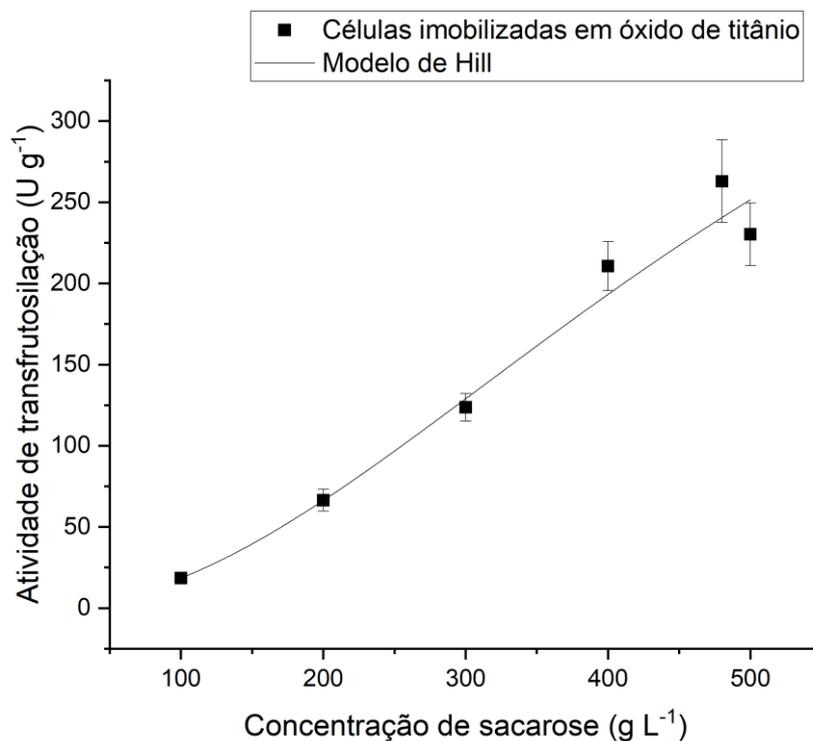
Verificou-se que o maior valor de atividade de transfrutoseilação ($262,89 \pm 25,49$) foi obtido para a concentração de sacarose igual a 480 g L^{-1} . Em semelhança, têm-se que Garcia *et al.* (2021) encontraram, para células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 reticulada em glutaraldeído, maior atividade de transfrutoseilação na concentração de $377,5 \text{ g L}^{-1}$, e maior razão A_T/A_H para a concentração de $480,2 \text{ g L}^{-1}$. Gonçalves *et al.* (2020), utilizando a célula reticulada e encapsulada, chegou em maiores valores de atividade para a concentração de 400 g L^{-1} . Araújo *et al.* (2022) encontraram, para FTase tanto apenas imobilizada em PHB (polihidroxibutirato) quanto imobilizada em PHB e reticulada com glutaraldeído, maiores valores de atividade de transfrutoseilação em concentrações de substrato entre 400 e 500 g L^{-1} .

Após as células microbianas alcançarem seu pico de atividade enzimática, observou-se uma leve diminuição da atividade. Esses resultados podem sugerir a presença de inibição devido à saturação dos sítios ativos do complexo enzimático pelo substrato e/ou pelo produto, ou uma possível limitação de acesso do substrato aos sítios ativos das FTases aderidas às células microbianas (Antosová, Polakovic, 2001; Ashfaque *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2020).

Alvarado-Huallanco e Maugeri (2011) sintetizaram fruto-oligossacarídeos utilizando a FTase de *Rhodotorula sp.* Seus estudos concluíram que, para concentrações de sacarose acima de 70% do meio reacional (em g L⁻¹), ocorre efeitos de inibição pelo substrato. De maneira semelhante, observou-se que a imobilização da FTase em óxido de titânio resultou em redução da atividade de transfrutoseilação a partir da concentração de 600 g L⁻¹.

A Figura 18 mostra o perfil de cinética enzimática ajustado de acordo com o Modelo de Hill, sendo este o que mais se adequou aos dados, onde o coeficiente de determinação de erro (R²) foi de 0,993, como mostra a Tabela 8.

Figura 18 - Dados sobre a atividade de transfrutoseilação e seu ajuste ao modelo de Hill para células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm)



Fonte: Autora (2024).

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Hill para células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40

(continua)

Parâmetros	Células imobilizadas em TI40
$V_{\text{máx}}$ (U g ⁻¹)	548,44 ± 235,23

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Hill para células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (conclusão)

Parâmetros	Células imobilizadas em TI40
$k_{0,5}$ (g L ⁻¹)	543,56 ± 197,2
n	1,98 ± 0,19
R ²	0,993

Fonte: Autora (2024).

Ao se avaliar os resultados aos modelos cinéticos clássicos reportados na literatura, apenas o Modelo de Hill se ajustou com os dados experimentais. Entretanto, para isso, foi necessário que o ajuste se realizasse até a concentração de 500 g L⁻¹, visto que, a partir desse ponto, os valores de atividade caem drasticamente, impedindo a adequação do ensaio em qualquer modelo cinético. Outros autores também relataram o modelo cinético de Hill para seus dados, como Cunha *et al.* (2019), para a FTase micelial, Faria *et al.* (2020), com células imobilizadas em sílica gel, e Araújo *et al.* (2022), com imobilização em PHB e PHB reticulado com glutaraldeído.

A velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) representa a máxima velocidade de reação alcançada pelo sistema em uma concentração saturante de substrato. Indica a capacidade máxima da enzima de converteres substrato em produto. O valor de $V_{m\acute{a}x}$ obtido neste trabalho foi de 548,44 ± 235,23 U g⁻¹. O coeficiente de Hill (n) descreve a cooperatividade da ligação do substrato à enzima. Um valor de n maior que 1 indica cooperação positiva, enquanto um valor menor que 1 indica cooperação negativa. Logo, é possível afirmar que há cooperação positiva, visto que se obteve um valor de 1,98 ± 0,19 para o coeficiente de Hill. A constante de dissociação aparente ($k_{0,5}$) refere-se à concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima de reação. Quanto menor o valor desse parâmetro, maior a afinidade da enzima pelo substrato. O valor encontrado para $k_{0,5}$ foi maior que os valores reportados pelos autores citados acima, e a Tabela 9 apresenta o comparativo entre todos os parâmetros.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Hill para células de *A. oryzae* IPT-301 por alguns autores da literatura

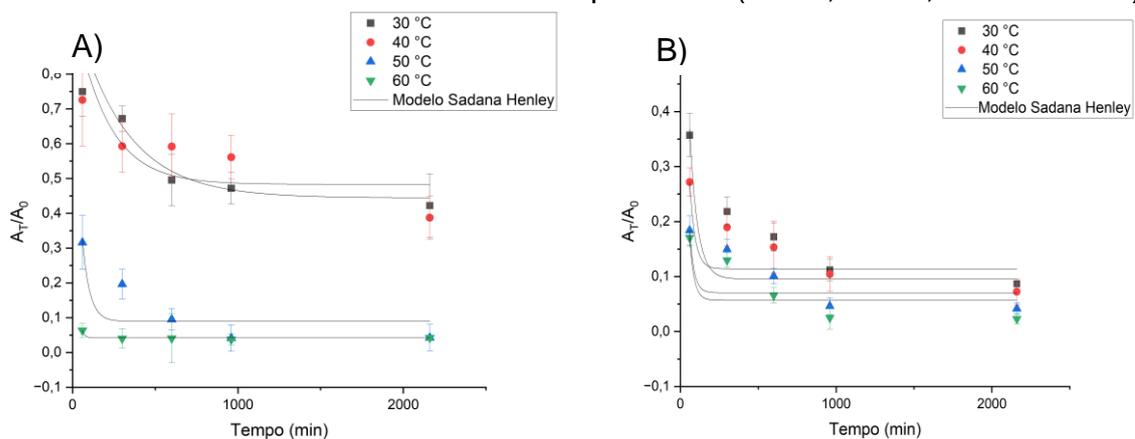
Parâmetros	Este trabalho	Cunha <i>et al.</i> (2019)	Faria <i>et al.</i> (2020)	Araújo <i>et al.</i> (2022)*
$V_{m\acute{a}x}$ (U g ⁻¹)	548,44	342,23	1,45	8,023 e 10,35
$k_{0,5}$ (g L ⁻¹)	543,56	234,73	204,2	221,14 e 205,9
n	1,98	1,41	10,4	6,38 e 6,39
R ²	0,993	0,926	0,993	0,94 e 0,98

Fonte: Autora (2024).

Nota: Valores para célula apenas imobilizada em PHB e imobilizada em BHB e reticulada com glutaraldeído, respectivamente.

A Figura 19 mostra o perfil de inativação da FTase imobilizada em TI40.

Figura 19 - Perfil de desativação térmica de células de *A. oryzae* IPT-301 incubadas durante 36 h sob diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C)

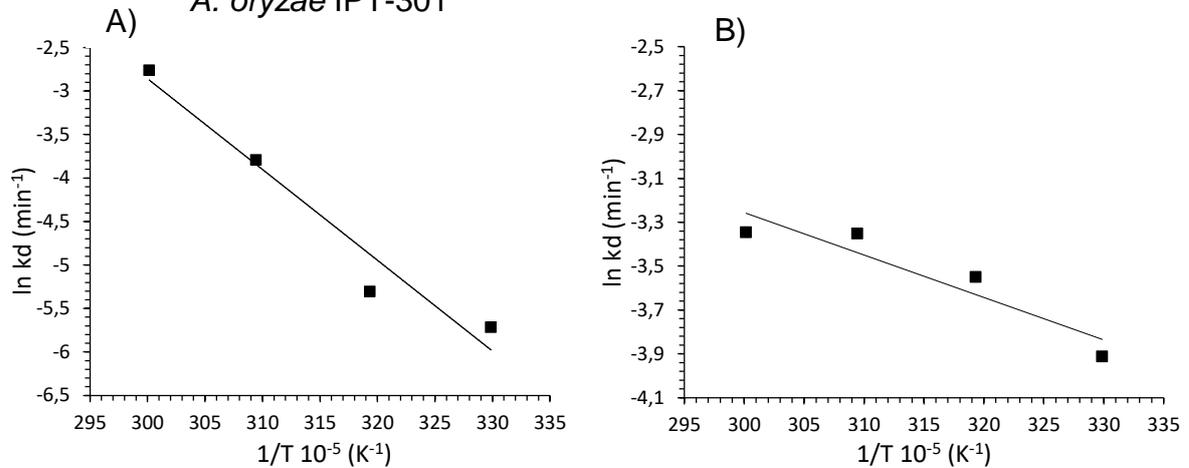


Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) células imobilizadas em TI40;
B) célula *in natura*.

A partir da Figura 19 (A) e (B), obteve-se os valores da constante de desativação térmica (k_D) para cada temperatura, podendo assim, realizar a linearização pela Equação de Arrhenius (Figura 20) para obtenção da energia de ativação de desnaturação térmica (E_D) do biocatalizador e da FTase *in natura*.

Figura 20 - Linearização da Equação de Arrhenius [$\ln(k_D)$ versus (T^{-1})] para determinação da energia de desnaturação térmica (E_D) das células de *A. oryzae* IPT-301



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) células imobilizadas em TI40;

B) células *in natura*.

A energia de ativação de desnaturação térmica para a célula imobilizada foi obtida pela Equação (13), onde o ajuste indicado pela Figura 20 (A) apresentou um valor de R^2 igual a 0,95.

$$\ln k_D = 28,464 - 0,1044 \frac{1}{T} \quad (13)$$

Para a FTase *in natura*, a energia de ativação de desnaturação térmica foi obtida pela Equação (14), onde o ajuste indicado pela Figura 20 (B) apresentou um valor de R^2 igual a 0,87.

$$\ln k_D = 2,5465 - 0,0193 \frac{1}{T} \quad (14)$$

A Tabela 10 apresenta os valores calculados dos parâmetros termodinâmicos, a partir dos ajustes dispostos na Figura 20 (A) e (B), para a célula imobilizada (IM) e *in natura*:

Tabela 11 - Parâmetros termodinâmicos para as células imobilizadas em óxido de titânio e *in natura*

Parâmetros	FTase	Temperatura (°C)			
		30	40	50	60
R ²	IM	0,77	0,36	0,46	0,93
	<i>in natura</i>	0,57	0,75	0,34	0,48
k _D (min ⁻¹)	IM	3,29 x 10 ⁻³	4,97 x 10 ⁻³	22,6 x 10 ⁻³	63,3 x 10 ⁻³
	<i>in natura</i>	20 x 10 ⁻³	28,7 x 10 ⁻³	34,9 x 10 ⁻³	35,2 x 10 ⁻³
T _{1/2} (min)	IM	210,68	139,47	30,69	10,96
	<i>in natura</i>	34,66	24,15	19,82	19,69
E _D (kJ mol ⁻¹)	IM		86,79		
	<i>in natura</i>		16,05		
ΔH _D (kJ mol ⁻¹)	IM	84,28	84,19	84,11	84,03
	<i>in natura</i>	13,52	13,44	13,36	13,28
ΔG _D (kJ mol ⁻¹)	IM	23,57	23,36	20,12	17,98
	<i>in natura</i>	13,53	13,44	13,36	13,28
ΔS _D (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	IM	0,2	0,19	0,2	0,2
	<i>in natura</i>	-0,018	-0,017	-0,017	-0,019

Fonte: Autora (2024).

A partir dos dados termodinâmicos, observa-se que para a célula imobilizada o maior tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi de 210,68 min, na temperatura de 30 °C, e que este parâmetro diminui conforme se aumenta a temperatura de incubação. O mesmo ocorre com a FTase *in natura*, porém, o seu maior tempo de meia vida foi de 34,66 min, que corresponde a 83,55 % a menos do tempo encontrado para a célula imobilizada, na mesma temperatura. Em consonância, Araújo *et al.* (2022) também relataram que a célula solúvel apresentou valores muito menores de tempo de meia-vida comparada com a célula imobilizada e imobilizada e reticulada com glutaraldeído, sendo estes de 122,46, 224,31 e 317,95 min, respectivamente, para a temperatura de 30 °C. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) pode ser definido como o tempo que é preciso para que a atividade enzimática diminua para metade da sua atividade inicial a uma dada temperatura. Altos valores de meia-vida indicam que a enzima pode resistir a essa temperatura por um período maior (Araújo *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021; Saqib *et al.*, 2010). Podemos verificar que, quanto menor o valor da constante de desnaturação térmica (k_D), maior é o tempo de meia-vida, logo, maior a estabilidade da enzima.

A energia de desativação térmica, ou, energia de ativação da desnaturação térmica (E_D), é a quantidade mínima de energia que deve ser fornecida para que uma enzima passe do seu estado estável para um estado intermediário instável e, possivelmente, para o estado desnaturado. O processo de desnaturação térmica leva a perda da estrutura tridimensional da enzima, o que impacta sua atividade catalítica (Saqib *et al.*, 2010). Os resultados obtidos no experimento mostram que a energia de ativação da desnaturação térmica da célula imobilizada ($86,79 \text{ kJ mol}^{-1}$) é 5,4 vezes maior que da célula *in natura* ($16,05 \text{ kJ mol}^{-1}$), o que indica que a imobilização da FTase aumentou sua estabilidade térmica.

A variação de entalpia de ativação de desnaturação (ΔH_D) representa a energia térmica absorvida ou liberada durante uma reação química ou processo físico mantido a pressão constante. Em termos da desnaturação térmica de enzimas, a variação de entalpia de ativação para desnaturação indica a quantidade de energia requerida para levar a enzima ao estado ativado para a desnaturação a uma determinada temperatura (Saqib *et al.*, 2010). Valores altos e positivos da variação de entalpia de ativação de desnaturação indica maior termoestabilidade do biocatalisador (Araújo *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021). Com isso, nota-se que para este parâmetro, os maiores valores são pertencentes à condição de célula imobilizada, sendo que, para a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, obteve-se valores 6,2 vezes maior que a célula *in natura*.

A variação de entropia de desnaturação (ΔS_D) reflete a quantidade de desordem ou aleatoriedade presente em um sistema. Durante a desnaturação, a estrutura organizada da enzima se desfaz, levando a um incremento na entropia, ou seja, a desnaturação térmica leva a um aumento da entropia (Saqib *et al.*, 2010). Diferentemente de todos os outros parâmetros abordados, a variação de entropia de desnaturação foi o único cujos dados apresentaram-se melhores para a célula *in natura*, visto que, os resultados para esta condição, obtiveram valores negativos, o que indica a transição para o estado mais ordenado da enzima.

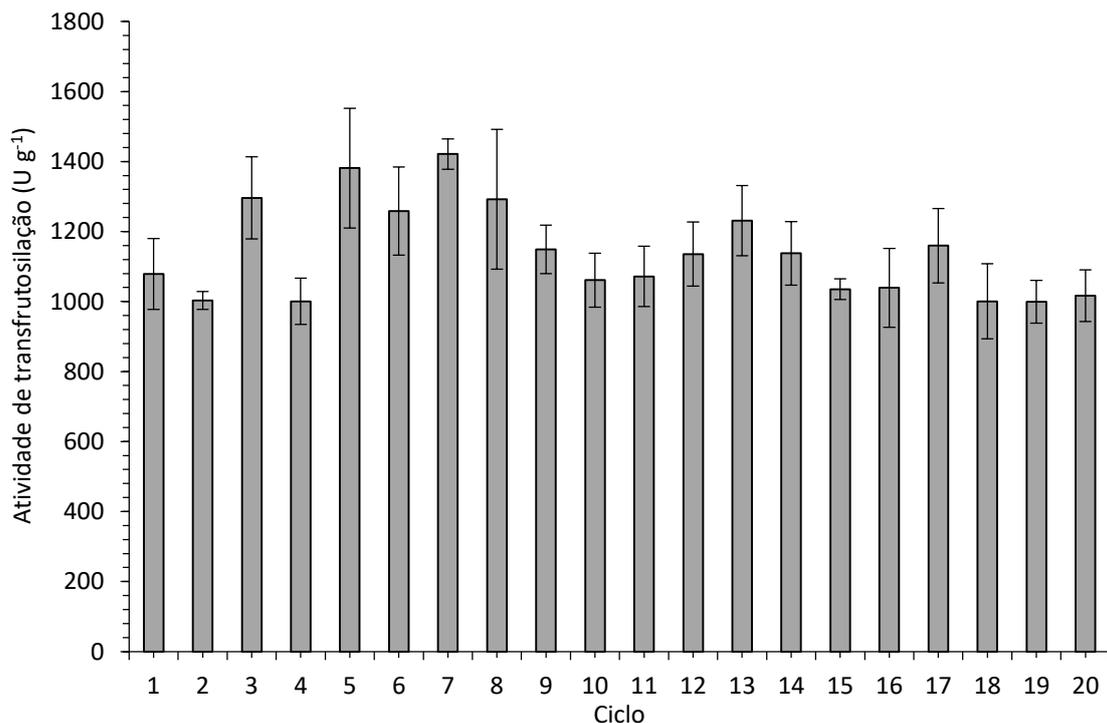
A variação da energia de Gibbs (ΔG_D) é o parâmetro termodinâmico mais fundamentado e preciso para analisar a estabilidade térmica do biocatalisador, visto que inclui tanto contribuições entálpicas quanto entrópicas, sendo que, quanto maior seus valores, mais termoestável se encontra o sistema (Faria *et al.*, 2020). Obteve-se melhores resultados para a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e para a célula imobilizada, sendo este valor 1,7 vezes maior que a célula *in natura*.

Por fim, pode-se concluir que a imobilização de células em suporte de óxido de titânio aumentou a termoestabilidade quando comparada com a célula *in natura*. Araújo *et al.* (2022) ao avaliarem a estabilidade térmica da célula de *Aspergillus oryzae* IPT-301 *in natura*, imobilizado e imobilizado e reticulado, também alcançaram melhores valores dos parâmetros termodinâmicos para as condições de imobilização, destacando que os resultados foram mais altos, em todas as temperaturas testadas, para a FTase imobilizada e reticulada, indicando que essa forma de imobilização proporciona uma proteção superior em comparação com a FTase solúvel e apenas imobilizada.

5.5 ESTABILIDADE OPERACIONAL

O ensaio de estabilidade operacional em reator batelada foi realizado com 20 ciclos, onde os resultados de atividade de transfrutoseilação em função do número de ciclos está disposto na Figura 21:

Figura 21 - Estabilidade operacional de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm), durante ciclos reacionais consecutivos em batelada



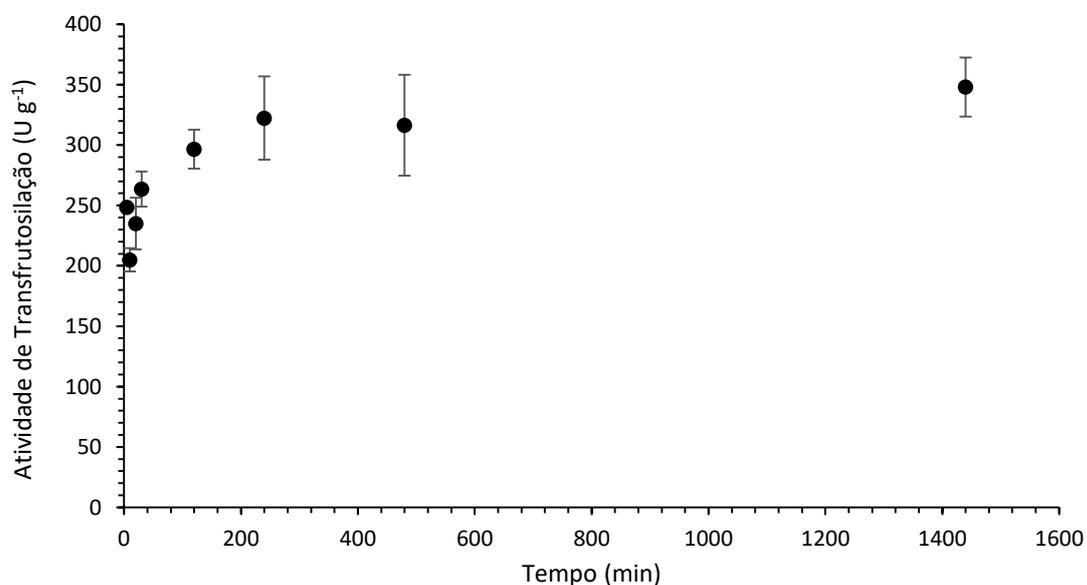
Fonte: Autora (2024).

O maior valor de atividade de transfrutoseilação do ensaio, foi de $1421,56 \pm 43,24 \text{ U g}^{-1}$, para o sétimo ciclo. No entanto, pode-se notar que, de acordo com as análises estatísticas, os pontos não possuem diferença significativa. Mesmo após vinte ciclos reacionais, o último ponto apresentou um valor de atividade de $1016,42 \pm 73,81 \text{ U g}^{-1}$. Pode-se dizer que houve uma queda de apenas 30 % do maior valor de atividade, em comparação com o menor valor do ensaio, sendo estes correspondentes ao sétimo e penúltimo ciclo, respectivamente.

Faria *et al.* (2020) reportaram que a atividade de transfrutoseilação, de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em sílica gel, não se alterou ao decorrer dos primeiros dois ciclos consecutivos, vindo a cair cerca de 45 % de seu valor inicial no terceiro, permanecendo constante até cair, novamente, no quinto ciclo. Garcia *et al.* (2021) mostraram, com a reticulação da mesma célula com glutaraldeído, que após 12 ciclos a atividade se manteve 88,9 % da inicial. Com isso, os resultados obtidos não só corroboram com os dados da literatura, que indicam uma maior estabilidade operacional para a utilização de células imobilizadas, como potencializam o suporte de óxido de titânio para imobilização celular.

A Figura 22 mostra o perfil do biocatalisador heterogêneo em reator de leito fixo (PBR) durante 24 h de processo.

Figura 22 - Estabilidade operacional de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte poroso TI40 (1,0 x 1,0 x 1,0 cm), durante ciclos reacionais consecutivos em reator PBR



Fonte: Autora (2024).

Ao analisar a Figura 22 é possível perceber que a partir de 120 min de reação o sistema se apresenta estabilizado, o que pode ser confirmado pela análise ANOVA, que apontou que não há diferença significativa entre este ponto e os demais, até o final do processo. A maior atividade de transfrutossilação foi de $345,06 \pm 24,38 \text{ U g}^{-1}$, após 24 h de reação.

Dias *et al.* (2022) obtiveram o maior valor de atividade de transfrutossilação, para a célula *in natura* de *A. oryzae* IPT-301 em reator PBR, de 660 U g^{-1} , com início da estabilidade em 25 min de reação, com condições para concentração de substrato de 470 g L^{-1} , a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e vazão volumétrica de 15 mL min^{-1} , atribuindo o aumento da atividade com a maior vazão de escoamento. Entretanto, o aumento do fluxo também aumenta a velocidade da queda desta atividade, que pode estar associada ao arraste de enzimas. Relataram que na menor vazão estudada, esta de 5 mL min^{-1} , houve uma maior estabilidade operacional. Ribeiro *et al.* (2023), imobilizando as células do mesmo fungo com glutaraldeído, alcançaram o maior valor de atividade (190 U g^{-1}) do biocatalisador em 5 mL min^{-1} , $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e concentrações de sacarose de 473 e 500 g mL^{-1} , condições semelhantes com aquelas encontradas por Dias *et al.* (2022), e utilizadas neste trabalho. Ambos obtiveram estabilidade de reação durante as 12 horas de funcionamento dos reatores.

Ao realizar um comparativo entre os ensaios de reatores batelada e PBR, pode-se notar que em ambos os casos o biocatalisador se mostrou eficiente, atingindo a estabilidade a partir da primeira hora de processo, e se mantendo até o final, de 20 ciclos para o reator batelada (20 horas) e de 24 horas para o PBR.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a produção e imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em suportes porosos de óxido de alumínio e óxido de titânio, com atividade de transfrutossilação, por cultivo celular submerso em meio de cultura sintético.

Concluiu-se que, a partir da curva de crescimento microbiano e seus valores de atividade de transfrutossilação, o melhor tempo de cultivo celular foi de 32 h para ambos os suportes utilizados. O ensaio de regeneração e reutilização mostrou que o suporte de titânia TI40 pôde ser reutilizado com segurança por dois cultivos após a regeneração, com isso, este foi selecionado para os demais ensaios, visto sua maior resistência à fratura durante os ensaios. Os ensaios de caracterização bioquímica obtiveram melhores resultados para: a faixa de pH correspondente entre 5,0 e 6,0, com maior atividade para o meio com pH 5,5; o ensaio de armazenamento indicou que não há diferença significativa na atividade de transfrutossilação nos tempos 0 e 1 dia, entretanto, após 3 dias de armazenamento, os valores caem substancialmente; concentração de sacarose do meio reacional de 480 g L⁻¹, sendo o Modelo de Hill o que melhor se ajustou aos dados, obtendo-se, assim, os valores de 548,44 ± 235,23, 543,56 ± 197,2 e 1,98 ± 0,19 para os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$, $k_{0,5}$ e n , respectivamente; o biocatalisador se mostrou mais estável termicamente que a célula *in natura*, mas ambos apresentaram maior termoestabilidade para a menor temperatura, de 30 °C. Já os ensaios de estabilidade operacional demonstraram que o suporte manteve atividade de transfrutossilação nos 20 ciclos realizados em batelada, com 1 h de reação em cada, mantendo valores constantes durante todo processo, e em reator de leito fixo, mostrou estabilidade na atividade de transfrutossilação a partir do tempo de 120 min, se mantendo assim até o final do ensaio, de 24 h.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A fim de continuidade deste trabalho, são propostas as seguintes sugestões:

- Avaliar o suporte de óxido de alumínio com porosidades diferentes e com temperaturas maiores de sinterização, a fim de aumentar sua resistência durante o processo de cultivo;
- Otimização das variáveis de imobilização (temperatura, pH e velocidade de agitação) por meio de planejamento de experimentos, durante ensaios de cultivo celular;
- Desenvolvimento de novo modelo cinético que melhor se adeque aos dados da FTase;
- Realizar estudos do uso do biocatalisador estudado em reatores de leito fixo, verificar a influência da altura do leito catalítico, vazão volumétrica e reciclo na atividade de transfrutoseilação, e avaliação dos coeficientes de transferência de massa;
- Estudar os efeitos de inibição enzimática em processos contínuos durante a produção de FOS.

REFERÊNCIAS

ALTERTHUM, Flavio (org.). **Biotecnologia industrial, v. 1: fundamentos**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2020. E-book. (1 recurso online). (Biotecnologia industrial). ISBN 9788521218975. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/9788521218975>. Acesso em: 8 jul. 2024.

ALVARADO-HUALLANCO, Mónica B.; MAUGERI FILHO, Francisco. Kinetic studies and modelling of the production of fructooligosaccharides by fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.* **Catalysis Science & Technology**, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 1043, 2011.

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, 20 maio 2008. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.02.016>. Acesso em: 28 maio 2024.

ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.

ASHFAQUE, Mohammad; SOLOMON, Sushil; PATHAK, Neelam. Kinetic Study of Immobilized Cellobiase Produced from Immobilized Wild-Type *Trichoderma longibrachiatum*. **Sugar Tech**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 340-346, 12 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12355-015-0410-1>. Acesso em: 08 mar. 2024.

BARBOSA, Nathália Romani. **Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja de poliuretano para a produção enzimática de fructooligosacarídeos**. 2022. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2022.

BASSO, Luiz Carlos; BASSO, Thiago Olitta; ROCHA, Saul Nitsche. Ethanol Production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel Production-Recent Developments And Prospects**, [s.l.], p. 85-100, 15 set. 2011. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/17047>.

BLACK, J. G.; BLACK, L. J. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. E-book. (1 recurso online). ISBN 9788527737326. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/9788527737326>. Acesso em: 5 jul. 2024.

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

BRAGA, Tiago Pinheiro; PINHEIRO, Antônio Narcísio; TEIXEIRA, Camila Vieira; VALENTINI, Antoninho. Dehydrogenation of ethylbenzene in the presence of CO₂ using a catalyst synthesized by polymeric precursor method. **Applied Catalysis A: General**, [s.l.], v. 366, n. 1, p. 193-200, set. 2009. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2009.07.004>. Acesso em: 20 jan. 2024.

BRENDA. **Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig**. 2018. Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.9>. Acesso em: 28 jan. 2024.

CABRERA-OROZCO, Alberto; GALÍNDEZ-NÁJERA, Silvia Patricia; RUIZ-ORDAZ, Nora; GALÍNDEZ-MAYER, Juvencio; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, Francisco Fernando. Biodegradation of a commercial mixture of the herbicides atrazine and S-metolachlor in a multi-channel packed biofilm reactor. **Environmental Science And Pollution Research**, [s.l.], v. 24, n. 33, p. 25656-25665, 20 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-6204-5>. Acesso em: 15 jan. 2024.

CASTRO, C.C.; NOBRE, C.; DUPREZ, M.-E.; WEIRELD, G. de; HANTSON, A.-L.. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 118, p. 82-90, fev. 2017.

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

COVIZZI, L. G. *et al.* Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 143-160, jul./dez. 2007.

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, jun. 2019.

FERNANDEZ, Rubén Cuervo; OTTONI, Cristiane Angélica; SILVA, Elda Sabino da; MATSUBARA, Rosa Mitiko Saito; CARTER, José Márcio; MAGOSSÍ, Luis Roberto; WADA, Maria Alice Alves; RODRIGUES, Maria Filomena de Andrade; MARESMA, Beatriz Guilarte; MAIORANO, Alfredo Eduardo. 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, maio 2007. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0803-x>. Acesso em: 11 fev. 2024.

DIAS, Giancarlo s; SANTOS, Erica D; XAVIER, Michelle Ca; ALMEIDA, Alex F; SILVA, Elda s; MAIORANO, Alfredo e; PERNA, Rafael F; MORALES, Sergio Av. Study on the transfructosylation activity of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells in a packed bed reactor aiming at fructooligosaccharide production. **Journal Of**

Chemical Technology & Biotechnology, [s.l.], v. 97, n. 10, p. 2904-2911, 9 jul. 2022.

DIAS, Giancarlo de Souza. **Implementação de reator de leito fixo empacotado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para produção de frutooligosacarídeos**. 2020. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, MG, 2020.

DORTA, Claudia; CRUZ, Rubens; OLIVA-NETO, Pedro de; MOURA, Danilo José Camargo. Sugarcane molasses and yeast powder used in the Fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 33, n. 12, p. 1003-1009, 12 jul. 2006. Oxford University Press (OUP).

FARIA, F. P. **Obtenção de cerâmicas porosas de óxido de zinco para aplicação em fotocatalise**. 2019. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas – MG, 2019.

FARIA, Larissa Lemos; MORALES, Sergio Andres Villalba; PRADO, José Pedro Zanetti; DIAS, Giancarlo de Souza; ALMEIDA, Alex Fernando de; XAVIER, Michelle da Cunha Abreu; SILVA, Elda Sabino da; 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, 7 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-020-03016-7>. Acesso em: 23 out. 2023.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, María; SANROMÁN, M. Ángeles; MOLDES, Diego. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 31, n. 8, p. 1808-1825, dez. 2013.

FOGLER, H. Scott. **Cálculo de Reatores - O Essencial da Engenharia das Reações Químicas**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2014. 978-85-216-2638-1. Disponível em: [https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-216-2638-1/epubcfi/6/24\[%3Bvnd.vst.idref%3Dchap01!\]/4\[page1\]/186/1:369\[uto%2Cs](https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-216-2638-1/epubcfi/6/24[%3Bvnd.vst.idref%3Dchap01!]/4[page1]/186/1:369[uto%2Cs). Acesso em: 05 fev. 2024.

FORTES, R. C.; MUNIZ, L. B. Efeitos da suplementação dietética com frutooligosacarídeos e inulina no organismo humano: Estudo baseado em evidências. **Ciência & Saúde**, Brasília, DF, v. 20, p. 241-252, 2009.

FUJISHIMA, A.; ZHANG, X; TRYK, D. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. **Surface Science Reports**, [s.l.], v. 63, n. 12, p. 515-582, 15 dez. 2008. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfrep.2008.10.001>. Acesso em: 28 jun. 2024.

GANAIE, Mohd Anis; RAWAT, Hemant Kumar; WANI, Owais Ahmad; GUPTA, Uma Shanker; KANGO, Naveen. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**,

[s.l.], v. 49, n. 5, p. 840-844, maio 2014. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.026>. Acesso em: 19 jan. 2024.

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, 25 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s43153-021-00110-9>. Acesso em: 17 jul. 2024.

GONÇALVES, Maria Carolina P; MORALES, Sergio A V; SILVA, Eida 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 & Biotechnology**, [s.l.], v. 95, n. 9, p. 2473-2482, 21 abr. 2020. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.6429>. Acesso em: 29 mar. 2024.

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO, J. A. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 105-118, dez. 2002.

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, ago. 1990.

JOHN, Rojan P.; NAMPOOTHIRI, K. Madhavan; PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 41, n. 4, p. 759-763, abr. 2006.

KIM, B. W.; KWON, H. J.; PARK, H. Y.; NAM, S. W.; PARK, J. P.; YUN, J. W.. Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Bioprocess Engineering**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 11-16, 27 jul. 2000. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s004499900078>. Acesso em: 19 jan. 2024.

KOURKOUTAS, Y; A BEKATOROU,; BANAT, I.M; MARCHANT, R; KOUTINAS, A.A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 21, n. 4, p. 377-397, ago. 2004. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>. Acesso em: 04 set. 2024.

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, mar. 1996.

L'HOCINE, Lamia; WANG, Zhang; JIANG, Bo; XU, Shiyang. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger*

AS0023. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 81, n. 1, p. 73-84, jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00277-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00277-7).

LEE, Sang Yup. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 98-105, mar. 1996. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9). Acesso em: 23 out. 2023.

LÓPEZ-MUÑOZ, M. J. REVILLA, A. ALCALDE, G. Brookite TiO₂-based materials: Synthesis and photocatalytic performance in oxidation of methyl Orange and As (III) in aqueous suspensions. **Catalysis Today**, [s.l.], v. 240, p. 138-145, 2015.

LORENZONI, André S.G.; AYDOS, Luiza F.; KLEIN, Manuela P.; AYUB, Marco A.Z.; RODRIGUES, Rafael C.; HERTZ, Plinho F.. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 111, p. 51-55, jan. 2015.

MACEDO, L. L.; VIMERCATI, W. C.; ARAÚJO, C. S. (2020). Fructooligosaccharides: nutritional, technological and sensory aspects. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, p. 4, il. color.

MAIORANO, Alfredo Eduardo; PICCOLI, Rosane Moniz; SILVA, Elda Sabino da; RODRIGUES, Maria Filomena de Andrade. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 30, n. 11, p. 1867-1877, 9 jul. 2008. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-008-9793-3>. Acesso em: 19 jan. 2024.

MEGDA, Fábio. **Imobilização da frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em óxido de zinco para a produção de fructooligossacarídeos**. 2023. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2023.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 426-428, 1 mar. 1959. American Chemical Society (ACS).

MORDOR INTELLIGENCE. **Market size of fructooligosaccharides and stock analysis** - Trends and growth forecasts (2023 - 2028). Mordor Intelligence. 2020. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/fructooligosaccharides-fos-market>. Acesso em: 15 jan. 2023.

MUSSATTO, Solange I.; AGUILAR, Cristóbal N.; RODRIGUES, Lígia R.; TEIXEIRA, José A.. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 344, n. 6, p. 795-800, abr. 2009. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2009.01.025>. Acesso em: 19 jan. 2024.

NASCIMENTO, Gustavo Carvalho do; BATISTA, Ryhára Dias; SANTOS, Claudia Cristina Auler do Amaral; SILVA, Ezequiel Marcelino da; PAULA, Fabrício Coutinho

de; MENDES, Danylo Bezerra; OLIVEIRA, Deyla Paula de; ALMEIDA, Alex Fernando de. β -Fructofuranosidase and β -D-Fructosyltransferase from new *Aspergillus carbonarius* PC-4 strain isolated from Canned Peach Syrup: effect of carbon and nitrogen sources on enzyme production. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2019, p. 1-13, 8 jan. 2019.

NOBRE, C.; ALVES FILHO, E.G.; FERNANDES, F.A.N.; BRITO, E. S.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Production of fructo-oligosaccharides by *Aspergillus ibericus* and their chemical characterization. **Lwt**, [s.l.], v. 89, p. 58-64, mar. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.015>. Acesso em: 12 jul. 2024.

OTTONI, C. A.; CUERVO-FERNÁNDEZ, R.; PICCOLI, R. M.; MOREIRA, R.; GUILARTEMARESMA, B.; SABINO DA SILVA, E.; 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, ed. 1, p.49-59, 2012.

PAPAGIANNI, Maria. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 244-263, maio 2007.

PARK, Jong-Pil; OH, Tae-Kwang; YUN, Jong-Won. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 37, n. 5, p. 471-476, dez. 2001.

PINHEIRO, R. M. M. **Síntese e propriedades no infravermelho distante de pó de TiO₂ nanoestruturado**. 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2012.

QUEISSADA, Daniel Delgado; SILVA, Jesiel Alves da. Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens. **Holos Environment**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 271, 9 abr. 2020. Lepidus Tecnologia. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14295/holos.v20i2.12378>. Acesso em: 13 jul. 2024.

RIBEIRO, Menossi; DA, Rin; DE, Souza; DA, Cunha; DE, Almeida; DA, Silva; MAIORANO, Alfredo; FIRMANI, Perna; VILLALBA, Morales. Cross-linked whole cells for the sucrose transfructosylation reaction in a continuous reactor. **Chemical Industry And Chemical Engineering Quarterly**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 99-110, 2024. National Library of Serbia. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2298/ciceq221220015m>. Acesso em: 13 jul. 2024.

ROBERFROID, M.. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 33, n. 2, p. 103-148, jan. 1993.

ROCHA, Maria De Fátima Farias. **Imobilização celular e suas principais aplicações em bioprocessos: uma revisão**. Tecnologia, investigação, sustentabilidade e os desafios do século XXI... Campina Grande: Realize Editora, p. 543-557, 2020. Disponível em: <https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/64942>.

Acesso em: 04 set. 2024.

ROGERS, P. L.; JEON, Y. J.; LEE, K. J.; LAWFORD, H. G.. *Zymomonas mobilis* for Fuel Ethanol and Higher Value Products. **Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology**, [s.l.], p. 263-288, 2007.

ROMANO, Nelson; SANTOS, Mauricio; MOBILI, Pablo; VEGA, Roberto; GÓMEZ-ZAVAGLIA, Andrea. Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-oligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 202, p. 467-475, jul. 2016.

ROTAN, Magnus; RYTTER, Erling; EINARSRUD, Mari-Ann; GRANDE, Tor. Solid state mechanism leading to enhanced attrition resistance of alumina based catalyst supports for Fischer–Tropsch synthesis. **Journal Of The European Ceramic Society**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 1-6, jan. 2013.

SALEIRO. G. T; CARDOSO, S. L; TOLEDO, R; HOLANDA, N. F. Avaliação das fases cristalinas de dióxido de titânio suportado em cerâmica vermelha. **Revista Cerâmica**, Campos dos Goytacazes, n. 56, p. 162-167, Universidade Estadual do Norte Fluminense; 2010.

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, mar. 2005.

SANTANA, J. L. *et al.* Analysis of the performance of a packed bed reactor to production ethyl esters from crude vegetable oil using lipase immobilized in silica modified with protic ionic liquid. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, n. 8, p. 891-898, 2018.

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, maio 2010.

SARTORI, Thauane Aparecida Inácio da Costa. **Biocerâmicas porosas de alumina e de alumina-zircônia recobertas com fosfato de cálcio para implantes ósseos**. Orientador: Profa. Dra. Elíria M. J. Agnolon Pallone. 2015. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2015.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 2002.

SILVA, Maria Beatriz Pregolato de Oliveira; ABDAL, Daniela; PRADO, José Pedro Zanetti; DIAS, Giancarlo de Souza; MORALES, Sergio Andres Villalba; XAVIER, Michelle da Cunha Abreu; ALMEIDA, Alex Fernando de; SILVA, Elda Sabino da; MAIORANO, Alfredo Eduardo; PERNA, Rafael Firmani. 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. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.28320>. Acesso em: 18 jul. 2024.

SINGH, R. S., SINGH, R. P. Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential. **Food Technol. Biotechnol.** [s.l.], v. 48, n. 4, p. 435–450, 2010.

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

SOUZA, Paula Monteiro; ALIAKBARIAN, Bahar; FERREIRA FILHO, Edivaldo Ximenes; MAGALHÃES, Pérola Oliveira; PESSOA JUNIOR, Adalberto; 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, nov. 2015. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.043>. Acesso em: 26 jan. 2024.

THORAT, Alpna A.; DALVI, Sameer V. Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: recent developments and future perspective. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 181-182, p. 1-34, fev. 2012. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.12.044>. Acesso em: 30 jul. 2024.

TIMMIS, Kenneth N.. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 4, n. 12, p. 779-781, dez. 2002.

VANDÁKOVÁ, M. *et al.* Optimization of cultivation conditions for production of fructosyltransferase by *Aureobasidium pullulans*. **Chem Pap**, [s.l.] v. 58, n. 1, p. 15–22, 2004.

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

VEGA, Roberto; ZÑNIGA-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, nov. 2011.

VIANA, M. M. **Estudo de filmes finos e materiais particulados de TiO₂ e de Ag/TiO₂ produzidos pelo processo sol-gel**. 2011. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

WEISS, James N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 11, n. 11, p. 835-841, set. 1997

WONG, Chun Ming; WONG, Kwun Hei; CHEN, Xiao Dong. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 78, n. 6, p. 927-938, abr. 2008. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1407-4>. Acesso em: 01 abr. 2023.

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

ZAMBELLI, Paolo; TAMBORINI, Lucia; CAZZAMALLI, Samuele; PINTO, Andrea; ARIOLI, Stefania; BALZARETTI, Silvia; PLOU, Francisco J.; FERNANDEZ-ARROJO, Lucia; MOLINARI, Francesco; CONTI, Paola. An efficient continuous flow process for the synthesis of a non-conventional mixture of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 190, p. 607-613, jan. 2016. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.002>. Acesso em: 06 abr. 2023.