

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

VINÍCIUS GOUVEIA DE MELLO

**ESTUDO DO DESEMPENHO CATALÍTICO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae*
IPT-301, IMOBILIZADAS EM SUPORTES POROSOS, PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS EM REATORES DE LEITO FIXO**

POÇOS DE CALDAS/MG

2025

VINÍCIUS GOUVEIA DE MELLO

**ESTUDO DO DESEMPENHO CATALÍTICO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae*
IPT-301, IMOBILIZADAS EM SUPORTES POROSOS, PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS EM REATORES DE LEITO FIXO**

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

Área de concentração: Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

POÇOS DE CALDAS/MG

2025

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

Mello, Vinícius Gouveia de.

Estudo do desempenho catalítico de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, imobilizadas em suportes porosos, para a produção de fruto-oligossacarídeos em reatores de leito fixo / Vinícius Gouveia de Mello. - Poços de Caldas, MG, 2025.

83 f. : il. -

Orientador(a): Sergio Andres Villalba Morales.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Fruto-oligossacarídeos. 2. *Aspergillus oryzae*. 3. Frutosiltransferase. 4. Bioprocessos. I. Morales, Sergio Andres Villalba, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

VINÍCIUS GOUVEIA DE MELLO

ESTUDO DO DESEMPENHO CATALÍTICO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301, IMOBILIZADAS EM SUPORTES POROSOS, PARA A PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS EM REATORES DE LEITO FIXO

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

Aprovada em: 13 de março de 2025.

Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Maximilian Joachim Hoddapp
Instituição: Universidade Federal de Itajubá

Prof. Dr. Marlus Pinheiro Rolemberg
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Andres Villalba Morales, Usuário Externo**, em 07/04/2025, às 08:42, 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 **1456837** e o código CRC **6B608767**.

Dedico à Pâmela, minha esposa,
e às nossas famílias.

AGRADECIMENTOS

À Pâmela, pois foi quem me acompanhou e me motivou durante toda a minha trajetória acadêmica e profissional.

Aos meus pais, Cristina e Israel, e à minha irmã, Jerusa, pelos ensinamentos e por me apoiarem incondicionalmente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales, e ao meu coorientador, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, pela oportunidade de participar do Grupo de Pesquisa em Tecnologia Enzimática e Bioprocessos (GPTEB), pelos conselhos, ensinamentos valiosos e apoio durante todo o mestrado e pela amizade.

A todos do GPTEB, pelo compartilhamento de conhecimentos e pelas inúmeras colaborações ao longo de toda a pesquisa.

Aos servidores e demais trabalhadores da UNIFAL-MG, especialmente aos técnicos do prédio C de Poços de Caldas, pelo suporte técnico e administrativo, por me motivarem a ingressar no mestrado e por me auxiliarem a conciliar trabalho e estudos.

Ao Laboratório de Tecnologias Computacionais da Universidade Federal do Tocantins (LABTEC-UFT), por terem projetado e produzido os suportes porosos por impressão 3D.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Proc. APQ-00793-24; Proc. BPD-00030-22).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Proc. 404912/2021-4; Universal - Proc. 408302/2023-2).

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

RESUMO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são alimentos nutracêuticos considerados promissores substitutos de substâncias adoçantes convencionais. Mundialmente, observa-se um crescimento no mercado de FOS, com previsão para atingir cerca de US\$ 6,25 bilhões até 2030. Muitos estudos têm se concentrado na síntese de FOS a partir da sacarose com o uso de células fúngicas com elevada atividade de transfrutossilação (A_t). Destaca-se, nessa aplicação, a cepa *Aspergillus oryzae* IPT-301, tanto em estudos em batelada quanto em reatores contínuos. Isto posto, o presente trabalho objetivou avaliar o desempenho de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes compostos de espuma de poliuretano comercial (EPU) e poliácido láctico (PLA), empacotadas em reatores de leito fixo (PBR) para a produção de FOS. Os ensaios foram realizados com fluxo ascendente, pH de 5,5 e vazão de 1 ml min⁻¹. No estudo da cinética enzimática com EPU, o sistema atingiu o regime estacionário a partir de cerca de 30 min e a maior A_t ($1504,27 \pm 116,71$ U g⁻¹, 50 °C) foi obtida utilizando 473 g L⁻¹ de sacarose na alimentação. Nos estudos de inibição, observou-se que baixas concentrações de glicose podem inibir a A_t células de *A. oryzae* IPT-301. Pela avaliação da desativação com EPU, observaram-se decaimentos significativos de A_t para temperaturas acima de 30 °C, porém, o maior valor de atividade média no período de 96 h foi obtido com 40°C. Na determinação da desativação para o PLA, estatisticamente não houve variação da atividade, provavelmente, devido à elevada oscilação no perfil de A_t causada pela formação de caminhos preferenciais. Ressalta-se que, em todos os ensaios de desativação, os biocatalisadores tiveram A_t até 96 h. Com o estudo da queda de pressão (ΔP), observou-se que as esferas de vidro utilizadas na base e no topo do leito ofereceram a colaboração mais expressiva, representando cerca de 99 % da ΔP total. Na avaliação da distribuição de tempos de residência (DTR) com EPU, verificou-se um comportamento característico de reatores reais, com assimetria e variância significativa no perfil de DTR e tempo médio de residência de 38,34 min. Tais resultados demonstram que o uso de PBR empacotado com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas é uma alternativa promissora para a produção contínua de FOS.

Palavras-chave: fruto-oligossacarídeos; *Aspergillus oryzae*; frutossiltransferase; bioprocessos.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are nutraceuticals considered promising substitutes for conventional sweeteners. Worldwide, the FOS market is growing, with a forecast to reach approximately US\$ 6.25 billion by 2030. Many studies have focused on the synthesis of FOS from sucrose using fungal cells with high transfructosylation (A_t) activity. In this application, the *Aspergillus oryzae* IPT-301 strain stands out, both in batch and continuous reactor studies. Therefore, the present study aimed to evaluate the performance of *A. oryzae* IPT-301 cells immobilized on supports composed of commercial polyurethane foam (PUF) and polylactic acid (PLA), packaged in packed bed reactors (PBR) for the production of FOS. The tests were performed with ascending flow, pH of 5.5 and flow rate of 1 ml min⁻¹. In the study of enzyme kinetics with EPU, the system reached steady state after approximately 30 min and the highest A_t (1504,27 ± 116,71 U g⁻¹, 50 °C) was obtained using 473 g L⁻¹ of sucrose in the feed. In the inhibition studies, it was observed that low glucose concentrations can inhibit A_t in *A. oryzae* IPT-301 cells. By evaluating deactivation with PUF, significant A_t decreases were observed for temperatures above 30 °C, however, the highest average activity value in the 96 h period was obtained at 40°C. In determining deactivation for PLA, there was no statistical variation in activity, probably due to the high oscillation in the A_t profile caused by the formation of preferential pathways. It is noteworthy that, in all deactivation tests, the biocatalysts had A_t up to 96 h. By studying the pressure drop (ΔP), it was observed that the glass spheres used at the base and top of the bed offered the most expressive collaboration, representing approximately 99% of the total ΔP . In the evaluation of the residence time distribution (DTR) with PUF, a behavior characteristic of real reactors was observed, with asymmetry and significant variance in the DTR profile and an average residence time of 38.34 min. These results demonstrate that the use of PBR packed with immobilized *A. oryzae* IPT-301 cells is a promising alternative for the continuous production of FOS.

Keywords: fructooligosaccharides; *Aspergillus oryzae*; fructosyltransferase; bioprocesses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equipamento para corte de EPU.....	38
Figura 2 – Suportes de EPU e PLA.....	38
Figura 3 – Montagem do aparato experimental.....	41
Figura 4 – Leitos catalíticos empacotados	44
Figura 5 – Saturação do leito catalítico com AM	45
Figura 6 - Perfil da atividade de transfrutossilação em função do tempo com diferentes concentrações de sacarose para avaliação da cinética enzimática de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU.....	50
Figura 7 - Perfil da atividade de transfrutossilação em regime estacionário em função da concentração de sacarose para a avaliação de modelos cinéticos enzimáticos com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU ...	52
Figura 8 - Perfil da atividade de transfrutossilação em função do tempo em diferentes temperaturas para a avaliação da desativação com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU.....	56
Figura 9 - Perfis de atividade de transfrutossilação em função do tempo em diferentes temperaturas para a avaliação de modelos de desativação com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU.....	57
Figura 10 - Perfis de k_D em função da temperatura para a determinação da E_D com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU.....	58
Figura 11 - Perfil de atividade de transfrutossilação em função do tempo para a avaliação de modelos de desativação com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em PLA.....	62
Figura 12 - Perfis de ΔP em função da concentração de sacarose para as diferentes partículas dos leitos catalíticos.....	67
Figura 13 - Perfil de $E(t)$ para leito catalítico empacotado com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU.....	69
Figura 14 - Curva analítica para determinação de azul de metileno em solução com 473 g L ⁻¹ de sacarose.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definições para a atividade de transfrutossilação	21
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos para ensaios realizados em PBR com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU	53
Tabela 3 - A_t com diferentes concentrações de glicose em ensaios de inibição realizados em PBR com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU	55
Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos de desativação para ensaios realizados em PBR com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU.....	60
Tabela 5 - E_D determinada para ensaios realizados em PBR com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU.....	60
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos de desativação para ensaios realizados em PBR com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em PLA	63
Tabela 7 - Características físicas das partículas constituintes dos leitos catalíticos de PBRs com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU e PLA ..	64
Tabela 8 - Propriedades físicas das partículas constituintes dos leitos catalíticos e regimes de escoamento em PBRs com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU e PLA.....	65
Tabela 9 - Queda de pressão nos leitos catalíticos referentes aos ensaios realizados em PBRs com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU e PLA	66
Tabela 10 - Momentos calculados para a avaliação da DTR para ensaios realizados em PBRs com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em EPU.....	70

LISTA DE SIGLAS

AM	Azul de Metileno
DTR	Distribuição de Tempos de Residência
EPU	Espuma de Poliuretano
EUA	Estados Unidos da América
EV _b	Esferas de Vidro na Base do Leito Catalítico
EV _t	Esferas de Vidro no Topo do Leito Catalítico
FFase	Frutofuranosidase
FOS	Fruto-oligossacarídeos
FTase	Frutosiltransferase
GF2	1-kestose
GF3	1-nistose
GF4	1-β-frutofuranosilnistose
GP	Grau de Polimerização
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo
PBR	Reator de Leito Fixo
PFR	Reator Tubular Empistonado
PLA	Poliácido Láctico
PHB	Poli-hidroxibutirato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo geral	15
1.1.2	Objetivos específicos	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	16
2.2	FRUTOSILTRANSFERASE	17
2.3	IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS.....	19
2.4	ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO.....	20
2.5	CINÉTICA ENZIMÁTICA	22
2.6	INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	24
2.7	DESATIVAÇÃO	25
2.8	REATOR DE LEITO FIXO	29
2.9	QUEDA DE PRESSÃO	31
2.10	DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA..	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR	37
3.1.1	Pré-tratamento e caracterização física da matriz de suporte	37
3.1.2	Produção e imobilização das células fúngicas	39
3.2	ENSAIOS CATALÍTICOS	40
3.2.1	Caracterização do aparato experimental com PBR.....	40
3.2.2	Avaliação da operação em estado estacionário em PBR	41
3.2.3	Avaliação da cinética enzimática	42
3.2.4	Avaliação da inibição da At pela presença de glicose	42
3.2.5	Avaliação da desativação térmica	43
3.2.6	Determinação da DTR.....	44
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	46
3.3.1	Determinação da densidade.....	46
3.3.2	Determinação da viscosidade dinâmica	47
3.3.3	Determinação da porosidade do leito catalítico	47

3.3.4	Determinação da At e Ah	48
3.3.5	Determinação da concentração de azul de metileno	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	50
4.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA GLICOSE	54
4.3	AVALIAÇÃO DA DESATIVAÇÃO	55
4.3.1	Avaliação da desativação com uso de suportes em EPU.....	55
4.3.2	Avaliação da desativação com uso de suportes em PLA.....	61
4.4	AVALIAÇÃO DA QUEDA DE PRESSÃO	64
4.5	AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE TEMPOS DE RESIDÊNCIA.....	68
5	CONCLUSÕES	71
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	71
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE A – CURVA ANALÍTICA	82

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos que promovem benefícios a saúde comprovadamente, denominados nutracêuticos, têm apresentado um crescimento constante no consumo mundial. Entre esses alimentos, os fruto-oligossacarídeos (FOS) são considerados os açúcares prebióticos mais consumidos, devido às suas boas características organolépticas, estabilidade térmica e química e aos efeitos benéficos que proporcionam, tais como: não cariogenicidade; indigestibilidade; aumento da absorção de macronutrientes; e melhorias nos resultados de tratamentos de algumas doenças (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Chaves; Franco; Oliveira, 2019; Correa *et al.*, 2024; Ibrahem; Al-Shawi; Al-Temimi, 2024; Rosa *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2024). Mundialmente, o mercado de FOS representa cerca de 3,85 bilhões de dólares (2024) e deve atingir o valor de 6,25 bilhões de dólares até o ano de 2030 (Mordor Intelligence, 2025).

Os FOS são carboidratos formados por cadeias poliméricas lineares, compostas por monômeros de frutose unidos por ligações β -(2,1) e uma D-glicose terminal, ligada por meio de uma ligação α -glicosídica (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Correa *et al.*, 2024; Maiorano *et al.*, 2008; Márques-López *et al.*, 2023; Noidee; Songbang; Ninchan, 2023; Ojwach *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2024). Essas cadeias apresentam o grau máximo de polimerização igual a 10, porém, os FOS de cadeias curtas, tanto de origem natural quanto industrial, são os que apresentam maior ocorrência, especialmente as moléculas 1-kestose (GF2), 1-nitose (GF3) e 1- β -frutofuranosilnitose (GF4) (Correa *et al.*, 2024; Márques-López *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2024). Tais substâncias podem ser obtidas comercialmente por processos de extração de matéria-prima vegetal e por processos enzimáticos de síntese a partir da sacarose. Para a síntese com o uso de sacarose como substrato, utilizam-se, geralmente, biocatalisadores que contenham enzimas com elevadas atividades de transfrutossilação (A_t), como a frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26) e a frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9) (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Márques-López *et al.*, 2023; Noidee; Songbang; Ninchan, 2023; Ojwach *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2024). Nessa aplicação, destaca-se a cepa *Aspergillus oryzae* IPT-301, que produz FTase com elevada A_t (Cunha *et al.*, 2019; Maiorano *et al.*, 2020; Morales *et al.*, 2020; Perna *et al.*, 2018b).

Industrialmente, a produção de FOS em processos descontínuos com uso FTase solúvel apresenta características que tornam os custos do produto final elevado. Isso porque, nesses processos, a variação da composição do meio em função do tempo pode inibir a atividade enzimática e a presença da enzima solúvel dificulta a recuperação do produto, o que também inviabiliza a reutilização desse biocatalisador. Assim, em comparação com a FTase solúvel, o uso de biocatalisadores compostos por FTase ou células com FTase immobilizadas podem promover melhorias significativas no processo de produção de FOS. Entre tais melhorias, se destacam a redução da contaminação do efluente do reator, possibilidade de recuperação do biocatalisador e a possibilidade de aumento na produtividade e na estabilidade operacional, quando utilizados em reatores contínuos, como os de leito fixo (PBR). (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Ganaie; Lateef; Gupta, 2014; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Ribeiro, 2022).

O desenvolvimento e a aplicação de processos com o uso de células fúngicas immobilizadas empacotadas em PBR pode proporcionar resultados promissores na produção de FOS, pois se opera com parâmetros estáveis, em regime estacionário, e a inibição da A_t por produtos pode ser reduzida. Além disso, a aplicação desse biocatalisador em processo contínuo pode reduzir as limitações reacionais por fenômenos de transferência de massa e melhorar a seletividade, a especificidade e a estabilidade enzimática. Destaca-se ainda a importância da seleção do material a ser utilizado como suporte na produção do biocatalisador, o qual deve apresentar baixo custo, reusabilidade e propriedades químicas e físicas adequadas (Castro *et al.*, 2017; Gomes, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020; Jung *et al.*, 2011; Krasnan *et al.*, 2016; Mussato *et al.*, 2009; Saeed; Iqbal, 2013; Souza *et al.*, 2017).

Com base no que foi exposto acima, no presente trabalho foram preparados biocatalisadores contendo células de *A. oryzae* IPT-301 immobilizadas em suportes macroporosos compostos de espuma de poliuretano comercial (EPU) e poliácido láctico (PLA). A avaliação do desempenho desses materiais na aplicação em PBR para produção de FOS ocorreu pela determinação dos parâmetros: de estabilidade operacional; termodinâmicos; cinéticos; de queda de pressão; de desativação catalítica; e de distribuição de tempos de residência. Tais estudos foram realizados para que fossem determinadas as condições de operação em PBR que maximizem A_t e, possivelmente, a produção de FOS.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho, em reator PBR, de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em diferentes suportes, visando a produção contínua de FOS com elevada atividade enzimática e estabilidade operacional.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Produzir biocatalisadores heterogêneos com elevada atividade enzimática, a partir do cultivo submerso de *A. oryzae* IPT-301 em meio de cultura sintético e imobilização em suportes de EPU e PLA;
- b) Avaliar os efeitos da queda pressão no reator de leito fixo utilizado;
- c) Avaliar os parâmetros cinéticos nos sistemas reacionais em operação em estado estacionário;
- d) Determinar os parâmetros de estabilidade térmica em cada sistema reacional testado;
- e) Avaliar a estabilidade operacional e cinética de desativação dos biocatalisadores;
- f) Determinar a distribuição dos tempos de residência no reator utilizado;
- g) Avaliar o desempenho dos biocatalisadores heterogêneos testados em PBR com fluxo contínuo e regime estacionário, por meio da determinação das atividades enzimáticas de transfrutoseilação e hidrolítica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Observou-se, nos últimos anos, um aumento na preferência por alimentos que ofereçam, além de propriedades nutritivas, significativos benefícios à saúde. Produtos com essas características podem ser classificados como nutracêuticos, caso sejam substâncias obtidas a partir de outros alimentos e possuam efeito benéfico à saúde comprovado, como o tratamento de caráter preventivo ou terapêutico de doenças (Batista *et al.*, 2024; Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Chaves; Franco; Oliveira, 2019; Correa *et al.*, 2024; Ibrahim; Al-Shawi; Al-Temimi, 2024; Rosa *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2024). Dentre os alimentos nutracêuticos, os fruto-oligossacarídeos (FOS) são os probióticos mais consumidos, com um mercado mundial estimado de 3,85 bilhões de dólares em 2024 e previsão de crescimento ao valor de 6,25 bilhões de dólares até o ano de 2030 (Mordor Intelligence, 2025). Os FOS estão presentes em baixas concentrações em muitos produtos naturais, como banana, trigo, mel, cebola e tomate, e são utilizados na fabricação de uma grande variedade de alimentos funcionais e cosméticos, devido, neste caso, às suas propriedades umectantes (Batista *et al.*, 2024; Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Correa *et al.*, 2024; Ibrahim; Al-Shawi; Al-Temimi, 2024; Xu *et al.*, 2024).

Os FOS não são digeridos ou absorvidos no sistema gastrointestinal humano e, portanto, são definidos como um tipo de fibra alimentar. Assim, podem ser consumidos por portadores de diabetes e apresentam propriedades prebióticas, por servirem de substrato às bactérias probióticas presentes no trato gastrointestinal (Menon *et al.*, 2024; Xu *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024). Esses açúcares prebióticos podem ser empregados como substitutos de substâncias adoçantes como a sacarose em diversas aplicações, pois apresentam estabilidade química e térmica adequadas, boas propriedades organolépticas e melhoram a durabilidade dos alimentos (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Correa *et al.*, 2024). Ademais, o consumo de FOS pode estimular o funcionamento do sistema imunológico, reduzir a concentração de colesterol, aumentar a absorção de micronutrientes, como magnésio e cálcio, prevenir câncer de cólon e melhorar os resultados de tratamentos de diversas doenças (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Maiorano *et al.*, 2008; Noidee; Songbang; Ninchan,

2023; Rosa *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2024). Ressalta-se, segundo Belmonte-Izquierdo *et al.* (2023), que, apesar dos benefícios, recomenda-se que o consumo diário dessas substâncias não deve exceder 20 g.

FOS são parte de uma classe de carboidratos denominada frutanos, que são compostos por polímeros de frutose, nos quais prevalecem ligações glicosídicas β -(2,6) e/ou β -(2,1) e uma unidade de D-glicose por molécula, em muitos casos. Os frutanos são classificados segundo: a origem da molécula; a linearidade e a composição da cadeia carbônica; o grau de polimerização; e os tipos de ligações presentes. Nesses critérios, os frutanos classificados como FOS são oligômeros de cadeias lineares com unidades de frutose unidas exclusivamente por ligações β -(2,1), que apresentam grau de polimerização (GP) máximo de 10 e uma D-glicose terminal ligada por uma ligação α -glicosídica (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Correa *et al.*, 2024; Márques-López *et al.*, 2023, Noidee; Songbang; Ninchan, 2023; Xu *et al.*, 2024).

As moléculas de FOS de maior ocorrência são as de cadeias curtas, denominadas 1-kestose (GF2), 1-nitose (GF3) e 1- β -frutofuranosilnístose (GF4), tanto em fontes naturais quanto em produtos obtidos por processos industriais (Amanful *et al.*, 2024; Maiorano *et al.*, 2020; Ojwach *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2024). Comercialmente, esses açúcares prebióticos podem ser produzidos pela extração de matéria-prima vegetal ou pela síntese enzimática a partir de substrato a base de sacarose. Nos bioprocessos de síntese de FOS, as enzimas utilizadas podem ser obtidas de plantas ou de microrganismos, como bactérias e fungos, e as propriedades apresentadas por essas moléculas geralmente proteicas podem variar de acordo com a fonte que as produz (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Choukade; Kango, 2019; Maiorano *et al.*, 2008; Yun, 1996).

Assim, diante desse cenário comercial caracterizado por uma demanda crescente de FOS, considera-se de extrema importância o desenvolvimento de processos de produção que aumentem a oferta desse açúcar prebiótico a baixos custos. Além disso, ao se tornar esse produto mais acessível, uma maior quantidade de pessoas poderá obter benefícios salutareos pela presença de FOS na alimentação.

2.2 FRUTOSILTRANSFERASE

As enzimas são biocatalisadores que normalmente requerem condições

moderadas de temperatura, pressão e pH para apresentarem elevada seletividade, biodegradabilidade e reusabilidade em aplicações em bioprocessos. Essas características possibilitam classificar essas macromoléculas como materiais sustentáveis e ambientalmente amigáveis, o que justifica o crescente número de estudos para o desenvolvimento de processos que visam diversas aplicações das mesmas (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Fernandes, 2010; Robinson, 2015).

A síntese de FOS a partir da sacarose pode ocorrer pela aplicação de enzimas com elevada atividade de transfrutossilacção (A_t), como a frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26) e a frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9). Essas enzimas podem ser produzidas por diversas cepas de fungos, tais como *Aspergillus* sp., *Aureobasidium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., e de bactérias, tais como *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. e *Zymomonas* sp. (Márques-López *et al.*, 2023; Maiorano *et al.*, 2020; Noidee; Songbang; Ninchan, 2023; Ojwach *et al.*, 2022).

Enzimas de origem microbiana com atividade de transfrutossilacção, como a FTase, podem ser encontradas extracelularmente e também concentradas e imobilizadas nas próprias células que as produzem. As células com atividade de transfrutossilacção podem ser aplicadas diretamente na síntese de FOS, o que pode melhorar a estabilidade térmica e química enzimática e simplificarem os processos de separação e purificação dos produtos, se comparada à aplicação de enzimas extracelulares solúveis. Essas e outras propriedades das células utilizadas como biocatalisadores, tais como estabilidade mecânica, alta A_t e possibilidade de reutilização, podem ainda ser melhoradas com o uso de técnicas de imobilização e/ou reticulação (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2021; Maiorano *et al.*, 2008; Ribeiro, 2022).

Muitos estudos reportam resultados promissores sobre a produção de FOS pela aplicação de FTase produzida por diversas cepas de fungos, tais como *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Aureobasidium* sp. (Choukade; Kango, 2019; Ganaie; Lateef; Gupta, 2014; Maiorano *et al.*, 2020; Morales *et al.*, 2020; Ojwach *et al.*, 2022; Perna *et al.*, 2018b). Industrialmente, as FTases produzidas por espécies de fungos *A. pullulans* e *A. niger* são as mais utilizadas como biocatalisadores para a síntese enzimática de FOS. No entanto, conforme apresentado por Fernández (2007) em um estudo com 17 cepas de fungos filamentosos, a espécie *A. oryzae* tem se destacado por produzir enzimas FTase com elevados valores de A_t . Nesse estudo,

especificamente, a variedade *A. oryzae* IPT-301 apresentou resultados mais promissores para possíveis aplicações industriais e, como confirmado em pesquisas posteriores, pode produzir FTase com altas A_t , tanto extracelular quanto intracelular (Cunha *et al.*, 2019; Fernández *et al.*, 2007; Maiorano *et al.*, 2020; Morales *et al.*, 2020; Ojwach *et al.*, 2022; Ottoni *et al.*, 2012; Perna *et al.*, 2018b).

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS

A imobilização celular consiste no confinamento de células, por interações físicas e/ou químicas, em suportes, matrizes ou membranas, com o objetivo de manter suas propriedades biocatalíticas e de melhorar características de bioprocessos (Chiang *et al.*, 1997; Ganaie; Lateef; Gupta, 2014; Krasnan *et al.*, 2016; Saeed; Iqbal, 2013; Yun *et al.*, 1996). Os métodos mais utilizados para a obtenção desses biocatalisadores são: a imobilização em superfícies sólidas, o aprisionamento em matriz porosa, a contenção por barreiras físicas ou membranas e a reticulação. Além desses métodos, também se utilizam combinações de técnicas de imobilização, o que pode melhorar algumas propriedades, porém eleva os custos de produção (Krasnan *et al.*, 2016; Saeed; Iqbal, 2013).

Muitas vantagens têm sido observadas pelo uso de células imobilizadas em processos biotecnológicos, tais como: aumento da resistência química, térmica e a variações de pH; elevados rendimentos e produtividade, devido à alta concentração de células; facilidade de remoção do meio reacional, o que possibilita a regeneração, a reutilização e facilita as etapas de separação e purificação de produtos; e a redução da sensibilidade dos biocatalisadores à agentes contaminantes. Ademais, as células imobilizadas, além de possuírem boa estabilidade ao armazenamento, quando são utilizadas em reatores de leito fixo, apresentam boa estabilidade operacional e reduzem a inibição enzimática causada por produtos (Castro *et al.*, 2017; Gomes, 2019; Jung *et al.*, 2011; Krasnan *et al.*, 2016; Mussato *et al.*, 2009; Saeed; Iqbal, 2013).

Entretanto, em alguns casos, há a necessidade de análises criteriosas sobre a viabilidade do uso da imobilização celular, pois essa aplicação pode conferir limitações aos processos. Alguns desses problemas podem se apresentar como custos adicionais para a produção dos biocatalisadores, inviabilidade de certas espécies de microrganismos serem imobilizadas satisfatoriamente e limitações difusionais, devido às características físicas da biomassa imobilizada (Krasnan *et al.*, 2016; Mussato *et*

al., 2009). Além disso, ressalta-se que, na imobilização em matrizes porosas, a seleção de materiais de suporte com propriedades físicas e químicas e geometria adequada é determinante para o bom desempenho do sistema reacional (Mussato *et al.*, 2009; Saeed; Iqbal, 2013).

Em vista da demanda crescente de produção industrial de FOS, observa-se que o uso de biocatalisadores produzidos por imobilização de células vem apresentando, em muitos casos, vantagens muito significativas, se comparada ao uso de células livres, enzimas solúveis e enzimas imobilizadas (Krasnan *et al.*, 2016; Saeed; Iqbal, 2013). Segundo Yun (1996), as células imobilizadas apresentam maior estabilidade operacional do que as enzimas imobilizadas. Em ensaios com suportes de diferentes composições para imobilização de células de *A. japonicus*, Mussato *et al.* (2009) observaram, com o uso de matriz de fibra vegetal, atividades enzimáticas equivalentes às obtidas com células livres. Com o uso de células imobilizadas de *A. pullulans*, Jung *et al.* (2011) produziram FOS em PBR, com estabilidade operacional, por cerca de 100 dias e Castro *et al.* (2017) obtiveram melhores resultados do que os atingidos com células livres de uma mesma espécie.

Destacam-se ainda os resultados promissores obtidos com o uso de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas na produção de FOS de cadeias curtas. Isso foi confirmado por Prata (2020), pela realização de ensaios em PBR, com boa estabilidade operacional e A_t , com células encapsulados em alginato de cálcio. No caso de Barbosa (2022), muitos resultados promissores foram obtidos com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em espuma de poliuretano (EPU) em cultivo submerso, com preservação de cerca de 50,23 % e 60,90 % da A_t , respectivamente, após 12 ciclos de batelada. Além disso, diversos resultados que evidenciam o potencial de aplicação industrial dessa cepa fúngica foram obtidos com o uso de células reticuladas (Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Ribeiro, 2022).

2.4 ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

Para produção de FOS, normalmente as enzimas FTase utilizadas comercialmente necessitam de altas concentrações de sacarose (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Mano *et al.*, 2018; Sánchez-Martínez *et al.*, 2020; Yun, 1996). Nessas condições, geralmente são produzidas moléculas de FOS com GP de 3, 4 e 5, por meio do mecanismo que pode ser descrito pela ação da FTase sobre moléculas de

sacarose (GF) ou de FOS (GF_n , $n > 1$), conforme a seguinte representação (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Ganaie; Lateef; Gupta, 2014; Maiorano *et al.*, 2008):



No mecanismo acima, a FTase, devido à atividade hidrolítica (A_h), promove a quebra de ligações glicosídicas β -(2,1) e a transferência de grupos frutossil a uma molécula receptora, por meio da A_t . Esse processo gera a liberação de FOS e de glicose (G), como um dos subprodutos, e depende de valores elevados da razão A_t/A_h , para que sejam obtidas altas conversões de sacarose em FOS (Choukade; Kango, 2019; Maiorano *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2020; Perna *et al.*, 2018b).

A definição de A_t pode variar de acordo com o objeto de estudo ou com os resultados experimentais disponíveis para o cálculo desse parâmetro. Na Tabela 1 são apresentadas algumas definições usuais encontradas na literatura.

Tabela 1 – Definições para a atividade de transfrutossilção

Definição	Autoria
Quantidade de enzima que transfere um 1 μ mol de frutose por minuto	(Aguiar-Oliveira; Maugeri, 2011; Alvarado-Obando <i>et al.</i> , 2022; Chen; Liu, 1996; Dorta <i>et al.</i> , 2006; Morales <i>et al.</i> , 2020; Oliveira <i>et al.</i> , 2019; Sánchez <i>et al.</i> , 2010)
Quantidade de enzima que libera um 1 μ mol de glicose por minuto	(Fernández <i>et al.</i> , 2004; Park; Oh; Yun, 2001; Sangeetha; Ramesh; Prapulla, 2005; Yun, 1996)
Quantidade de enzima que produz um 1 μ mol de FOS por minuto	(Maiorano <i>et al.</i> , 2020; Ottoni <i>et al.</i> , 2012; Perna <i>et al.</i> , 2018a)
Quantidade de enzima que produz um 1 μ mol de 1-kestose por minuto	(Han <i>et al.</i> , 2020; L'Hocine <i>et al.</i> , 2000; Madlová <i>et al.</i> , 2000; Vandáková <i>et al.</i> , 2004)
Quantidade de enzima que produz um 1 mmol nitrofenol por minuto	(Wang; Rakshit, 1999)

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

2.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA

No estudo cinético de reações químicas catalisadas por enzimas, avalia-se a velocidade e os mecanismos dessas transformações químicas, bem como as condições que favorecem a geração de produtos desejados. Assim, em aplicações em projetos de engenharia química, o conhecimento da cinética enzimática é determinante para a escolha do tipo de reator mais adequado para se obterem melhores parâmetros de desempenho de um catalisador (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000). Tais métodos podem ser aplicados para a avaliação de biocatalisadores heterogêneos, como os destacados no Tópico 2.3, empacotados em reatores de leito fixo visando a produção de FOS.

Em reações catalisadas por enzimas em meio aquoso, para se avaliar a cinética da reação ocorrida em condições experimentais conhecidas, é necessário se determinar a velocidade da reação com sistemas operando em estado estacionário (reatores contínuos) ou nos instantes iniciais (batelada). Isso porque as condições operacionais variam em função do tempo, devido ao consumo do substrato e aos efeitos do processo reacional no meio, e, no instante inicial ou no regime estacionário, essas condições podem ser definidas e a concentração do substrato (S) pode ser considerada inalterada (Borzani *et al.*, 2001).

Para condições experimentais que possibilitam a determinação da velocidade inicial da reação enzimática, V ($U\ g^{-1}$), podem-se ajustar os dados experimentais de V em função de S ($g\ L^{-1}$) a uma equação cinética adequada. Normalmente, nos processos fermentativos enzimáticos, os dados se ajustam a modelos matemáticos que representam reações de ordem variável, pois v aumenta proporcionalmente a S , até um valor de S a partir do qual V se mantém constante. Para tal processo, pode ser aplicado o modelo cinético de Michaelis-Menten, que, apesar de não ser muito complexo, ainda é muito utilizado, devido à eficácia apresentada nos ajustes a essa cinética (Borzani *et al.*, 2001; Levenspiel, 2000).

O modelo de Michaelis-Menten, que representa o efeito de saturação pelo substrato por um perfil hiperbólico, se baseia nas hipóteses de que: o substrato e a enzima formam um composto intermediário (complexo enzima-substrato) por uma reação reversível; e o complexo enzima-substrato dá origem aos produtos da reação, por decomposição ou reação com outras substâncias (Borzani *et al.*, 2001; Levenspiel,

2000). A modelagem algébrica, representada pela Equação 2, que descreve essas características foi obtida por Michaelis e Menten (1913) em estudos sobre a hidrólise da sacarose pela enzima invertase.

$$V = V_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_M + S} \quad (2)$$

Na Equação 2, $V_{m\acute{a}x}$ (U g^{-1}) é a velocidade máxima da reação, atingida na condição de saturação da enzima pelo substrato, e K_M (g L^{-1}) é denominada como constante de Michaelis-Menten. Essa constante está relacionada ao grau de afinidade da enzima pelo substrato e representa o valor de S que resulta em $V = 0,5 V_{m\acute{a}x}$ (Borzani *et al.*, 2001; Levenspiel, 2000; Nelson; Cox; Hoskins, 2022).

Para a maioria das enzimas, a cinética descrita pelo modelo de Michaelis-Menten se adequa satisfatoriamente aos dados experimentais. No entanto, em algumas reações enzimáticas o substrato se liga a múltiplos sítios de enzimas multiméricas. Esse comportamento enzimático, definido como cooperação positiva, pode ser ajustado à equação de Hill (Equação 3), que foi desenvolvida a partir do estudo das interações entre o oxigênio (O_2) e a hemoglobina. Graficamente, a variação da velocidade V em função da concentração do substrato na cinética representada pela equação de Hill apresenta um perfil sigmoide (Rodwell *et al.*, 2017; Weiss, 1997).

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

Na Equação 3, $K_{0,5}$ representa a concentração do substrato que resulta em metade da velocidade da reação enzimática inicial e n é denominado coeficiente de Hill. O valor desse coeficiente empírico se relaciona às características das interações entre os múltiplos sítios da enzima e o substrato. Quando n é igual a 1, ocorre uma cinética de saturação simples e a Equação se torna análoga à equação de Michaelis-Menten. Porém, caso se encontre um valor para n maior que 1, implica que a enzima apresenta cooperatividade positiva, com grau e acentuação da curva sigmoide (V em função de S) diretamente proporcionais a n (Rodwell *et al.*, 2017; Weiss, 1997).

Na condição em que $n > 1$, uma vez que o substrato se liga a um sítio da

enzima a afinidade dos demais sítios ao substrato é aumentada, o que implica que V é significativamente sensível a pequenas variações de S . Já em casos onde $n < 1$, considera-se que ocorre cooperatividade negativa entre o substrato e os sítios ativos enzimáticos e V torna-se pouco sensível a variações de S (Rodwell *et al.*, 2017; Weiss, 1997).

Observa-se, assim, que, por meio de diferentes mecanismos, a concentração do substrato afeta significativamente a velocidade das reações enzimáticas. Porém, a cinética desses processos também sofre influência de outros fatores, como pH e temperatura. Esses parâmetros foram avaliados por Cunha *et al.* (2019), para FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301, em substrato com cerca de 471 g L⁻¹ de sacarose, os quais obtiveram maiores valores de A_t com pH igual a 5,5 e temperatura de 50 °C. Nessas condições de pH e temperatura, Dias (2020) estudou a cinética enzimática de células de *A. oryzae* IPT-301 em reator de leito fixo e observou maiores resultados de A_t com a concentração de sacarose igual a 473 g L⁻¹.

2.6 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Na catálise enzimática, a cinética das reações pode ser alterada pela perda de atividade devido a processos reversíveis ou irreversíveis de inibição da atividade de enzimas envolvidas em mecanismos reacionais de interesse. A ocorrência desse processo inibitório em biocatalisadores pode reduzir significativamente a vida útil desses materiais e inviabilizar a aplicação dos mesmos em processos industriais. Dessa forma, em projetos PBRs empacotados com biocatalisadores, como na aplicação de células imobilizadas para a produção de FOS, a identificação de inibição da atividade catalítica pode gerar a necessidade de redução do volume reacional, reduzir a conversão de reagentes possível nesses sistemas e ampliar a frequência de processos de substituição do leito. Isso, pois a composição da corrente nesses reatores irá variar espacialmente, o que poderá potencializar a redução da atividade enzimática, devido a variação de parâmetros causadores de inibição (Borzani *et al.*, 2001; Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

A presença de algumas substâncias pode causar a redução na taxa de reação enzimática e, por isso, podem ser classificadas como inibidores. Normalmente, a inibição de reações enzimáticas pode ocorrer reversivelmente de forma competitiva, acompetitiva ou não-competitiva, de acordo com os tipos de interações entre enzima,

substrato e inibidor. A inibição ocorre competitivamente quando o substrato e a substância inibidora disputam o mesmo sítio ativo enzimático e, de maneira não-competitiva, se essas espécies se ligam exclusivamente a sítios diferentes da enzima. E, no caso da inibição incompetitiva, o inibidor causa a desativação do complexo enzima-substrato (Borzani *et al.*, 2001; Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

Na aplicação da FTase para a produção de FOS, que normalmente ocorre com substratos com altas concentrações de sacarose, observa-se a ocorrência de inibição enzimática causada por produtos, como a glicose liberada pela A_h . O mecanismo inibitório de diversas enzimas FTase tem sido determinado como competitivo com as moléculas de glicose. Dessa maneira, ao se considerar o efeito de concentrações significativas de glicose no meio reacional, pode-se utilizar um modelo para o cálculo da velocidade de reação com esse tipo de inibição, como a de Michaelis-Menten modificada descrita pela Equação 4 (Alvarado-Huallanco; Maugeri-Filho, 2010; Borzani *et al.*, 2001; Gabrielczyk *et al.*, 2018; Khandekar *et al.*, 2014; Pravičović *et al.*, 2023; Sánchez-Martínez *et al.*, 2020).

$$V_i = V_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_M(1 + i/K_i) + S} \quad (4)$$

Na Equação, a constante K_i (g L^{-1}) é associada à inibição competitiva por glicose e o termo i (g L^{-1}) representa a concentração inicial desse subproduto. Assim, a velocidade de reação com inibição competitiva, V_i (U g^{-1}), para $i > 0$, será menor do que V calculado pela Equação 2 (Borzani *et al.*, 2001).

2.7 DESATIVAÇÃO

Nos processos de biocatálise, um dos problemas mais relevantes é a perda da atividade em função do tempo. Uma série de mecanismos já foi proposta para se conhecer as causas e as formas de se minimizar a desativação enzimática, no caso de bioprocessos. Esses fenômenos influenciam no projeto e na escolha dos reatores para se aplicar em um processo industrial e são determinantes para a avaliação da viabilidade de um biocatalisador (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

Os processos reacionais catalisados por enzimas são significativamente afetados pela temperatura do meio. Isso, porque essas macromoléculas são

suscetíveis a desnaturação térmica, devido ao possível rompimento de ligações que interferem na estrutura tridimensional enzimática. Dessa forma, a desnaturação pode alterar a conformação de muitas regiões da enzima e inativar sítios que reagem com o substrato (Dixon; Webb, 1979; Fields, 2001; Fogler, 2012).

A desnaturação térmica de enzimas está relacionada a aspectos termodinâmicos que afetam diretamente na taxa de reação enzimática. O estudo dessas propriedades pode auxiliar a definir a temperatura ótima que proporcione atividade e estabilidade operacional biocatalítica adequadas ao processo avaliado. Com essa finalidade, é possível avaliar a variação da atividade catalítica em função do tempo a uma determinada temperatura, conforme descrito pelas Equações 5 e 6 (Dixon; Webb, 1979; Fields, 2001; Fogler, 2012).

$$\frac{A_t(t)}{A_{t_0}} = a(t) \quad (5)$$

$$-\frac{da}{dt} = k_D a^d \quad (6)$$

Define-se o termo $a(t)$ presente na Equação 5 como a atividade catalítica no tempo t resultante da razão entre a razão entre as A_t nesse tempo ($A_t(t)$) e em $t = 0$ (A_{t_0}). Em uma curva típica de desativação, a atividade decai com o tempo e os valores de a se encontram no intervalo: $0 \leq a \leq 1$. Na lei de velocidade de decaimento expressa pela Equação 6, d é a ordem da desativação determinada pelo ajuste aos dados experimentais e k_D é a constante de desativação. Considerando que, para $t = 0$ h, $a = 1$, a Equação 6 pode ser integrada de acordo com as ordens de desativação (d), como demonstrado nas Equações 7 e 8. Estas equações podem ser ajustadas a dados experimentais para obtenção e avaliação dos parâmetros d e k_D (h^{-1}) (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

Para $d = 1$,

$$a(t) = e^{-k_D t} \quad (7)$$

Para $d \neq 1$,

$$a(t) = ((d - 1)k_D t + 1)^{1/(1-d)} \quad (8)$$

Um modelo exponencial e não linear para obtenção de parâmetros de desativação térmica enzimática, como a constante de desativação térmica de primeira ordem k_D , foi proposto por Sadana e Henley (1987) e está descrito pela Equação 9.

$$\frac{A_t(t)}{A_{t_0}} = (1 - \alpha) \exp(-k_D t) + \alpha \quad (9)$$

onde α é o parâmetro de ajuste do modelo ($A_{t_{final}}/A_{t_0}$), t (h) é o tempo decorrido da reação e $A_t(t)/A_{t_0}$ é a atividade residual no tempo t .

Ao se obter o valor de k_D (h^{-1}) para uma dada temperatura, é possível determinar o tempo de meia-vida enzimático ($t_{1/2}$, em h) expresso pelas Equações 10, 11 e 12, referentes aos ajustes obtidos a partir das Equações 7, 8 e 9, respectivamente. Esse resultado representa o tempo necessário, sob as condições operacionais estabelecidas, para que a atividade enzimática atinja metade do valor da atividade no tempo inicial (Araújo *et al.*, 2022; Fogler, 2012; Sadana; Henley, 1987; Silva *et al.*, 2021).

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_D} \ln\left(\frac{1 - \alpha}{0,5 - \alpha}\right) \quad (10)$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_D} \ln(2) \quad (11)$$

$$t_{1/2} = \frac{(2^{(d-1)} - 1)}{((d - 1)k_D)} \quad (12)$$

A constante de desativação k_D é uma função da temperatura que segue a equação de Arrhenius (Equação 13), a qual permite avaliar como a temperatura influencia na taxa de desativação. Isso pode ser efetuado por meio de valores de k_D obtidos em diferentes temperaturas em sistemas reacionais com as mesmas características, inclusive a concentração inicial de reagentes.

$$k_D = Ae^{-E_D/RT} \quad (13)$$

onde A é o fator de frequência de colisão de Arrhenius, R é a constante universal dos gases ($8,3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e E_D a energia de ativação da desnaturação térmica enzimática. A Equação 13 pode ser linearizada para determinação dos parâmetros A e E_D por ajuste a valores de k_D obtidos em temperaturas distintas, na forma da Equação 14 (Araújo *et al.*, 2022; Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

$$\ln k_D = \ln A - \frac{E_D}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (14)$$

A constante E_D representa a quantidade de energia necessária para ativar o processo de desnaturação enzimática, portanto, quanto maior o seu valor, mais lenta será a velocidade de desativação. Para melhor compreensão do processo termodinâmico de desativação, o valor obtido de E_D , com o ajuste às Equações 13 ou 14, pode ser utilizado para os cálculos da entalpia (ΔH_D , em kJ mol^{-1}), da energia de Gibbs (ΔG_D , em kJ mol^{-1}) e da entropia (ΔS_D , em $\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) de ativação da desnaturação enzimática. Essas funções de estado podem ser calculadas com o uso das Equações 15, 16 e 17 (Araújo *et al.*, 2022; Koretsky, 2007; Souza *et al.*, 2015).

$$\Delta H_D = E_D - RT \quad (15)$$

$$\Delta G_D = -RT \ln \left(\frac{k_D h}{k_b T} \right) \quad (16)$$

$$\Delta S_D = \frac{(\Delta H_D - \Delta G_D)}{T} \quad (17)$$

onde k_b é a constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) e h é a constante de Planck ($6,624 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$) (Araújo *et al.*, 2022; Koretsky, 2007; Souza *et al.*, 2015).

A grandeza ΔH_D é relacionada à quantidade de energia necessária para desnaturar 1 mol de enzima, enquanto ΔS_D representa a variação de energia por variação unitária de temperatura na transição do estado enzimático nativo para o desnaturado. No caso da grandeza ΔG_D , há contribuições dos resultados de entalpia

e entropia e se trata de um importante parâmetro para interpretação do grau de espontaneidade do processo estudado. Assim, valores próximos de zero ou negativos indicam que a enzima, nas condições estudadas, se apresenta mais suscetível ao processo de desnaturação térmica e, conseqüentemente, menos estável. Para valores maiores de ΔG_D , considera-se que a desnaturação é menos espontânea e que a enzima é mais termicamente estável (Araújo *et al.*, 2022; Koretsky, 2007; Souza *et al.*, 2015).

Com o uso do modelo de Sadana e Henley (Equação 9), Araújo *et al.* (2022) e Pereira *et al.* (2024) avaliaram a desativação da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 e determinaram os parâmetros termodinâmicos associados E_D desse processo, conforme descrito acima. A partir dos resultados obtidos nesses estudos, com a FTase imobilizada e reticulada em polihidroxibutirato (PHB) (Araújo *et al.*, 2022) e imobilizada em partículas de sabugo de milho (Pereira *et al.*, 2024), observaram-se que essas enzimas extracelulares provenientes da cepa *A. oryzae* IPT-301 sofrem um aumento significativo na taxa de desativação entre 30 e 60 ° C. Como nas duas pesquisas ocorre uma desativação expressiva nas primeiras horas de operação em batelada, considera-se importante a execução de ensaios em PBR com biocatalisadores que possam ser mais termicamente estáveis, como as células dessa cepa fúngica imobilizadas em suportes porosos.

2.8 REATOR DE LEITO FIXO

O reator de leito fixo (PBR) é um tipo de reator de escoamento contínuo, com o leito preenchido com catalisador heterogêneo. Nessa configuração de reator, os reagentes são consumidos à medida que percorrem o leito, de forma proporcional à massa de catalisador. Na modelagem de um PBR, ao considerar o escoamento uniforme, ou seja, que as concentrações não variem radialmente e variem axialmente de maneira constante, a velocidade de reação (r'_j) irá variar em função da massa de catalisador, W (g), (Equação 18) e das concentrações das espécies, exceto para reações de ordem zero (Fogler, 2012).

$$r'_j = \frac{dF_j}{dW} [=] \left[\frac{\text{mols de } j \text{ reagidos}}{\text{g de catalisador } s} \right] \quad (18)$$

O PBR, de acordo com Fogler (2012), possui a constituição semelhante a um reator tubular empistonado (PFR) preenchido com catalisador heterogêneo. Para se obter a equação de projeto de um PBR, a partir das condições supracitadas, pode-se iniciar pelo balanço molar, assumindo que não ocorram gradientes radiais de temperatura, concentração e velocidade de reação, conforme a Equação 19. Além disso, não há acúmulo nessa equação, devido à hipótese de operação em estado estacionário desse sistema.

$$\begin{aligned} \text{entrada} - \text{saída} + \text{geração} &= \text{acúmulo} \\ F_A(W) - F_A(W + \Delta W) + r'_A &= 0 \end{aligned} \quad (19)$$

O balanço molar generalizado, representado pela Equação 19, foi efetuado para: uma espécie genérica A, a massa de catalisador W , a vazão molar F_A (mols de A s⁻¹) e a taxa de reação heterogênea r'_A (mols de A g_{catalisador}⁻¹ s⁻¹). Essa equação pode ser escrita na forma diferencial, para aplicações em que a queda de pressão e a desativação catalítica não podem ser desprezadas:

$$\frac{dF_A}{dW} = r'_A \quad (20)$$

Com a integração da Equação 20 projeto, é possível se determinar a massa de catalisador para se obter uma determinada vazão molar F_A ,

$$W = \int_{F_{A0}}^{F_A} \frac{dF_A}{r'_A} \quad (21)$$

O PBR geralmente possui construção simples, baixos custos de manutenção e atinge altas conversões, comparado a outros reatores catalíticos. Porém, devido à dificuldade de se manter a temperatura homogênea no leito, esses reatores têm tendência à formação de pontos quentes, caso ocorram reações exotérmicas. Outros desafios de se utilizar PBRs são: a redução dos caminhos preferenciais, que provocam a subutilização dos catalisadores, e a complexidade do processo de substituição do leito catalítico, o que eleva os custos operacionais e justifica a necessidade do uso de biocatalisadores com boa estabilidade operacional e elevada

atividade enzimática. Além do mais, nesses reatores, deve-se avaliar e buscar minimizar, caso sejam significativos, os efeitos de queda de pressão, limitações difusionais e escoamento irregular no leito (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

No desenvolvimento de processos de produção de FOS, muitas vantagens tem sido observadas pelo uso da síntese a partir da sacarose em PBR, promovida pela atividade de transfrutossilção de enzimas como a FTase. Nessas aplicações, normalmente, são utilizadas enzimas ou células fúngicas imobilizadas, o que reduz a contaminação dos efluentes dos reatores, simplifica as etapas de separação dos produtos e minimiza os efeitos de inibição por subprodutos (Dias *et al.*, 2022; Jung *et al.*, 2011; Veljković *et al.*, 2023). Além disso, a produção de FOS por síntese enzimática via transfrutossilção em sistemas contínuos eleva a produtividade do processo e favorece a obtenção de FOS de cadeias curtas, que são as moléculas desses açúcares que apresentam propriedades funcionais mais promissoras (Dias *et al.*, 2022; Veljković *et al.*, 2023).

2.9 QUEDA DE PRESSÃO

O uso de PBR em bioprocessos apresenta alguns desafios relacionados às características físicas das partículas de biocatalisador, tais como as dimensões externas e a porosidade. No processo reacional, é desejável que uma grande área com biocatalisadores ativos esteja disponível para que haja contato efetivo com o substrato. Isso pode ser atingido com diferentes porosidades e com a redução do tamanho das partículas biocatalíticas. Porém, deve-se avaliar o efeito do leito biocatalítico sobre o escoamento do fluido, em termos de perdas de energia e, conseqüentemente, queda de pressão, o que pode afetar o tempo de contato entre substrato e sítios enzimáticos e a transferência de massa (Fogler, 2012; Rocha; Pereira, 2019).

Para a determinação da queda de pressão em um PBR, deve-se antes avaliar qual o regime de escoamento ocorre no estado estacionário. Para isso, recomenda-se a utilização da equação de Reynolds modificada (Equação 22), na qual ε é a porosidade do leito (volume vazio/volume total) e μ (Pa s) e ρ (kg m⁻³) são, respectivamente, a viscosidade dinâmica e a densidade do fluido (Fogler, 2012; Rocha; Pereira, 2019).

$$Re^* = \frac{\rho U d_p}{\mu(1 - \varepsilon)} \quad (22)$$

onde U é a velocidade de escoamento da solução reagente (m s^{-1}) e d_p é o diâmetro característico da partícula no leito catalítico, dado em m. Para a determinação de d_p , deve-se considerar a esfericidade da partícula (ϕ), conforme as Equações 23 e 24, descritas para partículas cúbicas (Londe; Lima; Finzer, 2021).

$$\phi = \left(\frac{\pi}{6}\right)^{1/3} \quad (23)$$

$$d_p = \frac{a}{\phi} \quad (24)$$

em que a é o valor médio da aresta ou do diâmetro da partícula. Para partículas esféricas, ϕ é igual a 1.

Em regime laminar de escoamento, usualmente atribuído a $Re^* < 10$, a equação de Darcy (Equação 25 e Equação 26) pode ser aplicada para o cálculo de perda de carga. Segundo esse equacionamento, no regime laminar, a queda de pressão pode ser definida com a razão entre μ e a permeabilidade do leito, denominada constante de Darcy (Equação 26), K_{Darcy} (m^2) (Fogler, 2012; Rocha; Pereira, 2019).

$$\frac{\Delta P}{\Delta L} = \frac{\mu U}{K_{Darcy}} \quad (25)$$

$$K_{Darcy} = \frac{\varepsilon^3 d_p^2}{180(1 - \varepsilon)^2} \quad (26)$$

onde U é a velocidade superficial (m s^{-1}), ΔP é a variação de pressão (N m^{-2}) e ΔL (m) a variação de comprimento, referente à região avaliada do leito. Destaca-se que K_{Darcy} é determinada de acordo com as características de cada partícula.

Para valores de $Re^* \geq 10$, referentes aos regimes de escoamento de transição e turbulento, aplica-se satisfatoriamente a equação de Ergun (Equação 27) para a

determinação da perda de carga em leito poroso. Nessa equação, o segundo termo praticamente não afeta os resultados em regimes laminares de escoamento (Fogler, 2012; Rocha; Pereira, 2019).

$$\frac{\Delta P}{\Delta L} = \frac{150(1 - \varepsilon)^2 \mu U}{\varepsilon^3 d_p^2} + 1,75 \left[\frac{(1 - \varepsilon) \mu^2 \rho}{\varepsilon^3 d_p} \right] \quad (27)$$

Em PBR empacotado com biocatalisadores heterogêneos, além do regime de escoamento, as características físicas das partículas que preenchem o leito também interferem na perda de carga. Assim, como demonstrado nas Equações 25, 26 e 27, a magnitude da queda de pressão no leito do PBR é ampliada para pequenos valores de d_p e de ε , pois causam a redução do volume disponível para o escoamento do fluido alimentado no reator (Fogler, 2012; Rocha; Pereira, 2019). Esses parâmetros também podem ser afetados pelas características da biomassa presente no leito, como no caso do uso de células de fungos filamentosos imobilizadas, devido ao volume e a permeabilidade desses materiais.

2.10 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE TEMPO DE RESIDÊNCIA

Em situações reais, os modos de escoamento em reatores como o PBR normalmente se distanciam dos modelos ideais. Os desvios da idealidade, nessas situações, ocorrem, geralmente, pela formação de caminhos preferenciais, curtos-circuitos externos e desvios. Esses fatores podem ser capazes de interferir substancialmente no desempenho do reator e causar a subutilização do biocatalisador disponível no leito, devido à variação espacial de tempo que as moléculas do substrato permanecem em contato com os sítios ativos do biocatalisador. Como, nesses modos de escoamento não ideais, elementos do fluido podem levar tempos diferentes para percorrer o leito empacotado do reator, o comportamento desse sistema pode ser avaliado por métodos de determinação da distribuição de tempo de residência (DTR) (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

Experimentalmente, a DTR pode ser determinada injetando-se uma substância inerte, denominada traçador, no fluxo de alimentação do reator. Essa substância deve: ser completamente solúvel no substrato; apresentar propriedades físicas semelhantes ao mesmo; e ser de fácil detecção na faixa de diluição necessária ao método utilizado.

O momento em que ocorre a injeção do traçador é considerado o tempo $t = 0$ e, a partir desse instante, mede-se a concentração de traçador no efluente do reator (C), dada em mg L^{-1} . Para a injeção dessa substância, os métodos mais utilizados são do tipo pulso e do tipo degrau (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

Na injeção do tipo pulso, o traçador deve ser adicionado à corrente de entrada do reator instantaneamente, no menor intervalo de tempo possível. Nessa aplicação, os traçadores coloridos são alguns dos mais utilizados e, para a detecção dessas substâncias, pode-se utilizar métodos espectrofotométricos. A resposta ao estímulo provocado pelo pulso pode ser representada em uma distribuição dos valores mensurados de C em função de t (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

Aos dados de injeção do tipo pulso pode-se aplicar uma função que descreve o tempo que cada elemento que compõe o fluido permaneceu no leito, chamada função de distribuição de tempo de residência $E(t)$ (min^{-1} , Equação 28). Na Equação 28, descreve-se o modelo dessa função para o caso de vazão volumétrica constante e a expressão em seu denominador representa a área sob a curva $C(t)$. Se a função $E(t)$ adimensional for integrada em função do tempo, de $t = 0$ a $t = \infty$ (Equação 29), a fração resultante, igual a 1, representa a quantidade total de traçador adicionado que saiu do reator e corresponde à área sob a curva $E(t)$ (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

$$E(t) = \frac{C}{\int_0^{\infty} C dt} \quad (28)$$

$$\int_0^{\infty} E(t) dt = 1 \quad (29)$$

Segundo Fogler (2012), para que a injeção tipo pulso seja adequada à determinação da DTR, é preciso que o traçador seja injetado em um intervalo de tempo consideravelmente menor que os tempos de residência das partículas de fluido no leito. Outra característica desejável no método de injeção é que a dispersão do fluido, ocorrida entre o ponto de injeção e o início do leito catalítico, seja desprezável. Caso essas condições não sejam satisfeitas, a curva $C(t)$ poderá apresentar uma cauda muito longa e induzir a erros na análise da DTR, principalmente na integração

de $C(t)$.

As DTRs podem ser caracterizadas e comparadas pela análise de três momentos da distribuição da função de DTR ($E(t)$). O primeiro momento, chamado de tempo médio de residência (t_m) das partículas de fluido no sistema reacional, é determinado pela Equação 30 (Fogler, 2012).

$$t_m = \int_0^{\infty} tE(t) dt \quad (30)$$

O segundo momento da DTR é utilizado para se avaliar o espalhamento da distribuição dos dados experimentais. Esse momento, calculado pela Equação 31 e associado à média, é chamado de variância ou desvio padrão ao quadrado (σ^2), expresso em min^2 . Dessa forma, quanto maior o resultado de σ^2 , maior é a dispersão desses dados (Fogler, 2012):

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - t_m)^2 E(t) dt \quad (31)$$

Para a determinação do terceiro momento, também relativo à média dos valores, calcula-se o parâmetro correspondente à assimetria da distribuição (Equação 32), representado por s^3 (m^{-3}). Para a interpretação desse momento, considera-se que elevados níveis de assimetria da disposição dos dados em torno da média são associados a resultados elevados de s^3 (Fogler, 2012).

$$s^3 = \frac{1}{\sigma^2} \int_0^{\infty} (t - t_m)^3 E(t) dt \quad (32)$$

Para se avaliar a DTR pela interpretação desses três momentos, visando a identificação de possíveis melhorias no projeto do reator testado, deve-se observar as características físicas das partículas empacotadas no leito. Isso porque, como mencionado no Tópico 2.9, as dimensões e a porosidade das partículas e do leito são proporcionais ao espaço disponível para o escoamento do fluido no interior do reator. Ademais, quando se utilizam células, como as de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em suportes porosos, as propriedades físicas da biomassa presente nos suportes

também podem colaborar significativamente para as características da DTR das partículas de fluido no leito do PBR. Essas interferências na DTR também podem ser causadas por partículas inertes que possam ser utilizadas para preencher algumas regiões do leito do reator (Dias, 2020; Fogler, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR

3.1.1 Pré-tratamento e caracterização física da matriz de suporte

Para a realização dos ensaios propostos neste trabalho, foram utilizados dois tipos de suportes macroporosos de materiais poliméricos, constituídos de espuma de poliuretano (EPU) e poliácido láctico (PLA). Cada uma dessas matrizes suporte foi aplicada separadamente em ensaios em PBR e o desempenho de ambas, visando a produção de FOS, foi comparado. Para o EPU, optou-se pela geometria cúbica, pois, apesar de ser diferente da geometria do leito do reator, não foi possível produzir partículas cilíndricas desse material com os equipamentos disponíveis. Na confecção dos suportes cúbicos de EPU comercial, utilizou-se o equipamento elétrico mostrado na Figura 1, que possibilitou o corte do material com um fio metálico tensionado, que foi aquecido pela passagem de corrente elétrica. Após o processo de corte, esses suportes em EPU apresentaram média das arestas igual a $9,82 \pm 0,58$ mm, o que resultou em valores das diagonal das faces maiores que o diâmetro interno do leito do PBR. Essas dimensões foram utilizadas pois esse material se deformou facilmente no empacotamento dos leitos catalíticos, o que pode ter reduzido a formação de caminhos preferenciais.

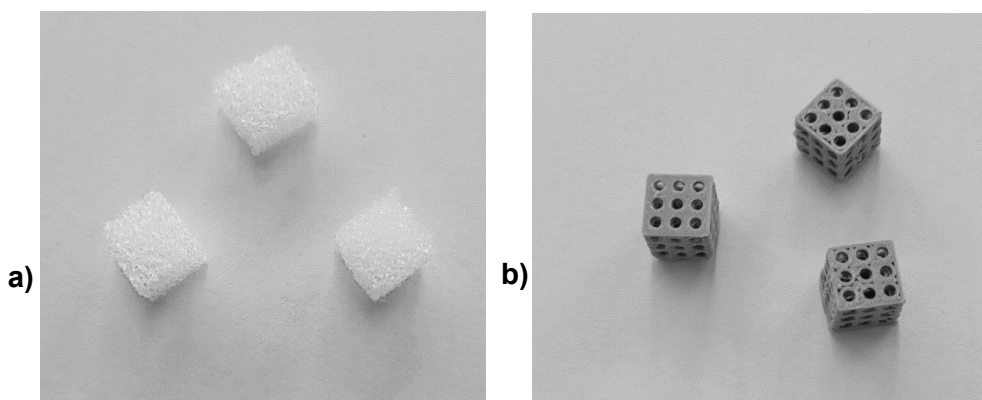
Para a produção dos suportes em PLA, foi empregada a técnica de manufatura aditiva, realizada na Universidade Federal do Tocantins, com o uso de software para a criação do modelo do suporte e impressora 3D alimentada com filamento desse polímero para a impressão. Visando a comparação do desempenho com o uso dos suportes em EPU, as matrizes em PLA também foram produzidas no formato cúbico, porém com arestas menores, iguais a $8,20 \pm 0,01$ mm, pois, devido a rigidez do PLA, esses suportes não se deformaram durante o empacotamento. Essas e as dimensões dos suportes em EPU foram aferidas com o uso de um paquímetro com resolução de 0,05 mm. Alguns dos suportes resultantes desses processos de confecção podem ser visualizados na Figura 2.

Figura 1 - Equipamento para corte de EPU



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Figura 2 – Suportes de EPU e PLA



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: a) Suporte de EPU.

b) Suporte de PLA.

Os dois suportes, antes do uso na produção dos biocatalisadores, passaram por um procedimento de limpeza e descontaminação. Com essa finalidade, inicialmente os materiais, separadamente, foram submersos em solução de detergente neutro por 30 min e, em seguida, lavados com água tipo II. Na etapa seguinte, os suportes foram mantidos em submersão por 30 min em solução de álcool etílico na concentração de 70 % (m/m) e, novamente, lavados com água tipo II.

Subsequentemente, em conjuntos de 3 peças, os materiais foram secos em estufa de secagem de circulação forçada (Tecnal®, modelo TE-394/1) por 24 h, sob a temperatura de 50 °C, e pesados em balança analítica, para determinação da massa seca dos suportes.

3.1.2 Produção e imobilização das células fúngicas

Os biocatalisadores foram produzidos pela imobilização de células com atividade de transfrutossilação do fungo *A. oryzae* IPT-301, por meio de cultivo submerso em frascos Erlenmeyer de 250 ml. O meio complexo utilizado para esse cultivo foi preparado com a composição dada por: nitrato de sódio (NaNO_3) ($5,0 \text{ g L}^{-1}$), di-hidrogênofosfato de potássio (KH_2PO_4) ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), cloreto de manganês tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ($0,3 \text{ g L}^{-1}$), sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ($0,01 \text{ g L}^{-1}$), sacarose (150 g L^{-1}) e extrato de levedura ($5,0 \text{ g L}^{-1}$). Essas substâncias, pesadas em balança analítica (Shimadzu®, modelo AU220), foram dissolvidas com água tipo II e o pH dessa solução resultante foi ajustado para o valor de 5,5 (em pHmetro Tecnal®, modelo TEC-7), com a adição de gotas de ácido acético glacial ou de solução de NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Aos frascos, adicionou-se 50 ml desse meio e 3 peças de suporte preparados conforme descrito no Tópico 3.1.1 (em EPU ou em PLA) e, em seguida, tais conjuntos de materiais foram esterilizados em autoclave (Phoenix®, modelo AV-50) por 15 min, sob a temperatura de 121 °C (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Fernández *et al.*, 2007; Ottoni *et al.*, 2012).

A inoculação dos meios estéreis contendo os suportes foi efetuada a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C), em cabine de fluxo laminar vertical (Pachane®, modelo PCR 2), pela adição de 50 μL de suspensão de esporos. As suspensões de esporos utilizadas, com concentrações aproximadas de $1,5 \cdot 10^7$ esporos mL^{-1} , foram adicionadas a esses frascos como auxílio de micropipetadores monocanais com volume variável de 10 a 100 μL . Após as transferências dos inóculos, tais recipientes foram incubados em incubadoras do tipo *shaker* com agitação orbital (Tecnal®, modelo TE 4200), durante 32 h, sob a temperatura de 30 °C e velocidade de agitação de 200 rpm (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Fernández *et al.*, 2007; Ottoni *et al.*, 2012).

Os biocatalisadores foram separados do meio de cultivo após a incubação por

filtração a vácuo, com uso de funil de Buchner e papel de filtro qualitativo de 90 mm de diâmetro. Nesse procedimento de filtração cada conjunto de três suportes com células de *A. oryzae* IPT-301 foi lavado com cerca de 500 ml de água tipo II. Subsequentemente, os biocatalisadores foram armazenados em solução tampão de tris-acetato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), sob refrigeração a aproximadamente $3 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 ENSAIOS CATALÍTICOS

3.2.1 Caracterização do aparato experimental com PBR

O modelo de reator PBR de bancada utilizado nos ensaios, construído em vidro borossilicato, possui as dimensões aproximadas de $12,0 \pm 0,05 \text{ mm}$ de diâmetro interno, $20,0 \pm 0,5 \text{ cm}$ de comprimento de leito e $29,0 \pm 0,5 \text{ cm}$ de comprimento total. O leito desse PBR é envolto por uma camisa para troca térmica, com dois conectores para a circulação do fluido do trocador de calor, e possui roscas externas nas extremidades do leito (entrada e saída), para conexão das tubulações para alimentação e coleta de efluente.

Para o controle da temperatura do leito biocatalítico do reator mencionado acima, foi utilizado um banho termostatizado (Tecnal®, Modelo TE-2005) que possibilitou o bombeamento constante de água tipo II aquecida através da camisa do reator. A cuba de aquecimento da água desse sistema também foi utilizada para o aquecimento do substrato, o qual estava contido em um recipiente conectado à entrada do reator. Para o transporte do substrato que alimentou os sistemas em fluxo ascendente e para a coleta dos efluentes, usaram-se tubos de silicone com diâmetros interno de 3 mm e externo de 5 mm, isolados termicamente com tubos de polietileno, e bomba peristáltica (MS Tecnopon, modelo LDP-201-3/DMC 100) com regulagem de vazão. Essa montagem experimental está exemplificada na Figura 3.

Figura 3 – Montagem do aparato experimental



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: (a) banho termostático, (b) bomba peristáltica e (c) PBR.

3.2.2 Avaliação da operação em estado estacionário em PBR

Para a execução nos ensaios em PBR no presente trabalho, a entrada dos reatores foi preenchida com pérolas de vidro de diâmetro aproximado de $4,4 \pm 0,4$ mm, até a altura de $75,5 \pm 0,5$ mm. Esse preparo foi efetuado para sustentação dos biocatalizadores na região encamisada do reator. O leito biocatalítico nesses ensaios foi composto por três unidades de suporte de EPU com células imobilizadas, sobre as quais se adicionaram perolas de vidro de $70,0 \pm 0,5$ mm. As pérolas de vidro foram dispostas sobre os biocatalisadores com o intuito de estabilizá-los na posição inicial, em quantidades suficiente para também evitar a deformação excessiva dos suportes e maior compactação do leito.

A determinação do período de operação em estado estacionário dos sistemas reacionais suprarreferidos, montados com os aparatos descritos no Tópico 3.2.1, foi executada com ensaio em triplicata, com duração de 60 min por réplica, e uso do teste de Tukey (nível de confiança de 95%). A operação desses ensaios ocorreu a

temperatura de 50 °C, regulada no banho termostatizado, e com vazão de 1 ml min⁻¹ de solução reagente. Essa solução de alimentação foi preparada com a concentração de 473 g L⁻¹ de sacarose em tampão de tris-acetato (0,2 mol L⁻¹) e pH igual a 5,5. Durante os 60 min de operação contínua dos reatores, amostras de 5 ml foram coletadas dos efluentes desses sistemas nos tempos: 0 min; 5 min; 10 min; 15 min; 20 min; 30 min; 40 min; 50 min; e 60 min. Ressalta-se que os valores adotados para o preparo da solução reagente (concentração e pH) e de temperatura do meio reacional foram otimizados em estudos anteriores, para essa aplicação do *A. oryzae* IPT-301 visando a produção de FOS (Cunha *et al.*, 2019; Dias, 2020; Ribeiro, 2022).

3.2.3 Avaliação da cinética enzimática

Para o estudo da cinética enzimática da FTase, os leitos catalíticos foram empacotados com três unidades de biocatalisadores imobilizados em suportes de EPU, aplicando-se o método de preparo do aparato experimental no Tópico 3.2.1. Para cada valor de concentração do substrato, as amostras nesses ensaios foram coletadas até o início da operação em estado estacionário, como determinado pelo método explicado no Tópico 3.2.2. Os dados utilizados para determinação dos parâmetros da cinética enzimática com o uso da Equação 2 foram obtidos como uso das soluções reagentes nas concentrações de sacarose, em g L⁻¹, iguais a: 200, 300, 400, 473 e 600 (Dias, 2020; Dias *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2019).

3.2.4 Avaliação da inibição da A_t pela presença de glicose

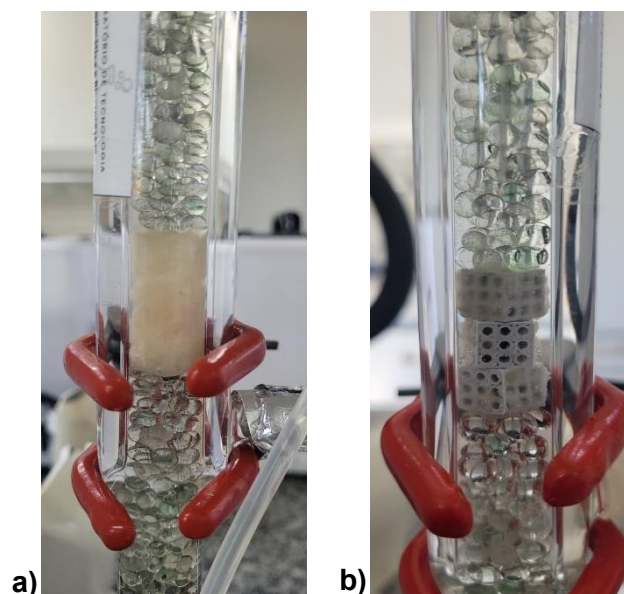
Com o uso do sistema reacional com reator de leito fixo montado segundo o Tópico 3.2.1, efetuou-se a avaliação do efeito da presença de glicose na solução de alimentação. Nesses ensaios, utilizaram-se três unidades de suportes de EPU com células imobilizadas e foram avaliadas as soluções de alimentação com pH de 5,5, concentrações de 473 g L⁻¹ de sacarose, 0,2 mol L⁻¹ de tris-acetato e concentrações de glicose distintas de: 11,8 g L⁻¹, 23,6 g L⁻¹ e 47,3 g L⁻¹, equivalentes a 2,5 %; 5 %; e 10 % da massa inicial de sacarose. Para cada concentração de glicose, foram realizados ensaios em triplicata, com sistema reacional sob a temperatura de 50 ° C e alimentação com vazão de 1 ml min⁻¹. A amostra de cada réplica de tais ensaios de inibição foi coletada no estado estacionário do sistema reacional, conforme

determinado pelos procedimentos do Tópico 3.2.2, e os resultados foram avaliados com o auxílio do teste de Tukey, com o nível de confiança de 95 % (Borzani *et al.*, 2001; Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

3.2.5 Avaliação da desativação térmica

Os ensaios de desativação térmica foram realizados em duplicata, no sistema descrito no Tópico 3.2.1, com empacotamento do leito catalítico com biocatalisadores imobilizados em EPU e PLA (Figura 4). As soluções utilizadas nesse estudo, para alimentação do sistema reacional, foram preparadas com as concentrações de 473 g L⁻¹ de sacarose, em tampão de tris-acetato (0,2 mol L⁻¹) e pH igual a 5,5. Em termos de condições operacionais, realizaram-se esses ensaios com o banho termostatizado regulado em 50 °C e com a vazão de 1 ml min⁻¹. O tempo da monitoração da desativação térmica dos biocatalisadores foi de 96 h a cada réplica, com coleta de amostras de 5 ml dos efluentes dos reatores a partir do início das saídas de fluido e nos seguintes tempos: 0,5 h; 1 h; 2 h; 3 h; 4 h; 6 h; 8 h; 12 h; 16 h; 24 h; 36 h; 48 h; 72 h; e 96 h. Aos dados obtidos pelos métodos analíticos (Tópico 3.3.4) aplicou-se o teste de Tukey (grau de confiança de 95 %) e o ajuste às Equações 7, 8 e 9, com o auxílio do programa OriginPro (OriginLab, versão 8.6.0) (Araújo *et al.*, 2022; Fogler, 2012; Sadana; Henley, 1987; Silva *et al.*, 2021).

Figura 4 – Leitos catalíticos empacotados



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: a) biocatalisador com EPU.

b) biocatalisador com PLA.

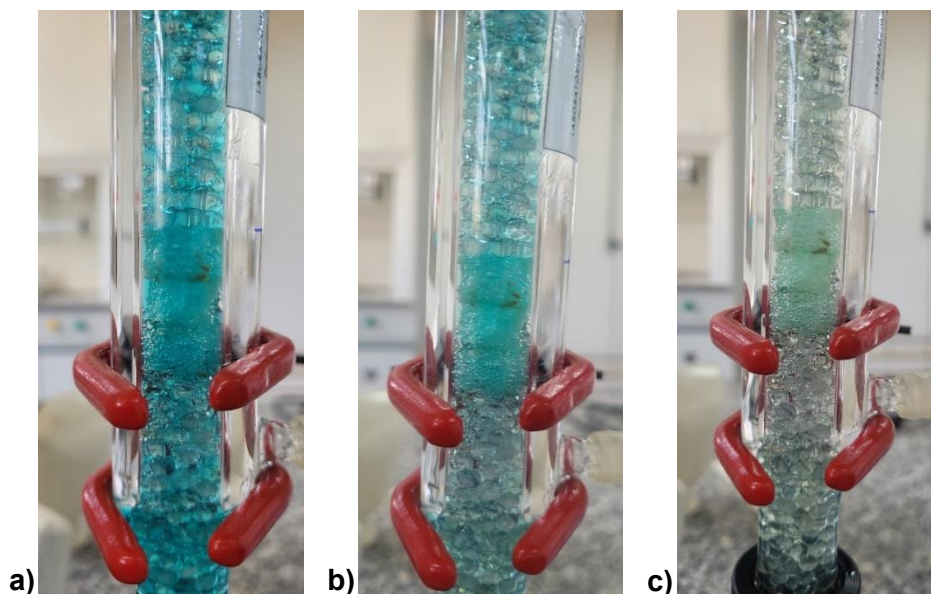
3.2.6 Determinação da DTR

Para a determinação da DTR foram utilizadas duas soluções com o mesmo pH (5,5) e as mesmas concentrações de sacarose (473 g L^{-1}) e de tris-acetato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) dos ensaios suprarreferidos. Uma dessas soluções, chamada solução A, foi preparada tal qual aquelas utilizadas nesses ensaios e à mistura denominada solução B, foi adicionado o traçador azul de metileno (AM), na concentração de 10 mg L^{-1} . Essa substância foi selecionada por possuir, nas condições dos ensaios realizados neste trabalho, as características necessárias para a aplicação como traçador, em concordância com a descrição presente no Tópico 2.10 (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

Os ensaios de DTR foram realizados em triplicata com as mesmas montagens do aparato experimental e do leito catalítico descritos no Tópico 3.2.1. Inicialmente, em cada uma das réplicas de tais ensaios, foi efetuada a saturação do leito catalítico com o traçador AM, conforme descrito por Dias (2020), pelo bombeamento das soluções intercaladas a uma vazão de 1 ml min^{-1} (Figura 5). Nessa etapa, o sistema foi primeiramente alimentado com a solução A, por 40 min, até atingir o estado estacionário. Em seguida, passou-se à alimentação do reator com a solução B, até

que a medida de absorvância permanecesse constante no efluente e igual à medida da solução B. Essa etapa de saturação do leito foi finalizada com a alimentação da solução A e conferência da absorvância das amostras de efluente do sistema. Essas medidas foram encerradas quando a absorvância apresentada permaneceu igual à da solução A.

Figura 5 – Saturação do leito catalítico com AM



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: a) Concentração máxima de AM.

b) Concentração intermediária de AM.

c) Substrato sem AM em leito saturado.

As injeções do tipo pulso de 2 ml da solução B foram executadas nos leitos saturados, em cada réplica, com o uso de uma seringa de 5 ml, fabricada em polipropileno, com uma agulha de aço inoxidável. Essa adição da solução B ao sistema reacional foi efetuada próxima à entrada do reator e, instantaneamente, iniciou-se a coleta de amostras de 2 ml do efluente, em intervalos de 5 min. Após cada pulso de traçador, a amostragem na saída do reator foi cessada quando as medidas dessas alíquotas resultaram em valores aproximadamente iguais aos da solução A.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1 Determinação da densidade

Determinaram-se as densidades das soluções com concentrações de sacarose de 200, 300, 400, 473 e 600 g L⁻¹, em tris-acetato a 0,2 mol L⁻¹ e pH igual a 5,5, por método de picnometria. A calibração do picnômetro de Gay-Lussac em vidro utilizado e a determinação do volume calibrado desse recipiente (V_c [m³]) foram efetuadas com água do tipo II, em triplicata. Para isso, determinou-se a massa do picnômetro vazio com tampa (m_v [kg]), por pesagem em uma balança analítica (Shimadzu®, modelo AUY220). Em seguida, adicionou-se água até o preenchimento de todo o volume do picnômetro sem tampa, evitando-se a formação de bolhas de ar, e a tampa foi colocada de forma que o líquido preenchesse o capilar nela contido. O recipiente com água foi aquecido em banho-maria (Nova Técnica®, modelo NT 245) a 50 °C por 2 horas, para equilíbrio da temperatura e da dilatação do picnômetro mais a água. Após esse período, o picnômetro foi retirado do banho, secado cuidadosamente na parte externa e deixado em repouso em dessecador por 1 hora, para atingir a temperatura ambiente. Seguiu-se, então, com a pesagem desse conjunto em balança analítica para determinação da massa de água utilizada para preencher o picnômetro a 50 °C (m_a [kg]) (ISO 6883:2017, 2017).

Com os dados obtidos para o picnômetro com água e a densidade da água a 50 °C ($\rho_a = 986,99$ kg m⁻³), calculou-se o V_c com o uso da Equação 33. Subsequentemente, determinou-se a massa do picnômetro preenchido com cada solução de sacarose (m_s [kg]) pelo método citado acima para a água. As densidades dessas soluções a 50 °C (ρ_s [kg m⁻³]) foram calculadas com a Equação 34 (ISO 6883:2017, 2017).

$$V_c = \frac{m_a - m_v}{\rho_a} \quad (33)$$

$$\rho_s = \frac{m_s - m_v}{V_c} \quad (34)$$

3.3.2 Determinação da viscosidade dinâmica

Foram determinadas as viscosidades dinâmicas de amostras de soluções com as mesmas composições das soluções utilizadas nos ensaios para alimentar os reatores PBR. Assim, foram analisados, em triplicata, os substratos com concentrações de sacarose iguais a 200, 300, 400, 473 e 600 g L⁻¹, preparadas com tris-acetato a 0,2 mol L⁻¹ e com pH igual a 5,5. Os ensaios de viscosidade foram realizados na temperatura utilizada nos meios reacionais, de 50 °C, e com o uso do viscosímetro *Brookfield*, modelo DV-I Prime, equipado com *spindle* 18, sob a velocidade de agitação de 60 rpm.

3.3.3 Determinação da porosidade do leito catalítico

A estimativa da porosidade dos leitos catalíticos (ε) foi efetuada separadamente para cada material adicionado no empacotamento dos PBRs utilizados nos ensaios com EPU e PLA. Para isso, determinaram-se os volumes ocupados por esses sólidos ($V_{sólidos}$), por meio da medição do volume deslocado de líquido causado por cada fração de partículas adicionadas em provetas preenchidas com água do tipo II. Esse procedimento foi efetuado com as esferas de vidro usadas na base (EV_b) e no topo (EV_t) dos leitos colocadas em provetas graduadas de 100,0 cm³ \pm 0,5 cm³, às quais se adicionaram 50 cm³ \pm 0,5 cm³ de água. O $V_{sólidos}$ das esferas foi considerado como a diferença entre o volume final aferido na proveta e o adicionado (Borges *et al.*, 2023; Rocha; Pereira, 2019).

Para a determinação os $V_{sólidos}$ referentes aos biocatalisadores, 3 peças de cada biocatalisador, imobilizados em EPU e PLA, foram inseridas separadamente em provetas de 10,00 cm³ \pm 0,05 cm³, de maneira semelhante ao empacotamento realizado nos leitos. Nessas provetas foram vertidos 5,00 cm³ \pm 0,05 cm³ de água e o volume final aferido foi utilizado para o cálculo de $V_{sólidos}$, como descrito acima. Posteriormente, calcularam-se os volumes totais dos leitos (V_{leito} [cm³]), assumindo a geometria cilíndrica, considerando os diâmetros da região não encamisada (base, 3,60 mm \pm 0,05 mm), encamisada (topo e região com biocatalisador, 1,20 mm \pm 0,05 mm) e os comprimentos dos segmentos ocupados pelas diferentes partículas (L [cm]) (Borges *et al.*, 2023; Fogler, 2012; Rocha; Pereira, 2019).

Os resultados de ε para os diferentes segmentos dos leitos catalíticos

utilizados, empacotados com biocatalisadores imobilizados em EPU e PLA e EV_b e EV_t , foram calculados com o uso das Equações 35 e 36 (Borges *et al.*, 2023; Fogler, 2012; Rocha; Pereira, 2019).

$$(1 - \varepsilon) = \frac{V_{sólidos}}{V_{leito}} \quad (35)$$

$$\varepsilon = 1 - \frac{V_{sólidos}}{V_{leito}} \quad (36)$$

3.3.4 Determinação da A_t e A_h

Durante o período de operação dos PBRs, os frascos contendo as amostras coletadas nas correntes de saída de tais sistemas foram aquecidas por imersão, com o uso de um equipamento de banho-maria com água mantida em temperatura de ebulição, por um período de 10 minutos, seguida de imersão em banho de gelo por 5 min. Em seguida, utilizaram-se tais amostras para a quantificação colorimétrica, com auxílio de um espectrofotômetro (Bel Photonics®, modelo V-M5), das concentrações de glicose (G), utilizando-se o método GOD/PAP® (kit enzimático glicose-oxidase), e de açúcares redutores (AR), com o uso do método DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico). Tais dados experimentais foram utilizados para o cálculo das concentrações de frutose liberada no meio reacional (F) e de frutose transfrutossilada (F_T), utilizando-se as Equações (37) e (38). (Araújo *et al.*, 2022; Chen; Liu, 1996; Dias *et al.*, 2022; Morales, *et al.*, 2020).

$$[F] = [AR] - [G] \quad (37)$$

$$[F_T] = [G] - [F] \quad (38)$$

Para os ensaios de inibição da A_t , devido à adição de glicose na alimentação do reator ($[G]_i$), utilizaram-se os seguintes cálculos de concentração de AR e G , para substituição de $[AR]$ e $[G]$ nas Equações 39 e 40:

$$[AR]^* = [AR] - [G]_i \quad (39)$$

$$[G]^* = [G] - [G]_i \quad (40)$$

A partir dos resultados obtidos para as concentrações de frutose transfrutossilada e frutose liberada e das Equações 31 e 32 abaixo, foram determinadas as atividades enzimáticas de tranfrutossilação (A_t) e hidrolítica (A_h). Sendo que, neste trabalho foram utilizadas as definições de uma unidade de A_t e A_h , respectivamente, como: a quantidade de enzima que transfere ou libera um 1 μmol de frutose, por minuto por grama de biomassa seca, sob as condições experimentais utilizadas (Cunha *et al.*, 2019; Faria *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Morales *et al.*, 2020; Prata, 2020).

$$A_t = \frac{[F_T]Q}{m_{biomassa}} \quad (41)$$

$$A_h = \frac{[F]Q}{m_{biomassa}} \quad (42)$$

onde Q se refere à vazão volumétrica de substrato (ml min^{-1}) e $m_{biomassa}$, à massa de biomassa seca contida no leito catalítico (g).

3.3.5 Determinação da concentração de azul de metileno

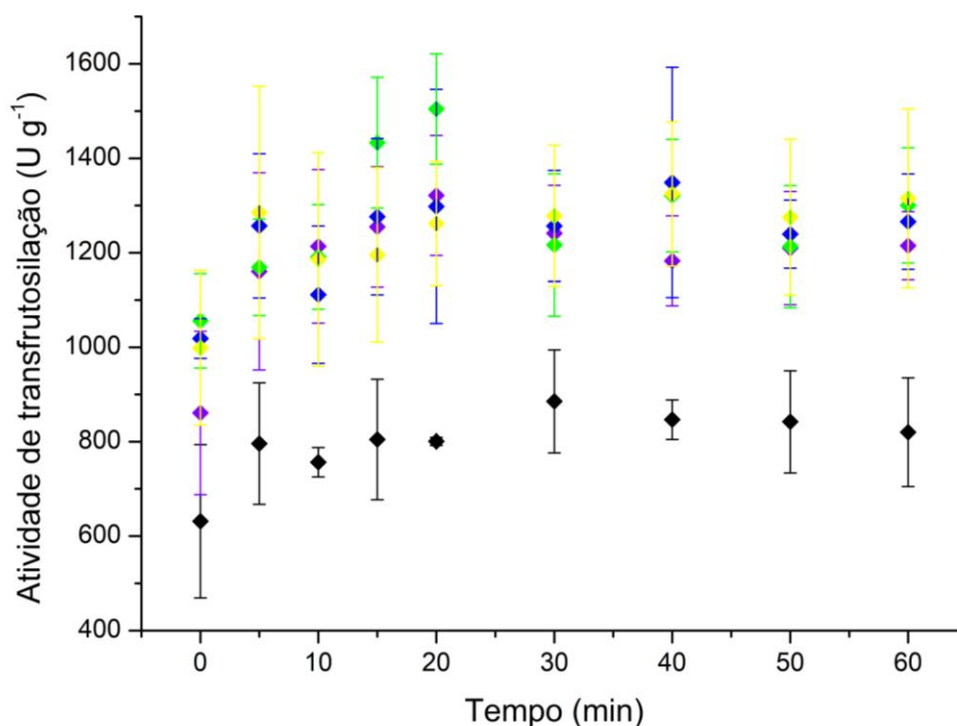
Nos ensaios de DTR, descritos no Tópico 3.2.6, as concentrações de AM foram determinadas com o uso do espectrofotômetro (Bel Photonics ®, modelo V-M5). Nesse método analítico, optou-se pela regulagem do comprimento de onda de 665 nm, com o objetivo de se obter o máximo de absorvância para o AM e determinação das concentrações dessa espécie química.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA

Os ensaios para avaliação do período de operação em estado estacionário, efeito da concentração na A_t e determinação de parâmetros cinéticos foram realizados em triplicata, conforme o método descrito no Tópico 3.2.3. A vazão utilizada nesses sistemas contínuos do tipo PBR foi de 1 ml min^{-1} e os leitos foram empacotados com biocatalisadores imobilizados em EPU. Os resultados desses ensaios, para todas as concentrações analisadas, estão presentes na Figura 6.

Figura 6 - Perfil da atividade de transfrutoseilação em função do tempo com diferentes concentrações de sacarose para avaliação da cinética enzimática de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: (◆) 200 g L^{-1} , (◆) 300 g L^{-1} , (◆) 400 g L^{-1} , (◆) 473 g L^{-1} e (◆) 600 g L^{-1} .

Nota: experimentos realizados com pH de 5,5, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e vazão de 1 ml min^{-1} .

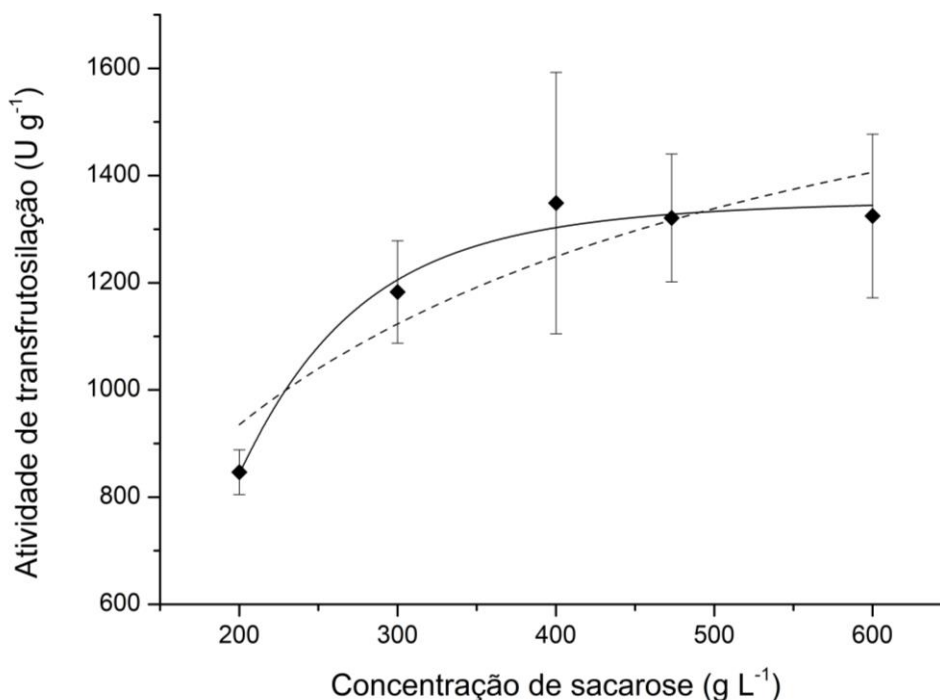
De acordo com as distribuições de dados presentes na Figura 6, observaram-se maiores valores de A_t para concentrações acima de 300 g L^{-1} de sacarose, o que

corresponde com as características esperadas pela presença de enzimas do tipo FTase no meio reacional, por proporcionarem alta produtividade de FOS na presença de altas concentrações desse dissacarídeo (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Mano *et al.*, 2018; Sánchez-Martínez *et al.*, 2020; Yun, 1996). Entretanto, não se observou um aumento nos resultados de A_t diretamente proporcional à concentração de sacarose, pois o maior valor obtido para essa atividade enzimática, igual a $1504,27 \pm 116,71 \text{ U g}^{-1}$, ocorreu com a concentração de 473 g L^{-1} de sacarose, em 20 min.

Os perfis cinéticos dispostos Figura 6 indicam que, possivelmente, a A_t das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU são inibidas na presença de altas concentrações desse substrato, geralmente acima de valores de cerca de 500 g L^{-1} , como reportado por Cunha *et al.* (2019) em ensaios em batelada com FTase solúvel e células biocatalíticas, ambos com o uso de *A. oryzae* IPT-301. Gonçalves *et al.* (2020) e Faria *et al.* (2021), utilizando essa mesma cepa em ensaios em batelada, também observaram tal comportamento com células reticuladas e encapsuladas em alginato de cálcio e enzimas imobilizadas em sílica gel, respectivamente. No caso de Dias *et al.* (2022), observaram-se dados que contribuem para a confirmação dessa hipótese, obtidos em PBR, com leito catalítico empacotado com células de *A. oryzae* IPT-301.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da reação de transfrutossilacção nos sistemas analisados, utilizaram-se os valores de A_t dos sistemas determinadas com amostras coletadas no mesmo tempo de operação, com os reatores funcionando em estado estacionário. O intervalo que resultou nesse regime de operação foi estimado entre 30 e 60 min, período no qual, pela tendência visualmente aparente, as médias dos resultados A_t permaneceram aproximadamente constantes nos perfis representados na Figura 6 (Fogler, 2012; Lorenzoni *et al.*, 2015). Assim, utilizaram-se os pontos em 40 min de operação, devido aos menores desvios padrões calculados para a maioria das concentrações, apesar de o resultado do teste Tukey (nível de confiança de 95 %) ter demonstrado que, para cada concentração, os pontos experimentais da Figura 6 são estatisticamente iguais. Essa distribuição dos resultados de A_t determinados em regime estacionário em função das concentrações de sacarose está representada graficamente na Figura 7.

Figura 7 - Perfil da atividade de transfrutoseilação em regime estacionário em função da concentração de sacarose para a avaliação de modelos cinéticos enzimáticos com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: (---) modelo de Michaelis-Menten, (—) Modelo de Hill.

Nota: experimentos realizados com pH de 5,5, 50 °C e vazão de 1 ml min⁻¹.

Observa-se, na Figura 7, uma tendência ao aumento da A_t diretamente proporcional à concentração de sacarose, no intervalo abaixo de 300 g L⁻¹. Isso foi confirmado com a aplicação do teste de Tukey com nível de confiança de 95 %, pela definição do ponto referente a 200 g L⁻¹ de sacarose como estatisticamente diferente dos pontos subsequentes, os quais são estatisticamente iguais. As duas curvas presentes na Figura 7 correspondem aos ajustes aos dados experimentais dos modelos cinéticos descritos pelas Equações 2 e 3, cujos parâmetros calculados estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos para ensaios realizados em PBR com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU

Parâmetros	Michaelis-Menten	Hill
K_M (g L ⁻¹)	201,83 ± 90,91	-
$K_{0,5}$ (g L ⁻¹)	-	176,08 ± 7,83
$V_{m\acute{a}x}$ (U g ⁻¹)	1878,91 ± 291,81	1355,71 ± 40,07
n	-	3,91 ± 1,03
R^2	0,79	0,96

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Pelos parâmetros ajustados presentes na Tabela 2, verificou-se que os valores para as constantes K_M e $K_{0,5}$, iguais a 201,83 ± 90,91 g L⁻¹ e 176,08 ± 7,83 g L⁻¹, respectivamente, foram semelhantes. Esses resultados, que representam as concentrações que correspondem a metade da velocidade máxima da reação nas condições experimentais empregadas, podem ser considerados significativamente elevados e, por isso, demonstrar uma elevada afinidade entre o substrato e as enzimas com A_t presentes nas células de *A. oryzae* IPT-301. Entre os resultados de $V_{m\acute{a}x}$, iguais a 1878,91 ± 291,81 U g⁻¹ e 1355,71 ± 40,07 U g⁻¹, ajustados respectivamente para os modelos de Michaelis-Menten e Hill, o que apresentou maior coerência com as maiores atividades obtidas experimentalmente em regime estacionário foi o obtido com a aplicação da equação de Hill. Além disso, o ajuste ao modelo de Hill resultou em um coeficiente de determinação (R^2) (igual a aproximadamente 0,96) mais satisfatório que o obtido para o modelo de Michaelis-Menten. Isso indica que, possivelmente, a distribuição sigmoide seja a forma mais adequada de representação da cinética enzimática obtida nas condições experimentais utilizadas (Rodwell *et al.*, 2017; Weiss, 1997).

O valor obtido para o coeficiente de Hill (Tabela 2) igual a 3,91 ± 1,03 implica que, provavelmente, as enzimas presentes nos biocatalisadores avaliados apresentam cooperatividade positiva, em relação à A_t . Garcia *et al.* (2021) também obtiveram resultados que sugerem que o modelo de Hill representa satisfatoriamente a cinética enzimática da FTase de *A. oryzae* IPT-301. Esses dados foram gerados pelo estudo experimental realizado em PBR com células dessa cepa livres e reticuladas com glutaraldeído, cujos resultados, respectivamente para $V_{m\acute{a}x}$, $K_{0,5}$ e n ,

foram iguais a: 662,34 U g⁻¹ e 833,08 U g⁻¹; 97,80 g L⁻¹ e 85,90 g L⁻¹; 2,33 e 1,67. Porém, em experimentos realizados em PBR com células de *A. oryzae* IPT-301 e vazão de 11,5 ml min⁻¹, Dias *et al.* (2022) obtiveram o melhor coeficiente de determinação para a cinética de Michaelis-Menten (0,96), que gerou valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_M iguais a 634 ± 85 U g⁻¹ e 157 ± 78 g L⁻¹, respectivamente.

Em estudos realizados em batelada com FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301, Faria *et al.* (2021) ($V_{m\acute{a}x} = 1,45 \pm 0,03$ U g⁻¹, $K_{0,5} = 240,2 \pm 4,0$ g L⁻¹ e $n = 10,4 \pm 6,1$) e Araújo *et al.* (2022) observaram ajustes satisfatórios ao modelo de Hill. Nos ensaios realizados por Faria *et al.* (2021), obteve-se R^2 igual a 0,99. No caso de Araújo *et al.* (2022), para os ensaios com FTase imobilizada em (PHB) ($V_{m\acute{a}x} = 8,02 \pm 0,65$ U g⁻¹, $K_{0,5} = 221,14 \pm 15,92$ g L⁻¹ e $n = 6,38 \pm 2,87$) e PHB funcionalizado com glutaraldeído ($V_{m\acute{a}x} = 10,35 \pm 0,30$ U g⁻¹, $K_{0,5} = 205,90 \pm 5,78$ g L⁻¹ e $n = 6,39 \pm 1,76$), respectivamente, obtiveram-se valores para R^2 iguais a 0,94 e 0,98. Tais resultados também indicam que, possivelmente, a FTase de *A. oryzae* IPT-301 apresente cooperatividade positiva nas condições experimentais adotadas.

4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA GLICOSE

Os ensaios para avaliação da inibição causada por diferentes concentrações de glicose ($C_{glicose}$) na A_t das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU foram realizados conforme os procedimentos descritos no Tópico 3.2.4. Como se pode observar nos resultados de tais ensaios presentes na Tabela 3, não foi possível determinar os resultados de A_t para as concentrações maiores que 11,8 g L⁻¹ de glicose, pelos métodos detalhados no Tópico 3.3.4. Isso pode indicar limitações dos métodos analíticos usados para determinação das composições dos efluentes gerados nesses ensaios, para os casos de baixa A_t . Porém, pode-se comprovar o efeito significativo de inibição dessa atividade enzimática pela presença de glicose.

Pela análise estatística dos dados, observou-se que os dois resultados expressos na Tabela 3 são estatisticamente iguais. No entanto, ao se comparar os valores médios desses resultados, nota-se uma redução de cerca de 63 % da A_t na presença de 11,8 g L⁻¹ de glicose no meio reacional. Apesar desses resultados não permitirem concluir satisfatoriamente a avaliação cinética desse processo de inibição, a redução acentuada da A_t evidencia que esse processo pode ocorrer com baixos

valores de $C_{glicose}$, para células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU. Tais dados reforçam o efeito de inibição competitiva apresentado pela glicose comprovado em diversos estudos, como descrito por Gabrielczyk *et al.* (2018) e Pravičović *et al.* (2023).

Tabela 3 - A_t com diferentes concentrações de glicose em ensaios de inibição realizados em PBR com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU

$C_{glicose}$ (g L ⁻¹)	A_t (U g ⁻¹)
0,00	835,55 ± 212,37
11,82	315,87 ± 170,46

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

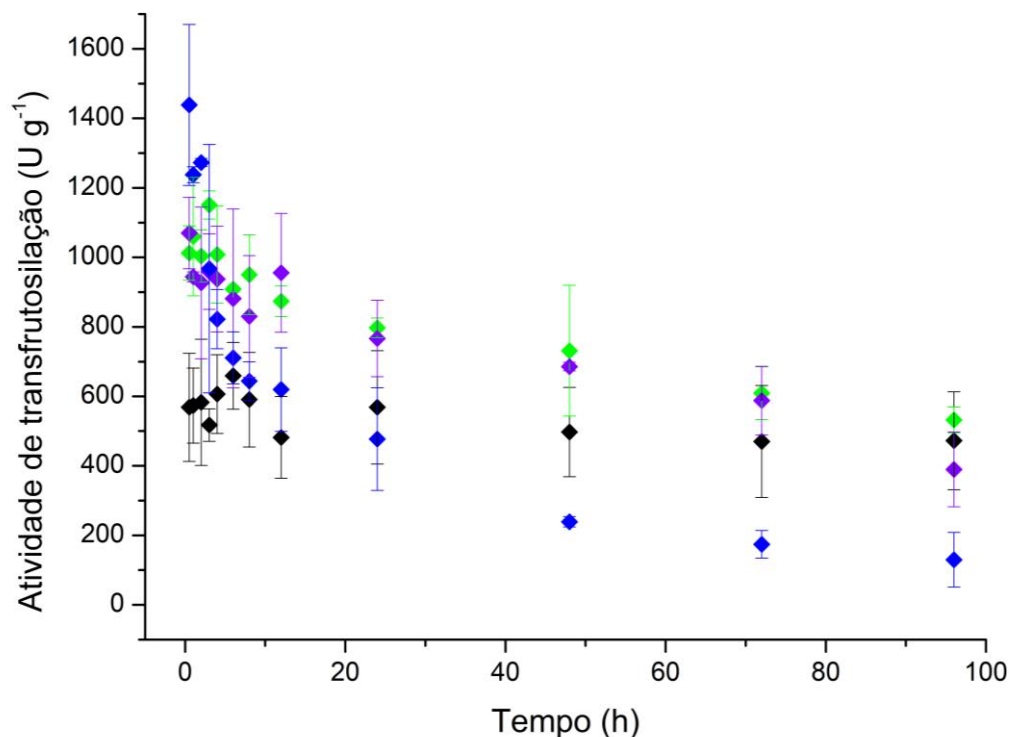
4.3 AVALIAÇÃO DA DESATIVAÇÃO

4.3.1 Avaliação da desativação com uso de suportes em EPU

A avaliação da desativação dos biocatalisadores compostos por células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU foi efetuada com ensaios em duplicata, para cada valor de temperatura, e vazão de substrato mantida a 1 ml min⁻¹. Esses ensaios foram executados segundo o método descrito no Tópico 3.2.5 e os resultados obtidos dessa maneira se encontram na Figura 8.

Na Figura 8, é possível observar, até 12 h de operação, maiores valores de A_t para temperaturas acima de 30 °C, com pico em 30 min, referente à 60 °C e à A_t igual a 1438,76 ± 231,51 U g⁻¹. Nesse gráfico, nota-se, a partir de cerca de 6 horas de operação dos PBRs (intervalo com maiores oscilações nos dados), que ocorre um decaimento significativo das atividades catalíticas para temperaturas maiores que 30 °C. Assim, nos pontos coletados ao final dos experimentos, com 96 h, obtiveram-se resultados coerentes com o esperado decaimento das atividades biocatalíticas em função da temperatura, devido à desativação mais acentuada para 60 °C e a maior estabilidade térmica referente ao perfil de 30 °C (Dixon; Webb, 1979; Fields, 2001; Fogler, 2012).

Figura 8 - Perfil da atividade de transfrutoseilação em função do tempo em diferentes temperaturas para a avaliação da desativação com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: (◆) 30 °C, (◇) 40 °C, (◇) 50 °C e (◆) 60 °C.

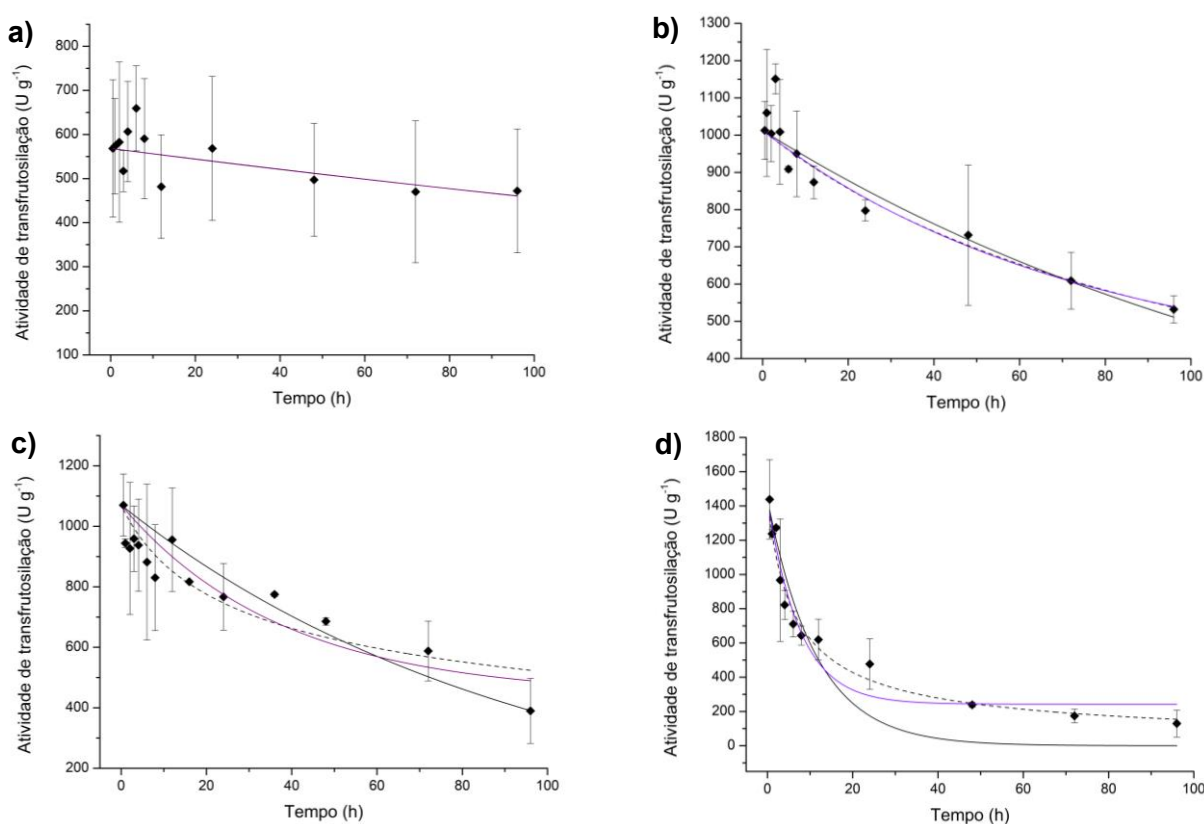
Nota: experimentos realizados com 473 g L⁻¹ de sacarose, pH de 5,5, e vazão de 1 ml min⁻¹.

Os modelos matemáticos representados pelas Equações 7, 8 e 9 foram empregados para ajustes aos dados presentes na Figura 8 e obtenção dos parâmetros de desativação enzimática. Os perfis ajustados referentes aos modelos de desativação de primeira ordem, de ordem d e de Sadana e Henley estão representados na Figura 9.

Destaca-se que os estudos realizados no presente trabalho para a avaliação da desativação catalítica por 96 h, com células do gênero *Aspergillus* aplicadas em reatores de leito fixo, visando a produção de FOS, são inéditos na literatura. Como se verifica no trabalho de Dias *et al.* (2022), que estudaram a estabilidade operacional de células de *A. oryzae* IPT-301 em PBR por 12 h, a 50 °C e com vazão de substrato de 5 e 11,5 ml min⁻¹. Apesar de outros estudos em PBR para produção de FOS terem sido feitos em períodos maiores que 96 h, os biocatalisadores utilizados nesses casos

foram produzidos com outras cepas fúngicas. Desses trabalhos, destacam-se os executados por Jung *et al.* (2011), que utilizaram células de *Aureobasidium pullulans* imobilizadas em alginato de cálcio, em ensaios de mais de 100 dias de duração, e Zambelli *et al.* (2016), por terem executado ensaios contínuos de até 7 dias, com células de *Cladosporium cladospooides* imobilizadas com alginato de sódio.

Figura 9 - Perfis de atividade de transfrutossilação em função do tempo em diferentes temperaturas para a avaliação de modelos de desativação com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

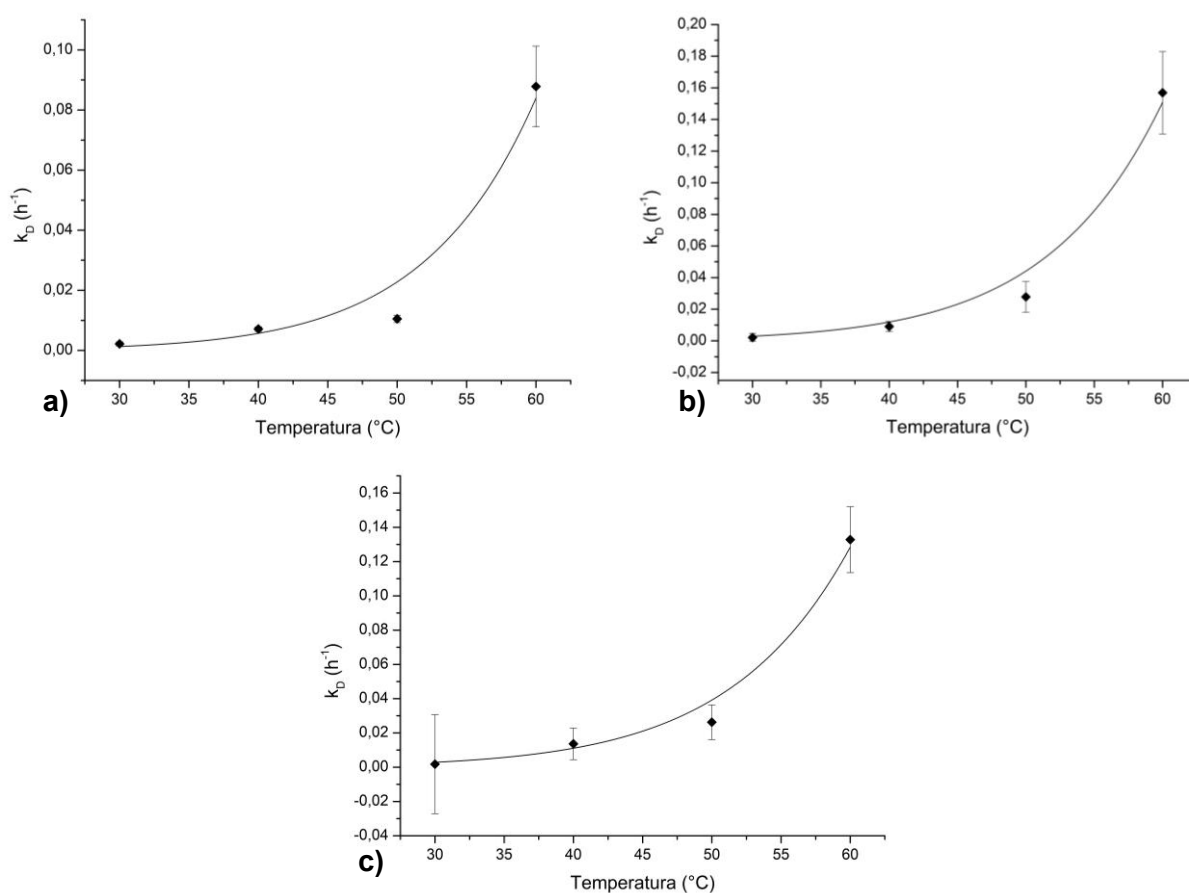
Legenda: (a) 30 °C, (b) 40 °C, (c) 50 °C, (d) 60°C, (---) primeira ordem, (—) ordem d e (—) Sadana e Henley.

Nota: experimentos realizados com 473 g L⁻¹ de sacarose, pH de 5,5, e vazão de 1 ml min⁻¹.

Pode-se observar, nos gráficos dispostos na Figura 9, que as maiores divergências entre as curvas ajustadas para os diferentes modelos de cinética de desativação ocorrem para as temperaturas que causaram maiores decaimentos relativos das A_t (50 e 60 °C). Os parâmetros resultantes desses ajustes estão apresentados na Tabela 4 e os resultados de k_D foram utilizados para a determinação

dos dados de E_D (Tabela 5), por aplicação das Equações 13 e 14, conforme as representações gráficas na Figura 10.

Figura 10 - Perfis de k_D em função da temperatura para a determinação da E_D com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: (a) primeira ordem, (b) ordem d, (c) Sadana e Henley e (—) modelo de Arrhenius.

Nota: experimentos realizados com 473 g L⁻¹ de sacarose, pH de 5,5, e vazão de 1 ml min⁻¹.

Pelos resultados ajustados para as constantes k_D (Tabela 4), considerando os coeficientes de determinação, o modelo cinético de primeira ordem é, provavelmente, mais adequado para descrever as cinéticas de desativação a 30 e 40 °C, apesar de que, para 40 °C, os R^2 referentes aos três modelos ficaram semelhantes. Porém, os valores de R^2 indicam que, para 30 °C, os ajustes obtidos para os modelos cinéticos não foram muito precisos estatisticamente, possivelmente, devido à alta dispersão dos dados e a baixa redução da A_t após 96 h nessa temperatura. Já para as temperaturas

de 50 e 60 °C, os melhores ajustes para obtenção de k_D ocorreram com os modelos com o coeficiente d ajustável, cujos valores resultaram nas ordens de reação iguais a 4,13 e 2,38, respectivamente.

Os resultados E_D obtidos através dos ajustes representados na Figura 10, podem ser considerados estatisticamente satisfatórios para os três modelos cinéticos considerados, conforme os resultados de R^2 próximos de 1 resultantes (Tabela 5) (Araújo *et al.*, 2022; Fogler, 2012; Levenspiel, 2000). No entanto, as cinéticas de ordem d e de Sadana e Henley geraram ajustes aos dados experimentais com qualidade ligeiramente melhor.

Nos resultados apresentados na Tabela 4, observa-se, de forma coerente com a Equação 13, um aumento significativo de k_D em função da temperatura, resultados cuja magnitude é ampliada com o aumento da taxa de desativação enzimática. Isso implica na variação observada para os valores de $t_{1/2}$ calculados, que podem ser considerados coerentes com os dados dos ensaios nas Figuras 8 e 9, devido à presença de k_D nas Equações 10, 11 e 12. Utilizando FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 em batelada, a 50 °C, Faria *et al.* (2021) e Araújo *et al.* (2022), respectivamente, com o uso de FTase imobilizada em sílica gel e imobilizada em PHB funcionalizado, obtiveram valores ajustados para $t_{1/2}$ iguais a 11,33 e 2,07 h. Isso implica que, provavelmente, a FTase das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU aplicadas em PBR apresentam maior estabilidade térmica do que a FTase extracelular, como foi utilizada nos estudos desses autores.

Gonçalves *et al.* (2020), pela avaliação de células de *A. oryzae* IPT-301 reticuladas e livres em batelada, observaram menores taxas de desativação com o uso dos biocatalisadores reticulados, o que resultou em um $t_{1/2}$ igual a 16,5 h (50 °C). Comparando com os valores de $t_{1/2}$ supracitados, nota-se que, provavelmente, as células de *A. oryzae* IPT-301 com A_t apresentam menor taxa de desativação do que suas enzimas extracelulares, para os tipos de aplicações mencionados acima. Nesses ensaios citados, as barreiras energéticas representadas pela E_D obtidas também corroboram essa hipótese, conforme a Tabela 5, o valor calculado por Gonçalves *et al.* (2020), igual a 136,32 kJ mol⁻¹, e os dados apresentados por Faria *et al.* (2021) e Araújo *et al.* (2022), iguais a 56,8 kJ mol⁻¹ e 50,8 kJ mol⁻¹, respectivamente.

Tabela 4 – Parâmetros termodinâmicos de desativação para ensaios realizados em PBR com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU

Parâmetros	Modelo	Temperaturas			
		30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
k_D (h ⁻¹)	Ordem 1	2,18.10 ⁻³	7,12.10 ⁻³	1,05.10 ⁻²	8,78.10 ⁻²
	Ordem d	2,14.10 ⁻³	9,07.10 ⁻³	2,78.10 ⁻²	0,157
	SH	1,78.10 ⁻³	1,36.10 ⁻²	2,62.10 ⁻²	0,133
d	Ordem d	0,74	1,96	4,13	2,38
α	SH	-0,21	0,36	0,41	0,17
R^2	Ordem 1	0,46	0,90	0,75	0,86
	Ordem d	0,40	0,89	0,81	0,96
	SH	0,40	0,89	0,77	0,94
$t_{1/2}$ (h)	Ordem 1	317,96	97,35	66,01	7,89
	Ordem d	296,36	108,39	89,19	7,40
	SH	300,41	111,34	71,62	6,92
ΔH_D (kJ mol ⁻¹)	Ordem 1	114,20	114,12	114,03	113,95
	Ordem d	107,56	107,47	107,39	107,31
	SH	103,83	103,74	103,66	103,58
ΔG_D (kJ mol ⁻¹)	Ordem 1	110,37	111,01	113,60	111,32
	Ordem d	110,42	110,38	110,98	109,71
	SH	110,88	109,33	111,14	110,71
ΔS_D (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	Ordem 1	0,01	0,01	0,001	0,01
	Ordem d	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
	SH	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 5 – E_D determinada para ensaios realizados em PBR com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU

Parâmetros	Primeira ordem	Ordem d	Sadana e Henley
E_D (kJ mol ⁻¹)	116,72 ± 40,64	110,08 ± 27,72	106,35 ± 24,19
R^2	0,95	0,97	0,97

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

De acordo com os valores de ΔH_D na Tabela 4, os biocatalisadores avaliados neste trabalho necessitam de menores quantidades de energia para desnaturação de 1 mol de enzimas, em todas as temperaturas utilizadas, se comparados aos resultados obtidos por Faria *et al.* (2021) (37,11 kJ mol⁻¹, 50 °C) e Araújo *et al.* (2022) (37,11 kJ mol⁻¹, 50 °C), nas condições citadas acima. Resultados semelhantes aos que estão presentes na Tabela 4 foram adquiridos por Gonçalves *et al.* (2020), como o valor de 133,64 kJ mol⁻¹, a 50 °C, com o uso de células reticuladas. Observando-se os altos valores de ΔG_D calculados para células *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU expressos nessa tabela, pode-se considerar que desnaturação enzimática tende a não ocorrer espontaneamente nas condições experimentais descritas (Souza *et al.*, 2015; Koretsky, 2007). Essas mesmas características podem ser atribuídas aos processos de desativação estudados por Faria *et al.* (2021) (108,86 kJ mol⁻¹, 50 °C), Araújo *et al.* (2022) (104,29 kJ mol⁻¹, 50 °C) e Gonçalves *et al.* (2020) (89,83 kJ mol⁻¹, 50 °C), considerando os biocatalisadores que apresentaram melhor desempenho em cada um desses trabalhos.

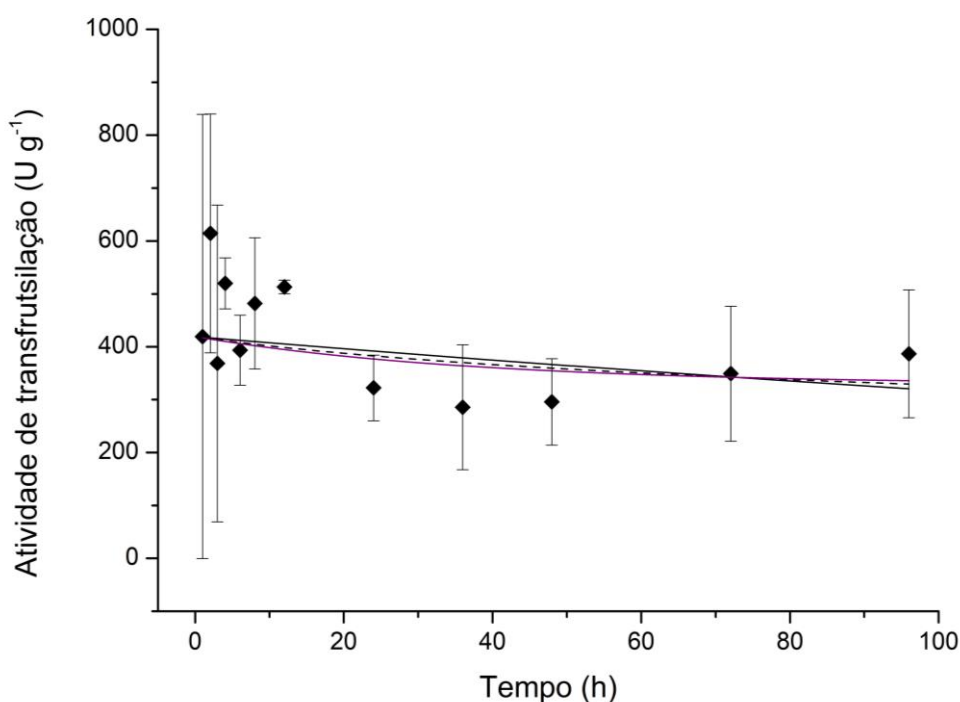
Os dados de ΔS_D calculados próximos de 0, para os modelos de primeira ordem, ordem d e de Sadana e Henley, demonstram que as estruturas enzimáticas presentes nos biocatalisadores testados apresentam baixo grau de desordem dos sistemas. Esses dados representam a ocorrência de baixas quantidades de energia incrementadas por unidade de temperatura na transição enzimática para o estado desnaturado (Heidtmann *et al.*, 2012; Koretsky, 2007; Souza *et al.*, 2015). Resultados semelhantes foram observados, em temperaturas entre 30 e 60 °C, com FTase de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada em sílica gel por Faria *et al.* (2021) (-0,17 kJ mol⁻¹ K⁻¹, 50 °C), imobilizada em PHB funcionalizado por Araújo *et al.* (2022) (-0,17 kJ mol⁻¹ K⁻¹, 50 °C) e células de *A. oryzae* IPT-301 reticuladas usadas por Gonçalves *et al.* (2020) (0,14 kJ mol⁻¹ K⁻¹, 50 °C).

4.3.2 Avaliação da desativação com uso de suportes em PLA

Na Figura 11 são mostrados os resultados dos ensaios de desativação térmica da A_t , realizados em duplicata com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes de PLA e gerados pela aplicação do método detalhado no Tópico 3.2.5. Nesse gráfico também se encontram as curvas que representam os ajustes aos modelos cinéticos de desativação implementados com os dados experimentais. Assim

como nos ensaios realizados com biocatalisadores imobilizados em EPU, discutidos no t3pico anterior, tais ajustes foram feitos para os modelos de primeira ordem, de ordem d e de Sadana e Henley.

Figura 11 - Perfil de atividade de transfrutossila33o em fun33o do tempo para a avalia33o de modelos de desativa33o com c33lulas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em PLA



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: (---) primeira ordem, (—) ordem d e (—) Sadana e Henley.

Nota: experimentos realizados com 473 g L^{-1} de sacarose, pH de 5,5, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e vaz33o de 1 ml min^{-1} .

No perfil apresentado na Figura 11, observam-se desvios padr33es consideravelmente elevados at33 o per33odo de 3 h de opera33o. Al33m disso, percebe-se a ocorr33ncia de oscila33o33es nos valores m33dios de A_t durante todo o per33odo representado nesse gr33fico. Tais observa33o33es podem ser complementadas pela avalia33o desses dados com o teste de Tukey (95 % de confian33a), que determinou que todos os pontos s33o estatisticamente iguais.

Essa elevada dispers33o dos dados pode ter sido causada pela ocorr33ncia de caminhos preferenciais e pelo baixo volume de c33lulas biocatal33ticas presentes nas superf33cies externas dos suportes. Os caminhos preferenciais no leito foram causados

principalmente pelos suportes cúbicos rígidos de PLA não terem preenchido satisfatoriamente o perfil cilíndrico dos leitos catalíticos. A quantidade reduzida de biomassa também contribuiu para a formação dessas regiões com menor resistência ao escoamento, além de ter reduzido a superfície biocatalítica acessível à solução reagente (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

Os resultados dos ajustes dos modelos de desativação aos dados dos ensaios com PLA, obtidos pela aplicação das Equações 7, 8 e 9, estão exibidos na Tabela 6. Os valores de $t_{1/2}$ não foram calculados para esses ensaios, pois, devido à dispersão do perfil de desativação, não foi identificado um nível decaimento da A_t suficiente para essa determinação (Araújo *et al.*, 2022; Fogler, 2012; Sadana; Henley, 1987; Silva *et al.*, 2021).

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos de desativação para ensaios realizados em PBR com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em PLA

Parâmetros	Primeira ordem	Ordem d	Sadana e Henley
k_D (h^{-1})	$2,80 \cdot 10^{-3}$	$4,73 \cdot 10^{-3}$	$2,59 \cdot 10^{-3}$
d	-	5,77	-
α	-	-	0,78
R^2	0,17	0,11	0,12

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

De acordo com os resultados descritos na Tabela 6, as equações de desativação utilizadas não se ajustam satisfatoriamente aos dados experimentais com PLA. Isso pode ser definido pelos baixos valores dos coeficientes R^2 calculados para os três modelos avaliados.

Comparando-se o valor máximo de A_t obtido com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes de PLA (4 h), igual a $519,92 \pm 48,09 \text{ U g}^{-1}$, com os resultados dos ensaios com EPU nas mesmas condições, são observadas atividades expressivamente maiores com o uso de EPU como suporte, até o tempo de 48 h. Nesse ponto, os ensaios células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU apresentaram A_t igual a $685,92 \pm 12,29 \text{ U g}^{-1}$. Em ensaios em PBR (470 g L⁻¹ de sacarose, 50 °C, pH de 5,5 e vazão de 11,5 ml min⁻¹), Dias *et al.* (2022) obtiveram valores de A_t de cerca de 751 U g⁻¹ aproximadamente constantes, no período de 3 a

12 h de operação. Isso implica que, nessas condições citadas, as células de *A. oryzae* IPT-301 apresentam, em média, elevados valores de A_t e, conseqüentemente, um elevado potencial de proporcionarem altas produtividades de FOS com boa estabilidade operacional, quando aplicadas em reatores de leito fixo.

Considera-se que melhores desempenhos catalíticos com o uso de PLA, provavelmente, poderão ocorrer com a otimização das condições de imobilização de células de *A. oryzae* IPT-301 nesse material, incluindo a avaliação da porosidade adequada desses suportes. Além disso, com a manufatura aditiva, os materiais suportes em PLA podem ser projetados com uma geometria mais adequada ao perfil dos leitos dos reatores utilizados. Esses aprimoramentos poderão reduzir a formação de caminhos preferenciais e melhorar os processos de transferência de massa e calor no meio reacional (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000). Destaca-se ainda, nessa aplicação visando a produção de FOS, a relevante inovação tecnológica caracterizada pelo uso de suportes de PLA obtidos por impressão 3D.

4.4 AVALIAÇÃO DA QUEDA DE PRESSÃO

A partir dos métodos apresentados nos Tópicos 2.9 e 3.3.3, estimaram-se valores característicos dos leitos catalíticos utilizados e das partículas que os compuseram. Assim, foram determinadas as porosidades em cada região dos leitos dos PBRs e os dados referentes a essas grandezas estão presentes na Tabela 7.

Tabela 7 – Características físicas das partículas constituintes dos leitos catalíticos de PBRs com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU e PLA

Parâmetros	Materiais			
	EV _b	EV _t	EPU	PLA
d_p (cm)	0,46 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,98 ± 0,06	0,82 ± 0,01
$V_{sólidos}$ (cm ³)	8,1 ± 0,5	7,8 ± 0,5	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
L (cm)	4,60 ± 0,05	10,00 ± 0,05	3,00 ± 0,05	3,00 ± 0,05
V_{leito} (cm ³)	11,64	11,31	3,39	3,39
$(1 - \varepsilon)$	0,70	0,69	0,15	0,44

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: (EV_b) esferas de vidro na base do leito e (EV_t) esferas de vidro no topo do leito.

Ao se observar os dados da Tabela 7, percebe-se que os volumes ocupados por três peças de biocatalisadores imobilizados em EPU e PLA são pouco significativos, se comparados com os $V_{sólidos}$ estimados para as esferas de vidro. Assim, como os valores de $V_{sólidos}$ são inversamente proporcionais à porosidade do leito (ε), as regiões ocupadas pelas esferas de vidro apresentam menores volumes disponíveis para a percolação do substrato (Fogler, 2012; Rocha; Pereira, 2019).

Com uso dos métodos descritos nos Tópicos 3.3.1 e 3.3.2, foram determinadas as densidades e as viscosidades dinâmicas referentes às diferentes concentrações de soluções reagentes utilizadas nos ensaios de cinética enzimática, a 50 °C. Esses dados e os resultados calculados de Re para cada solução e material dos leitos são apresentados na Tabela 8. Os parâmetros Re foram determinados com o uso da Equação 22 e os dados das Tabelas 7 e 8. Ressalta-se, que com exceção do resultado para a solução de 200 g L⁻¹ para o EPU, que representa um regime transiente de escoamento, todos os outros resultados de Re indicam a ocorrência de escoamento laminar (Fogler, 2012; Rocha; Pereira, 2019).

Tabela 8 – Propriedades físicas das partículas constituintes dos leitos catalíticos e regimes de escoamento em PBRs com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU e PLA

Parâmetros	Materiais	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)				
		200	300	400	473	600
ρ (g cm ⁻³)		1,07	1,10	1,14	1,17	1,21
μ (cP)		1,00	1,88	2,63	2,92	5,22
Re	EV _b	0,46	0,25	0,19	0,17	0,10
	EV _t	1,03	0,57	0,42	0,39	0,22
	EPU	12,99	7,13	5,27	4,87	2,83
	PLA	3,61	1,98	1,47	1,35	0,79

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Observou-se, na Tabela 8, um aumento coerente dos valores de ρ e de μ em função das concentrações de sacarose, para as medições dessas grandezas realizadas a mesma temperatura de 50 °C. De acordo com os tipos de escoamentos relativos aos dados de Re calculados, determinaram-se as quedas de pressão

produzidas em cada segmento dos leitos catalíticos, para cada concentração de sacarose, utilizando-se as Equações 25, 26 e 27. Esses resultados se encontram na Tabela 9, descritos para cada tipo de material e somados para os leitos alimentados com cada solução reagente. Entretanto, as variações da composição dos fluidos que percorrem os leitos catalíticos, devido às reações catalíticas, não foram consideradas nos cálculos.

Tabela 9 – Queda de pressão nos leitos catalíticos referentes aos ensaios realizados em PBRs com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU e PLA

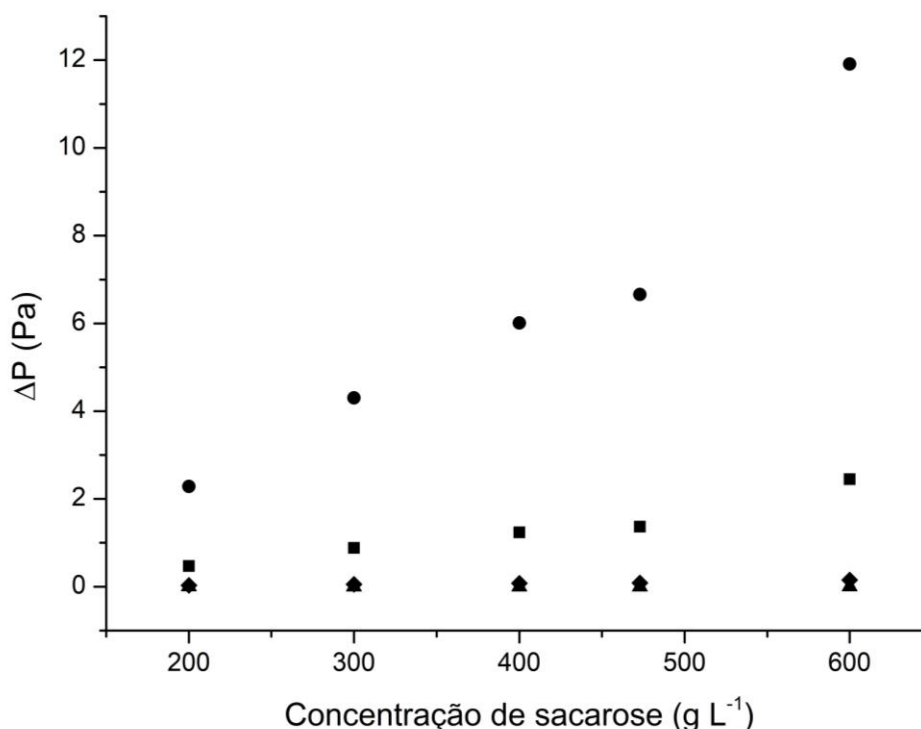
Parâmetro	Materiais	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)				
		200	300	400	473	600
ΔP (Pa)	EV _b	0,47	0,88	1,24	1,37	2,45
	EV _t	2,28	4,30	6,01	6,66	11,91
	EPU	1,25.10 ^{-3*}	3,54.10 ⁻⁴	4,94.10 ⁻⁴	5,47.10 ⁻⁴	9,79.10 ⁻⁴
	PLA	2,88.10 ⁻²	5,43.10 ⁻²	7,60.10 ⁻²	8,41.10 ⁻²	0,15
	Total (EPU)	2,75	5,18	7,25	8,03	14,36
	Total (PLA)	2,78	5,24	7,32	8,11	14,51

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Nota: * ponto calculado com a Equação 27. Os demais foram calculados com as Equações 25 e 26.

Nos resultados expressos na Tabela 9, é possível verificar valores de ΔP mais significativos para os segmentos com esferas de vidro, por serem sólidos não porosos e por apresentarem elevados $V_{sólidos}$ nos leitos catalíticos. Essas diferenças entre os resultados de ΔP em função das concentrações podem ser confirmadas pelos perfis demonstrados na Figura 12. Entre as partículas de biocatalisadores, pode-se observar maiores reduções de pressão com o uso do PLA como suporte. Isso pode ser explicado, de acordo com a Tabela 7, pelos menores resultados de ε e maiores $V_{sólidos}$ médios determinados para estes biocatalisadores, comparados com os dados obtidos para os biocatalisadores com suportes de EPU.

Figura 12 – Perfis de ΔP em função da concentração de sacarose para as diferentes partículas dos leitos catalíticos



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: (■) EV_b, (●) EV_t, (▲) EPU e (◆) PLA.

Nota: experimentos realizados considerando pH de 5,5, 50°C e vazão de 1 ml min⁻¹.

Com o aumento da queda de pressão há a redução da energia cinética das moléculas reagentes e, conseqüentemente, a diminuição de choques eficientes entre essas moléculas e os sítios ativos enzimáticos, o que reduz as velocidades de reação (Koretsky, 2007). Isso indica a relevância de se selecionar materiais inertes para o preenchimento de leitos fixos que possam não interferir significativamente nos processos de perda de carga. Porém, não se considerou que os efeitos de perda de carga nos leitos estudados neste trabalho foram significativos, de acordo com a magnitude dos valores totais de ΔP encontrados (Figura 12).

Delbianco *et al.* (2016) realizaram estudos de modelagem com reatores de leito fixo para conversão de gás de síntese em combustíveis líquidos, empacotados com catalisadores com d_p e ε respectivamente iguais a 0,25 cm e 0,49. Nesse processo de síntese de Fischer-Tropsch, considerou-se que quedas de pressão de cerca de 3 % (aproximadamente 50 kPa) da pressão na corrente de alimentação não são significativas. Isso demonstra a importância de se avaliar o nível de influência da perda

de carga em outros parâmetros de desempenho dos sistemas reacionais.

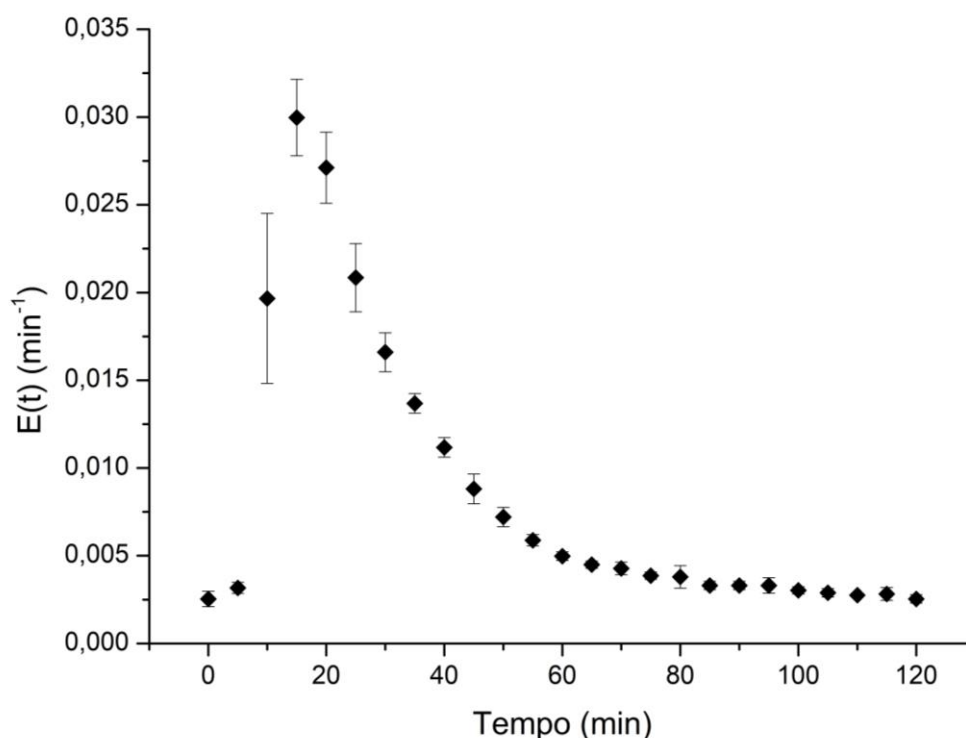
Em um módulo experimental de PBR recheado com esferas de vidro, Rocha e Pereira (2019) observaram que a porosidade dinâmica do leito variou com o escoamento, com uma média de 0,56, enquanto a porosidade estática foi mensurada como 0,4. Isso implica que os cálculos de ΔP podem fornecer estimativas inconsistentes, caso não se utilize a determinação adequada da porosidade do leito. Tal hipótese foi validada nas condições dos experimentos realizados por Rocha e Pereira (2019), pela comparação entre dados experimentais e cálculos com a equação de Ergun, que resultaram em ΔP s superestimados para a porosidade estática.

4.5 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE TEMPOS DE RESIDÊNCIA

Conforme o método descrito no Tópico 3.2.6, realizaram-se os ensaios para determinação da DTR dos reatores de leito fixo utilizados nos ensaios descritos nos tópicos anteriores, com o uso de biocatalisadores produzidos com EPU. Os resultados em triplicata obtidos com esse método de injeção em pulso se encontram representados na Figura 13. Esse gráfico se refere ao perfil da função de distribuição de tempo de residência ($E(t)$), que pode ser interpretada como a disposição das idades das partículas de fluido na saída do reator, calculada pela Equação 28 (Fogler, 2012).

Nas distribuições dos dados de $E(t)$, observa-se a formação de uma cauda longa com o decaimento desses valores após o pico formado. Essas características são típicas do uso da técnica de injeção tipo pulso, como Fogler (2012) e Levenspiel (2000) descrevem, e podem induzir a erros na avaliação nos momentos da DTR. Porém, devido ao desvio da idealidade esperado para reatores reais, a assimetria e valores iniciais e finais maiores que 0 na distribuição da função $E(t)$ podem ser considerados típicos desses ensaios. Tais comportamentos das partículas de fluido nos leitos podem ocorrer mesmo com injeções rápidas e adequadas do traçador. Algumas das causas desses desvios podem ser a ocorrência interações e adsorção do fluido em partículas sólidas e nas paredes do reator. Além disso, pontos de estagnação e caminhos preferenciais também afetam significativamente no escoamento do substrato.

Figura 13 – Perfil de $E(t)$ para leito catalítico empacotado com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Nota: experimentos realizados com 473 g L^{-1} de sacarose, 10 mg L^{-1} de AM, pH de 5,5, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e vazão de 1 ml min^{-1} .

Com o uso das Equações 30, 31 e 32, calcularam-se os momentos necessários para a caracterização satisfatória da DTR (t_m , σ^2 e S^3). Esses resultados foram obtidos por integração numérica (regra de Simpson de um terço) aplicada aos dados experimentais e estão dispostos na Tabela 10. O tempo de execução de cada réplica dos ensaios de DTR foi de 120 min, o qual corresponde ao período necessário para a estabilização das medidas de $C(t)$ em valores aproximadamente iguais aos registrados antes dos pulsos com AM (Dias, 2020; Fogler, 2012; Levenspiel, 2000). Pelos valores calculados, notou-se que a maior parte das partículas de fluido deixa o sistema em um tempo menor que o t_m (38,34 min), de acordo com a posição do pico na Figura 13. No entanto, pode-se considerar que o valor de t_m obtido foi coerente com o tempo de início do regime estacionário determinado no Tópico 4.1.

Tabela 10 – Momentos calculados para a avaliação da DTR para ensaios realizados em PBRs com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU

Momentos	Resultados
t_m (min)	38,34
σ^2 (min ²)	792,85
S^3 (min ⁻³)	177,49

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

O resultado obtido para a variância em torno da média (σ^2), ou quadrado do desvio padrão, indica que a distribuição dos valores experimentais apresenta um nível de espalhamento elevado, devido à magnitude de σ^2 . O valor do terceiro momento calculado em torno da média, S^3 , demonstra que os dados obtidos nos ensaios resultaram em uma distribuição com alta assimetria. Dessa maneira, os resultados determinados para esses três momentos caracterizam que a DTR do sistema reacional contínuo analisado se desvia significativamente do modelo ideal de PBR, mas podem ser considerados aceitáveis para os tipos de leitos fixos avaliados (Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

As possíveis causas desse comportamento podem ser atribuídas, além das interações com as superfícies internas dos reatores, às características físicas e operacionais dos biocatalisadores empacotados nos leitos catalíticos, tais como: poros do suporte de EPU obstruídos pela presença de grandes quantidades de células fúngicas; compactação crescente das partículas, devido à deformabilidade do suporte; e irregularidade na distribuição do biocatalisador no leito catalítico. Além disso, o grande volume de esferas de vidro na entrada e na parte superior dos reatores, como demonstrado pelos valores de ΔP , podem ter afetado significativamente o escoamento das partículas de fluido nesses sistemas (Dias, 2020; Fogler, 2012; Levenspiel, 2000).

5 CONCLUSÕES

Nas avaliações em PBR das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU foram observados elevados valores de A_t , com valor máximo igual a $1504,27 \pm 116,71$ U g⁻¹ (473 g L⁻¹ de sacarose, a 50 °C). Esses sistemas reacionais entraram em regime estacionário a partir de 30 min, aproximadamente, e apresentaram cinética enzimática satisfatoriamente descrita pelo modelo de Hill.

Nos estudos da inibição da A_t dos biocatalisadores imobilizados em EPU, notou-se que a presença de glicose pode reduzir significativamente a A_t . Esse efeito foi observado devido à redução da A_t média em cerca de 63 %, com a concentração de 11,8 g L⁻¹ de glicose, e aos dados de A_t não detectados para concentrações maiores desse inibidor.

Observaram-se, na avaliação da desativação enzimática, resultados elevados de A_t , até 12 h de operação, com temperaturas dos leitos de 40 e 50 °C e uma taxa de decaimento acentuada de A_t para 60 °C. Durante as 96 h de duração dos ensaios a 30 °C, não houve desativação enzimática significativa, porém, os valores de A_t a 30 °C foram significativamente menores que os das demais temperaturas, até os pontos medidos em 12 h. A partir desse período, as atividades se mantiveram semelhantes para as temperaturas de 30, 40 e 50°C, ressaltando-se que a atividade média com 40 °C, em 96 h de operação, foi a maior observada.

As avaliações de quedas de pressão demonstraram, devido às baixas porosidades nas regiões dos leitos ocupadas por esferas de vidro, que esses materiais foram responsáveis pelos maiores valores de ΔP nos ensaios. No caso dos biocatalisadores, as partículas produzidas com PLA apresentaram ΔP s cerca de 153 vezes maiores que as com EPU, porém ambos os materiais não contribuíram significativamente para os valores de ΔP totais calculados. Entretanto, considerou-se que, devido à magnitude desses valores totais, a perda de carga não foi suficiente para interferir no desempenho desses sistemas, nas condições experimentais adotadas.

Na determinação da DTR, observou-se que a maior parte do fluido deixa o sistema em um tempo menor que o t_m (38,34 min). Esse desvio da idealidade na distribuição das idades das partículas do substrato foi confirmado pela determinação dos momentos σ^2 (792,85 min²) e S^3 (177,49 min⁻³) da DTR. A magnitude desses

momentos, proporcionais ao nível de espalhamento e assimetria dos dados, respectivamente, é coerente para modelos reais de escoamento de fluidos em PBR.

As avaliações dos resultados obtidos demonstram que o uso de PBR com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas são uma opção promissora para a obtenção de FOS em modo contínuo por até 96 h de reação.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Conforme as conclusões obtidas no presente trabalho, propõem-se as seguintes sugestões para comporem pesquisas vindouras:

- a) Avaliar os processos de transferência de massa interna e externa em PBR;
- b) Aprofundar os estudos sobre inibição da A_t causada pelo substrato e pela presença de glicose;
- c) Avaliar a aplicação de suportes com diferentes geometrias e composições;
- d) Efetuar mais estudos de desempenho de biocatalisadores com substrato a temperatura igual a 40 °C;
- e) Comparar o desempenho de biocatalisadores em diferentes tipos e configurações de reatores;
- f) Estudar e implementar a modelagem matemática e a simulação, para aplicações em planejamentos experimentais e em análises da produção de FOS em larga escala.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 363-372, 2011.
- ALVARADO-OBANDO, M. *et al.* Engineering a heterologously expressed fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* N74 in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) for kestose production. **New Biotechnology**, v. 69, p.18-27, 2022.
- ALVARADO-HUALLANCO, M. B.; MAUGERI-FILHO, F. Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 12, p. 1654–1662, 2010.
- AMANFUL, B. *et al.* Stochastic techno-economic analysis for the co-production of alternative sweeteners in sugarcane biorefineries. **Food and Bioproducts Processing**, v. 143, p. 9-20, 2024.
- ARAÚJO, I. M. *et al.* Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 419-430, 2022.
- BARBOSA, N. R. **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.
- BATISTA, R.D. *et al.* Cost-Effective optimization of the transfructosylation activity of an invertase produced from *Aspergillus carbonarius* PC-4 using pineapple crown and determination of its biochemical properties. **Processes**, v. 12, n. 10, p. 1-15, 2024.
- BELMONTE-IZQUIERDO, Y. *et al.* Fructooligosaccharides (FOS) production by microorganisms with fructosyltransferase activity. **Fermentation**, v. 9, n. 11, p. 1-30, 2023.
- BORGES, I. G. *et al.* Avaliação da porosidade de grãos de arroz com diferentes umidades. *In*: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 17., 2023, Pelotas. **Anais [...]**, Pelotas: UFPEL, 2023. p. 1-4.
- BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. 1. ed. São Paulo: Blucher, v. 4, 2001.
- CASTRO, C. C. *et al.* Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 82-90, 2017.
- CHAVES, K. S.; FRANCO, L. L.; OLIVEIRA, K. A. M. Alimentos funcionais e

- nutracêuticos: conhecimento da terminologia e propriedades à saúde pelos consumidores de Barra do Garças–MT. **Revista Panorâmica online**, v. 1, 2019. Disponível em: <https://periodicoscientificos.ufmt.br/revistapanoramica/index.php/revistapanoramica/article/view/837>. Acesso em: 03 abr. 2024.
- CHEN, W. C.; LIU, C. H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 2, p. 153-160, 1996.
- CHIANG, C. *et al.* Immobilization of beta-fructofuranosidases from *Aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 5, p. 577-582, 1997.
- CHOUKADE, R.; KANGO, N. Characterization of a mycelial fructosyltransferase from *Aspergillus tamaris* NKRC 1229 for efficient synthesis of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 286, p. 434–440, 2019.
- CORREA, A. C. *et al.* Fructan-type prebiotic dietary fibers: clinical studies reporting health impacts and recent advances in their technological application in bakery, dairy, meat products and beverages. **Carbohydrate Polymers**, v. 323, p. 1-15, 2024.
- CUNHA, J. S. *et al.* Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 657-668, 2019.
- DELBIANCO, J. V. T. *et al.* Análise e otimização das condições operacionais de um reator de leito fixo na síntese de Fischer-Tropsch. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 281-293, 2016.
- DIAS, G. S. **Implementação de reator de leito fixo empacotado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para a produção de fructooligosacarídeos**. 2020. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2020.
- DIAS, G. S. *et al.* Study on the transfructosylation activity of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells in a packed bed reactor aiming at fructooligosaccharide production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 97, p. 2904-2911, 2022.
- DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 3. ed. New York: Academic Press, 1979.
- DORTA, C. *et al.* Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 1003–1009, 2006.
- FARIA, L. L. *et al.* Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, v. 43, n. 1, p. 43-59, 2021.
- FERNANDES, P. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on

Strategies for Better Biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, n. 1, p. 1-19, 2010.

FERNÁNDEZ, R. C. *et al.* Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp. 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, n. 12, p. 268-272, 2004.

FERNÁNDEZ, R. C. *et al.* Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n.1, p. 87-93, 2007.

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

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

GABRIELCZYK, J. *et al.* A comparative study on immobilization of fructosyltransferase in biodegradable polymers by electrospinning. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 847–862, 2018.

GANAIE, M. A.; LATEEF, A.; GUPTA, U. S. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2143- 2159, 2014.

GARCIA, R. L. *et al.* Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 2, p. 273-285, 2021.

GOMES, R. Produção biotecnológica de fruto-oligossacarídeos: review. **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**, v. 10, n. 25, p. 1-17, 2019.

GONÇALVES, M. C. P. *et al.* Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 9, p. 2473-2482, 2020.

HAN, S. *et al.* Purification and biochemical characteristics of a novel fructosyltransferase with a high FOS transfructosylation activity from *Aspergillus oryzae* S719. **Protein Expression and Purification**, v. 167, p. 1-9, 2020.

HEIDTMANN, R. B. *et al.* Kinetics and thermodynamic characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fractionated with ammonium sulphate. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v. 15, n. 1, p. 41-49, 2012.

IBRAHEM, A. A.; AL-SHAWI, S. G.; AL-TEMIMI, W. K. A. The antagonistic activity of the synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* and pineapple residue FOS against pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1-7, 2024.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Animal and vegetable333 fats and oils - determination of conventional mass per volume (litre weight in air)**. (ISO Standard No. 6883:2017), 2017.

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

KHANDEKAR, D. C. *et al.* Kinetics of sucrose conversion to fructo-oligosaccharides using enzyme (invertase) under free condition. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 12, p. 2529-2537, 2014.

KORETSKY, M. D. **Termodinâmica para engenharia química**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

KRASŇAN, V. *et al.* Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2535-2553, 2016.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. 3. ed. São Paulo: Blucher, 2000.

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

LONDE, T. M.; LIMA, E. A. P.; FINZER, J. R. D. Drying of pesticide of the type dispersible granule in pilot scale fluidized bed. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 33352–33375, 2021.

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

MADLOVÁ, A. *et al.* Thermal stability of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, v. 54, n. 6, p. 339-344, 2000.

MAIORANO, A. E. *et al.* Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 11, p. 1867–1877, 2008.

MAIORANO, A. E. *et al.* Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 12, p. 2619-2629, 2020.

MANO, M.C.R. *et al.* Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 17–37, 2018.

MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E. *et al.* Fructosyltransferases in plants: structure, function

and application: a review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 6, p. 1-10, 2023.

MENON, A. *et al.* Purification, characterisation, and determination of prebiotic potential of fructooligosaccharide from perennial rye grass. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, n. 4, p. 1-5, 2024

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333–369, 1913.

MORALES, S. A. V. *et al.* Imobilização de frutossiltransferase em sílica gel e bucha vegetal para a síntese de fruto-oligosacarídeos. In: SILVA, C. D. D. (org.). **Ciências Biológicas: Realidades e Virtualidades**. Ponta Grossa: Atena, 2020. p. 56-67.

MORDOR INTELLIGENCE. **Fructooligosaccharide market size & share analysis - growth trends & forecasts (2024 - 2029)**. [2025]. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/fructo-oligosaccharides-fos-market>. Acesso em: 03 mar. 2025.

MUSSATTO, S. I. *et al.* Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Research**, 344, n. 6, p. 795-800, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M; HOSKINS, A.A. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2022.

NOIDEE, C.; SONGBANG, S.; NINCHAN, B. Comparative efficiency of oligofructans production by *Bacillus subtilis* TISTR 001 from different carbon sources: sucrose, sugarcane juice, and molasses. **Sugar Tech**, v. 25, n.4, p. 950–958, 2023.

OJWACH, J. *et al.* Oligosaccharides production from coprophilous fungi: an emerging functional food with potential health-promoting properties. **Biotechnology Reports**, v. 33, p. 1-17, 2022.

OLIVEIRA, R. L. *et al.* Biochemical characterization and kinetic/thermodynamic study of *Aspergillus tamaris* URM4634 β -fructofuranosidase with transfructosylating activity. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 6, p. 1-12, 2019.

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

PARK, J.P.; OH, T.K.; YUN, J.W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 471–476, 2001.

PEREIRA, R. S. *et al.* Application of an agro-waste for the immobilization of microbial fructosyltransferase: a new alternative for fructooligosaccharide production. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 36, n. 3, p. 1-13, 2024.

PERNA, R. F. *et al.* Microbial fructosyltransferase: production by submerged fermentation and evaluation of pH and temperature effects on transfructosylation and hydrolytic enzymatic activities. **International Journal of Engineering Research and Science**, v. 4, n.3, p. 43–50, 2018a.

PERNA, R. F. *et al.* Produção e caracterização bioquímica de frutossiltransferase extracelular microbiana para a síntese de frutooligossacarídeos em escala laboratorial. *In*: SANTOS, A. S. (org.). **Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos**. Ponta Grossa: Atena, 2018b. p. 7-22.

PRATA, M. G. **Implementação de reator de leito fixo recheado com biomassa microbiana encapsulada em alginato para a produção de frutooligossacarídeos**. 2020. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas. 2020.

PRAVILOVIĆ, R. *et al.* Micro-kinetic model of fructo-oligosaccharide synthesis for prebiotic products. **AIChE Journal**, v. 69, n. 9, p.1-10, 2023.

RIBEIRO, B. M. **Imobilização de células íntegras de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando estudos biocatalíticos em reator de leito fixo para a produção de frutooligossacarídeos**. 2022. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas. 2022.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.

ROCHA, E. C. L.; PEREIRA, P. R. A. Análise da perda de carga e da porosidade em leito fixo. *In*: Brazilian Technology Symposium, 5., 2019, Campinas. **Anais [...]**. Campinas, 2019. Disponível em: <https://lcv.fee.unicamp.br/images/BTSym-19/Papers/204.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2025.

RODWELL, V. W. *et al.* **Bioquímica ilustrada de Harper**. 30. ed. Nova Iorque: AMGH, 2017.

ROSA, O. *et al.* Bioprocess development for fructooligosaccharides and carotenoids production using agave mead. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 54, p. 1-10, 2023.

SAEED, A.; IQBAL, M. Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge: review of development of the biomatrix as a tool for biotechnological applications. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 3, p. 573-60, 2013.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 6, p. 717-723, 1987.

SÁNCHEZ, O. F. *et al.* Sucrose biotransformation to fructooligosaccharides by *Aspergillus* sp. N74 free cells. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, n. 5, p. 662-673, 2010.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M. *et al.* Manufacturing of short-chain fructooligosaccharides: from laboratory to industrial scale. **Food Engineering Reviews**, v. 12, n. 2, p. 149-172, 2020.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Food Science and Technology**, v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005.

SILVA, M. B. P. O. *et al.* Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, n. 3, p. 1-11, 2021.

SOUZA, L. T. A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: SOCCOL, R. C.; FRANÇA, L. R.; RESENDE, R. R. (org.). **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2017. v. 4, cap. 15, p. 529 -568.

SOUZA, P. M. *et al.* Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, n. 3, p. 17-21, 2015.

VANDÁKOVÁ, M. *et al.* Optimization of cultivation conditions for production of fructosyltransferase by *Aureobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, v. 58, n. 1, p. 15–22, 2004.

VELJKOVIĆ, M. *et al.* Continuous production of fructo-oligosaccharides using selectively immobilized fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* onto Purolite® A109. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 117, n. 2, p. 149-156, 2023.

WANG, X. D.; RAKSHIT, S. K. Improved extracellular transferase enzyme production by *Aspergillus foetidus* for synthesis of isooligosaccharides. **Bioprocess Engineering**, v. 20, n.5, p. 429-434, 1999.

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

XU, W. *et al.* A review of fructosyl-transferases from catalytic characteristics and structural features to reaction mechanisms and product specificity. **Food Chemistry**, v. 440, p. 1-14, 2024.

YANG, Z. *et al.* Fermentation characteristics and prebiotic potential of enzymatically synthesized butyryl-fructooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 324, p. 1-8, 2024.

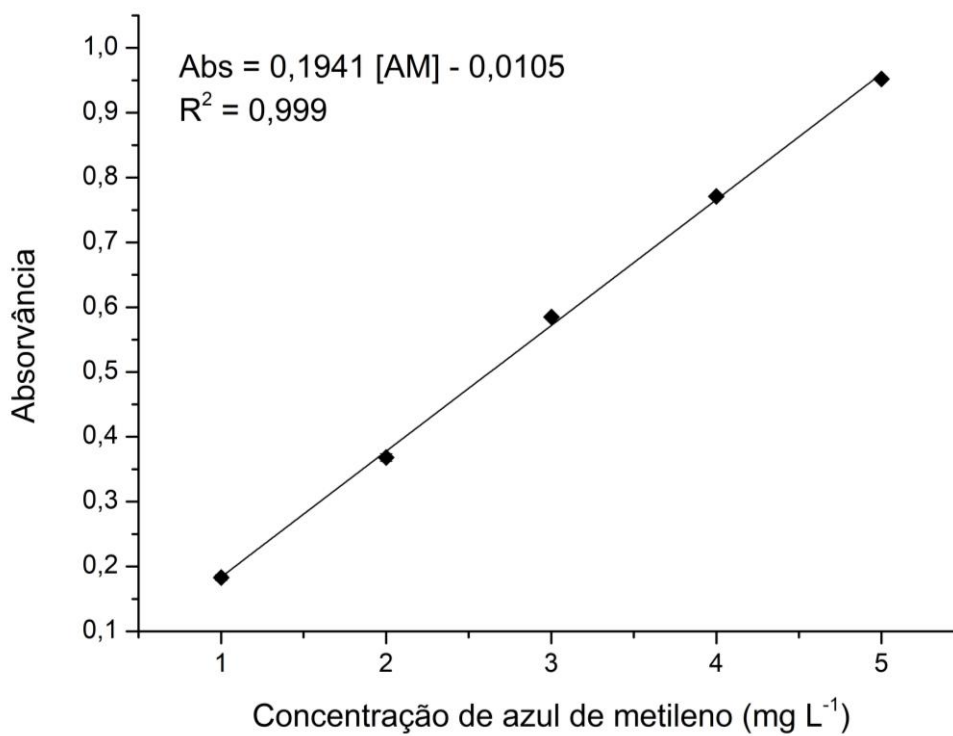
YUN, J. W. Fructooligosaccharides: occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 2, p. 107-117, 1996.

ZAMBELLI, P. *et al.* An efficient continuous flow process for the synthesis of a non-

conventional mixture of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, p. 607-613, 2016.

APÊNDICE A – Curva analítica

Figura 14 – Curva analítica para determinação de azul de metileno em solução com 473 g L⁻¹ de sacarose



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: (Abs) absorvância e (AM) azul de metileno.