

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CRISLAINE KLAI DO AMARAL

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE BIOQUÍMICA DE CÉLULAS DE *Aspergillus
oryzae* IPT-301 IMOBILIZADAS EM SUPORTES ORGÂNICOS PARA A SÍNTESE
ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

POÇOS DE CALDAS / MG

2025

CRISLAINE KLAID DO AMARAL

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE BIOQUÍMICA DE CÉLULAS DE *Aspergillus
oryzae* IPT-301 IMOBILIZADAS EM SUPORTES ORGÂNICOS PARA A SÍNTESE
ENZIMÁTICA DE FRUTO- OLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Engenharia Química
pelo Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade
Federal de Alfenas. Área de Concentração: Engenharia
Química

Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

Coorientador: Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales

POÇOS DE CALDAS/ MG

2025

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

Amaral, Crislaine Klaid.

Avaliação da estabilidade bioquímica de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes orgânicos para a síntese enzimática de fruto- oligossacarídeos / Crislaine Klaid Amaral. - Poços de Caldas, MG, 2025.

88 f. : il. -

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.

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

Bibliografia.

1. Estabilidade. 2. Esponja vegetal. 3. Poliuretano. 4. Frutosiltransferase. 5. Polióis. I. Perna, Rafael Firmani, orient. II. Título.

CRISLAINE KLAID DO AMARAL

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE BIOQUÍMICA DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 IMOBILIZADAS EM SUPORTES ORGÂNICOS PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

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

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2025.

Prof. Dr. Rafael Firmani Perna
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Sara Isabel da Cruz Silvério
Instituição: Universidade do Minho

Dra. Ana Carolina Vieira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2025, às 12:00, 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 **1456344** e o código CRC **9696C698**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da minha vida, pela força e motivação de cada dia. Os planos d'Ele são maiores que os meus e sempre vou estar onde quer que Ele queira.

Agradeço ao meu noivo, Luis Henrique, por estar sempre do meu lado e por sempre me incentivar a conquistar os meus sonhos, por não desistir de nós, nos meus piores e melhores momentos. Agradeço aos meus pais, Maria Izabel e Benedito Roberto, e ao meu irmão Isaías, por sempre me apoiarem e se orgulharem de mim, independente da escolha que eu faça. Vocês são meus alicerces e hoje estou aqui, graças a vocês, essa conquista é nossa.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, que me recebeu desde o início e me proporcionou grandes oportunidades durante o mestrado. Orientar não é apenas no âmbito profissional, mas apresentar caminhos melhores para seus alunos. Agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Sérgio Andres Villalba Morales, por todos ensinamentos, compreensão, empatia e lado humano comigo. Que Deus sempre abençoe vocês.

Agradeço ao pessoal do laboratório, em especial a Krycia, Samuel, Maria Laura e Sara, que estiveram comigo quase todo o tempo dessa jornada. Com certeza sem vocês, este trabalho não teria o resultado que teve. Agradeço também a Dani, que sempre esteve ali nos momentos mais difíceis. Um agradecimento especial a todo grupo GPTEB.

Agradeço a banca, Dra. Ana Carolina Vieira, que me assistia nos experimentos e sabia de todos os obstáculos da rotina laboratorial, e Dra. Sara Isabel da Cruz Silvério, pelos insights e sugestões pertinentes à dissertação.

Agradeço a Capes pela concessão da bolsa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são classificados como açúcares prebióticos que apresentam diversos benefícios à saúde humana e animal. Podem ser obtidos industrialmente, por rota enzimática via reação de transfrutossilacção em moléculas de sacarose catalisadas por enzimas frutossiltransferases aderidas às células microbianas. A imobilização de células em materiais de suporte possibilita obter biocatalisadores heterogêneos robustos e resistentes às condições adversas do meio reacional. Esponjas vegetais e esponja de poliuretano são suportes orgânicos com potencial evidenciado para a imobilização por apresentarem alta resistência mecânica e porosidade, essenciais para o crescimento microbiano. Além disso, são suportes biodegradáveis e de baixo custo. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação bioquímica de células de *Aspergillus. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes orgânicos. Para isso, a produção das células microbianas, ocorreu em meio de cultura sintético, pH 5,5, 200 rpm à 30 °C, por 28h quando imobilizadas em esponja vegetal ou 32h, imobilizadas em esponja de poliuretano. Foram testados diferentes tipos de agentes para o armazenamento sob refrigeração (4 °C), em pH 5,5, sendo os melhores resultados para glicerina bidestilada e sorbitol 70% v v⁻¹, com atividade de transfrutossilacção de 1307,45 U g⁻¹ e 1079,41 U g⁻¹, respectivamente, ao final de 90 dias, para as células de *A. oryzae* IPT- 301 imobilizadas em esponja vegetal. Já quando o suporte utilizado foi poliuretano, ao final do ensaio, esses biocatalisadores apresentaram atividade de 1211, 17 U g⁻¹ e 1271,86 U g⁻¹ para glicerina e sorbitol. Os ensaios de estabilidade térmica mostraram um decaimento na taxa de frutose transfrutossilada a partir de 1h de reação e aumento gradativo na concentração de glicose no meio reacional, no entanto quando utilizada a esponja vegetal os valores foram menores do que utilizando o poliuretano como suporte. O perfil de inibição enzimática mostrou em 32h de reação concentrações de FOS de 184,13 g L⁻¹, 145,65 g L⁻¹ e 203,64 g L⁻¹, assim como concentrações de sacarose de até 51,17 g L⁻¹, 186,51 g L⁻¹, 52,92 g L⁻¹, utilizando a biomassa *in natura*, imobilizada em esponja vegetal e poliuretano, respectivamente. Esse conjunto de dados evidencia o uso de agentes para manter a estabilidade durante o armazenamento da biomassa catalítica imobilizada, além de resultados atuais quanto a síntese de FOS em modo batelada e os subprodutos gerados durante a reação, utilizando células biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT- 301.

Palavras-chave: estabilidade; esponja vegetal; poliuretano; frutossiltransferase; polióis.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are classified as prebiotic sugars that offer various health benefits for humans and animals. They can be industrially produced via an enzymatic route through a transfructosylation reaction in sucrose molecules catalyzed by fructosyltransferase enzymes adhered to microbial cells. The immobilization of cells in support materials enables the production of robust heterogeneous biocatalysts that are resistant to adverse conditions in the reaction medium. Loofa sponges and polyurethane foam are organic supports with demonstrated potential for immobilization due to their high mechanical strength and porosity, essential for microbial growth. Furthermore, they are biodegradable and cost-effective supports. Thus, the aim of this work was to perform a biochemical evaluation of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells immobilized on organic supports. For this purpose, the microbial cell production took place in synthetic culture medium, pH 5.5, at 200 rpm and 30 °C, for 28 hours when immobilized on loofa sponge, or 32 hours when immobilized on a polyurethane matrix. Different types of agents were tested for refrigerated storage (4 °C) at pH 5.5, with the best results observed for bidistilled glycerin and 70% v v⁻¹ sorbitol, which exhibited transfructosylation activity of 1307.45 U g⁻¹ and 1079.41 U g⁻¹, respectively, after 90 days for *A. oryzae* IPT-301 cells immobilized in a loofa sponge. When polyurethane was used as the support, the biocatalysts displayed activities of 1211.17 U g⁻¹ and 1271.86 U g⁻¹ for glycerin and sorbitol, respectively, at the end of the assay. Thermal stability tests indicated a decline in the transfructosylated fructose rate after 1 hour of reaction, along with a gradual increase in glucose concentration in the reaction medium. However, this increase was lower when using a loofa sponge compared to polyurethane as the immobilization support. The enzyme inhibition profile after 32 hours of reaction showed FOS concentrations of 184.13 g L⁻¹, 145.65 g L⁻¹, and 203.64 g L⁻¹, as well as sucrose concentrations of up to 51.17 g L⁻¹, 186.51 g L⁻¹, and 52.92 g L⁻¹, using biomass in its natural form, immobilized in loofa sponge, and immobilized in polyurethane, respectively. This set of data highlights the effectiveness of storage agents in maintaining the stability of immobilized catalytic biomass, while also providing insights into the batch-mode synthesis of FOS and the by-products generated during the reaction using *Aspergillus oryzae* IPT-301 biocatalytic cells.

Keywords: stability; loofa sponge; polyurethane; fructosyltransferase; polyols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural dos fruto-oligosacarídeos (FOS) com os componentes kestose (GF2), nistose (GF3) e 1-β- frutofuranosilnistose (GF4).	18
Figura 2 - Níveis de estrutura nas proteínas. Estrutura primária, secundária, terciária e quaternária.	22
Figura 3 - Atividade de transfrutossilacção por FTase utilizando sacarose como substrato.	27
Figura 4 - Esponja vegetal em formato de cubos de 1,0 cm de aresta para a imobilização de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301.....	34
Figura 5 - Esponjas de poliuretano cortadas a cubos de 1,0 cm de aresta para a imobilização de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301	35
Figura 6 - Células biocatalíticas <i>in natura</i> de <i>A. oryzae</i> IPT-301 após cultivo.....	36
Figura 7 - Ensaio de armazenamento das células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 <i>in natura</i> e imobilizadas nas esponjas vegetal e de poliuretano.....	37
Figura 8 - Ensaio em reator modo batelada das células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 <i>in natura</i> e imobilizadas nas esponjas vegetal e de poliuretano.....	38
Figura 9 - Ensaio em reator modo batelada das células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 <i>in natura</i> e imobilizadas nas esponjas vegetal e de poliuretano.....	40
Figura 10 - Quantificação de açúcares redutores pelo método de DNS.....	42
Figura 11 - Quantificação da concentração de glicose por meio do kit enzimático GOD-PAP®.....	43
Figura 12 - Estabilidade de armazenamento de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e <i>in natura</i>	47
Figura 13 - Estabilidade de armazenamento em poliprolenoglicol de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e <i>in natura</i>	48

Figura 14 - Estabilidade de armazenamento em solução tampão tris acetato 0,2 mol L ⁻¹ de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e <i>in natura</i>	49
Figura 15 - Estabilidade de armazenamento de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e <i>in natura</i>	51
Figura 16 - Monitoramento do pH dos agentes estabilizantes utilizados durante o ensaio de armazenamento de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 <i>in natura</i> estocadas sob refrigeração (4 °C) e pH inicial 5,5, durante 90 dias.....	52
Figura 17 - Ensaio de estabilidade térmica com células biocatalíticas <i>in natura</i>	54
Figura 18 - Ensaio de estabilidade térmica com células biocatalíticas.....	57
Figura 19 - Perfil de inibição enzimática com células biocatalíticas <i>in natura</i>	61
Figura 20 - Perfil de inibição enzimática com células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal.....	64
Figura 21 - Perfil de inibição enzimática com células biocatalíticas imobilizadas em esponja de poliuretano.....	66
Figura 22 - Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação da concentração de açúcares redutores.....	84
Figura 23 - Perfil de inibição enzimática utilizando biomassa catalítica <i>in natura</i>	85
Figura 24 - Perfil de inibição enzimática utilizando biomassa catalítica imobilizada em esponja vegetal.....	86
Figura 25 - Perfil de inibição enzimática utilizando biomassa catalítica imobilizada em esponja de poliuretano.....	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS: DEFINIÇÃO, ESTRUTURA E SÍNTESE	17
3.1.1	Benefícios, aplicações e mercado	19
3.2	ENZIMAS: ESTRUTURA, SÍTIO ATIVO E ESTABILIDADE.....	21
3.2.1	Inibição enzimática	23
3.2.2	Frutosiltransferase e atividade de transfrutossilação	25
3.3	IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS BIOCATALÍTICAS	27
3.4	SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO.....	28
3.5	AGENTES ESTABILIZANTES.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	MATERIAIS	33
4.2	MÉTODOS.....	33
4.2.1	Desenvolvimento do biocatalisador heterogêneo	33
4.2.1.1	Microrganismo: preparo do inóculo e condições de cultivo	33
4.2.2.2	Pré-tratamento dos materiais de suporte	34
4.2.2.3	Produção e imobilização das células biocatalíticas	35
4.2.3	Avaliação das estabilidades do biocatalisador heterogêneo	36
4.2.3.1	Ensaio de estabilidade de armazenamento	36
4.2.3.2	Perfil de Inibição Enzimática	38
4.2.3.3	Ensaio de Estabilidade Térmica	39
4.3	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	40
4.3.1	Determinação da atividade enzimática	40
4.3.2	Quantificação de açúcares	40
4.3.2.1	Determinação da concentração de açúcares redutores	41
4.3.2.2	Determinação da concentração de glicose	42

4.3.3	Quantificação de sacarose e fruto-oligossacarídeos	43
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO	45
5.1.1	Glicerol e Sorbitol.....	45
5.1.2	Polipropilenoglicol.....	47
5.1.3	Solução Tampão Tris Acetato 0,2 mol L⁻¹.....	49
5.1.4	Armazenamento sem agentes	50
5.2	ESTABILIDADE TÉRMICA	54
5.3	PERFIL DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA	60
6	CONCLUSÃO	71
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICES.....	85

1 INTRODUÇÃO

O conceito de alimentos prebióticos foi introduzido pela comunidade científica há mais de vinte anos e foi bastante discutida, até que atualmente a definição mais aceita baseada nas declarações propostas por especialistas da Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) é que são substratos, utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros, que proporcionam benefícios à saúde e nutrição humana e animal (Cunningham *et al.*, 2021; Gibson *et al.*, 2017; Guarner *et al.*, 2024). Atualmente, há uma crescente demanda por prebióticos que possam ser ingredientes para alimentos nutracêuticos, devido às suas características vantajosas, como inibição da proliferação de patógenos no cólon, estímulo do desenvolvimento de bactérias benéficas e o sistema de imunidade (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Cunha *et al.*, 2019; Food Ingredients Brasil, 2011).

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) comerciais são oligômeros de unidades monossacarídicas, considerados de cadeia curta e classificados como prebióticos (Corrêa *et al.*, 2024; Garcia *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021). Seus principais componentes são kestose (GF2), nistose (GF3) e 1- β -frutofuranosilnistose (GF4) (Cunha *et al.*, 2019; Ganaie; Lateef; Gupta, 2014; Perna *et al.*, 2018). Tem se destacado como ingrediente alimentar promissor pois estimula a melhoria na microbiota intestinal, ampliando a imunidade, favorece a absorção de cálcio e magnésio, além de possuir baixo valor calórico e potencial anticarcinogênico, prevenindo principalmente o câncer de cólon do intestino (Choukade; Kango, 2021). Além disso, estudos recentes mostraram que os FOS auxiliam no controle do colesterol e na prevenção de anemia, obesidade, osteoporose, hipertensão, intolerância a lactose e insuficiência renal (Corrêa *et al.*, 2024).

De acordo com a literatura, o mercado global de alimentos prebióticos foi avaliado em US\$ 7,2 bilhões no ano de 2022 e deve atingir US\$ 22,92 bilhões até 2032, cuja taxa de crescimento anual está estimada em 12,43% de 2023 a 2032 (Verified Market Reports, 2023). Com relação ao FOS, o mercado mundial foi avaliado em aproximadamente US\$ 2,72 bilhões em 2023 e espera-se que cresça para US\$ 2,95 bilhões até 2024 (Research And Market, 2024). A taxa de crescimento se deve à crescente demanda por adoçantes naturais e fibras dietéticas, que é impulsionada por fatores como o aumento dos consumidores por alimentos nutracêuticos, seu uso em fórmulas infantis, alimentos funcionais e seus benefícios à saúde digestiva (Maximize Market Research, 2024). Países europeus e da América do Norte apresentaram a maior demanda no mercado global de FOS em 2023 (Pristine Market Insights, 2024). No

entanto, no Brasil ainda não há produção em larga escala de FOS, sendo necessário a importação desta biomolécula (Aranda, 2024; Barbosa, 2022). Considerando o potencial desse componente prebiótico aliado ao mercado financeiro, os estudos voltados ao desenvolvimento de tecnologias, produção e aplicação industrial economicamente viável, tornam-se mais atrativos na área (Corrêa *et al.*, 2024).

A principal rota de produção de FOS para aplicação industrial ocorre por meio do uso de enzimas microbianas denominadas frutossiltransferases (FTases, E.C.2.4.1.9), que utilizam a sacarose como substrato e são capazes de transferir grupos frutossil para moléculas de sacarose, exibindo elevada atividade de transfrutossilção (Antosová *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2017). Muitos estudos tem reportado parâmetros ótimos para produção de FTase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 e o comportamento de sua atividade enzimática de acordo com o pH, temperatura e concentração de sacarose (Araújo *et al.*, 2022; Gonçalves *et al.*, 2020; Maiorano *et al.*, 2020). Quando secretadas para o meio de cultura, são denominadas de FTases solúveis e, quando aderidas a parede celular do microrganismo, são conhecidas como FTase micelial (Cunha *et al.*, 2019; Perna *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021).

O uso de enzimas solúveis possui certas desvantagens, tais como sua não reutilização, alta sensibilidade a fatores externos podendo ser inibidas pela concentração de substratos e produtos, alto custo de purificação entre outras, o que geram limitações para uma eficiente aplicação industrial (Araújo *et al.*, 2022; Guisan, 2013; Mohidem *et al.*, 2023). Enzimas são biocatalisadores por natureza, e sua imobilização em um suporte cria um sistema de catálise heterogênea, simulando sua condição natural em células, onde ainda estão ligadas a estruturas celulares, membranas e organelas (Alves *et al.*, 2017). Assim a imobilização de células com atividade enzimática é uma possível estratégia para a solucionar a problemática de enzimas solúveis, pois visa aumentar a biomassa, obtendo biocatalisadores robustos, reutilizáveis e fáceis de separar do produto, conferindo resistência às mudanças do meio reacional, restringindo a mobilidade celular a uma região limitada, sendo essa tecnologia considerada um método promissor para diversos processos contínuos e batelada (Karel ; Libicki; Robertson, 1985; Saeed; Iqbal; Iqbal, 2013; Sheldon, 2007; Souza *et al.*, 2017).

A escolha adequada do suporte é um fator também muito importante no processo de imobilização, e seu efeito é influenciado principalmente pelas características e condições do sistema catalítico (Brena *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2025; Souza *et al.*, 2017). O suporte deve ter elevada área específica, permeabilidade, oferecer estabilidade química e mecânica às condições operacionais, ter baixo custo além de ser de natureza hidrofílica ou hidrofóbica e ter

uma morfologia e composição favoráveis ao processo (Brena *et al.*, 2013; Ureta *et al.*, 2021). A matriz do suporte utilizado para imobilização pode ser categorizada em materiais orgânicos, inorgânicos e suportes híbridos que incluem a combinação de biopolímeros (Nájera- Martinez *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2017).

A esponja vegetal é caracterizada pela estrutura orgânica e macroporosa, o que facilita a difusão do substrato e acomodação das células, além da superfície hidrofílica que possui a presença de grupos funcionais essenciais, favorecendo a afinidade entre as células biocatalíticas e o suporte durante a imobilização (Dzionic *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 1998; Oluwaseun; Fredik; Anthony, 2023; Saeed; Iqbal, 2013). Também é um material biodegradável, de baixo custo encontrado com abundância no país, fácil manuseio de operação, não tóxico e pode ser empregado durante um longo período de uso pois possui alta resistência mecânica (Aranda, 2024; Dzionic *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2019; Martinez *et al.*, 2015; Mussato *et al.*, 2012).

Já a esponja de poliuretano (EPU) é um material orgânico sintético, podendo ser obtido a partir de fontes naturais e renováveis, e têm se destacado devido a sua alta resistência mecânica, flexibilidade, bioestabilidade e biocompatibilidade características relevantes para seu uso como suporte para imobilização (Cipolatti *et al.*, 2020; Lyu *et al.*, 2021). O polímero possui unidades repetitivas contendo diferentes grupos funcionais aumentando sua versatilidade e aplicação industrial (Souza *et al.*, 2017). Células biocatalíticas obtidas a partir de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus spp* foram imobilizadas em matriz de poliuretano e evidenciaram um aumento expressivo na atividade enzimática, além da melhoria na estabilidade operacional dos biocatalisadores (Barbosa, 2022; Dal Maso *et al.*, 2021). Logo, o uso desses materiais como suporte mostram vantagens para sua aplicabilidade neste trabalho.

A estabilidade enzimática é um parâmetro fundamental para produção, acondicionamento e armazenamento do biocatalisador (Manning *et al.*, 2010). Para ser considerado um potencial biocatalisador, a estabilidade operacional deve ser satisfatória e a atividade catalítica e conformação nativa da enzima pós imobilização não devem sofrer muitas alterações (Bolina, 2020). Ultimamente, as indústrias biotecnológicas têm procurado melhorar a produtividade enzimática e desenvolver novas abordagens para satisfazer as demandas do mercado de aumentar o tempo de vida útil dos biocatalisadores, a fim de apoiar a produção em larga escala e promover o desenvolvimento econômico (Gonçalves *et al.*, 2019). Devido à instabilidade química e física das proteínas, fatores como temperatura, pH, interações iônicas com o meio e até mesmo a técnica de imobilização, podem alterar a conformação da molécula, implicando na perda de sua atividade e invalidando sua função. (Lindman *et al.*, 2006). Por essa

razão, diversas estratégias são adotadas para a estabilização, e com isso há a manutenção da estabilidade térmica e estabilidade de armazenamento, reutilização em processos e simplicidade para uso em reatores, (Gonçalves *et al.*, 2020; Guisan., 2013; Souza *et al.*, 2017).

Portanto, o presente trabalho visa imobilizar células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 em esponja vegetal e espuma de poliuretano e avaliar a estabilidade bioquímica dos biocatalisadores heterogêneos quando armazenados em diferentes soluções estabilizantes e quando aplicados em reator batelada para a produção de fruto-oligossacarídeos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Imobilizar células de *A. oryzae* IPT-301 em suportes orgânico durante o cultivo celular submerso e avaliar suas estabilidades bioquímicas visando obter biocatalisadores heterogêneos robustos, ativos e estáveis para a produção de fruto-oligossacarídeos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1ª Etapa: Desenvolvimento do biocatalisador heterogêneo

- a) Produzir células microbianas biocatalíticas por cultivo submerso em meio de cultura sintético e imobilizá-las, concomitantemente, nos materiais de suporte orgânicos: esponja de poliuretano e esponja vegetal;

2ª Etapa: Avaliação da estabilidade bioquímica do biocatalisador heterogêneo

- a) Avaliar o uso de potenciais agentes estabilizantes (solução tampão, sorbitol, polipropilenoglicol e glicerol) que viabilizem o armazenamento dos biocatalisadores heterogêneos sob condições refrigeradas;
- b) Obter os perfis de atividade enzimática, consumo de substrato e formação de produto dos biocatalisadores heterogêneos quando aplicados em reator operado em modo batelada, para diferentes concentrações de glicose;
- c) Monitorar a estabilidade térmica dos biocatalisadores heterogêneos em reator operado em modo batelada e verificar a taxa de formação de frutose transfrutossilada e glicose.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

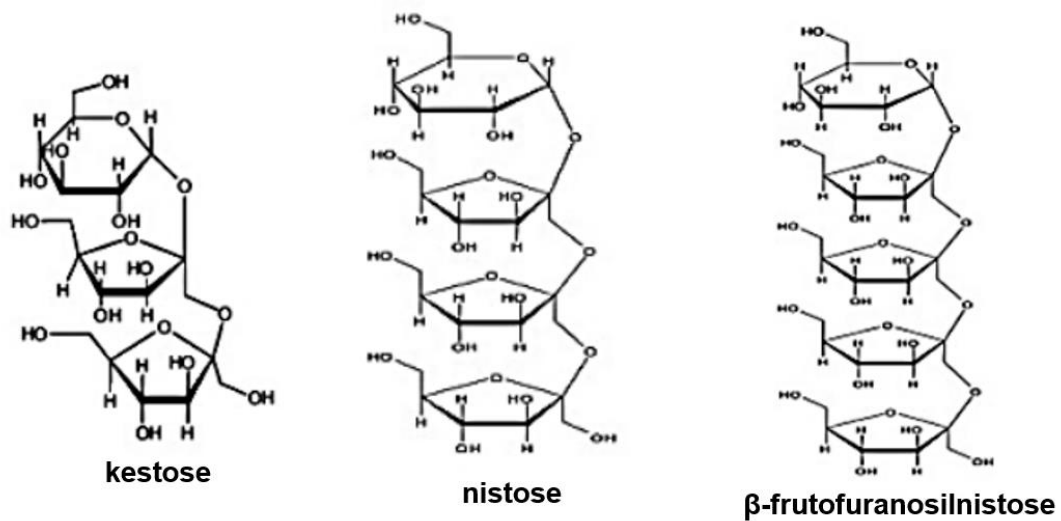
3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS: DEFINIÇÃO, ESTRUTURA E SÍNTESE

Nas últimas décadas, o surgimento de doenças virais causou enormes preocupações com a saúde, sociedade e economia e com isso, probióticos e prebióticos foram sugeridos como componentes para prevenção e cuidados intensivos para prevenção de viroses (Cunningam *et al.*, 2021). A Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) define prebióticos como ingredientes fermentados que resultam em mudanças específicas na composição e/ ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo então benefícios para a saúde do hospedeiro (Cunningam *et al.*, 2021; Guarner, *et l.*, 2024). Os prebióticos podem ser usados como ingredientes em alimentos e produtos diários, comumente são: frutanos, lactulose e oligossacarídeos de leite humano (HMS) (Guarner, *et al.*, 2024; Saad, 2006).

Os frutanos são fibras solúveis não digeríveis, sendo um grupo de carboidratos complexos categorizados como inulina (cadeia linear com ligações glicosídicas $\beta(2\rightarrow1)$), levans (polímeros lineares com ligações frutossil-frutose $\beta(2\rightarrow6)$), graminans (estruturas com ligações do tipo $\beta(2\rightarrow6)$ e $\beta(2\rightarrow1)$ terminadas com moléculas de glicose) e neofrutanos também denominados agavin (frutanos complexos com ligações $\beta(2\rightarrow3)$). A inulina é um polímero de frutose e são classificadas de acordo com o grau de polimerização, na forma de fruto-oligossacarídeos (FOS) e inulina. Enquanto a inulina pode conter até 70 unidades de frutose, os FOS são compostos de cadeia curta com grau de polimerização menor que 10 (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Côrrea *et al.*, 2024).

O termo FOS é usado principalmente para oligômeros de frutose que consistem em uma unidade de glicose e 2 a 4 unidades de frutose conectadas por ligações glicosídicas $\beta(2,1)$, possuindo um formato genérico do tipo GF_n (em que G se refere à molécula de glicose, F de frutose e n ao número de unidades do grupo frutossil) (Garcia *et al.*, 2021). Os oligômeros de frutose FOS são geralmente compostos de kestose (GF2), nistose (GF3) e 1- β -frutofuranosilnistose (GF4) e sua estrutura molecular é mostrada na Figura 1 (Cunha *et al.*, 2019; Rahim *et al.*, 2021).

Figura 1- Fórmula estrutural dos fruto-oligossacarídeos (FOS) com os componentes kestose (GF2), nistose (GF3) e 1- β - frutofuranosilnistose (GF4)



Fonte: Adaptado de Aranda (2024).

Naturalmente, os FOS estão presentes em diversas plantas e vegetais como tomate, alho, cebola, trigo, centeio, raiz de chicória, alcachofras de Jerusalém, nectarina, algas marinhas, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de mandioca, farelo de arroz, farelo de milho, palha de arroz, bagaço de maçã, mamão, cascas de beterraba e cascas de banana e altas concentrações foram encontradas em batata yacon (Cunha *et al.*, 2019; Rahim *et al.*, 2021). Porém essas fontes não possuem quantidade suficiente para ser extraído e aplicado industrialmente, logo, comercialmente o FOS pode ser obtido de outras maneiras, com maior rendimento: pela hidrólise da inulina ou usando enzimas fúngicas para síntese a partir da sacarose (Dou *et al.*, 2022; Maiorano *et al.*, 2020).

Comumente, as enzimas usadas em indústrias são produzidas por microrganismos principalmente por causa de sua alta pureza e atividade enzimática, estabilidade, menos geração de co-produtos e fabricação lucrativa (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023). A produção de fruto-oligossacarídeos em larga escala pode ser alcançada utilizando sacarose como substrato pela ação de β -D-frutofuranosidase (β -D-FFase) e da frutossiltransferase (β -D-FTase), ambas enzimas produzidas a partir de cepas de alto rendimento (Choukade; Kango, 2021). Células biocatalíticas *in natura* ou imobilizadas também podem ser usadas na produção de FOS, porém a etapa de separação ainda deve ser necessária no processo (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023).

As enzimas usadas para síntese de FOS podem ser produzidas por diferentes cepas fúngicas como *Aureobasidium* spp, *Fusarium* spp, *Penicilium* spp e majoritariamente

Aspergillus spp (Maiorano *et al.*, 2020). Dezesete diferentes linhagens de fungos filamentosos foram cultivadas em culturas em batelada para comparar suas habilidades para a produção de β -frutofuranosidase, em que *Aspergillus oryzae* IPT-301, *Aspergillus niger* ATCC 20611 e a linhagem IPT-615, apresentaram alta produção com de frutossiltransferase (Cuervo- Fernández *et al.*, 2007). Estudos recentes com FTase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 tem mostrado altas atividades de transfrutossilção e por isso, alto potencial para produção de FOS (Araújo *et al.*, 2022; Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Gonçalves *et al.*, 2020).

Os FOS comerciais possuem um poder adoçante entre 40% e 60% em comparação à sacarose, sendo equivalentes aos FOS encontrados naturalmente em alimentos (Khuenpet *et al.*, 2015; Santos-Moriano *et al.*, 2015). Dados da literatura mostram que, em solução, as propriedades do FOS e sua estabilidade térmica são superiores à sacarose, quando mantidas nas mesmas proporções, além de serem resultantes em uma faixa de pH entre 4 e 7 (Ureta *et al.*, 2019).

3.1.1 Benefícios, aplicações e mercado

Os FOS são classificados como prebióticos, pois possuem características como resistência a enzimas salivares, pancreáticas e até ao ácido estomacal, não sofrem hidrólise enzimática ou absorção no intestino delgado, são metabolizados seletivamente no cólon por um número limitado de bactérias benéficas e podem afetar a microbiota intestinal diminuindo a população de patógenos (Guarner *et al.*, 2024; Food Ingredients, 2011).

Diversas publicações de trabalhos com fruto-oligossacarídeos são encontradas na literatura e comprovam seus benefícios para saúde humana e animal. Estudos recentes examinaram os efeitos da ingestão de FOS em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos, em que pacientes com diabetes do tipo 1 apresentaram menor diversidade da microbiota, associada a alterações na permeabilidade intestinal (Ho *et al.*, 2019). Dessa forma, a ingestão de prebióticos pode melhorar o controle glicêmico e reduzir a permeabilidade intestinal, e assim, diminuir a resistência a insulina em pacientes diabéticos (Roshanravan *et al.*, 2017).

Outros trabalhos demonstraram que a ingestão de FOS pode reduzir a absorção de açúcares simples e carboidratos complexos na corrente sanguínea, diminuindo os níveis de glicose (Adriano *et al.*, 2019; Shimonaka *et al.*, 2020). No estudo de Choukade e Kango (2022), o uso *in vitro* de FOS mostrou potencial anticancerígeno contra câncer de cólon, induzindo

diretamente genes apoptóticos, responsáveis por eliminar células cancerígenas do organismo (Choukade; Kango, 2022).

De acordo com Euler *et al.* (2005) após suplementação de FOS em bebês saudáveis, a contagem de bifidobactérias em microbiota intestinal foram estatisticamente maiores do que o grupo de bebês que não ingeriram o prebiótico. Em estudo com adultos, os autores descobriram que as concentrações de bifidobactérias variava de acordo com a ingestão de FOS até o 12º dia (Bouhnik, 1996). Dados disponíveis mostraram que estudos com modelos celulares *in vitro* sugeriram que os prebióticos favorecem a absorção de minerais como magnésio, cálcio, cobre e ferro no cólon, aumentando a retenção óssea (Whisner; Castillo, 2018).

Existem ainda estudos que comprovam que os FOS são anticariogênicos, ou seja, não são assimilados por *Streptococcus mutans* para a geração de ácidos e β -glucanos insolúveis, responsáveis pela formação de cáries dentárias (Mutanda *et al.*, 2014). Quanto aos benefícios para saúde animal, o consumo de FOS mostrou melhorias na densidade óssea de ratos fêmeas Winstar em crescimento, além de aumentar o volume do fêmur, além de melhorar a absorção de cálcio e magnésio (Whisner; Castillo, 2018).

Além destes benefícios, suplementação alimentar com frutanos tem demonstrado ser uma importante ferramenta para pacientes diagnosticados com doença celíaca, um distúrbio digestivo e imunológico genético devido à ingestão de glúten, que afeta a absorção de nutrientes importante, como cálcio, fosfato e vitamina D (Corrêa *et al.*, 2024). Suplementação com FOS e inulina em crianças celíacas, em dieta sem ingestão de glúten, promoveu o aumento de vitamina D e E (Drabinská *et al.*, 2020)

A aplicação de FOS na indústria alimentícia é bastante vasta, estando presente como ingrediente em fórmulas infantis, suplementos vitamínicos para idosos, doces, erva-mate e também são comercializados para consumo diário além de serem aplicados em rações para animais domésticos (Guarner *et al.*, 2024; Verified Market Reports, 2024). Estudos vem testando a substituição parcial da sacarose por fruto-oligossacarídeos em bolos, pães, iogurtes e até mesmo, produtos derivados de carne (Corrêa *et al.*, 2024).

Conforme reportes técnicos- financeiros, o mercado global de alimentos prebióticos vem crescendo cada vez mais, em 2015, era avaliado em US\$ 2,9 bilhões com projeção de crescimento a uma taxa de 12,7 % até 2025. Já no ano de 2022, foi avaliado em US\$ 7,2 e deve atingir US\$ 22,92 bilhões até 2032, cuja taxa de crescimento anual está estimada em 12,43 % de 2023 a 2032 (Verified Market Reports, 2024). Com relação ao FOS, o mercado mundial foi avaliado em aproximadamente US\$ 2,72 bilhões em 2023 e espera-se que cresça para US\$ 2,95

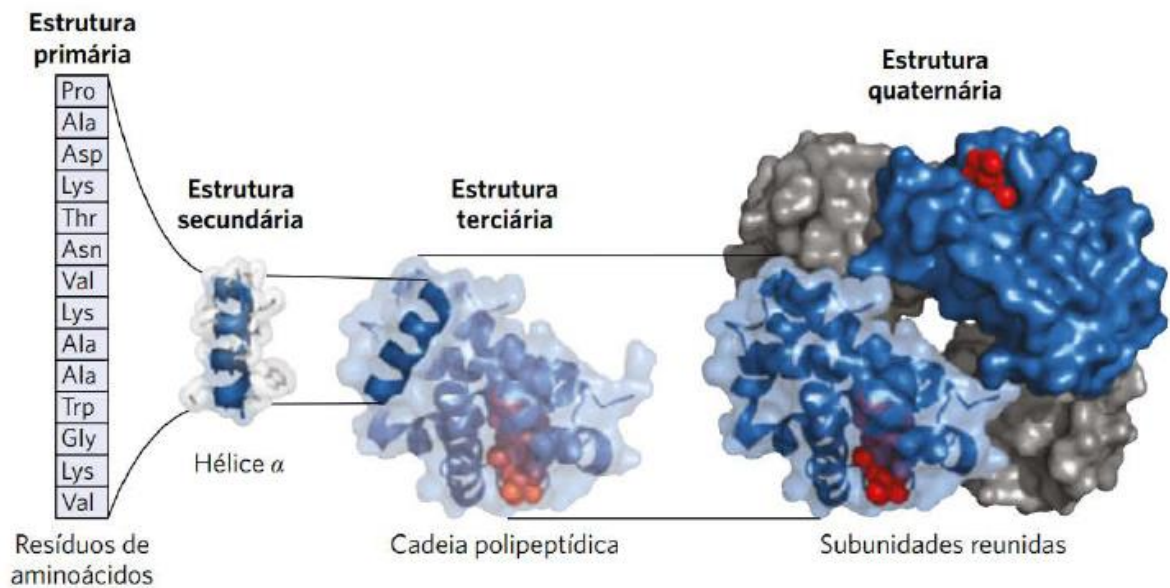
bilhões até 2024 (Research And Market, 2024). Países europeus e da América do Norte apresentaram a maior demanda no mercado global de FOS em 2023 (Pristine Market Insights, 2024).

3.2 ENZIMAS: ESTRUTURA, SÍTIO ATIVO E ESTABILIDADE

Biocatalisadores são moléculas que reduzem a energia de ativação necessária de uma reação, conhecidas como enzimas. Enzimas são moléculas proteicas que atuam de forma eficiente em processos biotecnológicos. Características como alta especificidade, alta atividade em condições moderadas, constante catalítica e biodegradabilidade, faz com as enzimas sejam catalisadores vantajosos para processos. Grande parte das características das enzimas são devido a sua estrutura molecular. As proteínas são compostas por ligações peptídicas entre aminoácidos, e quando formam uma sequência, esta é denominada estrutura primária (Illanes, 2008).

Uma estrutura tridimensional terciária é o resultado de interações de resíduos de aminoácidos localizados na estrutura primária que produzem uma configuração compacta e torcida. Essa estrutura terciária é essencial para a funcionalidade biológica da proteína. Ao conter mais de uma cadeia polipeptídica, constituem uma estrutura quaternária (Nelson, 2019) (Figura 2).

Figura 2- Níveis de estrutura nas proteínas. Estrutura primária, secundária, terciária e quaternária



Fonte: Adaptado de Nelson (2019).

A catálise ocorre em um “bolso” da enzima chamada sítio ativo, que geralmente é formada por alguns resíduos de aminoácidos, enquanto o restante da proteína atua como uma estrutura de suporte (Illanes, 2008). O substrato é ligado à enzima no sítio ativo e, ao fazer isso, são produzidas mudanças na distribuição de elétrons em suas ligações químicas que causam as reações que levam à formação de produtos. Inicialmente, para explicar o mecanismo de catálise, foi proposto o modelo de chave e fechadura por Emil Fischer em 1894, em que o sítio ativo teria uma forma geométrica única que complementaria a forma da molécula do substrato ao se encaixar. Posteriormente, esse modelo foi complementado pela teoria do ajuste induzido, segundo a qual o substrato induz uma mudança na conformação da enzima após a ligação, que pode orientar os grupos catalíticos de uma forma propensa à reação subsequente (Nelson, 2019).

Condições de temperatura, pH ou solvente e a presença de metais pesados e agentes quelantes, podem produzir perda de função, modificando a configuração adequada do sítio ativo. Portanto, qualquer agente que promova o desdobramento da proteína, ou seja, a mudança na sua conformação, irá separar os constituintes do sítio ativo e então sua atividade catalítica pode ser reduzida ou inativada (Fonseca *et al.*, 2006).

Propriedades fundamentais, como a estabilidade da enzima, são altamente dependentes da sua estrutura tridimensional. A molécula enzimática pode ser submetida a mudanças

químicas causando perda irreversível de atividade. Esse fenômeno é denominado inativação e geralmente ocorre após o desdobramento (Illanes, 2008; Nelson, 2019).

Outro fator importante a ser considerado para a estabilidade da enzima é o pH. Uma vez que as enzimas são cadeias polipeptídicas, o efeito do pH influencia diretamente suas propriedades. Na verdade, alterações no pH podem modificar a distribuição de cargas tanto no sítio ativo quanto em toda superfície da molécula de proteína. As enzimas podem ter resíduos de aminoácidos polares em seu sítio ativo, cuja carga varia de acordo com o pH. Em relação à atividade enzimática, observa-se que as taxas de reações catalisadas por enzimas tendem a apresentar máximos em determinadas faixas de valor (Fonseca *et al.*, 2006; Illanes, 2008).

3.2.1 Inibição enzimática

A grande maioria das enzimas são proteínas com função catalítica, com flexibilidade conformacional sutil. Isso as torna vulneráveis, e diversas condições ambientais e/ou ligantes podem levar à redução da atividade catalítica. Uma enzima pode ser irreversivelmente inativada (por altas temperaturas, extremos de pH, solventes não aquosos etc.) ou inibida por ligantes que se ligam a ela (Punekar, 2018). Ligantes são os substratos da reação, as moléculas sobre as quais as enzimas exercem suas atividades (Nelson, 2019).

Um ligante interage com uma região da proteína chamada de sítio de ligação, que é complementar em tamanho, forma, carga e caráter hidrofílico ou hidrofóbico. Os tipos de inibição enzimática podem ser categorizados com base em seus mecanismos e interações com enzimas e substratos (Punekar, 2018).

Uma reação reversível é um processo químico no qual os reagentes formam produtos que podem posteriormente reagir para regenerar os reagentes originais, além disso, a inibição reversível pode ser classificada em inibição competitiva, não competitiva e mista, dependendo da localização onde o inibidor se liga à enzima (Prete; Pagano, 2024).

Quadro 1- Classificação dos tipos de inibição reversível e seu respectivo mecanismo de funcionamento.

Classificação	Mecanismos
Inibição competitiva	Os inibidores competem com o substrato pela ligação ao sítio ativo da enzima.
Não competitiva	Os inibidores se ligam a um sítio alostérico, afetando a atividade enzimática independentemente da presença de substrato. Esse tipo não compete com o substrato; Os inibidores se ligam apenas ao complexo enzima-substrato, impedindo a conversão em produto. Esse tipo é menos comum, mas significativo em vias específicas.
Mista	Os inibidores podem se ligar tanto à enzima quanto ao complexo enzima-substrato com diferentes afinidades, afetando tanto a ligação ao substrato quanto a catálise.

Fonte: Adaptado de Kenakin (2023).

A inibição irreversível indica um inibidor capaz de criar uma modificação química da enzima, formando ligações covalentes com os grupos de alguns aminoácidos. Essa interação torna a enzima inativa para sempre. (Prete; Pagano, 2024; Verma *et al.*, 2023).

Os inibidores são estruturalmente relacionados aos produtos ou substratos dessa enzima. Isto é, moléculas estruturalmente semelhantes a um substrato ou produto podem ocupar o mesmo espaço no sítio ativo da enzima. Esses inibidores são chamados de inibidores isostéricos. Em algumas vias metabólicas, um metabólito sem qualquer similaridade química ou reatividade com uma etapa anterior, pode ser um inibidor de sua própria síntese. Essa molécula estruturalmente não relacionada não pode ocupar o sítio ativo isostérico da enzima, mas inibe a reação ao se ligar a um local distinto do sítio ativo. Esses inibidores são chamados de inibidores alostéricos, e o local onde se ligam é denominado sítio alostérico. Por fim, a ligação de um inibidor ao sítio alostérico é transmitida ao sítio ativo através da matriz proteica, causando uma mudança conformacional (Punekar, 2018).

3.2.2 Frutossiltransferase e atividade de transfrutossilacção

Os fruto-oligossacarídeos podem ser produzidos a partir da sacarose por enzimas com atividade transfrutossilante, como a frutossiltransferase (EC 2.4.1.9). (Castro *et al.*, 2017). É possível obter um rendimento máximo de 55- 60% ($\text{g}_{\text{FOS}} \text{g}_{\text{sacarose}}^{-1}$) utilizando a enzima isolada, embora um rendimento maior (64% $\text{g}_{\text{FOS}} \text{g}_{\text{sacarose}}^{-1}$) possa ser obtido utilizando células biocatalíticas (Castro *et al.*, 2017; Choukade; Kango, 2021). A enzima faz a clivagem de moléculas de sacarose, enquanto faz a transferência de moléculas de frutose recém geradas para receptores que podem ser oligossacarídeos, como kestose, nistose ou a própria sacarose (Choukade; Kango, 2021; Perna *et al.*, 2018). De acordo com o banco de dados de enzimas ativas em carboidratos (CAZY), as FTases são proteínas em formato de hélice β de 5 dobras que pertencem à família das glicosídeo hidrolases (GH), as quais catalisam a hidrólise e o rearranjo das ligações glicosídicas em moléculas de sacarose.

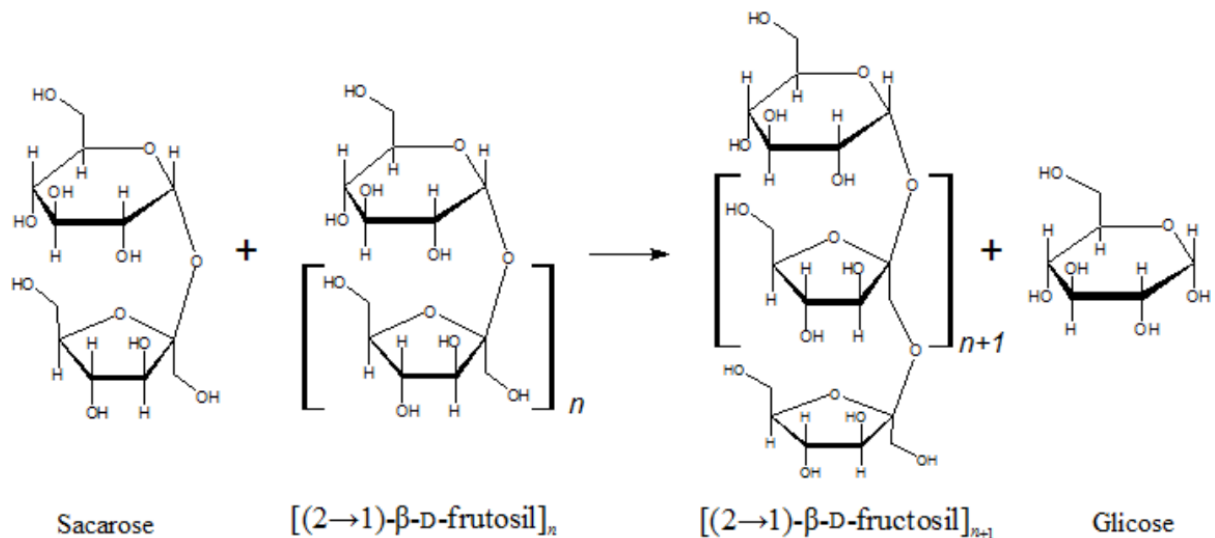
As FTases têm sido encontradas em mais de 36 mil espécies de plantas e microrganismos, como fungos filamentosos, bactérias e leveduras. No entanto, em plantas, a síntese de frutanos resulta da ação de uma série de enzimas, enquanto em microrganismos, os frutanos são gerados pela ação de apenas uma enzima. As propriedades da FTase dependem do microrganismo utilizado e do meio de cultura. Essas enzimas possuem principalmente atividade hidrolítica, transferase ou ambas (Choukade; Kango, 2021). A proporção entre as atividades de transfrutossilacção e hidrolítica pode ser considerada o critério mais importante ao avaliar a produção de FOS (fruto-oligossacarídeos) a partir de diferentes enzimas microbianas (Cunha *et al.*, 2019).

A fonte de carbono desempenha um papel determinante como indutor da reação, apesar de quantidades significativas de FTase serem produzidas com glicose e frutose, na maioria dos casos os melhores resultados têm sido obtidos utilizando sacarose como fonte de carbono e indutor. (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Maiorano *et al.*, 2020). No estudo de Cunha *et al.* (2019), a frutossiltransferase obtida de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por cultivo submerso foi caracterizada a partir de parâmetros otimizados como estabilidade térmica e pH, e concentração de sacarose como fonte de carbono no meio reacional. Frutossiltransferase micelial de *Aspergillus tamaris* NKRC 1229 também foi caracterizada para síntese eficiente de fruto-oligossacarídeos (Choukade; Kango, 2019). A produção extracelular e caracterização de frutossiltransferase e β - frutofuranosidase de *Aspergillus niger* ATCC 9642 e *Penicillium brasilianum* também foi realizada por Dal maso *et al.* (2021).

A produção de FTases tem sido relatada utilizando resíduos agroindustriais em cultivo em estado sólido (SSF) ou com sacarose como indutor em cultivo submerso (SmF). Para essa abordagem, são necessárias duas etapas gerais de produção: (i) produção da enzima e (ii) biotransformação de carboidratos sob condições controladas. A produção de FOS depende das condições do biorreator, incluindo temperatura, pH, velocidade de agitação e fluxo de oxigênio. (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Choukade; Kango, 2021). Silva *et al.* (2021) determinou a influência de temperatura, pH e tempo de armazenamento na atividade enzimática e estabilidade de FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 produzida por cultivo submerso. Diferentes resíduos sólidos agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de maçã, cascas de laranja e abacaxi, folhas de bananeira, melão e subprodutos de tâmaras têm sido explorados para a produção de FTase em cultivo em estado sólido (Bhardwaj *et al.*, 2024; Choukade; Kango, 2021, Pereira *et al.*, 2025). Partículas de sabugo de milho foram utilizadas como material de suporte para imobilização de FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 e mostraram melhoria em propriedades bioquímicas e estabilidade para obtenção de biocatalisadores heterogêneos potenciais para produção de FOS (Pereira *et al.*, 2025). No estudo de Bhardwaj *et al.*, (2024), borra de café foi empregada como um novo suporte potencial para a imobilização covalente de β -glicosidase para hidrólise de celobiose e os resultados mostraram estabilidade enzimática melhorada.

A Figura 3 apresenta o mecanismo da reação de transfrutoseilação da sacarose, em que as moléculas de frutose são transferidas para a posição β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose, que conecta o grupo glicosil ao grupo frutossil, catalisada pela FTase, levando à formação de FOS e à liberação de glicose (Gonçalves *et al.*, 2020).

Figura 3- Atividade de transfrutossilção por FTase utilizando sacarose como substrato



Fonte: Adaptado de Aranda (2024).

Diversos trabalhos definem uma unidade de atividade enzimática de transfrutossilção como a quantidade de enzima capaz de produzir um micromol (1 μmol) de FOS por minuto nas condições da reação (temperatura, pH e concentração de substrato) (Aranda, 2024; Araújo *et al.*, 2022; Barbosa, 2022; Cunha *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020).

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS BIOCATALÍTICAS

A imobilização celular é definida como a adesão de um agregado celular intacto a uma matriz inerte, com a preservação da atividade catalítica desejada (Saeed; Iqbal, 2013). Uma vantagem significativa da imobilização celular em relação às células *in natura* é que a velocidade da reação pode ser acelerada em um processo contínuo, isso garante a sua aplicabilidade industrial (Saeed; Iqbal, 2013). Diversas vantagens da imobilização celular incluem: estabilidade celular, proteção das células contra forças de cisalhamento e processamento principal e subsequente com custo reduzido (Lapponi *et al.*, 2022; Saeed; Iqbal, 2013).

O uso de enzimas solúveis em processos biotecnológicos possui diversas desvantagens, como a alta sensibilidade a vários agentes desnaturantes, alto custo, instabilidade para processamento em larga escala, mudanças de conformação, impossibilidade de reutilização e não aplicabilidade em reatores de leito fixo. (Araújo *et al.*, 2022; Mohidem *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2017). Enzimas são biocatalisadores por natureza, e sua imobilização em um suporte cria

um sistema de catálise heterogênea, simulando sua condição natural em células, onde ainda estão ligadas a estruturas celulares, membranas e organelas (Alves *et al.*, 2017). Diversas estratégias de imobilização têm sido estudadas por pesquisadores, abrangendo métodos de adsorção, ligação covalente, aprisionamento/encapsulação. (Gonçalves *et al.*, 2020; Mohidem *et al.*, 2023; Saeed; Iqbal, 2013). Como consequência da imobilização, algumas propriedades, como atividade catalítica, estabilidade térmica e estabilidade de armazenamento, são alteradas. (Mohidem *et al.*, 2023).

Outras vantagens das células imobilizadas são densidades celulares mais altas das células imobilizadas, resultando em melhores rendimentos ao longo de períodos prolongados de uso repetido, eliminação de fases de crescimento celular não produtivas, maior acessibilidade ao substrato, maior tolerância a altas concentrações de substrato e redução da inibição por produtos finais, regeneração e reutilização por períodos mais longos, e menor risco de contaminação (Saeed; Iqbal, 2013). Embora a imobilização de células não requeira o uso de enzimas purificadas, de custo elevado, ainda assim o processo biotecnológico necessita de uma etapa de separação do biocatalisador para o produto (Choukade; Kango, 2021).

3.4 SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO

A seleção da matriz de suporte é um fator chave para a imobilização, pois a partir dele o desempenho catalítico pode ser melhorado, dessa forma, deve ter resistência térmica, mecânica e física para suportar as condições variadas do processo industrial (Ureta *et al.*, 2019). É importante ressaltar que o suporte deve atuar como uma barreira que preserve a estrutura da enzima contra condições extremas do processo (pH, temperatura, danos mecânicos) evitando desnaturação e inativação (Souza *et al.*, 2017). Além disso, os suportes devem preferencialmente ter baixo custo e ecologicamente corretos, bem como inertes, para não interferir e não aumentar os custos da operação enzimática geral (Mohidem *et al.*, 2023; Ureta *et al.*, 2019).

No entanto, a seleção do suporte e suas propriedades estão intimamente relacionadas com o tipo de procedimento de imobilização escolhido para a enzima. Os materiais porosos apresentam como principal vantagem uma elevada área superficial interna disponível para a imobilização de células (Souza *et al.*, 2017). Contudo, é importante atentar para o diâmetro dos poros do suporte, pois o material escolhido deve proporcionar um espaço suficiente para acomodação do complexo enzima-suporte e deve haver uma boa afinidade entre os grupos

funcionais da enzima e do suporte, para que uma ligação efetiva possa ocorrer (Ureta *et al.*, 2019). De acordo com a composição química as matrizes de suporte podem ser categorizadas como nanomateriais, nanomateriais híbridos, inorgânicos e orgânicos, sendo esses últimos subdivididos em suportes orgânicos naturais e sintéticos (Mohidem *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2017). Diversos estudos justificam o uso de materiais orgânicos, pois estes podem superar as limitações associadas aos materiais inorgânicos, como a baixa biocompatibilidade, a reduzida afinidade com biomoléculas e a limitada adaptabilidade dos suportes inorgânicos para serem remodelados e aplicados em diferentes métodos de imobilização (Ureta *et al.*, 2024).

Esponja vegetal é derivada do fruto seco e maduro do gênero *Luffa*, e as mais conhecidas são *Luffa aegyptiaca* e *Luffa cylindrica*, cultivadas em grande parte nas regiões subtropicais e tropicais. Esta esponja é composta por uma rede aberta de fibras que formam o esqueleto do fruto. As principais vantagens desse material são suas alta porosidade, baixo custo, não toxicidade, técnica de aplicação e operação simples e alta resistência mecânica (Dzionic *et al.*, 2018). A esponja vegetal é uma planta trepadeira pertencente à família *Cucurbitaceae*, amplamente cultivada em regiões quentes e úmidas. A fibra que a compõem, é um conjunto de tecido vascular natural com estrutura reticular fibrosa (Guo *et al.*, 2019). Apresenta densidade de $0,92 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$, volume específico de poros de $31 \pm 6 \text{ cm}^3/\text{g}$, tamanho de poro de $335 \pm 65 \text{ }\mu\text{m}$ e diâmetro da fibra de $0,63 \pm 0,22 \text{ mm}$, esses valores indicam uma elevada eficiência de transferência de massa em um leito fixo de esponja vegetal (Saeed; Iqbal, 2013). Essa estrutura macroporosa, proporciona uma condição excelente para o crescimento de microrganismos, o que indica que ela pode ser uma alternativa natural e renovável. Em diversas literaturas, a esponja vegetal também é mencionada como um excelente suporte para imobilização celular, com capacidade de reciclagem e biodegradabilidade ativada (Shahi; Rai; Singh, 2016).

A composição química e a estrutura física da esponja mostram que ela contém 4,2 % de proteína, 1,08 % de lipídeo, 1,04 % de cinzas, 55,78 % de fibra e 37,81 % de carboidrato. A fibra é composta principalmente por aproximadamente 60% de celulose, 30% de hemiceluloses e 10% de lignina, diferenças na porcentagem de lignina nas fibras lignocelulósicas dependem de fatores ambientais e metabólicos. Morfologicamente, a esponja vegetal apresenta camadas sobrepostas de aproximadamente 2,0 a 4,0 mm, tornando-a uma estrutura complexa e interligada. As fibras possuem diferentes tamanhos variando entre 150 a 180 μm . A esponja é de cor clara, cilíndrica, composta por um vazio interconectado dentro de uma rede aberta de materiais de suporte matricial, com porosidade muito alta (79– 93 %) (Saeed; Iqbal, 2013).

Martinez *et al.* (2016) imobilizaram *Agrobacterium* em esponja vegetal para a produção de curculana ao longo de cinco ciclos consecutivos, obtendo uma produção média de 17,84 g L⁻¹ pelas células imobilizadas, durante o processo observaram que um grande número de células de *Agrobacterium* aderiram à esponja vegetal sem alterações em sua estrutura, mantendo estabilidade após trezentos dias de armazenamento a -18 °C. No trabalho de Dzionek *et. al* (2018) células da cepa *Planococcus* S5 foram imobilizadas em esponja vegetal, para utilizar na degradação de naproxeno, e identificaram que o biocatalisador desenvolvido apresentou alta resistência e degradou concentrações mais elevadas do fármaco em comparado com as células *in natura*. Pectinase obtida de *Aspergillus niger* FTR 002 foram imobilizadas em esponja vegetal e os biocatalisadores foram empacotados em reator de leito fixo, para clarificar suco de laranja, aumentando 40% na capacidade de clarificação (Oluwaseun; Fredik; Anthony, 2023).

Os suportes de poliuretano (PU) têm sido destacados devido à sua versatilidade, alta biocompatibilidade e elevadas resistências mecânica e biológica. Vale ressaltar que esses materiais também apresentam alta durabilidade, flexibilidade e biocompatibilidade, o que os torna muito versáteis, sendo utilizados em diversas aplicações. Diferente de outros polímeros, o poliuretano pode ser formado pela combinação de diversos monômeros, apresentando nas unidades repetitivas grupos químicos distintos, contendo, além das ligações de uretano, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, grupos éster, éter, amida e ureia, o que aumenta a versatilidade mecânica e química dessas matrizes poliméricas. Uma vantagem importante dos materiais de poliuretano alta biodegradabilidade e biocompatibilidade. Essas características são fundamentais para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis, baseados nos conceitos de economia circular (Ates *et al.*, 2022; Cipolatti *et al.*, 2020).

No trabalho de Barbosa (2022), células de *Aspergillus oryzae* IPT- 301 foram imobilizadas em matriz de poliuretano para produção de fruto- oligossacarídeos e o resultado mostrou que o tempo de cultivo de 32h foi suficiente para atingir atividade de transfrutossilação 145,43 U g⁻¹. No trabalho de Cardoso (2023) implementou um reator de leito fixo a partir dos dados de Barbosa (2022), obtendo então a produção de 155 g L⁻¹ de fruto-oligossacarídeos, no tempo de 12h, a partir de meio reacional constituído por sacarose (400 g L⁻¹), pH 5,5 e temperatura de 50°C. Frutosiltransferase de *Aspergillus niger* ATCC 9642 e β-fructofuranosidase de *Penicillium brasilianum* foram imobilizadas em matriz de poliuretano e mostraram aumento significativo da atividade enzimática além de serem reutilizadas em até 4 ciclos em reator de leito fixo (Dal Maso *et al.*, 2021). Já em um estudo realizado por Castro *et al.* (2017), a espuma de poliuretano, utilizada como suporte, mostrou-se como um eficiente

material para imobilização enzimática de células de *Aspergillus japonicus* ATCC 20236 e *Aureobasidium pullulans*.

3.5 AGENTES ESTABILIZANTES

Na literatura, encontra-se diferentes conceitos para compostos cuja função seja estabilizar proteínas. Em sua maioria são definidos como “*cosolvente*”, mas também se observou o uso de “*osmólitos*” por alguns autores. Neste presente trabalho, essas substâncias foram citadas como “*Agentes estabilizantes*”. A estabilidade das proteínas é essencial para suas atividades biológicas e aplicações biotecnológicas, pensando assim, várias estratégias, como engenharia de proteínas, alterações químicas (ou enzimáticas) e uso de agentes estabilizantes, podem ser utilizadas para estabilização dessas moléculas. Dentre essas abordagens, os agentes estabilizantes, principalmente os polióis, têm ressaltado devido ao seu baixo custo e interferir minimamente na função catalítica da enzima (Pazhang *et al.*, 2015).

Os mecanismos do efeito estabilizador proporcionado por moléculas osmoticamente ativas incluem hidratação preferencial, exclusão preferencial da proteína desnaturada e efeito de revestimento (Pazhang *et al.* 2015; Sun *et al.*, 2021). Uma das explicações para o efeito estabilizador de alguns polióis, é que muitos deles aumentam a tensão superficial de soluções aquosas, o que tem sido relacionado à estabilização de proteínas. Além disso, os polióis podem alterar as conformações locais das proteínas em uma direção que aumenta a flexibilidade (Pazhang *et al.*, 2015). Entende-se que o fato desses agentes estabilizantes serem preferencialmente excluídos da superfície da proteína, deve favorecer o estado da proteína com menor superfície exposta, deslocando assim o equilíbrio de desnaturação entre a conformação nativa (N) e a conformação desnaturada (D) em direção ao estado N, proporcionando uma maior estabilização da conformação N na presença de agentes estabilizantes, fazendo com que a proteína adote uma estrutura mais estável (Anjum; Rishi; Ahmad, 2000).

A glicerina é considerada um estabilizador para algumas enzimas, pois desloca o conjunto de proteínas nativas para estados mais compactos, isto é, estáveis (Braham *et al.*, 2021). Estudos sugerem que a hidratação preferencial das proteínas em misturas de glicerina/água é causada por interações eletrostáticas que induzem a orientação das moléculas de glicerina sobre a superfície das proteínas, de forma que a glicerina é ainda mais “excluída”. Assim, favorece conformações enzimáticas mais compactas. (Braham *et al.*, 2021; Vagenende *et al.*, 2009).

O sorbitol é um dos polióis frequentemente usados para estabilizar proteínas e aumentar sua termoestabilidade. O sorbitol é um álcool de açúcar naturalmente encontrado em frutas, inofensivo após a ingestão, em comparação com açúcares alimentares comuns, que podem ser mais adequados para alimentos (Pazhang *et al.*, 2015, Sun *et al.*, 2021).

O propilenoglicol, também conhecido como propano-1,2-diol, é um composto orgânico pertencente aos álcoois glicólicos, viscoso, amargo, inodoro e incolor. A substância é higroscópica, ou seja, absorve a umidade, solúvel em água e é um composto considerado seguro para uso em alimentos, medicamentos e cosméticos de acordo com a Food and Drug Administration (FDA). Suas propriedades atraentes incluem seu uso como solvente (habilidade de dissolver medicamentos que não são solúveis em água) e como umectante, afinidade pela água o que auxilia na estabilização de conteúdo de água de um material (Wiegand, 2014).

Para analisar diversos fatores que impactam a atividade das células vivas, soluções tamponantes são mais apropriadas. A natureza e a composição e a concentração do sistema tampão afetam significativamente a atividade e a viabilidade de microrganismos, o que pode resultar em uma diminuição da atividade eletroquímica (Dmitrieva *et al.*, 2022). Para manter a viabilidade e a atividade metabólica dos microrganismos, também é importante manter o pH da solução tampão correspondente, uma vez que a maioria das reações bioquímicas ocorre apenas em uma faixa estreita de pH e o acúmulo de metabolitos ácidos desacelera a glicólise. Deve-se observar também que a concentração de sais na solução cria uma certa pressão osmótica, e pequenas variações dessa pressão osmótica em relação à fisiológica podem ativar os mecanismos de proteção da célula (Freiman *et al.*, 2024).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para a imobilização das células biocatalíticas, foram utilizadas esponja vegetal e espuma de poliuretano adquiridas em comércio local (Poços de Caldas, MG). Sacarose comercial (marca União®), também foi adquirida em comércio local para uso como fonte de carbono para os ensaios de cultivo microbiano e como substrato, constituinte do meio reacional.

Foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico: tris(hidroximetil)aminometano P.A ((HOCH₂)₃CNH₂) (LabSynth®, Brasil) e ácido acético glacial (CH₃COOH) (Dinâmica®, Brasil) para preparação de solução tampão tris-acetato; tartarato de sódio e potássio tetrahidratado (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) (Dinâmica®, Brasil), hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®, Brasil) e ácido 3,5-dinitrosalicílico (C₇H₄N₂O₇) (Synth®, Brasil) para preparação do reagente DNS e glicose anidra (Dinâmica®, Brasil) para construção da curva de calibração do DNS; extrato de levedura (LabSynth®, Brasil), nitrato de sódio (NaNO₃) (Dinâmica®, Brasil); fosfato monopotássico (KH₂PO₄) (LabSynth®, Brasil); sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) (Dinâmica®, Brasil), cloreto de manganês tetrahidratado (MnC₁₂.4H₂O) (LabSynth®, Brasil) e sulfato de ferro heptahidratado (FeSO₄.7H₂O) (LabSynth®, Brasil) para a formulação do meio de cultura sintético; ágar batata dextrose (KASVI®, Brasil); glicerina bidestilada (Êxodo Científica®, Brasil); Tween-80 (Dinâmica®, Brasil) e cloreto de sódio (NaCl) (Dinâmica®, Brasil) para produção e armazenamento dos esporos. Para os ensaios de armazenamento, foram utilizados Sorbitol 70% (Êxodo Científica®, Brasil) e Polipropilenoglicol (Êxodo Científica®, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento do biocatalisador heterogêneo

4.2.1.1 Microrganismo: preparo do inóculo e condições de cultivo

Para a produção de células biocatalíticas foi utilizada a cepa fúngica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo banco de culturas do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/SP). Os esporos liofilizados do

microrganismo foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril e então, alíquotas de aproximadamente 100 μL foram inoculadas em meio de cultura sólido, em placas de Petri, contendo ágar batata dextrose preparado de acordo com as especificações do fabricante. Após, foi incubado por 7 dias a 30 °C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371). Os esporos produzidos foram coletados por meio de raspagem com auxílio de alça tipo Drigalski em formato T descartável, em 10 mL de solução constituída por NaCl 0,95 % (m v^{-1}) e Tween-80 0,1 % (v v^{-1}) filtrados com lã de vidro e acondicionados em tubo tipo Falcon de 50 mL. O procedimento foi realizado em bancada de fluxo laminar vertical (Pachane®, modelo PCR). Então, com auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®, Coréia do Sul) a concentração de esporos foi ajustada para aproximadamente 1×10^7 esporos m L^{-1} , em que foi adicionado 20% (m v^{-1}) de glicerina e, em seguida, foi armazenada sob congelamento a - 12 °C. (Adaptado de Cunha *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2021).

4.2.2.2 Pré-tratamento dos materiais de suporte

Para cada material de suporte, foi realizado um tratamento prévio específico. A esponja vegetal teve seu tamanho reduzido manualmente até a formação de fragmentos cúbicos com 1,0 cm de aresta (Figura 4). Posteriormente, os fragmentos cúbicos foram lavados abundantemente com água destilada e secos em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal®, Modelo TE-394/2 MP, Brasil) a 50 °C por 24 h.

Figura 4- Esponja vegetal em formato de cubos de 1,0 cm de aresta para a imobilização de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301



Fonte: Adaptado de Aranda (2024).

A esponja de poliuretano também foi manipulada para obtenção de matrizes macroporosas cúbicas de 1,0 cm de aresta (Figura 5- A) com auxílio de um cortador elétrico de 30V e 220W, desenvolvido pelo corpo técnico da UNIFAL-MG (Figura 5- B). Posteriormente, as peças foram lavadas abundantemente com água destilada e secas em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal®, Modelo TE-394/2 MP, Brasil) a 50 °C por 24 h.

Figura 5- Esponjas de poliuretano para a imobilização de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301



Fonte: Autora (2025).

Legenda: A) Esponjas d poliuretano cortadas em cubos de 1,0 cm de aresta;

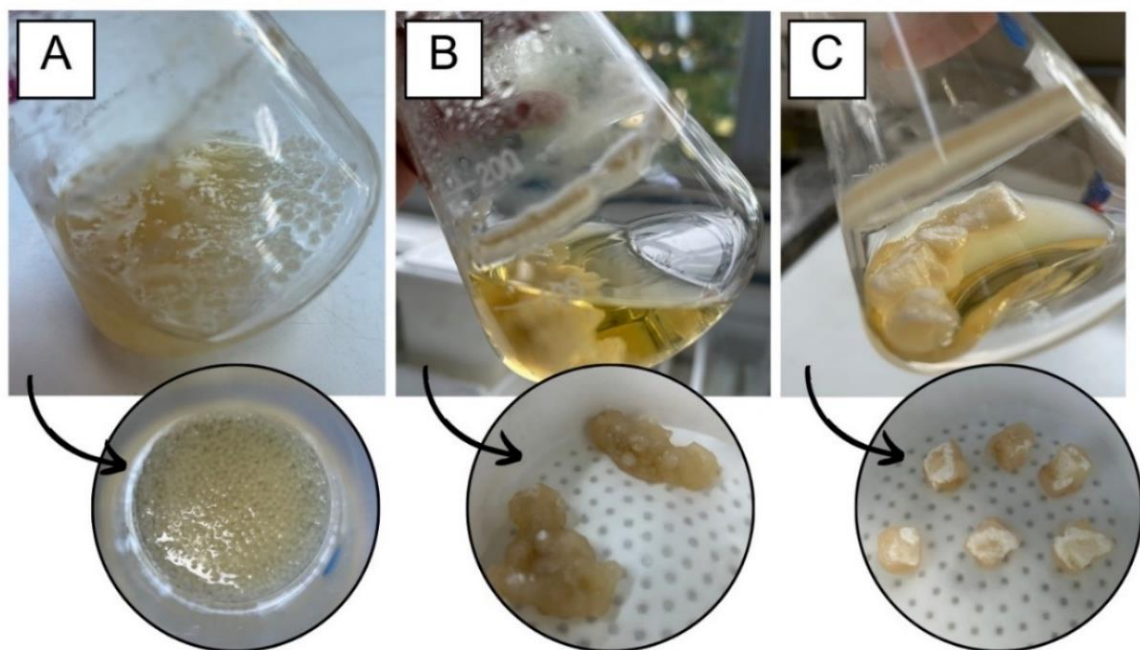
B) Cortador elétrico para confecção da estrutura cúbica do material de suporte.

4.2.2.3 Produção e imobilização das células biocatalíticas

As células biocatalíticas foram produzidas por cultivo celular submerso a partir do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 utilizando meio de cultura sintético, pH 5,5, constituído por: sacarose (150 g L⁻¹), extrato de levedura (5,0 g L⁻¹), NaNO₃ (5,0 g L⁻¹), KH₂PO₄ (2,0 g L⁻¹), Mg₂SO₄.7H₂O (0,5 g L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (0,3 g L⁻¹) e FeSO₄.7H₂O (0,01 g L⁻¹). Foram adicionados 50 mL do meio de cultura em frascos Erlenmeyers de 250 mL, vedados com algodão e esterilizados em autoclave (Phoenix Lufarco®, modelo AV) por 20 minutos a 120 °C e 2,022 atm. Os suportes, previamente tratados, também foram autoclavados, sob as mesmas condições experimentais, em frascos separados. Posteriormente, 6 fragmentos do material de suporte foram adicionados ao meio estéril, inoculando-se 500 µL de suspensão de esporos do fungo na concentração de 1 x 10⁷ esporos m L⁻¹.

Os frascos foram incubados em agitador orbital do tipo *shaker* (Tecnal®, modelo TE-4200, Brasil) a 30 °C e 200 rpm, com tempos otimizados em 28h (Aranda, 2024) e 32 h (Barbosa, 2022) para o cultivo microbiano nas esponjas vegetal e de poliuretano, respectivamente (Figura 6). O conteúdo total do frasco foi filtrado à vácuo em funil de Buchner em papel do tipo Whatman nº 1, e o material retido (células biocatalíticas imobilizadas) foi lavado abundantemente com água destilada e usado para caracterização das propriedades físicas e estudos de estabilidade térmica, operacional e de armazenamento.

Figura 6- Células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 após cultivo



Fonte: Autora (2025).

Legenda: A) Células *in natura* após 28h de cultivo;

B) Imobilizadas em esponja vegetal após 28h de cultivo;

C) Imobilizadas em poliuretano após 32h de cultivo.

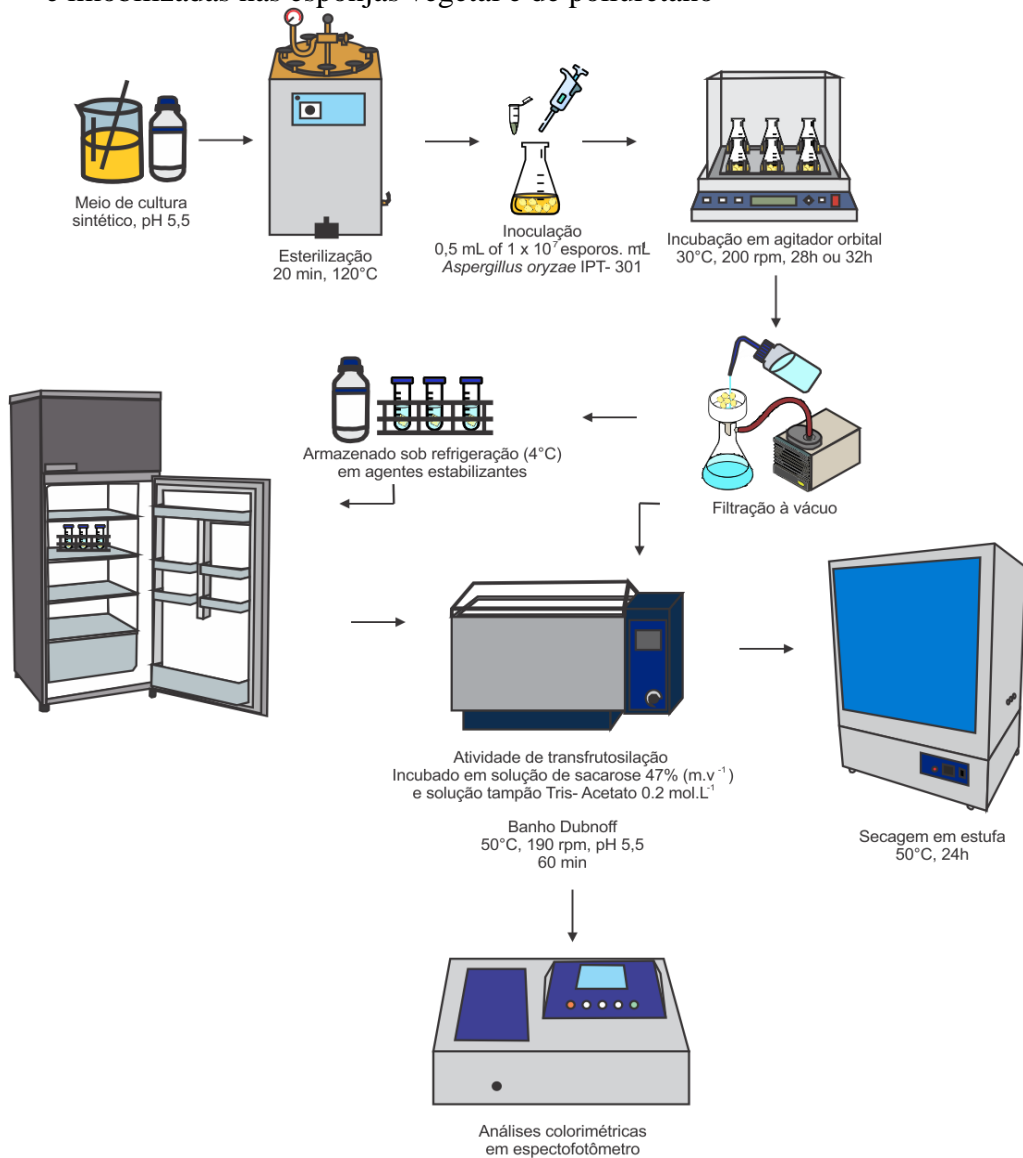
4.2.3 Avaliação das estabilidades do biocatalisador heterogêneo

4.2.3.1 Ensaio de estabilidade de armazenamento

Os ensaios de estabilidade de armazenamento foram realizados com as células biocatalíticas *in natura* e imobilizadas nos materiais de suportes, esponjas vegetal e de poliuretano, ao decorrer de 90 dias, mediante coleta de amostras em intervalos de tempo predefinidos (0, 5, 15, 45, 60 e 90) para monitoramento do pH do meio e obtenção dos perfis de atividade enzimática sob condições experimentais padrão.

Inicialmente, as soluções dos agentes estabilizantes sorbitol 70% ($v v^{-1}$), polipropilenoglicol (PPG), glicerina bidestilada e solução tampão tris- acetato 0.2 mol L^{-1} foram ajustadas para pH 5.5. Após o cultivo e a imobilização das células biocatalíticas, os biocatalisadores heterogêneos obtidos foram lavados abundantemente com água destilada, filtrados à vácuo e acondicionados em tubos do tipo Falcon®, mantendo-se imersos em solução constituída pelos agentes estabilizantes sob refrigeração à $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gonçalves *et al.*, 2020). Os experimentos foram realizados em triplicata, cujo protocolo experimental está ilustrado na Figura 7.

Figura 7- Ensaio de armazenamento das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 *in natura* e imobilizadas nas esponjas vegetal e de poliuretano

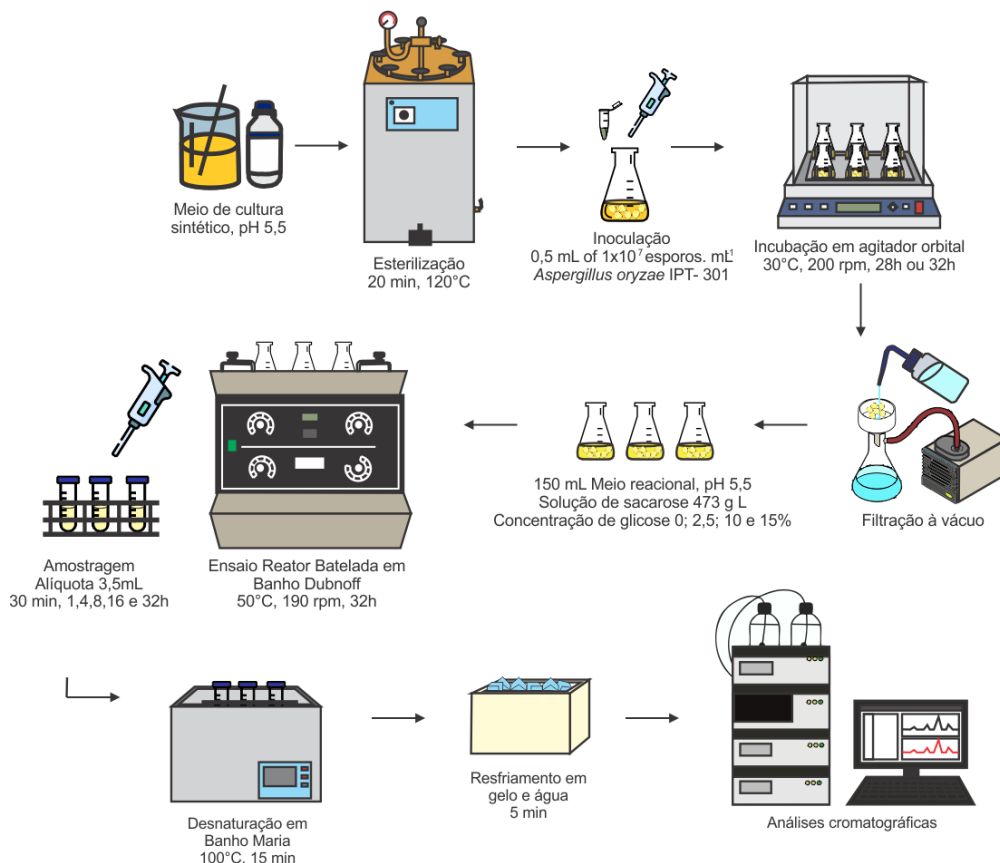


Fonte: Autora (2025).

4.2.3.2 Perfil de Inibição Enzimática

Aproximadamente 1,5 g de células biocatalíticas, *in natura* e imobilizadas, foi adicionado em frascos tipo Erlenmeyer com 150 mL de solução de meio reacional, pH 5,5, constituído por sacarose comercial 473 g L⁻¹ e glicose (0%; 2,5%; 10% e 15%, m v⁻¹). Os frascos foram incubados em banho Dubnoff (Lab-Line®, modelo 3540) a 50 °C e 190 rpm por 32h. As concentrações de sacarose (g L⁻¹), glicose (g L⁻¹) e FOS (g L⁻¹) foram obtidas por CLAE (item 4.3.3), mediante a coleta de alíquotas de 3,5 mL do meio reacional em intervalos de tempo predefinidos (30 min, 1 h, 4 h, 8 h, 16 h e 32h) ao decorrer da reação em modo batelada. Ao término do ensaio, as células biocatalíticas foram filtradas a vácuo e secas em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal®, Modelo TE-394/2 MP, Brasil) a 50 °C por 24h. Foram obtidos os perfis de consumo de substrato e formação de produto do reator operado em modo batelada durante a produção de FOS. Os experimentos foram realizados em triplicata e o protocolo experimental está ilustrado na Figura 8.

Figura 8- Ensaios em reator modo batelada das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 *in natura* e imobilizadas nas esponjas vegetal e de poliuretano

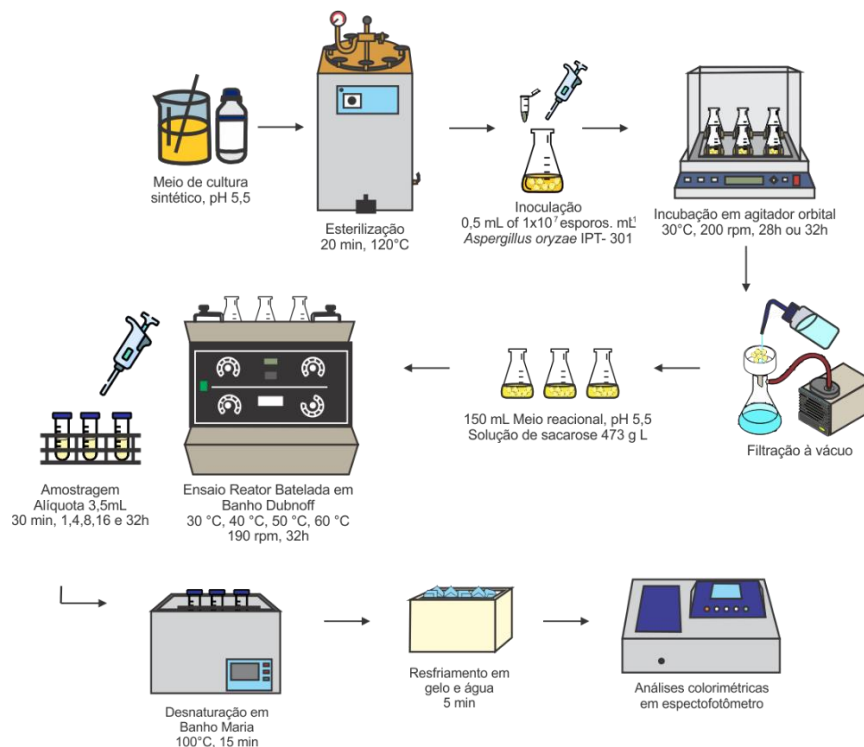


Fonte: Autora (2025).

4.2.3.3 Ensaio de Estabilidade Térmica

Aproximadamente 1,5 g de células biocatalíticas, *in natura* e imobilizadas, foi adicionado em frascos tipo Erlenmeyer com 150 mL de solução de meio reacional, pH 5,5, constituído por sacarose comercial 473 g L⁻¹. Os frascos foram incubados em banho Dubnoff (Lab-Line®, modelo 3540) variando a temperatura (30°C, 40°C, 50 °C e 60°C), em 190 rpm por 32h. A taxa de frutose transfrutossilada ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) e glicose (g L⁻¹) foram avaliadas mediante a coleta de alíquotas de 3,5 mL do meio reacional em intervalos de tempo predefinidos (30 min, 1 h, 4 h, 8 h, 16 h e 32h) ao decorrer da reação em modo batelada. Ao término do ensaio, as células biocatalíticas foram filtradas a vácuo e secas em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal®, Modelo TE-394/2 MP, Brasil) a 50 °C por 24h. Foram obtidos os perfis de taxa de frutose transfrutossilada ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) atividade enzimática, de consumo de substrato e formação de produto do reator operado em modo batelada durante a produção de FOS. Os experimentos foram realizados em triplicata e o protocolo experimental está ilustrado na Figura 9.

Figura 9- Ensaio em reator modo batelada das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 *in natura* e imobilizadas nas esponjas vegetal e de poliuretano



Fonte: Autora (2025).

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática de transfrutossilação (A_T) foi determinada conforme procedimento descrito por Cuervo-Fernandez *et al.* (2007), Ottoni *et al.* (2012) e Cunha *et al.* (2019). Para isso, as células biocatalíticas, *in natura* ou imobilizadas nos materiais de suporte, foram incubadas com 3,7 mL de solução de sacarose 47 % (m v⁻¹) e 1,2 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5. A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Lab-Line®, modelo 3540) a 50 °C, 190 rpm por 60 min e interrompida pela imersão do meio reacional em água em ebulição por 10 min, seguido por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min para desnaturação enzimática. Posteriormente, o meio reacional foi filtrado à vácuo e as concentrações de açúcares redutores e glicose foram quantificadas. A atividade A_T (em U g⁻¹) foi calculada pela Equação (1).

$$A_T = \frac{F_T V_r}{t_r m_{ms}} \quad (1)$$

Em que F_T é a concentração molar de frutose transfrutossilada (em $\mu\text{mol L}^{-1}$), V_r é o volume do meio reacional (em L), t_r o tempo de reação (em min) e m_{ms} se refere à massa seca (em g) das células biocatalíticas *in natura* ou imobilizadas nos suportes orgânicos.

Uma unidade (1U) de atividade de transfrutossilação foi definida como a quantidade de enzima que transfere um micromol (1 μmol) de frutose por minuto sob as condições experimentais estabelecidas (Cunha *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020).

4.3.2 Quantificação de açúcares

As concentrações de glicose (G) e açúcares redutores (AR) foram quantificadas pelos métodos colorimétricos GOD/PAP® (kit enzimático glicose-oxidase) e DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (Adaptado de MILLER, 1959), respectivamente. A concentração de frutose transfrutossilada (transferida) (F_T) no meio reacional foi determinada pela Equação (2) (Chen *et al.*, 1996; Cunha *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020).

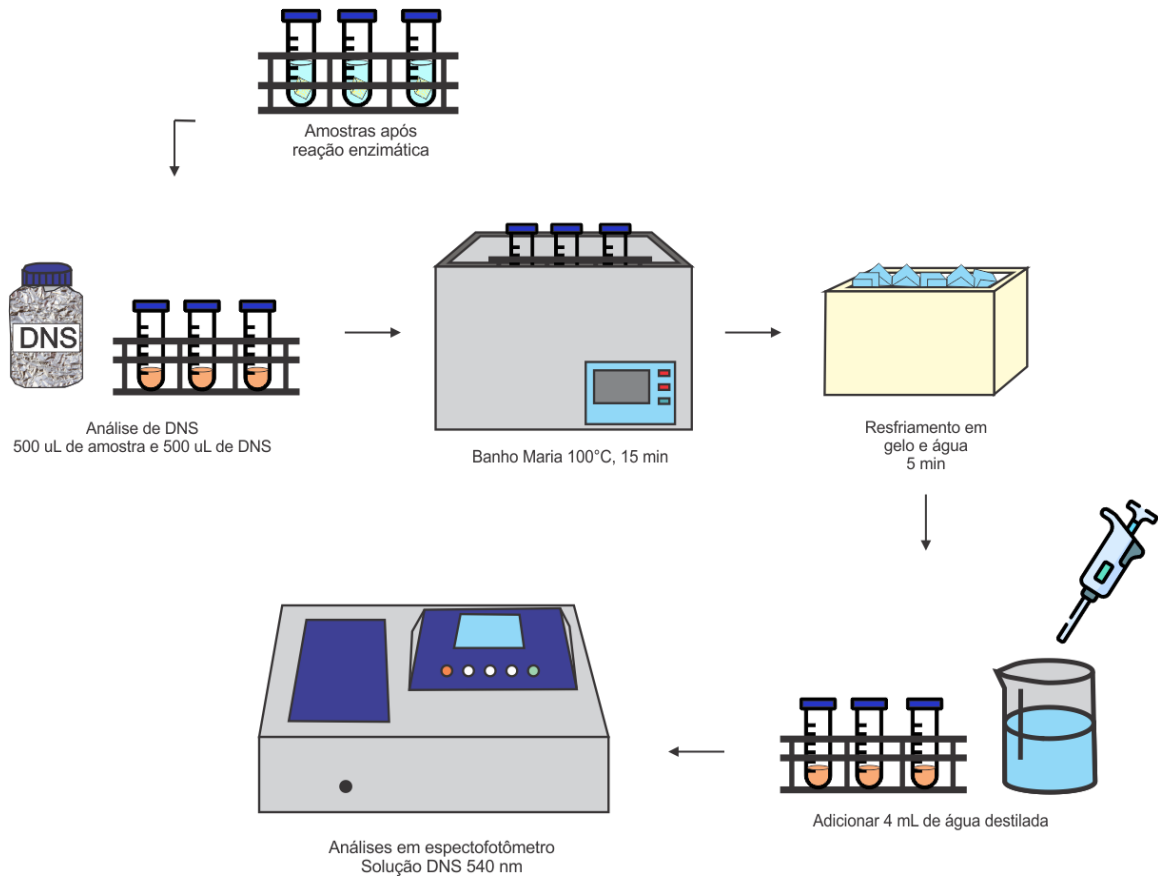
$$[FT] = 2[G] - [AR] \quad (2)$$

4.3.2.1 Determinação da concentração de açúcares redutores

Para a quantificação da concentração de açúcares redutores (AR), presentes no meio reacional, utilizou-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) adaptado de Miller (1959), conforme descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013). A solução de DNS (Solução A) foi preparada pela dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$) em 200,0 mL de solução 2 mol L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH). Paralelamente, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (Solução B) constituída por 600 g L^{-1} de tartarato duplo de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$). Após a dissolução, ambas as soluções (A e B) foram misturadas e levadas ao agitador magnético com aquecimento (TECNAL®, modelo TE-0856) numa temperatura de aproximadamente 40°C até homogeneização total. O volume final da mistura foi aferido para 1 L em balão volumétrico (Solução DNS).

A quantificação dos ARs foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 500 μL da amostra oriunda da reação enzimática, em 500 μL da solução DNS. A reação foi conduzida em banho maria a 100 °C por 15 min e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 4,0 mL de água destilada. Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Bel®, modelo UVM51) a 540 nm usando cubeta de vidro, visando medir as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos ARs mediante auxílio da curva de calibração obtida para o método DNS (Figura 10). O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco (amostra controle), porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática de transfrutossilação, por água destilada. A curva de calibração assim como a descrição da metodologia se encontra no Apêndice A.

Figura 10- Quantificação de açúcares redutores pelo método de DNS



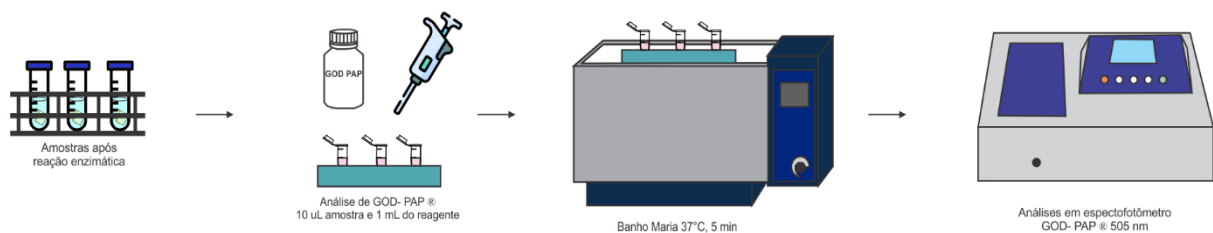
Fonte: Autora (2025).

4.3.2.2 Determinação da concentração de glicose

Para a quantificação da concentração de glicose (G), presente no meio reacional, utilizou-se o método GOD-PAP® (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.* 2021; Ganaie; Lateef; Gupta, 2014; Gonçalves *et al.* 2020; Vega, Zúniga-Hansen, 2011). O método consiste em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato. A oxidação da glicose pela glicose oxidase produz peróxido de hidrogênio, oxidado por meio da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4- hidroxibenzoato, produzem coloração rosácea ou vermelha (Bobbio; Bobbio, 2005; Wong; Wong; Chen, 2008). O kit enzimático utilizado no presente trabalho foi da marca Laborlab®. A quantificação da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em microtubos tipo Eppendorfs®, de 10 µL da amostra, oriunda da reação

enzimática, em 1,0 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min. As absorbâncias foram medidas com o auxílio de espectrofotômetro UV-Visível monofeixe (Bel Engineering®, modelo UV-M51) a 505 nm e, posteriormente, utilizadas para a obtenção das concentrações de glicose no meio reacional por meio do “*fator f*” estimado a partir da amostra padrão fornecida pelo fabricante. O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco (amostra controle), porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática, por água destilada (Figura 11).

Figura 11- Quantificação da concentração de glicose por meio do kit enzimático GOD- PAP®



Fonte: Autora (2025).

4.3.3 Quantificação de sacarose e fruto-oligossacarídeos

As concentrações de sacarose, glicose e de FOS (1-kestose, nistose e 1- β -frutofuranosilnistose), para construção do perfil de inibição enzimática foram obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando duas colunas cromatográficas acopladas em série (Shodex SC 1011, 300 x 7,8 mm) acondicionadas a 72 °C. Foi utilizado um sistema HPLC Waters (EUA) constituído por uma bomba isocrática W515, por um detector de índice de refração W2414, por um injetor automático W2707 e por *software* de controle e tratamento de dados Empower 2.0. As amostras foram eluídas com solução de EDTACa(Na)₂ 5×10^{-2} mol L⁻¹ a uma vazão de 0,4 mL min⁻¹ e os componentes foram identificados por comparação de tempos de retenção com padrões analíticos dos mesmos analitos (Fuji Wako Chemicals, Japão).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o tratamento dos dados experimentais foi submetido ao *teste de Tukey* pela metodologia de análise de variância (ANOVA), a um nível

de significância de 5%. O teste de Tukey avaliou a diferença significativa entre os dados experimentais, comparando-os um a um.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO

O ensaio de estabilidade ao armazenamento foi conduzido ao longo de 90 dias, após o cultivo das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 *in natura* e imobilizadas em esponja vegetal e esponja de poliuretano, visando monitorar a atividade de transfrutoseilação dos biocatalisadores heterogêneos. A estabilidade de armazenamento de células biocatalíticas imobilizadas é um fator relevante para sua aplicabilidade em larga escala, contribuindo para otimização do tempo e redução dos custos operacionais em processos industriais (Araújo *et al.*, 2022; Al-Najada *et al.*, 2019).

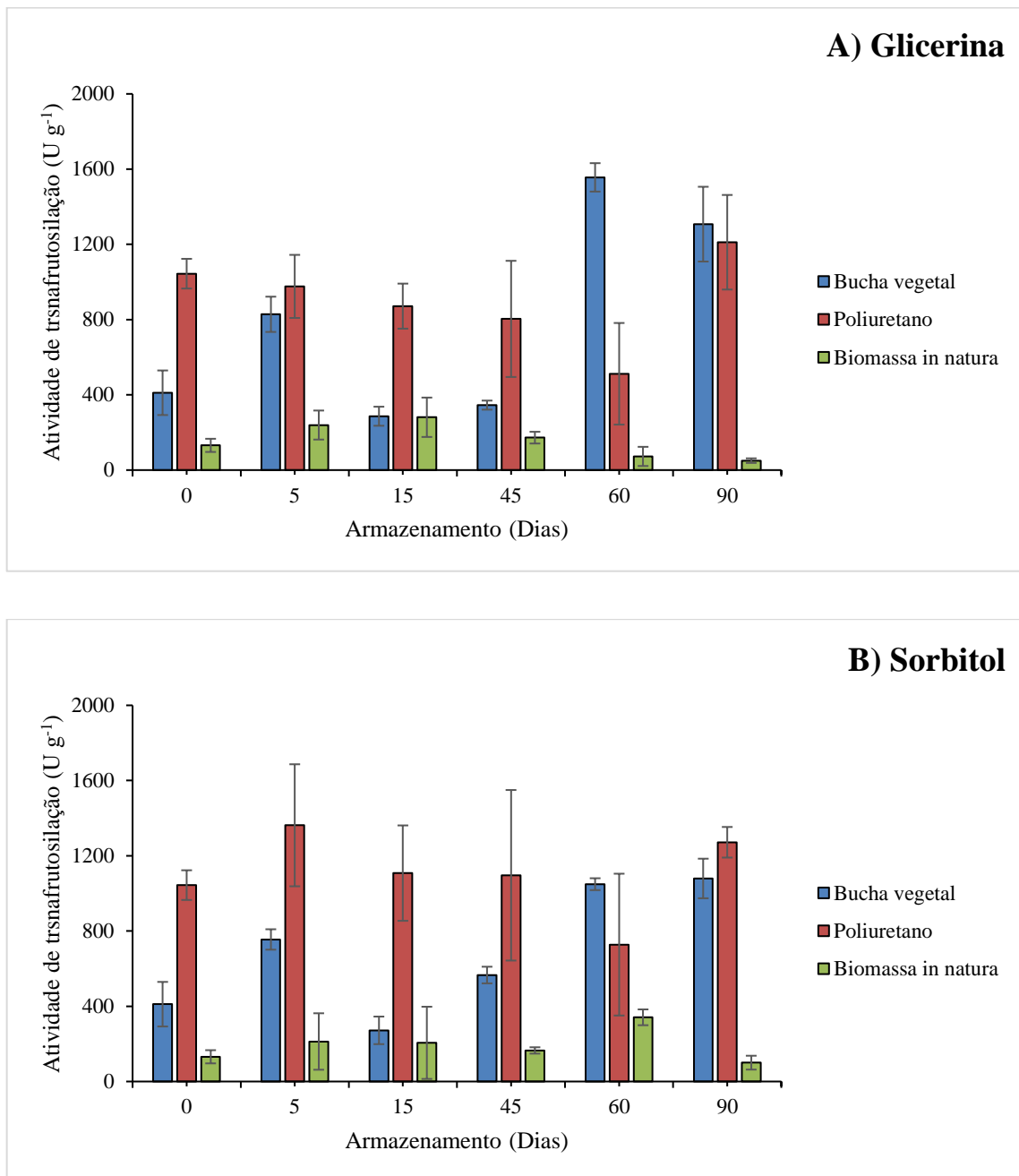
A partir disso, os biocatalisadores heterogêneos foram mantidos, em pH 5,5, sob refrigeração (4 °C) juntamente com os agentes estabilizantes, sendo esses glicerina bidestilada, sorbitol 70% (v v⁻¹), polipropilenoglicol e solução tampão tris-acetato (0,2 mol L⁻¹).

O valor da atividade enzimática do biocatalisador heterogêneo no dia 0, isto é, assim que retirado do cultivo submerso, foi utilizado como referência para estabelecer a porcentagem de perda de atividade catalítica (FTase). As células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, espuma de poliuretano e *in natura* apresentaram atividade aproximadamente de 411,06 U g⁻¹, 1044,12 U g⁻¹ e 131,38 U g⁻¹, respectivamente.

5.1.1 Glicerol e Sorbitol

A Figura 12 apresenta as atividades de transfrutoseilação obtidas para as células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e *in natura* armazenadas em (a) glicerina bidestilada, (b) sorbitol 70% (v v⁻¹).

Figura 12- Estabilidade de armazenamento de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e *in natura*



Fonte: Autora (2025).

Analisando a figura 12 (A e B) quando armazenados em glicerina e sorbitol, os biocatalisadores imobilizados em esponja vegetal apresentaram no geral, uma variação não linear da atividade de transfructosilação. Ao final do ensaio, a atividade enzimática das células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal armazenadas apresentaram valores de 1307,45 U g⁻¹ em glicerina bidestilada e 1079,41 U g⁻¹ em sorbitol 70% (v v⁻¹). Já quando o suporte

utilizado foi poliuretano, ao final do ensaio, esses biocatalisadores apresentaram atividade de 1211,17 U g⁻¹ e 1271,86 U g⁻¹ para glicerina e sorbitol, sequencialmente. Para as células *in natura* armazenadas verificou-se que a atividade aumentou gradativamente até o 15º dia de armazenamento (Figuras 12- A e B), e após há o decaimento sendo 50,12 U g⁻¹ em glicerina e 100,16 U g⁻¹ em sorbitol, ao final de 90 dias de ensaio.

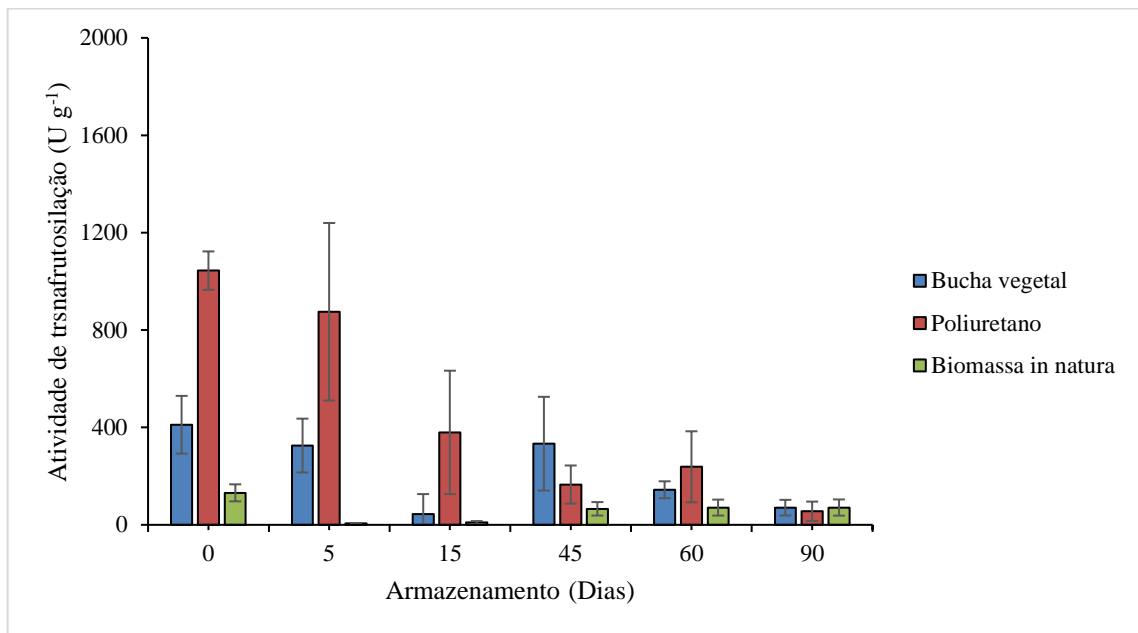
Sorbitol e glicerol são polióis amplamente usados para estabilização enzimática, evitando alterações na estrutura terciária tridimensional das proteínas sob condições extremas como altas temperaturas, solventes orgânicos, mudanças no meio, entre outros (Pazhang *et al.*, 2015). Estudos recentes confirmam que a adição destes componentes durante a produção de filmes pode melhorar as propriedades mecânicas, de solubilidade e de barreira (Calargün; Girgin; Tugrul, 2024). Isso acontece pois os grupos funcionais dos agentes se interagem com moléculas de água, reduzindo as interações intermoleculares (Ballesteros-Mártinez *et al.*, 2020) e, portanto, formam uma camada protetora ao redor da proteína no microambiente celular, garantindo a sua estabilidade e a preservação das propriedades bioquímicas do biocatalisador.

No trabalho de Sun *et al.*, (2017), estudos de termoestabilidade mostraram que os parâmetros termodinâmicos (tempo de meia-vida, energia de ativação e energia de Gibbs) da enzima α -L-ramnosidase de *Aspergillus niger* JMU-TS528, aumentaram após a adição de sorbitol afim de melhorar sua atividade. Por sua vez, em estudos de termoestabilidade da enzima tripsina, verificou-se que o tempo de meia-vida do biocatalisador aumentou em 5,3 na presença de glicerol e 16 vezes, na de sorbitol, o que indicou o efeito estabilizador desses agentes (Pazhang *et al.*, 2015). Diferentes mecanismos podem ser atribuídos ao efeito estabilizador desses dois agentes, incluindo hidratação preferencial, exclusão preferencial da proteína desnaturada e efeito de revestimento (Mehrnejad *et al.*, 2011).

5.1.2 Polipropilenoglicol

A Figura 13 apresenta as atividades de transfrutoseilação obtidas para as células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e *in natura* armazenadas em polipropilenoglicol.

Figura 13- Estabilidade de armazenamento em polipropilenoglicol de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e *in natura*



Fonte: Autora (2025).

Ao observar a Figura 13, os resultados de atividade enzimática, utilizando polipropilenoglicol, são mais baixos comparados aos outros agentes. Fica evidente o decaimento da atividade enzimática ao decorrer do ensaio e ao final de 90 dias, a atividade de transfrutoseilação das células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal, poliuretano e *in natura* armazenadas em polipropilenoglicol foi 70,54 U g⁻¹, 55,76 U g⁻¹ e 70,97 U g⁻¹ respectivamente.

O tempo e condições de armazenamento podem interferir diretamente na atividade enzimática, como afirmado por Piletskaya *et al.*, (2022) em seu estudo com enzimas de solos (hidrolases e oxidoredutases). Interações moleculares entre os agentes estabilizantes e as proteínas no microambiente celular podem ocorrer ao longo do tempo, e alterações nas condições naturais da célula podem causar mudanças estruturais suficientes para causar a perda de função da enzima, diminuindo a atividade catalítica durante o período de armazenamento (Nelson, 2019).

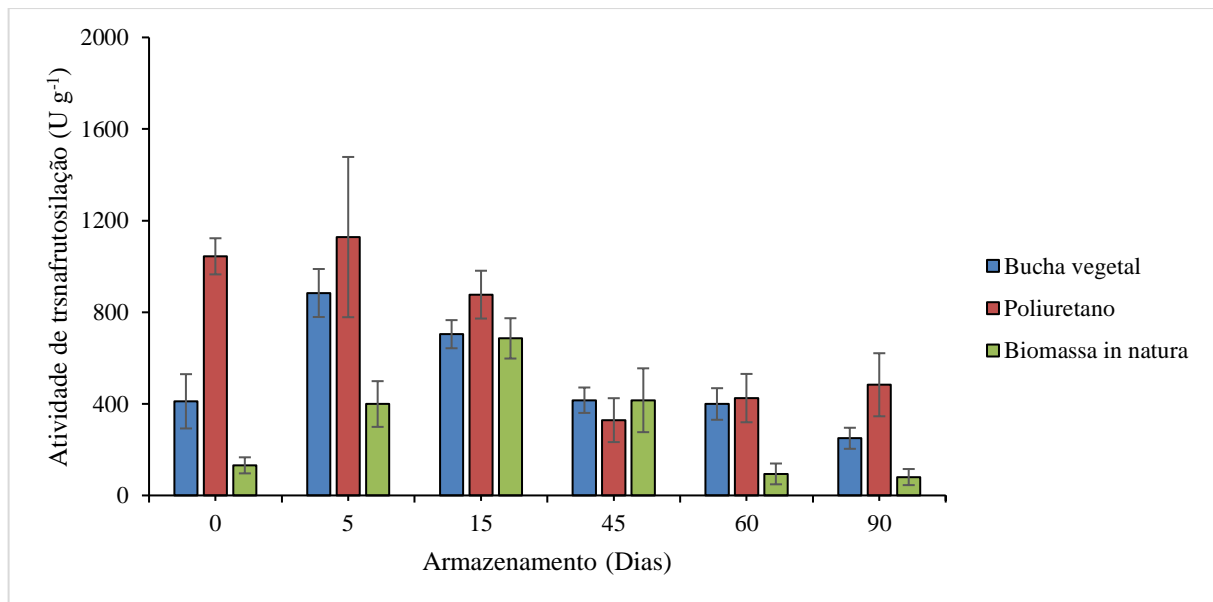
A estrutura enzimática é condicionada à interação com o meio reacional circundante e essa conformação é essencial para a biocatálise, dessa forma, a estabilidade pode ser afetada pela composição do meio, alterando sua estrutura funcional nativa e diminuindo sua eficiência catalítica (Fonseca *et al.*, 2006; Illanes, 2008). Mesmo sendo largamente utilizado pela indústria farmacêutica e alimentícia, liberado pela Food and Drugs Administration- FDA

(Wiegand, 2024), o polipropilenoglicol, nas condições que foi utilizado, não se apresenta como potencial agente estabilizante devido à redução na atividade enzimática das células.

5.1.3 Solução Tampão Tris Acetato 0,2 mol L⁻¹

A Figura 14 apresenta as atividades de transfrutoseilação obtidas para as células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e *in natura* armazenadas em solução tampão Tris Acetato 0,2 mol L⁻¹.

Figura 14- Estabilidade de armazenamento em solução tampão tris acetato 0,2 mol L⁻¹ de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e *in natura*



Fonte: Autora (2025).

Observando a Figura 14, a atividade de transfrutoseilação das células de *A. oryzae* IPT-301 *in natura* e imobilizadas em esponja vegetal e poliuretano, mantiveram a estabilidade ao armazenamento por até 15 dias, sem diferença significativa. Após, teve um decréscimo até o 90º dia de ensaio. Ao final, apresentaram valores de 80,25 U g⁻¹, 249,60 U g⁻¹ e 483,33 U g⁻¹ para o biocatalisador *in natura*, imobilizado em esponja vegetal e esponja de poliuretano, na sequência. Para manter a viabilidade e a atividade metabólica dos microrganismos, é essencial manter o pH da solução tampão correspondente (Freiman *et al.*, 2024). Diante disso, sugere-se que o uso de solução tampão pode se tornar uma alternativa promissora para o armazenamento de células biocatalíticas.

A composição e concentração da solução tampão pode afetar significativamente o comportamento de células microbianas, resultando em uma alteração da atividade catalítica e eletroquímica (Dmitrieva *et al.*, 2022) . A concentração de sais na solução cria uma pressão osmótica, devido a atuação de forças iônicas do meio (concentração da solução tampão – 0,2 mol L⁻¹), o que pode ativar mecanismos que provoquem mudanças na membrana celular, afetando a carga superficial das enzimas, levando a uma desaceleração ou aceleração no metabolismo, com maior exposição dos sítios ativos, ocasionando aumento da atividade enzimática (Freiman *et al.*, 2024; Record *et al.*, 1998).

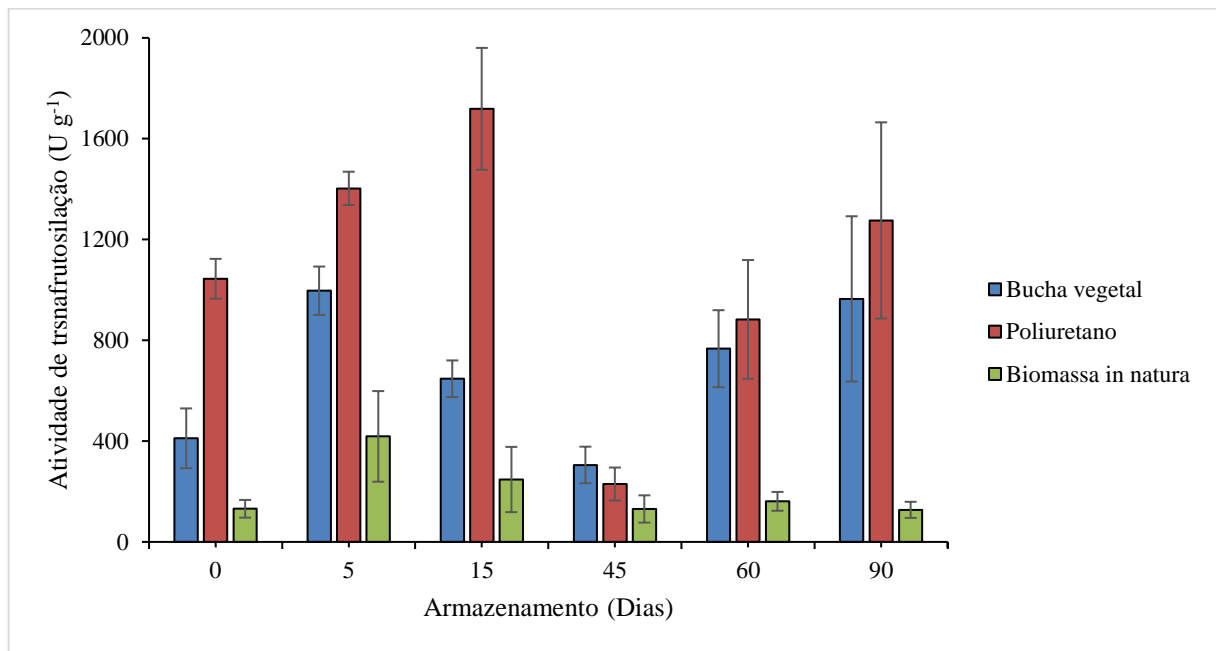
Alguns estudos revelaram resultados positivos quanto ao uso de solução tampão nos ensaios de armazenamento de células biocatalíticas e enzimas. Aranda (2024) reportou que as células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT- 301 imobilizadas em esponja vegetal, mantidas sob refrigeração e em solução tampão tris-acetato pH 6,0 (0,2 mol L⁻¹) exibiram maior estabilidade de armazenamento em comparação com as células armazenadas na ausência de solução tampão, retendo pelo menos 50% de sua atividade inicial até o sétimo dia de estocagem.

Células de *A. oryzae* IPT- 301 imobilizadas em matriz de poliuretano e imobilizadas e reticuladas com glutaraldeído foram armazenadas durante 28 dias sob refrigeração (4 °C) em solução tampão tris-acetato (0,2 mol L⁻¹), pH 5,5, e demonstraram maior estabilidade ao armazenamento durante 7 dias (Barbosa, 2022). No trabalho de Gonçalves *et al.*, (2020), células de *Aspergillus oryzae* IPT- 301 reticuladas com glutaraldeído e encapsuladas em alginato foram armazenadas em solução tampão tris-acetato (0,2 mol L⁻¹) pH 5,5, sob refrigeração (4 °C) e apresentaram estabilidade em até 9 dias, sem perda significativa de atividade.

5.1.4 Armazenamento sem agentes

A Figura 15 apresenta as atividades de transfrutoseilação obtidas para as células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e *in natura* armazenadas na ausência de agentes.

Figura 15- Estabilidade de armazenamento de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, de poliuretano e *in natura*



Fonte: Autora (2025).

Analisando os resultados mostrados na Figura 15, as células de *A. oryzae* IPT- 301 imobilizadas em esponja vegetal e esponja de poliuretano mantiveram atividade ao longo do armazenamento mesmo sem o uso de agentes. A atividade após 90 dias de ensaio foi 964 U g⁻¹ e 1275 U g⁻¹, para esponja vegetal e poliuretano, respectivamente.

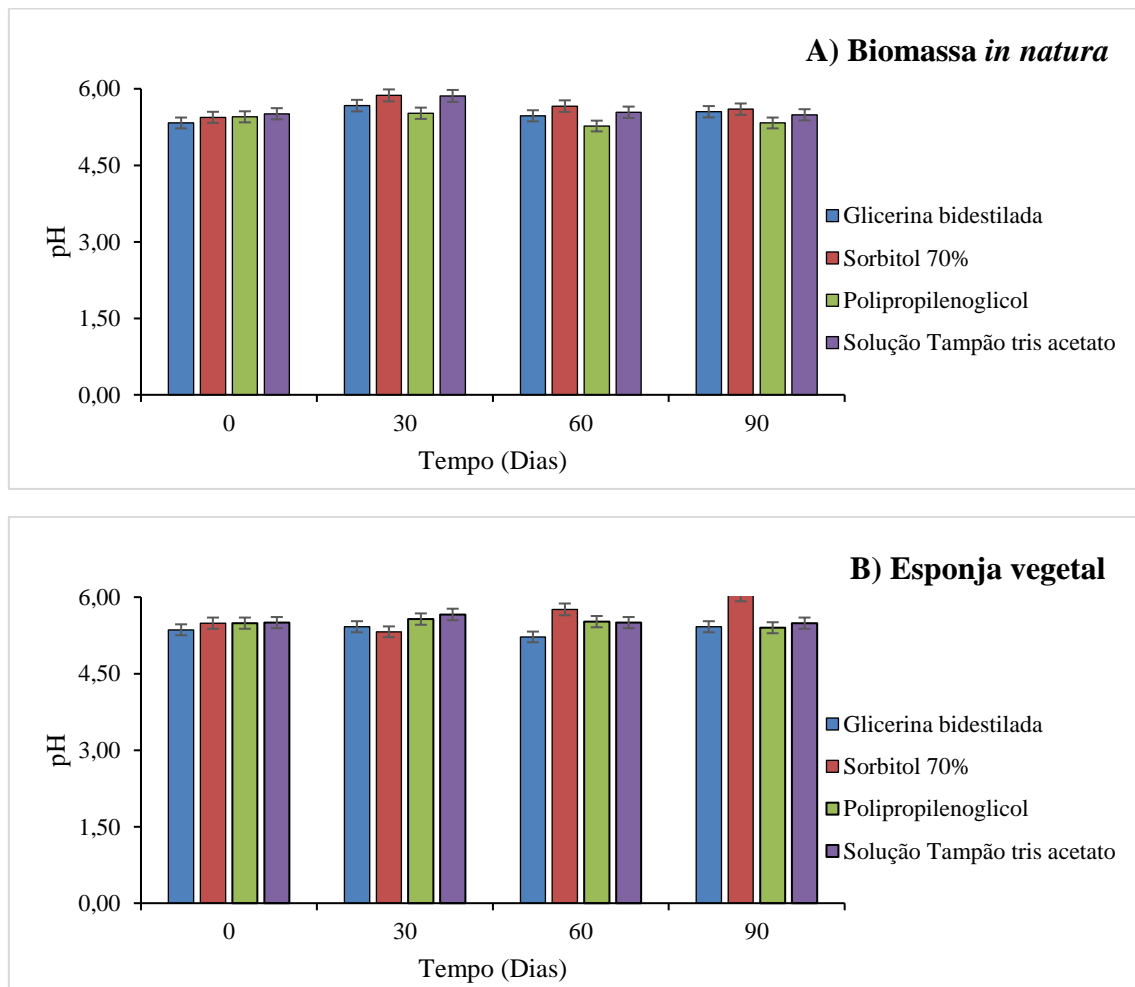
A concentração inicial de células imobilizadas desempenha um papel importante para a manutenção da atividade após o armazenamento (Efremenko; Tatarinova, 2007), podendo ter uma maior ou menor densidade de sítios ativos disponíveis (Saeed; Iqbal, 2013), influenciando na atividade enzimática dos biocatalisadores. A matriz esponja vegetal é natural e não possui padronização do tamanho e volume dos poros, além disso, estudos confirmam a presença de principais elementos como carbono, oxigênio e nitrogênio na superfície da esponja vegetal, o que pode favorecer a adsorção de água, fornecendo condições para o crescimento de microrganismos e sua manutenção (Saeed; Iqbal, 2013; Shahi; Rai; Singh, 2016). As EPU's apresentam elevada área específica com interstícios para o crescimento celular, porosidade uniforme que possibilita a troca gasosa, o fluxo de substrato e produtos metabólicos (Soares, 2012). Esses dados sugerem que o suporte de poliuretano oferece às células biocatalíticas proteção ao exterior, permitindo a atividade enzimática, em decorrência da melhoria do microambiente criado (Bustamante-Vargas *et al.*, 2015).

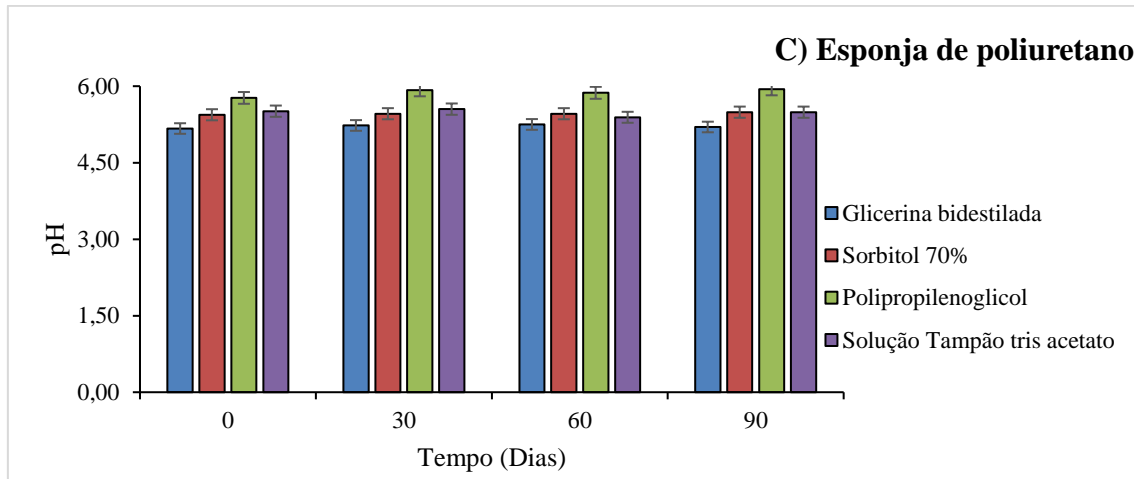
A partir de 15 dias estocadas, as células biocatalíticas *in natura* apresentaram decaimento da atividade de transfrutoseilação, mostrando $130,68 \text{ U g}^{-1}$ em 45 dias, depois disso mantiveram constante até o final do ensaio (90 dias), sem diferença significativa a nível de 5%. Ensaio de estabilidade ao armazenamento realizados com biomassa catalítica *in natura* de *Aspergillus oryzae* IPT- 301 indicaram uma estabilidade de cinco dias (Gonçalves *et al.*, 2020) sob refrigeração ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

5.1.5 pH durante o ensaio de estabilidade ao armazenamento

O pH dos agentes também foi monitorado ao decorrer do ensaio (Figura 16). Os dados revelaram que o pH inicial (5,5) não se alterou ao longo dos 90 dias a um nível de 95% de significância, para todos os agentes estabilizantes.

Figura 16- Monitoramento do pH dos agentes estabilizantes utilizados durante o ensaio de armazenamento de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT estocadas sob refrigeração ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e pH inicial 5,5, durante 90 dias





Fonte: Autora (2025).

Alterações no pH podem afetar a distribuições de carga de proteínas e consequentemente, interações eletrostáticas entre grupos de proteínas, proteína e solvente e entre as moléculas do próprio solvente (Fonseca *et al.*, 2006). Essas mudanças no equilíbrio eletrostático e ligações de hidrogênio podem causar a inativação da enzima (Aranda, 2024). Células biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT- 301 foram acondicionadas em solução tampão tris acetato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) variando o pH de 3,0 – 8,0, durante 24h, sob refrigeração ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e os resultados mostraram maiores atividades de transfrutossilção em faixas de pH entre 5,0 – 8,0 (Cunha *et al.*, 2019). De acordo com Barbosa (2022), células biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas e reticuladas em EPU exibiram maior estabilidade e maiores valores de atividade de transfrutossilção em uma faixa de pH compreendida entre 4,5 – 6,0, com máxima atividade em pH 5,5. Por fim, Aranda (2024) durante ensaio de estabilidade ao pH de células de *A. oryzae* IPT- 301 imobilizadas em esponja vegetal, verificou que os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos para uma faixa de pH compreendida entre 5,0 - 7,0, sendo que no pH 6,0 o biocatalisador apresentou a máxima atividade de transfrutossilção.

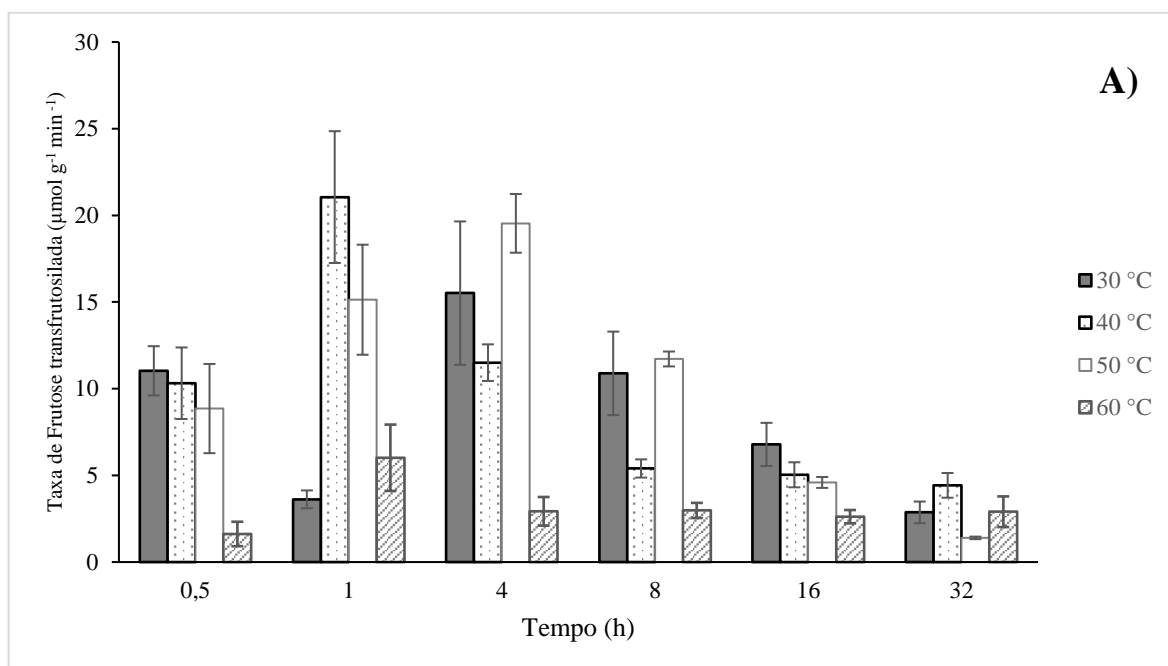
Na literatura também há reportes de faixas ótimas de pH para outras enzimas como o estudo de Batumalaie *et al.*, (2018) em que foi realizada a caracterização biofísica de lipase recombinante de *Acinetobacter haemolyticus*, verificou-se que a enzima mantém sua estrutura, conformação e atividade em faixas de pH 8,0- 12,0, a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo utilizada para uma ampla gama de aplicações. No trabalho de Daronch (2020), lacase de *Trametes versicolor* imobilizadas por aprisionamento em matriz de poliuretano, foram incubadas a diferentes valores de pH durante o ensaio de otimização, utilizando solução tampão citrato-fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e apresentaram maior valor de atividade catalítica sob o pH 4. O presente trabalho corrobora dados da literatura, em que tendo o conhecimento de condições otimizadas de fatores

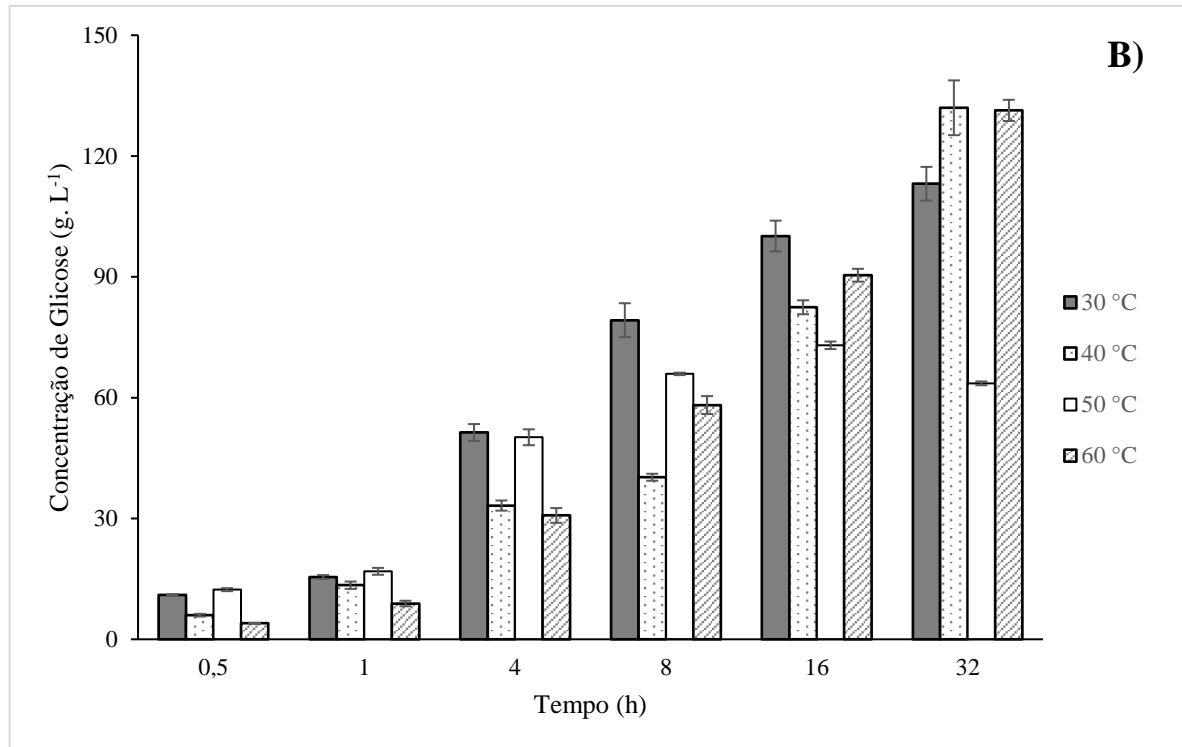
que afetam diretamente a atividade enzimática, como o pH, pode-se então manter a estabilidade do biocatalisador armazenado, possibilitando a sua aplicabilidade industrial, reduzindo custo com estocagem e facilitando processos de produção (Xu *et al.*, 2015).

5.2 ESTABILIDADE TÉRMICA

A Figura 17 apresenta taxas de frutose transfrutossilada (A) e concentração de glicose (B) obtidos durante o ensaio de estabilidade térmica, em que a reação em modo batelada foi conduzida com células biocatalíticas *in natura* sob diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C), durante 32h.

Figura 17- Ensaio de estabilidade térmica com células biocatalíticas *in natura*





Fonte: Autora (2025).

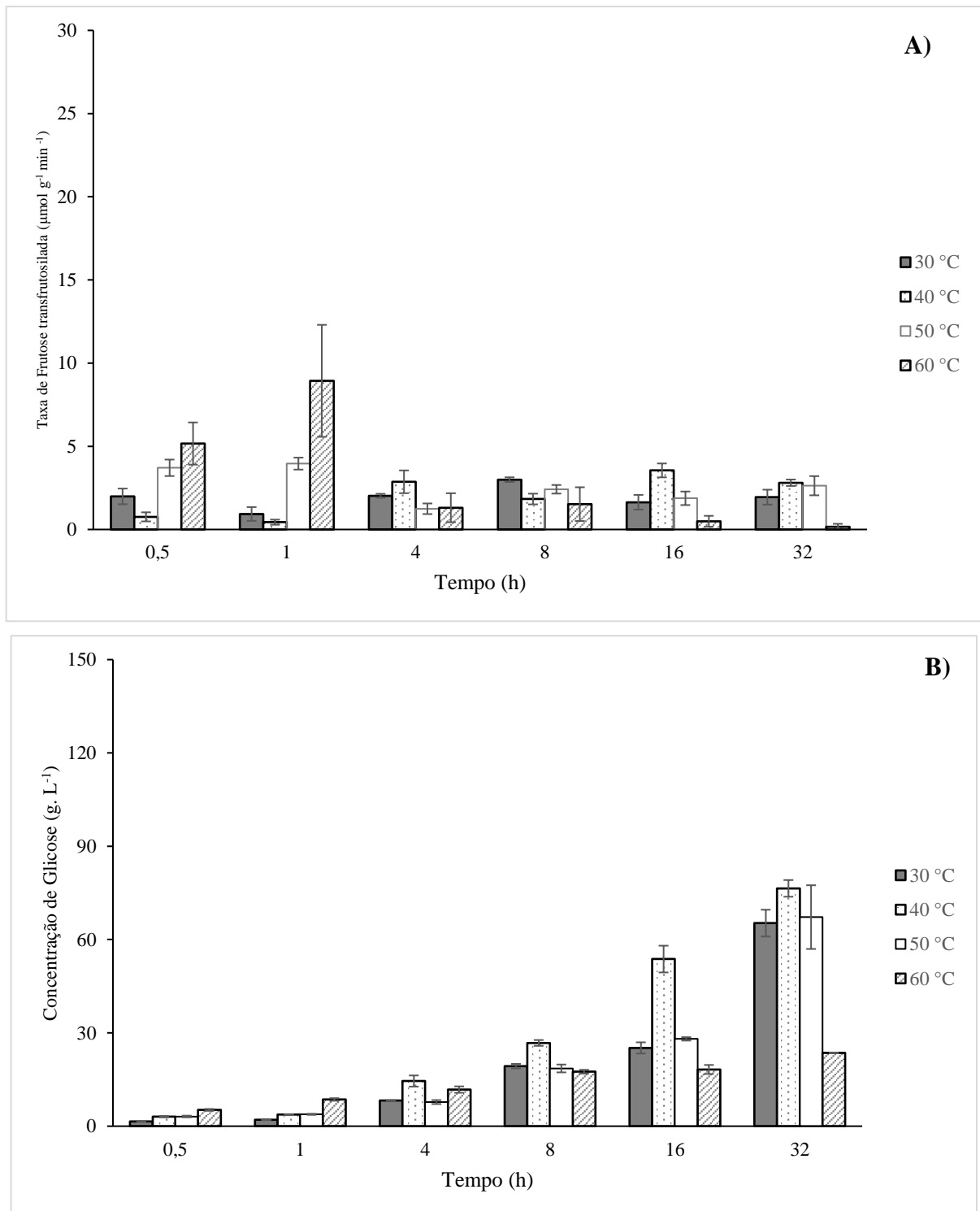
Legenda: A) Taxa de frutose transfrutossilada;
B) Concentração de glicose.

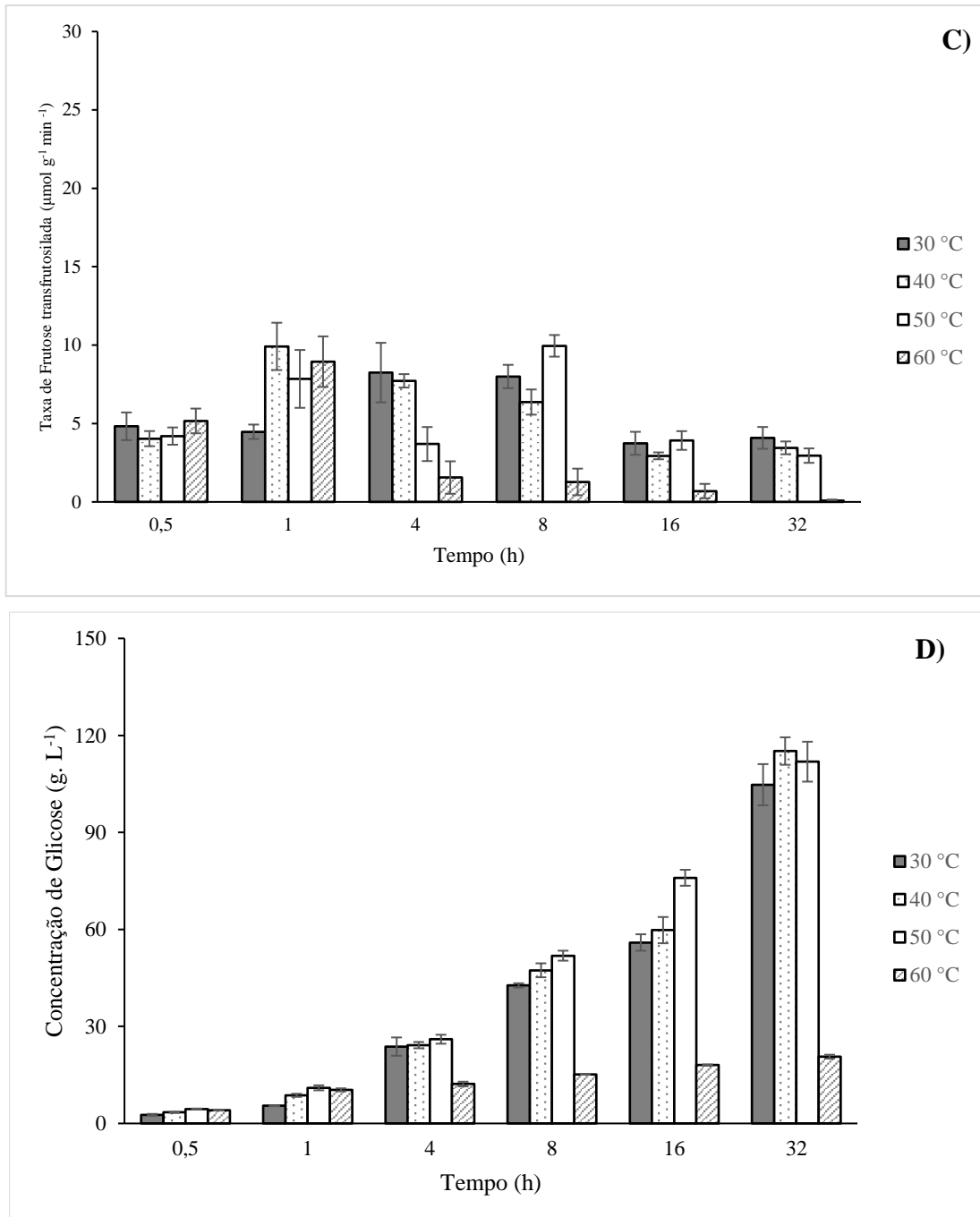
No geral, percebe-se um aumento nas taxas de frutose transfrutossilada até 1h de reação e após, nota-se um decaimento contínuo até o final do ensaio (Figura 17- A), enquanto a concentração de glicose (Figura 17- B) aumenta significativamente no meio. O aumento de ambas as moléculas pode ser devido ao maior tempo de contato entre substrato e complexo enzimático no microambiente celular e temperatura, fatores que levam ao aumento significativo da velocidade de reação (Muchendu, 2024). No entanto, essa mesma reação pode ser afetada pelo aumento de subprodutos no meio que podem se ligar a sítios inativos, alterando a estrutura e consequentemente diminuindo a atividade enzimática (Manikandan; Nagini, 2018), reduzindo assim a transfrutossilagem de moléculas de frutose, observado ao final do ensaio. No trabalho de Gonçalves *et al.*, (2020) células biocatalíticas *in natura* de *Aspergillus oryzae* IPT-301 foram conduzidas sob ensaios do efeito da temperatura do meio reacional na atividade enzimática e apresentaram maior hidrólise da sacarose em temperaturas de 30 °C a 35 °C, e nos ensaios de estabilidade térmica, a biomassa perdeu mais de 50% da atividade em temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C.

Para as temperaturas de 30 °C e 50 °C, a taxa de frutose transfrutossilada obteve maior valor em 4h de reação, sendo 15,516 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ e 19,540 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ respectivamente (Figura 17- A). Já para temperatura de 40 °C, o maior valor de taxa foi apresentado em 1h de

reação ($21,056 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$). Em $60 \text{ }^\circ\text{C}$, as taxas foram as menores, apresentando em 1h de reação $6,018 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$. Ressalta-se que, em temperaturas mais elevadas as enzimas aderidas às células microbianas podem sofrer desnaturação térmica, cujas interações moleculares que mantêm o equilíbrio de forças da proteína nativa (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de *van der Waals*) são interrompidas, o que afeta a estrutura tridimensional da enzima impactando sua atividade catalítica (Araújo *et al.*, 2022; Barbosa, 2022).

A concentração de glicose (Figura 17-B) mostrou um aumento gradativo ao longo do ensaio, em todas as temperaturas, o que era esperado, já que a reação ocorreu em modo batelada, em um sistema fechado, isto é, não haveria perda de glicose durante a reação, em um reator operando em modo batelada, não há entrada e nem saída de reagentes ou produtos quando a reação está ocorrendo (Fogler, 2012). Além disso, a enzima frutossiltransferase faz a clivagem das moléculas de sacarose, transferindo moléculas de frutose e levando a formação de frutooligossacarídeos, liberando moléculas de glicose no meio (Cunha *et al.*, 2019; Maiorano *et al.*, 2020; Santos, 2024) aumentando o acúmulo com o tempo.

Figura 18- Ensaio de estabilidade térmica com células biocatalíticas



Fonte: Autora (2025).

Legenda: A) Taxa de frutose transfrutossilada de células imobilizadas em esponja vegetal;

B) Concentração de glicose de células imobilizadas em esponja vegetal;

C) Taxa de frutose transfrutossilada de células imobilizadas em esponja de poliuretano;

D) Concentração de glicose de células imobilizadas em esponja de poliuretano.

Embora os perfis observados na Figura 18- (A,C) sejam semelhantes ao apresentado na Figura 17- A, percebe-se que os valores para taxa de frutose transfrutossilada obtida durante o ensaio com células biocatalíticas imobilizadas em suportes orgânicos, foram menores comparados aos obtidos com a biomassa *in natura*. Mesmo utilizando aproximadamente a mesma quantidade em massa de células biocatalíticas imobilizadas, a matriz de esponja vegetal

não possui padronização do tamanho e volume dos poros, portanto, a massa de células imobilizadas pode-se diferenciar e conseqüentemente, ter uma maior ou menor densidade de sítios ativos disponíveis, implicando na diminuição dos valores (Saeed; Iqbal, 2013).

Observando a Figura 18- A, nas temperaturas de 30 °C os maiores valores de taxa de frutose transfrutossilada foram 2,996 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ em 8h, e em 40 °C foi 3,350 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ em 16h de reação. Para as temperaturas de 50 °C e 60 °C, os maiores valores foram em 1h de reação, sendo 3,959 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ e 8,934 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente. Assim como aconteceu com as células biocatalíticas *in natura*, o aumento da temperatura favorece o aumento da energia cinética das moléculas, levando a colisões intermoleculares mais frequentes, e uma reação mais rápida, como observado em 50 °C e 60 °C, em 1h de reação (Muchendu, 2024). No entanto, temperaturas excessivamente altas podem levar à degradação do biocatalisador e vias de reação alteradas, resultando em rendimentos reduzidos e subprodutos indesejados (Rao; Prasad, 2022).

Já na Figura 18- C, para biomassa catalítica imobilizada em esponja de poliuretano, observa-se que as taxas de frutose transfrutossilada são em 30 °C 8,247 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ durante 4h de reação, em 40 °C 9,918 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, em 50 °C 7,845 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ e por fim em 60 °C 8,945 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, todos em 1h de reação. Esse comportamento se ajusta com a literatura, mostrando que em temperaturas amenas, como 30 °C, a reação leva um certo tempo para ter seu valor máximo de taxa, e em temperaturas mais elevadas como 60 °C, o valor maior mostra que a reação foi mais acelerada, porém ao final de 32h, foi a taxa de frutose transfrutossilada mais baixa (0,09 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$), demonstrando possível desnaturação do biocatalisador (Shuler; Kargi, 2002). No trabalho de Barbosa (2022) células biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT- 301 imobilizadas em esponja de poliuretano foram submetidas a ensaios de influência da temperatura do meio reacional na atividade enzimática e os resultados mostraram que, os maiores valores foram obtidos em 50 °C e após, houve um decaimento significativo na atividade catalítica.

Novamente a concentração de glicose mostrou aumento (Figura 18- C e D) expressivo, simultaneamente ao decaimento da taxa de frutose transfrutossilada, ao longo de 32h de reação para células imobilizadas em esponja vegetal e de poliuretano. Isso mostra que a partir de certas concentrações de subprodutos no meio reacional, nesse caso a glicose sendo um desses subprodutos da hidrólise da sacarose, a eficiência da atividade catalítica da frutossiltransferase pode ser afetada de maneira significativa, devido as condições do meio se tornarem estressantes para a enzima no microambiente celular (Illanes, 2008). Temperaturas mais altas podem

acelerar as taxas de reação, levando ao aumento da formação de subprodutos, em um reator em lote, a formação de produtos residuais intermediários aumenta com a temperatura, muitas vezes superando o rendimento desejado do produto (O' Reilly, 2002).

5.3 PERFIL DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Na Figura 19, são apresentados os resultados obtidos durante o ensaio em modo batelada, durante 32h, em temperatura de 50 °C, concentração inicial de sacarose em 473 g L⁻¹, variando a concentração de glicose em 0%, 2,5%, 10% e 15% (m m⁻¹) no meio reacional, utilizando células biocatalíticas *in natura* de *Aspergillus oryzae* IPT-301. Percebe-se que os perfis de concentração, no geral, são os mesmos, em que ao longo da reação há a diminuição da concentração de sacarose e aumento na concentração de glicose e frutooligossacarídeos, formados principalmente por nistose e kestose (APÊNDICE B).

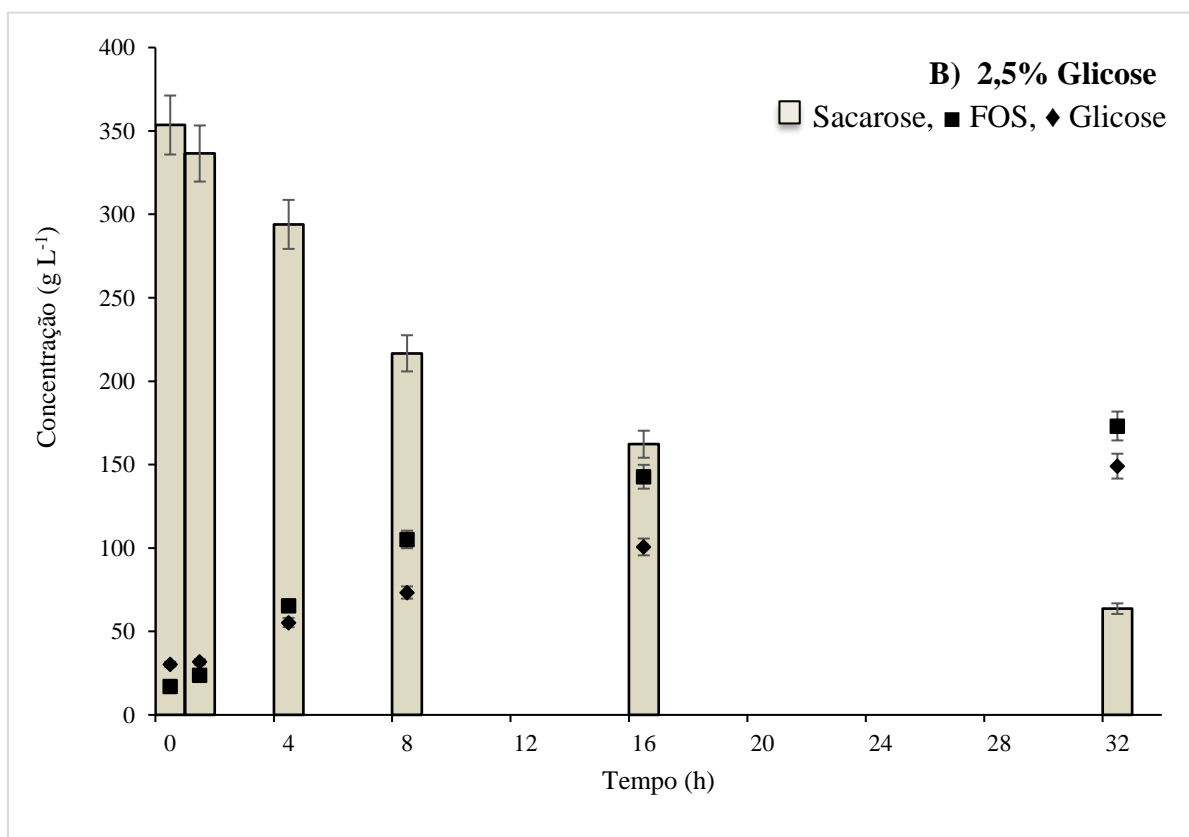
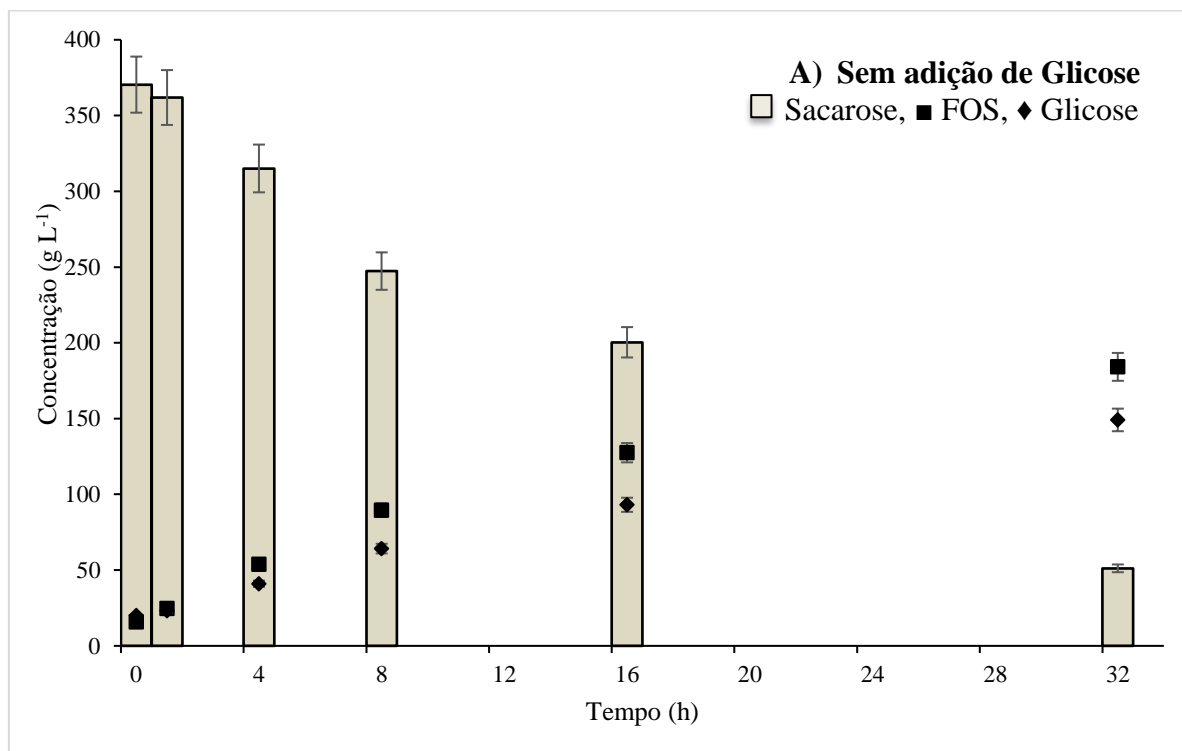
Quando não há adição de glicose no meio reacional, ao final do ensaio há 51,17 g L⁻¹ de sacarose (Figura 19- A), 149,109 g L⁻¹ de glicose e 184,13 g L⁻¹ de FOS. Considerando que no início a concentração de sacarose era 473 g L⁻¹, esses valores indicam o uso da sacarose como substrato para produção de FOS, pela atividade de transfrutossilacção das enzimas frutossiltransferase presentes oriundas do *Aspergillus oryzae* IPT-301. A molécula de sacarose é constituída por uma molécula de frutose e uma de glicose, e sua redução no meio reacional mostra a hidrólise da sacarose (Choukade; Kango, 2021).

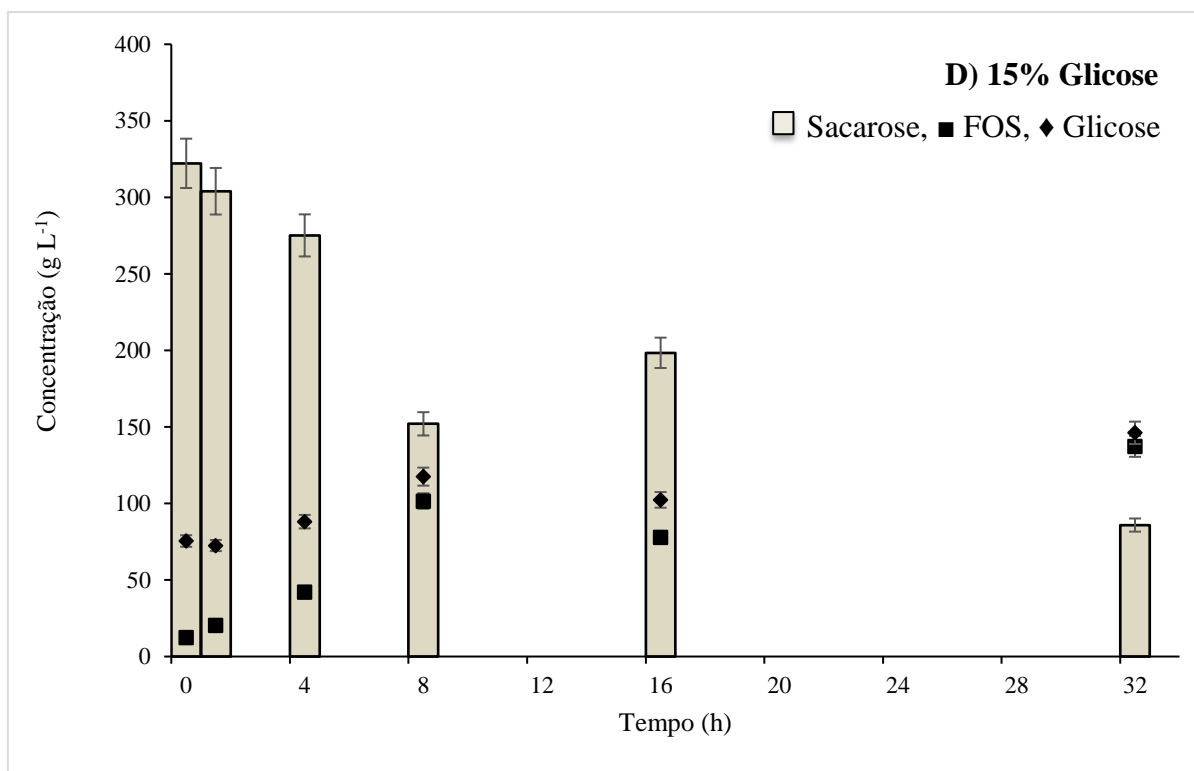
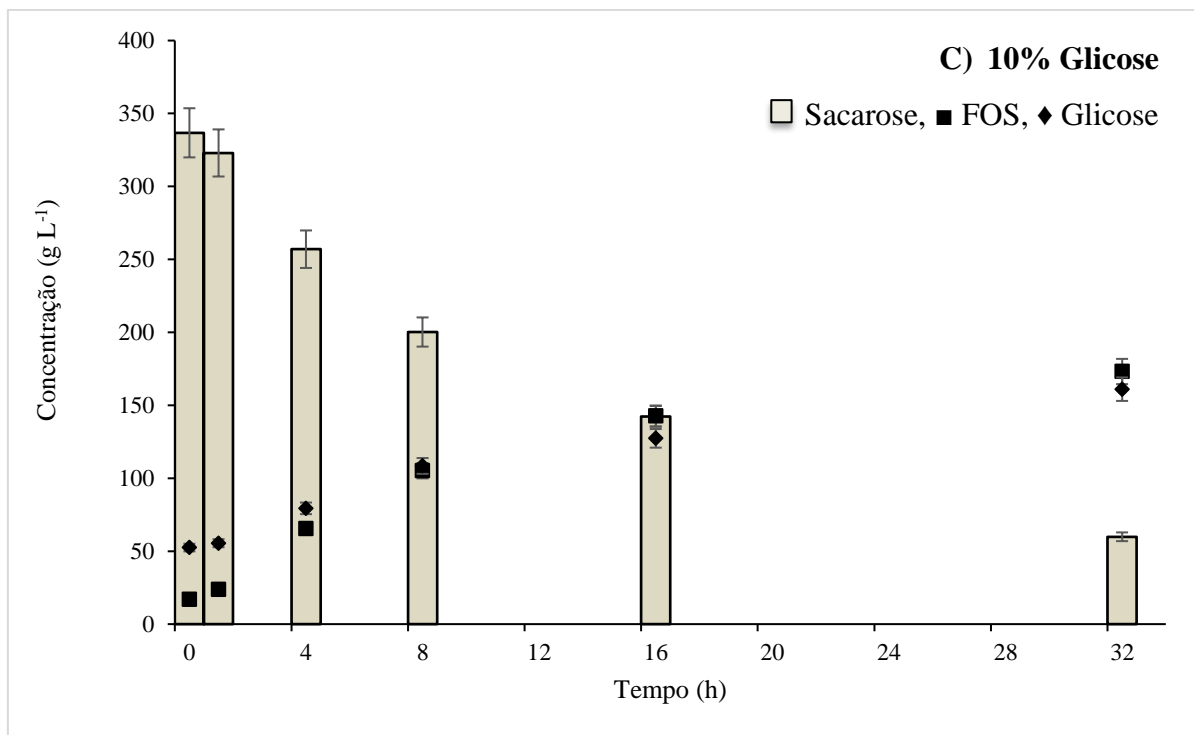
A adição de glicose no meio, não influenciou significativamente na hidrólise de sacarose, mas sim na produção de frutooligossacarídeos, a Tabela 1 mostra a concentração de sacarose, glicose e FOS ao final de 32h de reação com células biocatalíticas *in natura*, variando a adição de glicose no meio reacional.

Tabela 1- Concentração de substrato, produto e subproduto ao final de 32h de reação.

Adição de Glicose (%)	Concentração (g L ⁻¹)		
	Sacarose	Glicose	FOS
0	51,17	149,109	184,13
2,5	63,675	149,08	173,16
10	59,88	161,05	180,9
15	85,898	146,16	137,34

Fonte: Autora (2025).

Figura 19- Perfil de inibição enzimática com células biocatalíticas *in natura*



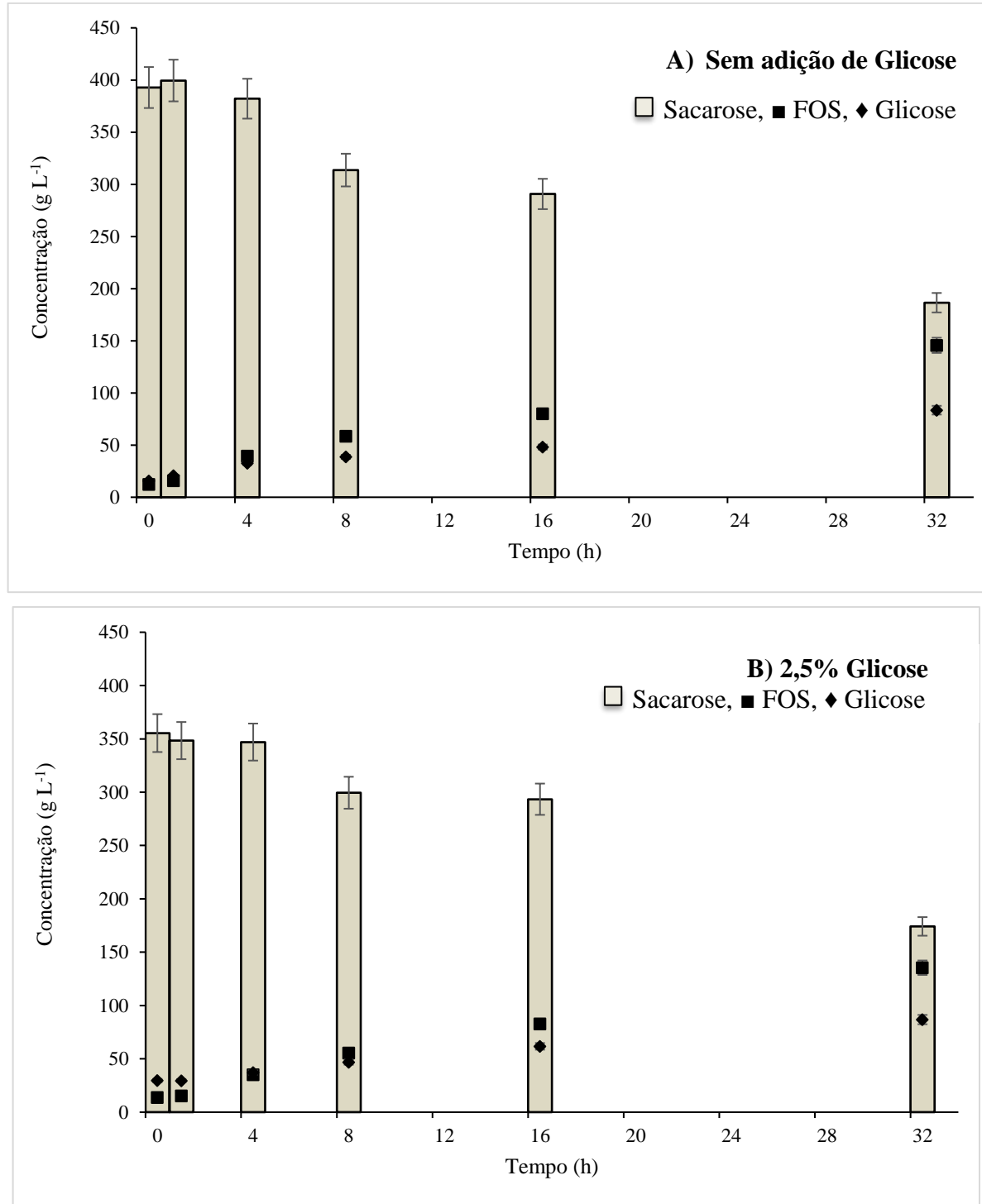
Fonte: Autora (2025).

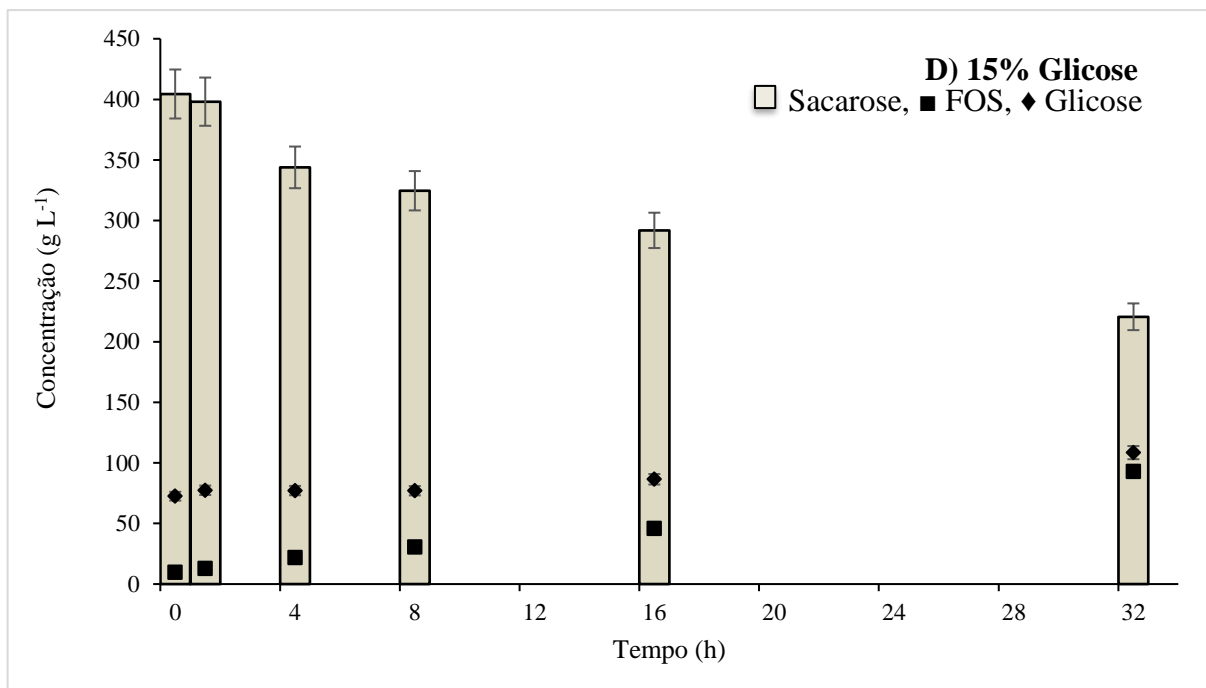
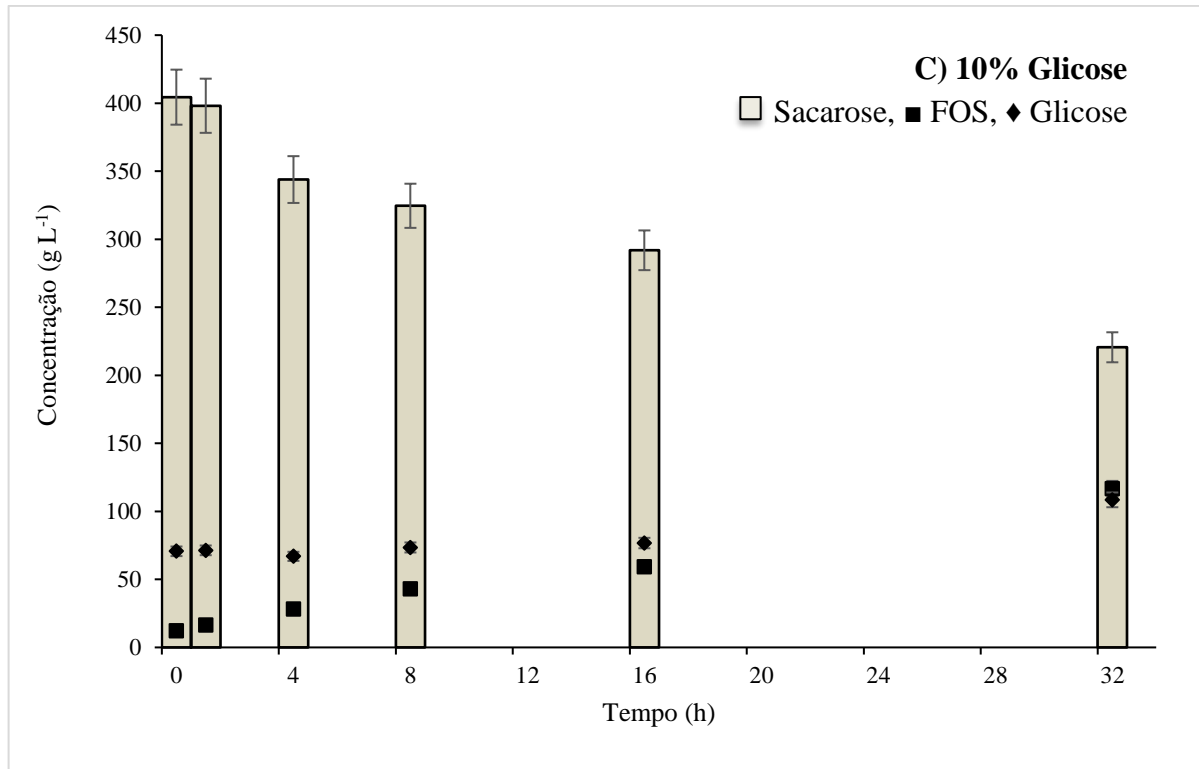
Percebe-se que a concentração de FOS diminuiu em aproximadamente 25%, quando adicionado 15% de glicose (m m^{-1}) ao meio reacional, comparado quando não houve adição. Nesse caso, a hipótese de inibição da atividade enzimática é abordada, porém o mecanismo ainda é desconhecido, sendo necessária maior caracterização da enzima e aplicação de modelos cinéticos. Alguns estudos citam a glicose como inibidor fúngico (Hirayama; Sumi; Hikada, 1989; Yun, 1996), no trabalho de Nishizawa; Nakajima; Nabetani (2001), β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* ATCC 20611, sob condições de 55 °C, pH 6,0, e concentração de 50% de sacarose, foi conduzida a um estudo cinético variando a adição de glicose no meio de 0 mol L⁻¹ a 0,3 mol L⁻¹, e os resultados mostraram que taxas iniciais de transfrutossilação foram afetadas pela adição de glicose significativamente, concluindo por meio de modelos que a transfrutossilação estava sendo inibida por glicose de uma forma não-competitiva.

Após as 32h de reação, os biocatalisadores foram submetidos a uma reação enzimática padrão por 60 min, pH 5,5 e concentração 473 g L⁻¹ de sacarose a 50 °C, mostrando ainda produzir cerca de 49,593 g L⁻¹ de FOS, utilizando o biocatalisador que não teve adição de glicose no meio. Aquele em que foi adicionado 2,5% produziu 47,694 g L⁻¹, em 10% 39,556 g L⁻¹ e em 15% 39,534 g L⁻¹. Isso indica que o biocatalisador não foi desativado durante as 32h de reação, mesmo com adição de glicose.

Na Figura 20, são apresentados os resultados obtidos durante o ensaio em modo batelada, durante 32h, em temperatura de 50 °C, concentração inicial de sacarose em 473 g L⁻¹, variando a concentração de glicose em 0%, 2,5%, 10% e 15% (m m^{-1}) no meio reacional, utilizando células biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal.

Figura 20- Perfil de inibição enzimática com células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal





Fonte: Autora (2025).

Ao observar a Figura 20, nota-se o mesmo comportamento em relação a células biocatalíticas *in natura*, em que ocorre a hidrólise da sacarose e sua concentração diminui no meio reacional ao longo da reação. Também há o aumento gradual da concentração de glicose e FOS, constituído por nistose e kestose (APÊNDICE B). Após o cultivo, os biocatalisadores foram submetidos a uma atividade enzimática padrão por 60 min, pH 5,5, concentração de 473 g L⁻¹ de sacarose a 50 °C, e mostraram produção de 68,386 g L⁻¹ de FOS.

Ao final do ensaio, quando não houve adição de glicose no meio, a concentração de sacarose mostrou valor de 186,511 g L⁻¹, de glicose 83,455 g L⁻¹ e de FOS 145,65 g L⁻¹. Esses valores são menores, comparados aos resultados das células de *A. oryzae* IPT- 301 *in natura* (Figura 19), indicando possivelmente menor concentração de biomassa ativa após a imobilização em esponja vegetal, assim como os resultados de estabilidade térmica (item 5.2) também demonstrou. A esponja vegetal vem sendo estudada como matriz de suporte para imobilização de células biocatalíticas, mostrando aumento de termoestabilidade (Aranda, 2024) e estabilidade operacional (Oluwaseun; Fredik; Anthony, 2023).

Quando acrescido de glicose no meio, o perfil de concentração ainda manteve o mesmo, novamente mostrando redução na produção de FOS, quando variando a porcentagem (Tabela 2). Isso indica que o aumento da concentração de glicose no meio pode ter inibido a atividade de transfrutossilação. No trabalho de Chuankhayan *et al.*, (2010) foi realizada a cristalização da frutossiltransferase de *Aspergillus japonicus* sendo possível a identificação do mecanismo catalítico e reconhecimento de substrato dessa enzima em questão, mostrando que após a clivagem da sacarose no bolso do sitio ativo, a molécula de frutose fica retida no fundo não havendo espaço para sair diretamente do bolso sem a saída da molécula de glicose, ou seja, o acúmulo de glicose no sítio ativo impede que haja a transferência de moléculas de frutose para outro substrato receptor, diminuindo a produção de frutooligossacarídeos.

Tabela 2- Concentração de substrato, subproduto e produto ao final de 32h de reação

Adição de Glicose (%)	Concentração (g L ⁻¹)		
	Sacarose	Glicose	FOS
0	186,511	83,455	145,65
2,5	174,158	86,806	135,42
10	220,598	108,46	116,57
15	266,687	108,45	92,969

Fonte: Autora (2025).

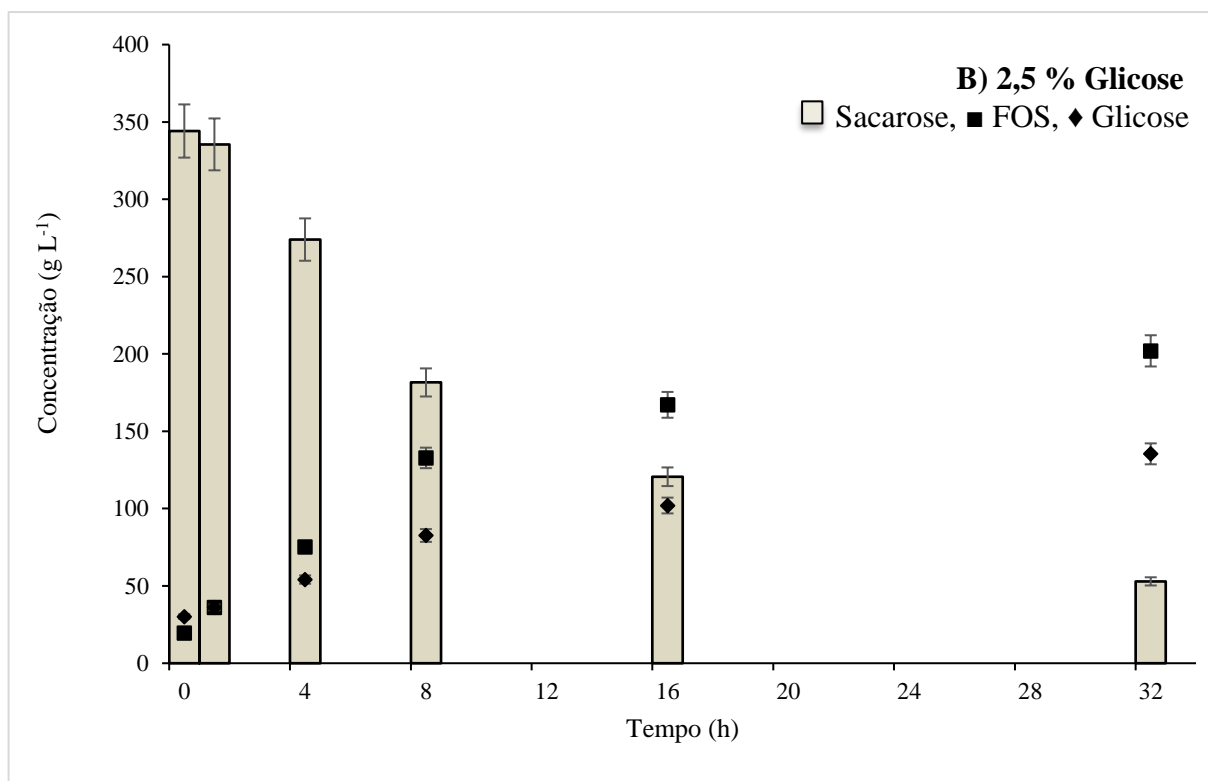
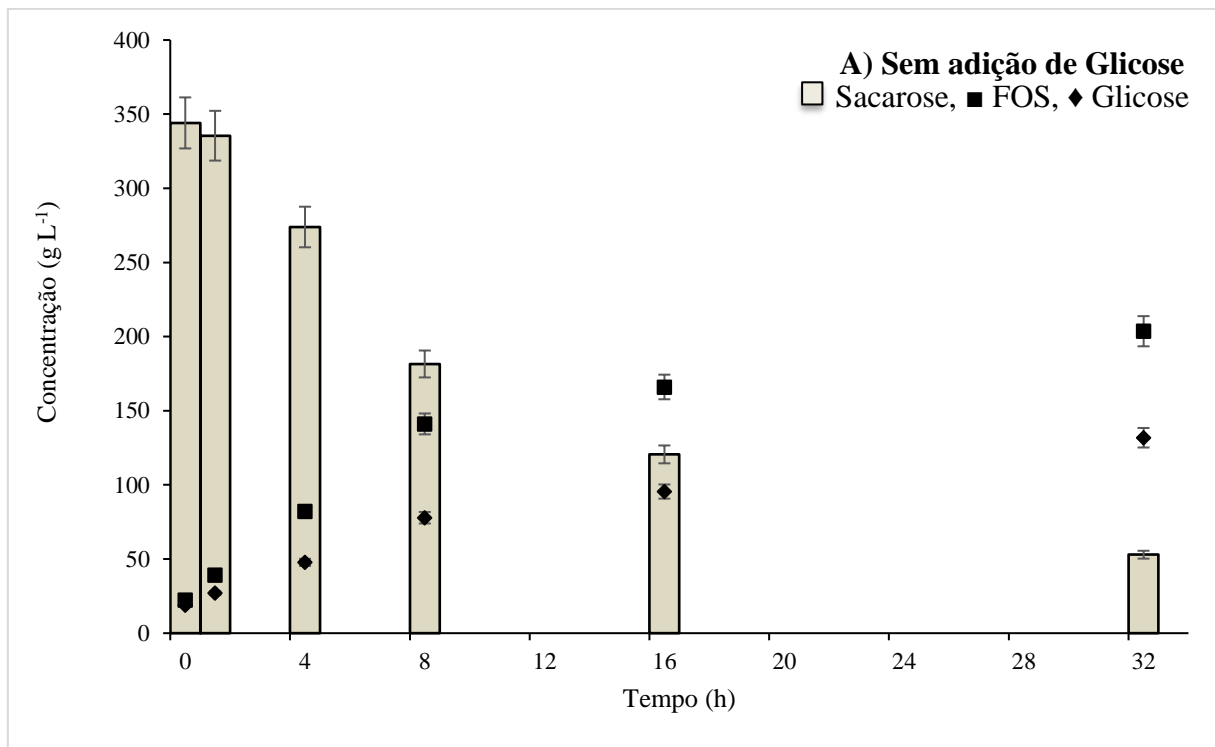
Após as 32h de reação, os biocatalisadores foram submetidos a uma reação enzimática padrão por 60 min, pH 5,5 e concentração 473 g L⁻¹ de sacarose a 50 °C, os resultados mostram que não houve desativação completa, mas redução de cerca de 50% da produção inicial (0% de glicose, 33,43 g L⁻¹, 2,5% de glicose 31,048 g L⁻¹, 10% 37,932 g L⁻¹ e 15% 30,277 g L⁻¹).

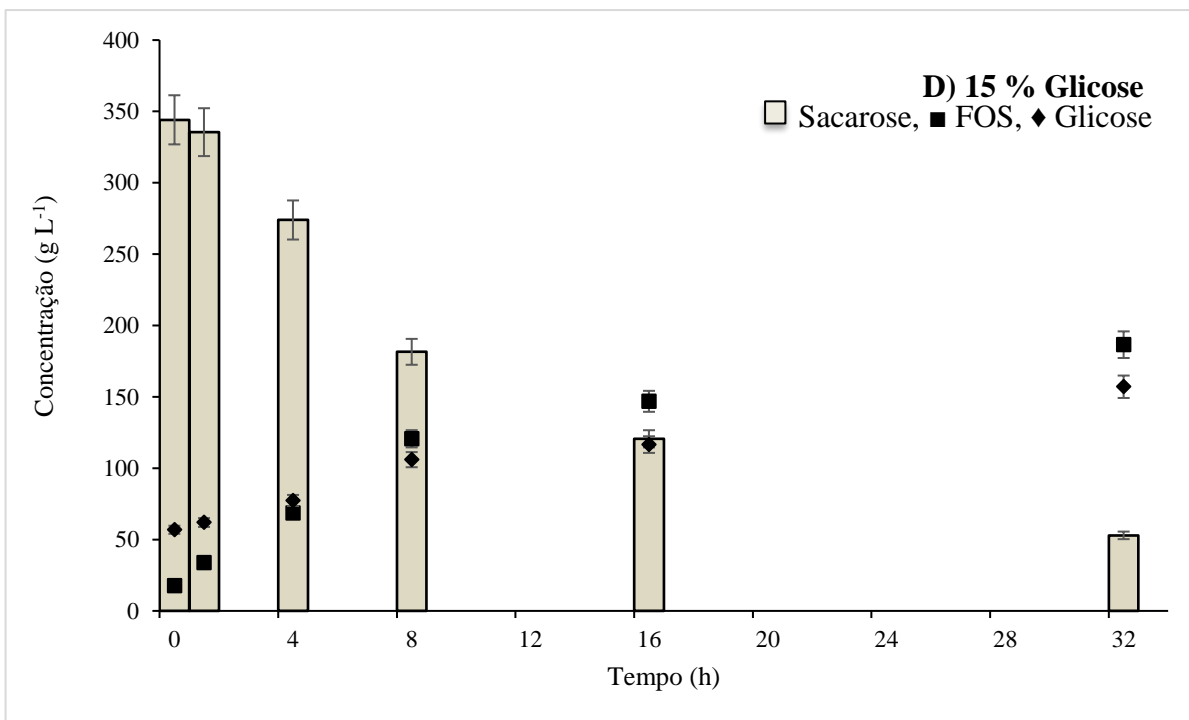
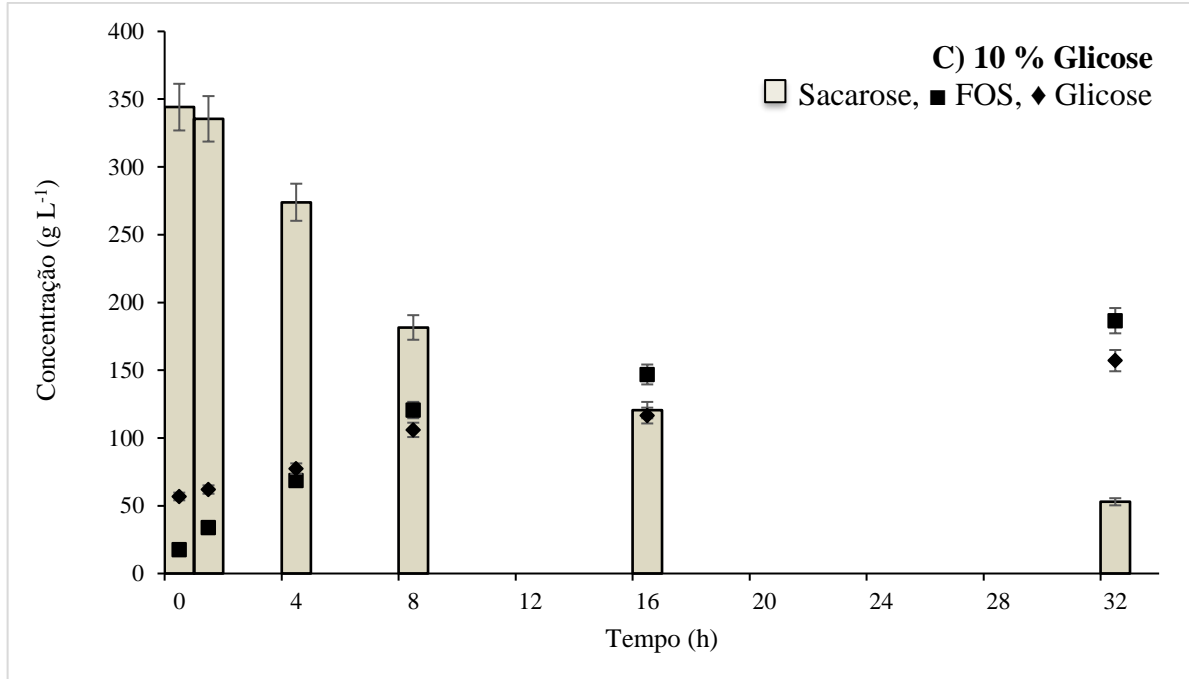
Na Figura 21, são apresentados os resultados obtidos durante o ensaio em modo batelada, durante 32h, em temperatura de 50 °C, concentração inicial de sacarose em 473 g L⁻¹, variando a concentração de glicose em 0%, 2,5%, 10% e 15% (m m⁻¹) no meio reacional, utilizando células biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja de poliuretano.

O perfil de concentração de reagente ainda se mantém o mesmo, comparado ao obtido com células biocatalíticas *in natura* e imobilizadas em esponja vegetal. O decaimento da concentração de sacarose mostra a hidrólise ao longo da reação, e o aumento da concentração de glicose e FOS, é devido a atividade de transfrutossilacção das enzimas presentes no microambiente celular. Após o cultivo, os biocatalisadores foram submetidos a atividade enzimática padrão, durante 60 min, em pH 5.5, concentração inicial de sacarose em 473 g L⁻¹ a 50 °C, e a produção de FOS foi de 73,166 g L⁻¹.

Ao final do ensaio de 32h, a concentração de FOS mostrou 203,64 g L⁻¹, sem adição de glicose no meio. Dos valores obtidos em ensaios com células biocatalíticas *in natura* (184,13 g L⁻¹) e imobilizadas em esponja vegetal (145,65 g L⁻¹), com a esponja de poliuretano foi o maior obtido, sob as mesmas condições. No trabalho de Barbosa (2022) células de *A. oryzae* IPT- 301 imobilizadas em esponja de poliuretano foram conduzidas a ensaio de estabilidade operacional, em que ciclos reacionais consecutivos de 60 min foram realizados, sob condições de pH 5.5, concentração inicial de sacarose 48% (m v⁻¹) a 50 °C, e os resultados mostraram que o maior valor para concentração de FOS foi no 10° ciclo (127,62 g L⁻¹), sendo realizados 12 ciclos.

Figura 21- Perfil de inibição enzimática com células biocatalíticas imobilizadas em esponja de poliuretano





Fonte: Autora (2025).

Ao adicionar 2,5% de glicose no meio reacional, a concentração de FOS obtida pelas células biocatalíticas imobilizadas em poliuretano, não diferem significativamente ($p > 0,05$) de quando não há adição de glicose. Percebe-se que ao adicionar 10% e 15% de glicose no meio reacional, houve a formação de um ponto de inflexão em 8h (Figura 21- C, D) em que a concentração de FOS passa a ser maior que a concentração de glicose. Além disso, no ponto de 16h as concentrações de sacarose, glicose e FOS, tem um desvio médio de $12,609 \text{ g L}^{-1}$ e $1,785 \text{ g L}^{-1}$, próximo de um ponto médio entre substrato e produtos.

Após as 32h de reação, os biocatalisadores foram submetidos a uma reação enzimática padrão por 60 min, pH 5,5 e concentração 473 g L^{-1} de sacarose a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, os resultados mostram que não houve desativação em 0%, 2,5% e 10% de adição de glicose ($85,974 \text{ g L}^{-1}$, $90,109 \text{ g L}^{-1}$ e $76,708 \text{ g L}^{-1}$), valores de FOS para os respectivos biocatalisadores utilizados (Tabela 3).

Tabela 3- Concentração de substrato, subproduto e produto ao final de 32h de reação

Adição de Glicose (%)	Concentração (g L^{-1})		
	Sacarose	Glicose	FOS
0	249,653	55,346	85,974
2,5	258,387	57,664	90,109
10	273,623	50,26	76,708
15	239,631	38,114	53,522

Fonte: Autora (2025).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a estabilidade bioquímica de células de *Aspergillus oryzae* IPT 301, imobilizadas em esponja vegetal e espuma de poliuretano, por cultivo celular submerso em meio de cultura sintético, frente ao armazenamento, a variações de temperatura e variações de concentração de glicose no meio reacional.

Por meio do monitoramento da atividade de transfrutossilagem durante 90 dias, a biomassa catalítica *in natura*, imobilizada em esponja vegetal e poliuretano apresentou maior estabilidade quando estocadas em sorbitol 70% v v⁻¹ pH 5,5, sob refrigeração (4°C), sendo 100,16 U g⁻¹, 1079,41 U g⁻¹ e 1271,86 U g⁻¹ de atividade para os biocatalisadores em sequência.

Os ensaios de estabilidade térmica mostraram perfis semelhantes em que a taxa de frutose transfrutossilada aumenta em 1h de reação e após, decai ao decorrer das 32h de experimento, simultaneamente, a concentração de glicose aumenta gradativamente do início ao final do ensaio. Os resultados mostraram menor termoestabilidade na temperatura de 60 °C, com menores valores de taxa de frutose transfrutossilada

O perfil de inibição enzimática foi obtido em função de 32h de reação em modo batelada, em que a concentração de FOS foi de 184,13 g L⁻¹, 145,65 g L⁻¹ e 203,64 g L⁻¹, utilizando a biomassa *in natura*, imobilizada em esponja vegetal e poliuretano, respectivamente, sem adição de glicose no meio reacional. Percebeu-se que após as 32h de reação, os biocatalisadores não eram desativados, mas diminuíram a atividade catalítica.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade deste trabalho, são propostas as seguintes sugestões:

- Caracterização da estrutura e cristalização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301, para melhor entendimento dos sítios ativos e ligações com substrato;
- Proposição de modelos de velocidade de reação enzimática, com inibição, que se ajustem aos dados experimentais para estimativa dos parâmetros cinéticos.

REFERÊNCIAS

- ADRIANO, L. S., DIONÍSIO, A. P., ABREU, F. A. P.D., CARIOCA, A. A. F., ZOCCOLO, G. J., Wurlitzer, N. J. Yacon syrup reduces postprandial glyceic response to breakfast: A randomized, crossover, double-blind clinical trial. **Food Research International**, [s. l.], v. 126, p. 108682p.dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108682>. Acesso em: 24 ut. 2024.
- ANJUM, F.; RISHI, V.; AHMAD, F. Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 1476, n. 1, p. 75-84, jan. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00215-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00215-0). Acesso em: 10 set. 2024.
- ANTOŠOVÁ, M.; ILLEOVÁ, V.; VANDÁJOVÁ, M.; DRUZKOVSKÁ, A.; POLAKOVIC, M.. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 135, p. 58-63, maio 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.02.016>. Acesso em: 03 out. 2024.
- AL-NAJADA, A. R.; ALMULAIKY, Y. Q.; ALDHAHRI, M.; EL-SHISHTAWY, R. M.; MOHAMED, A.; BAESHEN, M.; AL-FARGA, A.; ABDULAAL, W. H.; AL-HARBI, S. A. Immobilisation of α -amylase on activated amidrazone acrylic fabric: a new approach for the enhancement of enzyme stability and reusability. **Scientific reports**, [s.l.], v. 9, p. 12672, set. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-49206-w>. Acesso em: 15 set. 2024
- ARANDA, A. I. **Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja vegetal para a síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos**. 2024. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2024.
- ARAÚJO, I.M.; BECALETTE, P.C.; SILVA, E.S.; DIAS, G.S.; XAVIER, M.C.A.; ALMEIDA, A.F.; MAIORANO, A.E.; MORALES, S.A.V.; PERNA, R.F. Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s.l.], v. 98, n. 2, p. 419-430, nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.7255>. Acesso em: 28 set. 2024
- ATES, M.; KARADAG, S.; EKER, A. A.; EKER, B. Polyurethane foam materials and their industrial applications. **Polymer International**, [s.l.], v. 71, n. 10, p. 1157-1163, ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pi.6441>. Acesso em: 23 out. 2024.
- BALLESTEROS-MÁRTINEZ, A. L.; PÉREZ-CERVERAB, C.; ANDRADE-PIZARROA, R. Effect of glycerol and sorbitol concentrations on mechanical, optical, and barrier properties of sweet potato starch film. **NFS Journal**, [s.l.], v. 20, p. 1-9, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.06.002>. Acesso em: 20 jul. 2024.
- BARBOSA, N. R. **Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja de poliuretano para a produção enzimática de fruto-oligossacarídeos**. 2023. 92 f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2022.

BATUMALAIE, K.; KHALILI, E.; MAHAT, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. Biophysical characterization of a recombinant lipase KV1 from *Acinetobacter haemolyticus* in relation to pH and temperature. **Biochimie**, [s.l.], v. 152, p. 198-210, set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.011>. Acesso em: 15 jan. 2025.

BELMONTE-IZQUIERDO, Y.; SALOMÉ-ABARCA, L. F.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C.; LÓPEZ, M. G. Fructooligosaccharides (FOS) production by microorganisms with fructosyltransferase activity. **Fermentation**, [s.l.], v. 9, n. 11, p. 968, nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation9110968>. Acesso em: 15 jan. 2025.

BRAHAM, S. A.; SIAR, H.; ARANA-PEÑA, S.; BAVANDI, H.; CARBALLARES, D.; MORELLON-STERLING, R. Positive effect of glycerol on the stability of immobilized enzymes: Is it a universal fact? **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 102, p. 108-121, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.12.015>. Acesso em: 02 dez. 2024.

BHARDWAJ, S.; MISHRA, A.; GHOSH, D.; SINHA, A. K. Magnetically separable spent coffee grounds as a potential novel support for the covalent immobilization of β -glucosidase for cellobiose hydrolysis. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, [s.l.], v. 99, n. 9, p. 1984-1995, jul. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.7700>. Acesso em: 27 jan. 2025.

BOBBIO, F.O; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2005.

BOLINA, I. C. A. **Preparação e caracterização de biocatalisadores heterogêneos para a produção de biolubrificante**. 2020. 158 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2020.

BOUHNİK, Y. Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. **Nutrition and Cancer**, [s.l.], v. 26, n.1, p. 21-29, jan. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01635589609514459>. Acesso em: 27 jan. 2025.

BRENA, B.; GONZÁLEZ- POMBO, P. BATISTA- VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey: **Immobilization of Enzymes and Cells**. Springer Protocols. 3º Edição. 2013.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; OLIVEIRA, D.; NYARI, N. L. D.; VALDUGA, E.; SOARES, M. B. A.; BACKES, G. T.; DALLAGO; R. M. In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 122, p. 35-43, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.009>. Acesso em: 13 dez. 2024.

CALARGÜN, A. A.; GIRGIN, B.; TUGRUL, N. Investigation of glycerol and sorbitol effect to the cinnamon essential oil incorporated corn or rice starch based edible films. **Indian Journal of Chemical Technology**, [s.l.], v. 31, p. 531-537, nov. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.56042/ijct.v31i4.1470>. Acesso em: 17 dez. 2024.

CARDOSO, M. F. M. **Implementação de reator de leito fixo empacotado com células de *Aspergillus oryzae* IPT - 301 imobilizadas em esponja de poliuretano para a produção enzimática de fruto-oligossacarídeos.** 2023. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2023.

CASTRO, C.C.; NOBRE, C.; DUPREZ, M. E.; WEIRELD, G.; HANTSON, A. L. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructooligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 118, p. 82–90, fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.011>. Acesso em: 23 dez. 2024.

CHOUKADE, R.; KANGO, N. Production, properties, and applications of fructosyltransferase: a current appraisal. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s.l.], v. 41, n. 8, p. 1178-1193, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1922352>. Acesso em: 23 ago. 2024.

CHEN, W. C.; LIU, C. H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 153-160, fev. 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00099-2). Acesso em: 14 set. 2024.

CHUANKHAYAN P, HSIEH, C. Y., HUANG, Y. C., HSIEH, Y. Y., GUAN, H. H., HSIEH, Y. C., TIEN, Y. C., CHEN, C. D., CHIANG, C. M., CHEN, C. J. Crystal structures of *Aspergillus japonicus* fructosyltransferase complex with donor/acceptor substrates reveal complete subsites in the active site for catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v.285, n.30, p. 23251-23564, jul. 2010. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)60367-2/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)60367-2/fulltext). Acesso em: 15 jan. 2025.

CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; HENRIQUES, R.O.; PINTO, M. C. C.; LORENTE, G. F.; MANOEL, E. A. Production of new nanobiocatalysts via immobilization of lipase B from *C. antarctica* on polyurethane nanosupports for application on food and pharmaceutical industries. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 165, p. 2957-2963, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.179>. Acesso em: 15 jan. 2025.

CORRÊA, A. de C.; LOPES, M. S.; PERNA, R. F.; SILVA, E. K. 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**, [s.l.], v. 323, n. 1, p. 121396, set. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121396> Acesso em: 24 jan. 2025.

CUERVO-FERNÁNDEZ, R.; OTTONI, C. A.; SILVA, E.S.; MATSUARA, R. M. S.; CARTER, J. M.; MAGOSSO, L. R.; WADA, M. A. A.; RODRIGUES, M. F. A.; MARESMA, B. G; MAIORANO, A. E. Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of Ph and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 75, p. 87, maio 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0803-x>. Acesso em: 17 set. 2024.

CUNHA, J. S.; OTTONI, C. A.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E. S. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* ipt-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 36,

n. 2, p. 657-668, jun. 2019. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1822/61706>. Acesso em: 27 out. 2024.

CUNNINGHAM, M.; AZCARATE-PERI, M. A.; BARNARD, A.; BENOIT, V.; GRIMALDI, R.; GUYONNET, D.; HOLSCHER, H. D. Shaping the future of probiotics and prebiotics. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v. 29, n. 8, p. 667-685, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>. Acesso em: 17 jan. 2025.

DAL MASO, S. S. S.; COLET, R., SILVA, L. M.; COMIN, T., VENDRUSCULO, M. D.; HASSEMER, G., VARGAS, C. E. B.. Investigation of Optimal Conditions for Production, Characterization, and Immobilization of Fructosyltransferase and β -fructofuranosidase by Filamentous Fungi. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 11187- 11201, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33263/BRIAC114.1118711201>. Acesso em: 02 fev. 2024.

DARONCH, N. A. **Polyurethane Foam as Matrix for One-Step Laccase Immobilization**. Dissertação. 2020. 94 f. (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DIAS, G.S.; SANTOS, E.D.; XAVIER, M.C.A.; ALMEIDA, A.F.; SILVA, E.S.; MAIORANO, A.E.; PERNA, R.F.; MORALES, S.A.V. 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**, [s.l.], v. 97, n. 10, p. 2904-2911, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.7163>. Acesso em: 08 fev. 2024.

DMITRIEVA, M. V.; FREIMAN, A. S.; SOROKIN, V. V.; TARENT, A. A.; ZOLOTUKHINA, E. V. Peculiarities of using potassium ferricyanide as the mediator for bioanodes based on *Escherichia coli*. **Russian Journal of Electrochemistry**, [s.l.], v. 58, n. 10, p. 885-890, out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1023193522100044>. Acesso em: 03 fev. 2025.

DOU, Y.; YU, X.; LUO, Y.; CHEN, B.; MA, D.; ZHU, J. Effect of fructooligosaccharides supplementation on the gut microbiota in human: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, [s.l.], v. 14, p. 3298, ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu14163298>. Acesso em: 24 jan. 2025.

DRABINSKA, N.; KRUPA-KOZAK, U.; JAROCKA-CYRТА, E. Intestinal permeability in children with celiac disease after the administration of oligofructose-enriched inulin into a gluten-free diet-results of a randomized, placebo-controlled, pilot trial. **Nutrients**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 1–15, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12061736>. Acesso em: 24 jan. 2025.

DZIOŃEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D.; HUPERT-KOCUREK, K.; ADAMCZYK-HABRAJSKA, M.; GUZIK, U. Immobilization of planococcus sp. S5 strain on the loofah sponge and its application in naproxen removal. **Catalysts**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 176, abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal8050176>. Acesso em: 01 fev. 2025.

EFREMENKO, E. N.; TATARINOVA, N. Y. The effect of long-term preservation of bacterial cells immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel on their viability and biosynthesis

of target metabolites. **Microbiology**, [s.l.], v. 76, p. 336-341, jun. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0026261707030113>. Acesso em: 15 jan. 2025.

EULER, A. R., MITCHELL, D. K., KLINE, R., PICKERING, L. K. Prebiotic effect of fructo-oligosaccharide supplemented term infant formula at two concentrations compared with unsupplemented formula and human milk. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 157-164, fev. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15699689/>. Acesso em: 07 jan. 2025.

FOGLER, S. C. **Elements of chemical engineering reactions**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos. **Food Ingredients Brasil**, [s.l.], v. 17, p. 58-65, 2011.

FONSECA, L. C.; CORRÊA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.543-548, jun. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000300024>. Acesso em: 10 dez. 2024.

FREIMAN, A. S.; TALAGAEVA, N. V.; GOR'KOV, K. V.; ZOLOTUKHINA, E. V. Toward effect of butter system composition in dehydrogenase activity of *Escherichia coli* and its electrochemical activity in mediated biode. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 55, p. 103002, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.103002>. Acesso em: 11 dez. 2024.

GANAIIE, M. A.; LATEEF, A.; GUPTA, U. S. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied biochemistry and biotechnology**, [s.l.], v. 172, n. 4, p. 2143–2159, dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0661-9>. Acesso em: 16 fev. 2024.

GARCIA, R. L.; DIAS, G. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; TARDIOLI, P. W.; PERNA, R. F. Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 38, n. 2, p. 273-285, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43153-021-00110-9>. Acesso em: 08 fev. 2024.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 14, n. 8, p. 491-502, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>. Acesso em: 10 jan. 2025.

GONÇALVES, M.C.P., MORALES, S.A.V., SILVA, E.S., MAIORANO, A.E., PERNA, R.F., KIECKBUSCH, T.G. Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s.l.], v. 95, p. 2473-2482, abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.6429>. Acesso em: 08 jan. 2025.

GUARNER, F.; SANDERS, M. E.; SZAJEWSKA, H.; COHEN, H.; ELIAKIM, R. World gastroenterology organisation global guidelines: probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterol**, [s.l.], v. 58, n. 6, p 533-553, jun. 2024. Disponível em: https://journals.lww.com/jcge/fulltext/2024/07000/world_gastroenterology_organisation_global.2.aspx. Acesso em: 10 out. 2024.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 3. ed. Springer Protocols. 2013.

GUO, Y.; WANG, L.; CHEN, Y.; LUO, P.; CHEN, T. Properties of luffa fiber reinforced phbv biodegradable composites. **Polymers**, [s.l.], v. 11, n. 11, p. 1765, out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym11111765>. Acesso em: 11 dez. 2024.

HARRIS, J. M. Poly (Ethylene Glycol) **Chemistry: Biochemical and biomedical applications**. New York: Plenum Press, 1992.

HIRAYAMA, M., SUMI, N., HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 3, p. 667-673, mar. 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869350>. Acesso em: 03 fev. 2025.

HO, J., NICOLUCCI, A. C., VIRTANEN, H., SCHICK, A., MEDDINGS, J., REIMER, R. A., & HUANG, C. Effect of prebiotic on microbiota, intestinal permeability, and glycemic control in children with type 1 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 104, n. 10, p.4427-4440, jun 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00481> Acesso em: 03 fev. 2025.

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications**. Springer. 2008.

KAREL, S. F.; LIBICKI, S.; ROBERTSON, C. R. The immobilization of whole cells: engineering principles. **Chemical Engineering Science**, [s.l.], v. 40, n. 8, p. 1321-1354, nov. 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(85\)80074-9](https://doi.org/10.1016/0009-2509(85)80074-9). Acesso em: 17 jan. 2025.

KENAKIN, T. P. Enzymes as drug targets. **Pharmacology in Drug Discovery and Development**, [s.l.], v. 5, n. 8, p. 105-124, nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384856-7.00006-9>. Acesso em: 02 dez. 2024.

KHUENPET, K.; JITTANIT, W.; SIRISANSANEYAKUL, S.; SRICHAMNONG, W. Effect of pretreatments on quality of Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber powder and inulin extraction. **Transactions of the ASABE**, [s.l.], v. 58, n. 6, p. 1873-1884, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.13031/trans.58.11036>. Acesso em: 12 jan. 2025.

LAPPONI, M. J.; MÉNDEZ, M. B.; TRELLES, J. A.; RIVERO, C. W. Cell immobilization strategies for biotransformations. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s.l.], v. 33, p. 100565, fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100565>. Acesso em: 14 jan. 2025.

LINDMAN, S., XUE, W.-F., SZCZEPANKIEWICZ, O., BAUER, M. C., NILSSON, H., LINSE, S. Salting the charged surface: pH and salt dependence of protein G B1 stability.

Biophysical Journal, [s.l.], v. 90, n. 8, p. 2911-2921, abr. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071050>. Acesso em: 09 dez. 2024.

LIU, Y.; SEKI, M.; TANAKA, H.; FURUSAKI, S. Characteristics of Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a Carrier for Plant Cell Immobilization. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [s.l.], v. 85, n. 4, p. 416-421, jan. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80086-X](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80086-X). Acesso em: 07 out. 2024.

LORENZONI, A. S. G.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 111, p. 51–55, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.11.002>. Acesso em: 04 out. 2024.

LYU, X.; GONZALEZ, R.; HORTON, A.; LI, T. Immobilization of enzymes by polymeric materials. **Catalysts**, [s.l.], v. 11, n. 10, p. 1211, out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal11101211>. Acesso em: 10 jan. 2025.

MAIORANO, A. E.; SILVA, E. S.; PERNA, R. F.; OTTONI, C. A.; PICCOLI, R. A. M.; CUERVO- FERNANDEZ, R.; MARESMA, B.G.; RODRIGUES, M. F. A. Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 42, n. 12, p. 2619-2629, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03006-9>. Acesso em: 16 out. 2024

MANIKANDAN, P., NAGINI, S. Cytochrome p450 structure, function and clinical significance: a review. **Current Drug Targets**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 38-54, jan. 2018. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/81265>. Acesso em: 25 jan. 2025.

MANNING, M. C., CHOU, D. K., Murphy, B. M., PAYNE, R. W., & KATAYAMA, D. S. Stability of protein pharmaceuticals: An update. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 27, n. 4, p. 544-575, fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0045-6>. Acesso em: 10 dez. 2024.

MARTINEZ, C. O.; RUIZ, S. P.; FENELON, C.; MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; MATIOLI, G. Characterization of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 cells immobilized in a loofa sponge matrix, and application of this biopolymer in the development of functional yogurt. **Journal of the science of food and agriculture**, [s.l.], v. 96, n. 7, p. 2410–2417, ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7357>. Acesso em: 20 jan. 2025.

MAXIMIZE MARKET RESEARCH. **Fructo-Oligosaccharides (FOS) Market – Global Industry Analysis and Forecast (2024-2030) by Type, Application and Region**. 2024. Disponível em: <https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/fructo-oligosaccharides-fos-market/123240/>. Acesso em: 01 out. 2024.

MEHRNEJAD, F.; GHAHREMANPOUR, M. M.; KHADEM-MAAREF, M.; DOUSTDAR, F. Effects of osmolytes on the helical conformation of model peptide: Molecular dynamics simulation. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 134, n. 3, p. 035104, jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.3530072>. Acesso em: 24 jan. 2025.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 426-428, mar. 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>. Acesso em: 03 mar. 2024.

MOHIDEM, N. A.; MOHAMAD, M.; RASHID, M. U.; NORIZAN, M. N. HAMZAH, F.; MAT, H. B. Recent advances in enzyme immobilisation strategies: an overview of techniques and composite carriers. **Journal of Composites Science**, [s.l.], v. 7, n. 12, p. 488, nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcs7120488>. Acesso em: 05 dez. 2024.

MUCHENDU, E. Impact of temperature on reaction rate in catalytic reactions. **AJPO Journals**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 38-48, out. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.47672/jchem.2513>. Acesso em: 02 fev. 2025.

MUSSATO, S. I.; PRATA, M. B.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Production of fructooligosaccharides and b-fructofuranosidase by batch and repeated batch fermentation with immobilized cells of *Penicillium expansum*. **European Food Research and Technology**, [s.l.], v. 235, n. 1, p. 13-22, abr. 2012. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1822/19931>. Acesso em: 03 jan. 2025.

MUTANDA, T.; MOKOENA, M. P.; OLANIRAN, A. O.; WILHELMI, B. S.; WHITELEY, C. G. Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, [s.l.], v. 41, n. 6, p. 893-906, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1452-1>. Acesso em: 05 fev. 2025.

NÁJERA- MARTINEZ, E. F.; MELCHOR- MARTÍNEZ, E. M.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; LEVIN, L. N.; PARRA-SALDIVAR, R.; IQBAL, H. M.N. Lignocellulosic residues as supports for enzyme immobilization, and biocatalysts with potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 208, p. 748-759, maio 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.180>. Acesso em: 25 out. 2024.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NISHIZAWA, K., NAKAJIMA, M., NABETANI, H. Kinetic Study on Transfructosylation by b-Fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and Availability of a Membrane Reactor for Fructooligosaccharide Production. **Food Science Technology Research**, [s.l.], v. 7, n.1, p. 39-44, nov. 2001. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/fstr/7/1/7_1_39/_pdf. Acesso em: 05 out. 2024.

OLUWASEUN; FREDIK; ANTHONY, G. E.; FREDICK, O. T.; ANTHONY, O. A. Characteristics of Luffa sponge-immobilized pectinase from *Aspergillus niger* FTR 002 and its use in the continuous clarification of orange juice in packed-bed column bioreactor. **Applied Food Biotechnology**, [s.l.], v.10, n. 4, p. 245-256, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.22037/afb.v10i4.41883>. Acesso em: 06 fev. 2024.

O'REILLY, A. J. Batch reactor optimization, profitability vs waste minimization. **Chemical Engineering Research and Design**, [s.l.], v. 80, n.6, p. 587-596, set., 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1205/026387602760312782>. Acesso em: 24 out. 2024

- OTTONI, C. A.; CUERVO-FERNÁNDEZ, R.; PICCOLI, R. M.; MOREIRA, R.; GUILARTE-MARESMA, B.; DA SILVA, E. S.; RODRIGUES, M. F. A.; MAIORANO, A. E. Media optimization for β -Fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 49-59, mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-66322012000100006>. Acesso em: 02 dez. 2024.
- PAZHANG, M., MEHRNEJAD, F., PAZHANG, Y., FALAHATI, H., CHAPARZADEH, N. Effect of sorbitol and glycerol on the stability of trypsin and difference between their stabilization effects in the various solvents. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s.l.], v. 63, n. 2, p. 206-213, mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bab.1366>. Acesso em: 09 nov. 2024.
- PEREIRA, R. S.; VIEIRA, A. C.; LEITE, P. C.; MAESTRELLI, S. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; XAVIER, M. C. A.; LOPES, M. S. *et al.* Application of na agro-waste for the immobilization of microbial fructosyltransferase: a new alternative for fructooligosaccharide production. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 36, n. 3, p. e-20240172, nov. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20240172>. Acesso em: 04 out. 2024.
- PERNA, R. F.; CUNHA, J. S.; GONÇALVES, M. C. P.; BASSO, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. Microbial fructosyltransferase: production by submerged fermentation and evaluation of ph and temperature effects on transfructosylation and hydrolytic enzymatic activities. **International Journal of Engineering Research & Science**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 43-4314 mar. 2018. Disponível em: <https://zenodo.org/records/1213538>. Acesso em: 08 set. 2024.
- PRETE, S., PAGANO, M. Enzyme inhibidores as multifaceted tools in medicine and agriculture. **Molecules**, [s.l.], v. 29, n. 18, p. 4314, set. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29184314>. Acesso em: 15 jan. 2024.
- PRISTINE MARKET INSIGHTS. **Consumer Shift Towards Natural FOS Supplements Boosting Market for Functional Foods**. (2024). Disponível em: <https://www.pristinemarketinsights.com/fructo-oligosaccharides-market-report>. Acesso em: 10 dez. 2024
- PUNEKAR, N. S. **Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms**. Springer. 2018.
- RAHIM, M. A.; SAEED; IQBAL, F.; KHALID, W.; HUSSAIN, M.; ANJUM, F. M. Functional and nutraceutical properties of fructooligosaccharides derivatives: a review. **International Journal of Food Properties**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 1588-1602, out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1986520>. Acesso en: 12 dez. 2024.
- RAO, P. S.; PRASAD, K. The effects of temperature on catalytic performance: A review of recent advancements. **Applied Catalysis A: General**, [s.l.], v. 626, p. 118278, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2022.118278>. Acesso em: 23 jan. 2025.
- RECORD, M. T.; COURTENAY, E. S.; CAYLEY, D. S.; GUTTMAN, H. J. Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. **Trends in Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 143-148, abr. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01196-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01196-7). Acesso em: 23 jan. 2025.

RESEARCH AND MARKETS. **Fructooligosaccharides Global Market Report 2024**. (2024). Disponível em: <https://www.Researchandmarkets.Com/Reports/5989824/Fructooligosaccharides-Global-Market-Report>. Acesso em: 25 set. 2024.

ROSHANRAVAN, N., MAHDAVI, R., ALIZADEH, E., JAFARABADI, M. A., HEDAYATI, M., GHAVAMI, A., OSTADRAHIMI, A. Effect of butyrate and inulin supplementation on glycemic status, lipid profile and glucagon-like peptide 1 level in patients with type 2 diabetes: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. **Hormone and Metabolic Research**, [s.l.], v. 49, n. 11, p. 886-891, set. 2017. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0043-119089>. Acesso em: 08 jan. 2025.

ROUF, A.; KANOJIA, V.; NAIK, H. R. Cell immobilization: An overview on techniques and its applications in food industry. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 6, p. 1817-1824, out. 2017. Disponível em: <https://www.chemijournal.com/archives/2017/vol5issue6/PartY/5-6-188-335.pdf>. Acesso: 09 fev. 2025.

SAAD, S. M. I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 42, n. 1, p. 1-6, mar. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000100002>. Acesso em: 29 jan. 2025.

SAEED; IQBAL, A.; IQBAL, M. Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge: Review of development of the biomatrix as a tool for biotechnological applications. **Biotechnology Progress**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 573-600, abr. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.1702>. Acesso em: 05 set. 2024.

SANTOS, Érica Daniely. **Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em suportes inorgânicos e sua aplicação como biocatalisadores para a produção de frutooligossacarídeos**. 2024. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2024.

SANTOS-MORIANO, P.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; POVEDA, A.; JIMENEZ-BARBERO, J.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 119, p. 18-25, set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.011>. Acesso em: 03 dez. 2024.

SHAHI, A.; RAI, B. N.; SINGH, R. S. Analysis of metabolites and carbon balance in the biofiltration of cumene using loofa sponge as biofilter media. **Appl Biochem Biotechnol**, [s.l.], v. 180, p. 338-348, abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2102-z>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SHELDON, R.A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advances in Synthesis and Catalysis**, [s.l.], v. 349, p.1289-1307, jun. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>. Acesso em: 13 dez. 2024.

SHIMONAKA, A., ENMEI, Y., NATSUME, M., & TANAKA, Y. Effect of vanilla ice cream containing fructooligosaccharides on the moderation of postprandial blood glucose levels. **Japanese Pharmacology and Therapeutics**, [s.l.], v. 48, n.3, p. 369-372, 2020. Disponível em: <https://www.pieronline.jp/content/article/0386-3603/48030/369>. Acesso em: 07 set. 2024.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Engenharia de Bioprocessos: Conceitos Básicos**. EUA: Prentice Hall PTR. 3. ed. 2002.

SILVA, M. B. P. D. O.; ABDAL, D.; PEDRO, J.; PRADO, Z.; DE SOUZA DIAS, G.; ANDRES, S.; MORALES, V.; DA CUNHA, M.; XAVIER, A. Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s.l.], v. 24, p. e2020283, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.28320>. Acesso em: 16 dez. 2024.

SOARES, M. S., **Síntese e caracterização de esponjas de poliuretano para imobilização de células e aplicação na síntese de biodiesel**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, 2012.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A; PESSELA, J. B. C.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biociência Aplicada à Agro&Indústria**, São Paulo, v. 4, p. 529-568, 2017. Disponível em: <https://openaccess.blucher.com.br/article-details/imobilizacao-enzimatica-principios-fundamentais-e-tipos-de-suporte-20266/>. Acesso em: 24 fev. 2024.

SUN, J.; LI, W.; LIAO, H.; LI, L.; NI, H.; CHEN, F.; LI, Q. Adding sorbitol improves the thermostability of α -l-rhamnosidase from *Aspergillus niger* and increases the conversion of hesperidin. **Journal of Food Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 2, p. e14055, dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfbc.14055>. Acesso em: 13 out. 2024.

URETA, M. M.; MARTINS, G. N.; FIGUEIRA, O.; PIRES, P. F.; CASTILHO, P. C.; GOMEZ- ZAVAGLIA. Recent advances in β -galactosidase and fructosyltransferase immobilization. **Crit Rev Food Sci Nutr**, [s.l.], v. 61, n. 16, p. 2659-2690, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1783639>. Acesso em: 25 jan. 2025.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. Embrapa Agroindústria Tropical Fortaleza, CE. (2013). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento -Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos**. Disponível em: www.cnpat.embrapa.br. Acesso em: 01 dez. 2024.

VAGENENDE, V.; MIRANDA, G. S., BERNHARD, L.; TROUT. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. **Biochemistry**, [s.l.], v. 48, n. 26, p. 1084-11096, out. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi900649t>. Acesso em: 01 out. 2024.

VEGA, R.; ZÚNIGA-HANSEN, M. E. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. **Bioresource Technology**,

[s.l.], v. 102, n. 22, p. 10180–10186, nov. 2011. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.025>. Acesso em: 03 out.2024.

VERIFIED MARKET REPORTS. **Global Prebiotic Ingredients Market by Type (Inulin, Polydextrose), By Application (Food & Beverage, Dietary Supplements), By Geographic Scope and Forecast.** (2023). Disponível em:
<https://www.verifiedmarketreports.com/product/global-prebiotic-ingredients-market-size-and-forecast-to-2025/>. Acesso em: 10 out. 2024.

VERMA, G., BHUSHAN, B., SINGH, G., SINGH, K., KUMAR, S., GARG, A., RAJPUT, P. Pharmacological strategies for enzyme inhibition in disease therapeutics: a comprehensive review. **Current Enzyme Inhibition**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 96-108, dez. 2023. Disponível em:
<https://www.eurekaselect.com/article/136744>. Acesso em: 02 jan. 2025.

XU, Q.; ZHENG, X.; HUANG, M.; WU, M.; YAN, Y.; PAN, J.; YANG, Q.; DUAN, C. J.; LIU, J. L.; FENG, J. X. Purification and biochemical characterization of a novel β -fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 8, p. 1237-1246, ago. 2015. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.020>. Acesso em: 24 out. 2024.

WIEGAND, T. J. Propylene Glycol, Editor: Philip Wexler, **Encyclopedia of Toxicology**. 3. ed. Academic Press. 2014.

WHISNER, C. M.; CASTILLO, L. F. Prebiotics, bone and mineral metabolism. **Calcified Tissue International**, [s.l.], v. 102, n. 4, p. 443-479, abr. 2018. Disponível em:
<https://doi.org/10.1007/s00223-017-0339-3>. Acesso em: 23 out. 2024.

WONG, C.M.; WONG, K.H.; CHEN, X.D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 78, n. 6, p. 927-938, abr. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1407-4>. Acesso em: 07 fev. 2024.

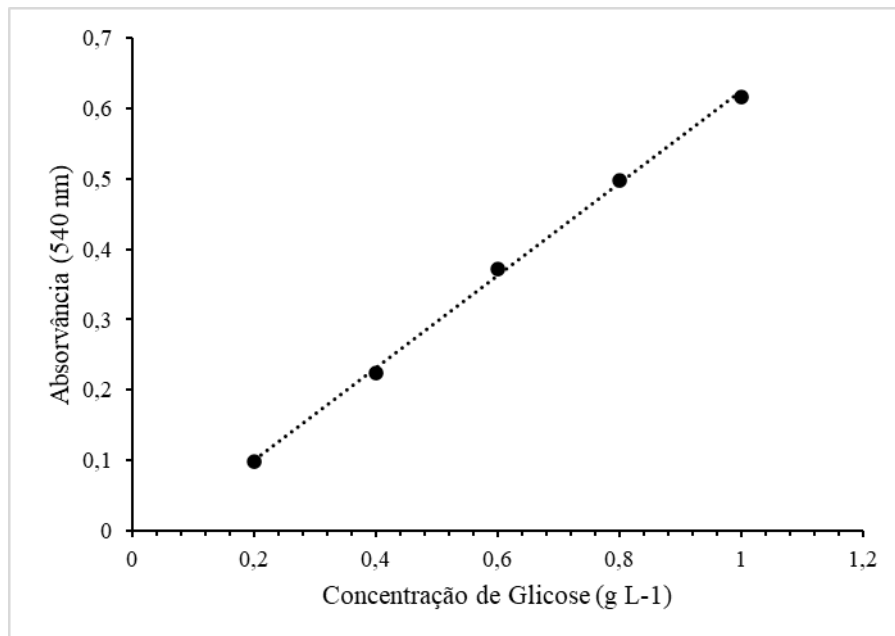
YUN, J. W. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], 19, n. 2, p. 107-117, ago. 1996. Disponível em:
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00188-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00188-3). Acesso em: 10 fev. 2024.

APÊNDICE A- Curva de Calibração para determinação de Açúcar Redutor

Para obtenção da curva de calibração (Figura 22), inicialmente foi preparada solução padrão- mãe de glicose anidra na concentração de 1 g L^{-1} . Posteriormente, foram realizadas diluições para obtenção de soluções com concentrações de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 g L^{-1} . Após, realizou-se o mesmo processo que se deu com as amostras (item 4.3.2.1) e com os valores de absorvâncias, plotou-se um gráfico de dispersão, em que o eixo X representou a concentração de glicose (g L^{-1}) e o eixo Y, as absorvâncias medidas e a partir disso, foi gerada a equação da reta correlacionando os termos de variável dependente (Y) com concentração, o coeficiente angular (a) com a absorvância e a variável independente (X) com a absorvância (Equação 3). O valor do coeficiente de correlação (R^2) obtido por meio do ajuste linear foi 0,9987.

$$Y = aX + b \quad \therefore [g L^{-1}] = a [ABS] + b \quad (3)$$

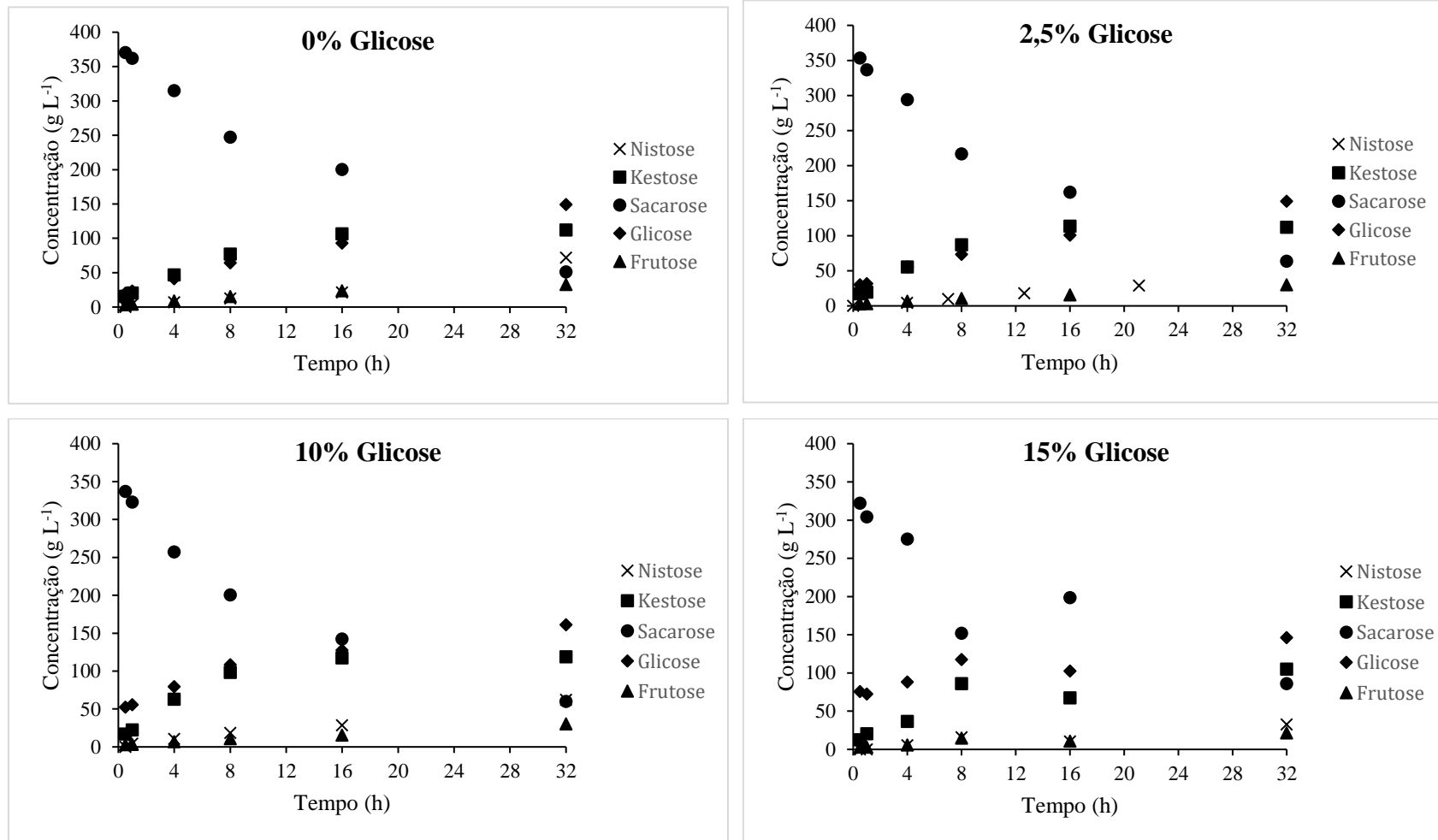
Figura 22- Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação da concentração de açúcares redutores



Fonte: Autora (2025).

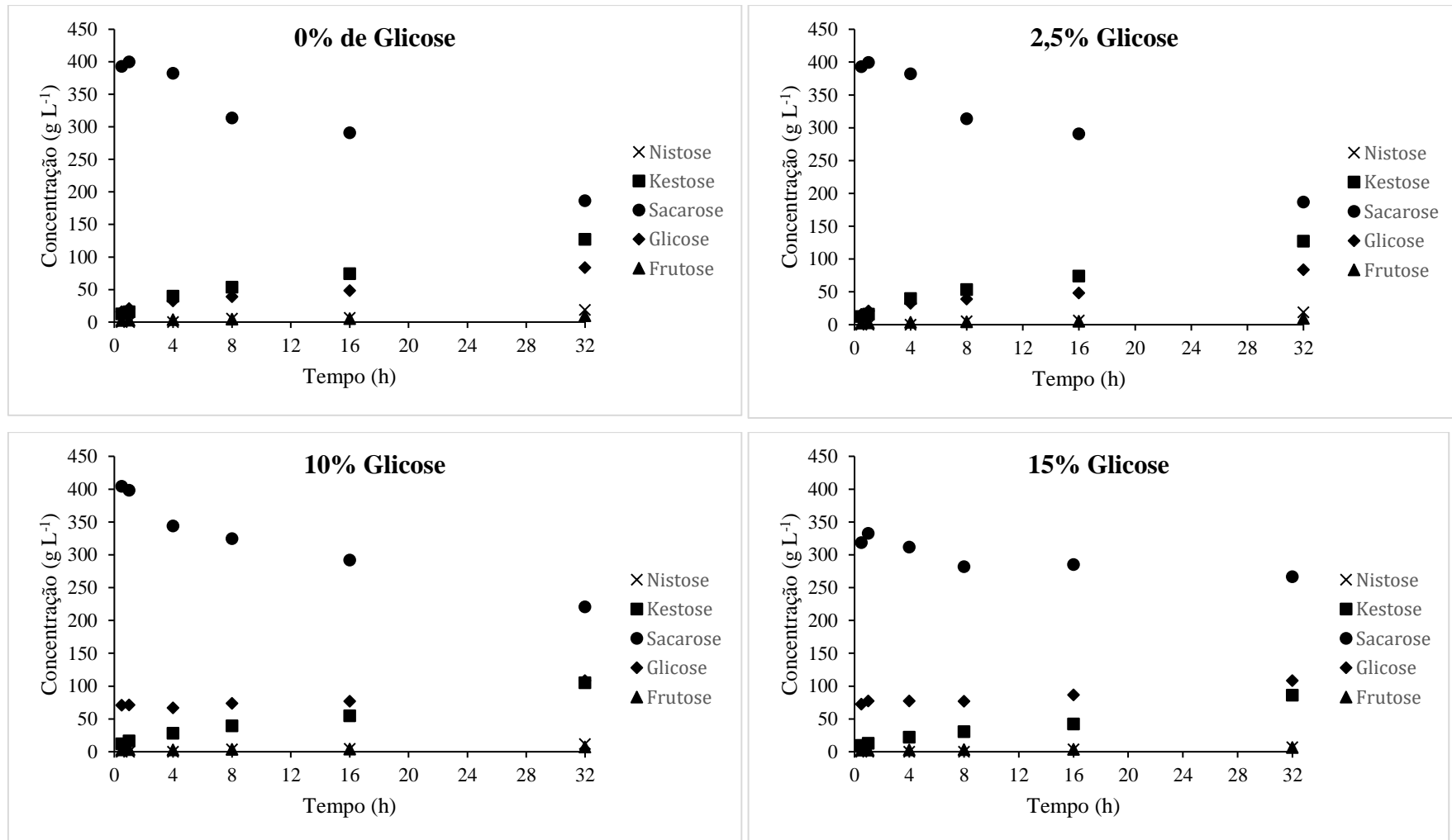
APÊNDICE B- Concentração de Reagentes durante a produção de FOS

Figura 23- Perfil de inibição enzimática utilizando biomassa catalítica *in natura*



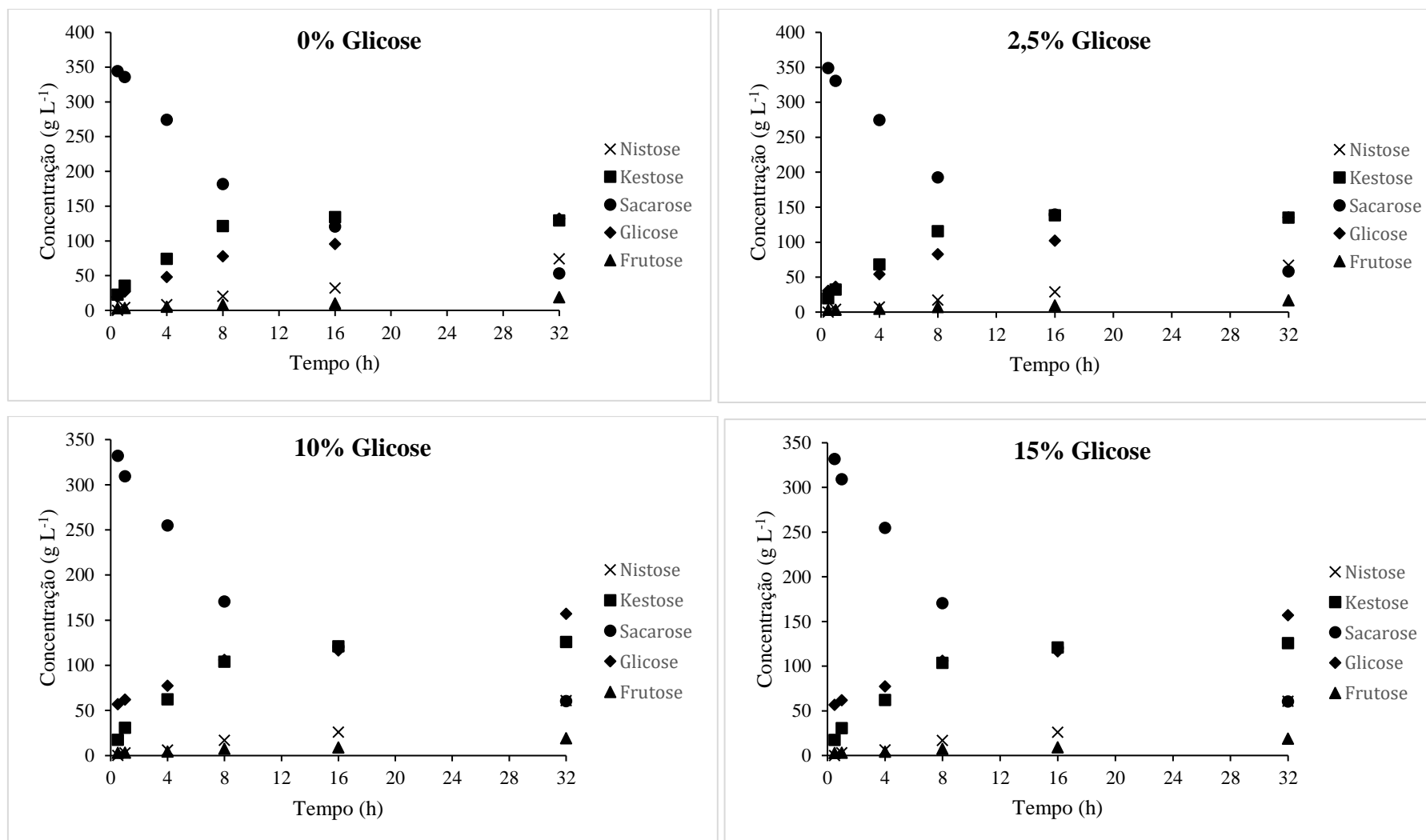
Fonte: Autora (2025).

Figura 24- Perfil de inibição enzimática utilizando biomassa catalítica imobilizada em esponja vegetal



Fonte: Autora (2025).

Figura 25- Perfil de inibição enzimática utilizando biomassa catalítica imobilizada em esponja de poliuretano



Fonte: Autora (2025).