

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANDRESSA BASSO DOS SANTOS

**MAXIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DE CÉLULAS
DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 IMOBILIZADAS EM SUPORTES DE PLA
FABRICADOS POR IMPRESSÃO 3D, VISANDO A PRODUÇÃO DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS EM SISTEMAS BATELADA E DE LEITO FIXO**

POÇOS DE CALDAS/MG

2026

ANDRESSA BASSO DOS SANTOS

**MAXIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DE CÉLULAS
DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 IMOBILIZADAS EM SUPORTES DE PLA
FABRICADOS POR IMPRESSÃO 3D, VISANDO A PRODUÇÃO DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS EM SISTEMAS BATELADA E DE LEITO FIXO**

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. Sergio Andres Villalba Morales

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

POÇOS DE CALDAS/MG

2026

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

Santos, Andressa Basso dos .

Maximização da atividade de transfrutossilagem de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes de PLA fabricados por impressão 3D, visando a produção de fruto-oligossacarídeos em sistemas batelada e de leito fixo / Andressa Basso dos Santos. - Poços de Caldas, MG, 2026.

71 f. : il. -

Orientador(a): Sergio Andres Villalba Morales.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. *Aspergillus oryzae* IPT-301. 2. Fruto-oligossacarídeos. 3. Imobilização celular. 4. Poli(ácido lático). 5. Impressão 3D. I. Morales, Sergio Andres Villalba , orient. II. Título.

ANDRESSA BASSO DOS SANTOS

MAXIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 IMOBILIZADAS EM SUPORTES DE PLA, FABRICADOS POR IMPRESSÃO 3D, VISANDO A PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS EM SISTEMAS BATELADA E DE LEITO FIXO

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

Aprovada em: 19 de fevereiro de 2026.

Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Marlus Pinheiro Rolemberg

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

Instituição: Universidade Federal do Tocantins



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Andres Villalba Morales, Usuário Externo**, em 19/02/2026, às 13:38, 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 **1717580** e o código CRC **E42FAC83**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por toda a graça e bênção concedidas ao longo desta jornada, e por me proporcionar a saúde necessária para a realização deste projeto. Aos meus pais, Carlos (in memoriam) e Viviani (dona), minha avó Alice, minha irmã Vitória (criança), meu padrasto (doutor, segundo pai) e meu tio Denilson (fiinho), que sempre se colocaram à disposição para me auxiliar, tanto de forma econômica quanto emocional. Obrigada por confiarem em mim e acreditarem no meu potencial.

Ao meu orientador, Sergio, pela confiança depositada em mim e por, mesmo à distância, sempre se fazer presente, oferecendo apoio, orientação e conhecimentos fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional, e ao meu coorientador, Rafael, que desde 2023 acreditou no meu potencial como pesquisadora, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento deste trabalho. À dona banca, que me ajudou em tudo ao longo desse período, ao Leo, muitas vezes mantendo minha sanidade, e aos amigos e companheiros de laboratório, Luara, Krystia, Castela, Isabela, Kalebe e Paula, que permaneceram ao meu lado, tornando essa caminhada mais leve e alegre.

À Universidade Federal do Tocantins (UFT), pela parceria científica e pelo desenvolvimento dos suportes tridimensionais utilizados neste trabalho, e, na UNIFAL-MG, à professora Sylma e ao discente de Iniciação Científica Luiz Gustavo, pela impressão dos suportes utilizados nos ensaios; ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP), pelo apoio técnico e auxílio na realização de análises; bem como à Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Portugal), pelas colaborações que contribuíram de forma significativa para o fortalecimento das atividades de pesquisa desenvolvidas neste estudo. Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP), pelo fornecimento da cepa microbiana e pelo apoio na realização das análises laboratoriais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, por meio dos processos FAPEMIG (Proc. APQ-00793-24; Proc. BPD00030-22) e CNPq (Proc. 404912/2021-4; Proc. 403007/2025-9; Proc. 408302/2023-2; bolsa produtividade Proc. 305029/2024-0).

RESUMO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são carboidratos funcionais de elevado valor agregado, produzidos por catálise enzimática a partir da sacarose. O uso de células imobilizadas representa uma alternativa promissora para síntese contínua, conferindo maior estabilidade e reaproveitamento do biocatalisador. Entre os fatores estruturais que influenciam esse desempenho, a porosidade dos suportes exerce papel fundamental na retenção celular e na acessibilidade do substrato aos sítios ativos. Neste trabalho, avaliou-se a maximização da atividade de transfrutossilacção de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes tridimensionais de poli(ácido láctico) (PLA), fabricados por impressão 3D com diferentes porosidades, em sistemas de reacção em batelada e em reator de leito fixo. Os suportes apresentaram porosidades de 49,0%, 61,8% e 64,3% e foram obtidos por manufatura aditiva do tipo FDM. A influência da porosidade na imobilização celular e na atividade de transfrutossilacção foi investigada, bem como os efeitos da concentração de sacarose e da velocidade de agitação (batelada) e da concentração de sacarose e vazão volumétrica (leito fixo), empregando delineamento composto central rotacional (DCCR). Os biocatalisadores obtidos após 38 h de cultivo submerso apresentaram maiores atividades de transfrutossilacção quando comparados aos obtidos após 32 h, com atividades específicas de $222,18 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 10,65$ (49,0%), $394,14 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 57,82$ (61,8%) e $398,09 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 37,99$ (64,3%). O suporte de menor porosidade apresentou a maior atividade absoluta (169,96 U), enquanto os suportes mais porosos apresentaram atividades absolutas de 66,62 U e 43,03 U. Nos ensaios em reator batelada, as maiores atividades de transfrutossilacção foram observadas na condição central do planejamento experimental, correspondentes a 175 rpm e $400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose. Nessas condições, foram obtidas atividades máximas de $361,85 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 7,92$ para o suporte de 49,0% e $605,88 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 52,89$ para o suporte de 64,3%. Na validação experimental em reator batelada, a atividade máxima observada foi de $386,97 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 12,74$ no tempo de 3 h para o suporte de 49,0% e de $520,94 \pm 24,98$ também no tempo de 3 h para o suporte de 64,3%. Nos ensaios em reator de leito fixo, sob as condições ótimas definidas pelo planejamento experimental ($400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose e $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), a atividade máxima observada foi de $52,3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 9,04$. Durante a validação experimental, a atividade variou entre $176,8 \pm 20,42$ e $8,37 \pm 0,72 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ao longo de 35 horas de operação contínua.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae* IPT-301; fruto-oligossacarídeos; imobilização celular; poli(ácido láctico); impressão 3D.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are functional carbohydrates with high added value, produced through enzymatic catalysis from sucrose. The use of immobilized cells represents a promising alternative for continuous synthesis, providing greater stability and reuse of the biocatalyst. Among the structural factors that influence this performance, support porosity plays a fundamental role in cell retention and substrate accessibility to active sites. In this study, the maximization of the transfructosylation activity of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells immobilized on three-dimensional poly(lactic acid) (PLA) supports fabricated by 3D printing with different porosities was evaluated in batch reaction systems and in a packed-bed reactor. The supports exhibited porosities of 49.0%, 61.8%, and 64.3% and were produced by FDM additive manufacturing. The influence of porosity on cell immobilization and transfructosylation activity was investigated, as well as the effects of sucrose concentration and agitation speed (batch) and sucrose concentration and volumetric flow rate (packed-bed), using a Central Composite Rotational Design (CCRD). Biocatalysts obtained after 38 h of submerged cultivation showed higher transfructosylation activities than those obtained after 32 h, with specific activities of $222.18 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 10.65$ (49.0%), $394.14 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 57.82$ (61.8%), and $398.09 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 37.99$ (64.3%). The support with lower porosity exhibited the highest absolute activity (169.96 U), whereas the more porous supports showed absolute activities of 66.62 U and 43.03 U. In batch reactor assays, the highest transfructosylation activities were observed at the central condition of the experimental design, corresponding to 175 rpm and $400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose. Under these conditions, maximum activities of $361.85 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 7.92$ were obtained for the 49.0% support and $605.88 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 52.89$ for the 64.3% support. In batch reactor validation experiments, the maximum activity observed was $386.97 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 12.74$ at 3 h for the 49.0% support and $520.94 \pm 24.98 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ also at 3 h for the 64.3% support. In packed-bed reactor assays, under the optimal conditions defined by the experimental design ($400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose and $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), the maximum activity observed was $49.86 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. During experimental validation, the activity ranged from 176.8 ± 20.42 to $8.37 \pm 0.72 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ over 35 h of continuous operation.

Keywords: *Aspergillus oryzae* IPT-301; fructooligosaccharides; cell immobilization; polylactic acid; 3D printing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 Fruto-oligossacarídeos (FOS)	12
3.2 Produção enzimática de FOS	13
3.2.1 Efeito inibitório da glicose na atividade de transfrutossilação	14
3.3 Imobilização celular em suportes porosos	15
3.4 Poli(ácido lático) (PLA) como material suporte em sistemas de imobilização	16
3.5 Impressão 3D aplicada à síntese de suportes para imobilização celular.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Preparação dos biocatalisadores	19
4.1.1 Fabricação dos suportes de PLA e determinação da porosidade	19
4.1.2 Cultivo e imobilização celular.....	20
4.1.3 Determinação da influência da porosidade na imobilização celular e atividade de transfrutossilação	23
4.2 Ensaio catalítico em sistema batelada	23
4.2.1 Influência da porosidade do biocatalisador na atividade de transfrutossilação em função do tempo de reação	23
4.2.2 Ensaio de maximização da atividade de transfrutossilação e influência de variáveis operacionais	24
4.2.3 Validação experimental da condição ótima de maximização da atividade de transfrutossilação	25
4.3 Ensaio catalítico em reator de leito fixo	26
4.3.1 Ensaio de maximização da atividade de transfrutossilação e influência de variáveis operacionais	26
4.3.2 Validação experimental da condição ótima de maximização da atividade de transfrutossilação	27
4.4 Métodos analíticos e análise estatística	28
4.4.1 Determinação da atividade de transfrutossilação.....	28
4.4.2 Determinação da concentração de açúcares	29
4.4.2.1 Determinação da concentração de açúcares redutores (AR)	29
4.4.2.2 Determinação da concentração de glicose (G)	30
4.4.3 Determinação da atividade absoluta.....	30
4.4.4 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
5.1 Porosidade dos suportes.....	32

5.2 Determinação da influência da porosidade na imobilização celular e atividade de transfrutossilagem	32
5.3 Ensaios catalíticos em reator batelada	35
5.3.1 Influência da porosidade do biocatalisador na atividade de transfrutossilagem em função do tempo de reação	35
5.3.2 Ensaios de maximização da atividade de transfrutossilagem e influência de variáveis operacionais	37
5.3.3 Validação experimental da condição ótima de maximização da atividade de transfrutossilagem	48
5.4 Ensaios em biorreator de leito fixo	50
5.4.1 Ensaios de maximização da atividade de transfrutossilagem e influência de variáveis operacionais	50
5.4.2 Validação experimental da condição ótima de maximização da atividade de transfrutossilagem	55
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Os fruto-oligosacarídeos (FOS) são carboidratos de cadeia curta com propriedades prebióticas que beneficiam a saúde intestinal ao aumentar a população de bactérias benéficas, como as bifidobactérias, ajudando a manter a homeostase do microbioma intestinal e modulando a inflamação (Oliveira *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023). Eles também são amplamente utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica para melhorar a textura e o sabor dos alimentos, além de servirem como adoçantes naturais devido a seu poder edulcorante e às propriedades não cariogênicas (Martins *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2023).

Os FOS podem ser produzidos a partir da sacarose, utilizando enzimas frutossiltransferase (FTases) como biocatalisadores, as quais podem ser obtidas de diferentes fontes microbianas, incluindo fungos e leveduras. Entre essas fontes, as células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 têm se destacado pela alta capacidade de produção de FTases, sendo consideradas biocatalisadores eficientes e promissores para a síntese de FOS (Ferreira *et al.*, 2023). Além disso, a imobilização de células de *Aspergillus oryzae* em suportes porosos durante o cultivo tem se mostrado uma estratégia eficaz para aumentar a estabilidade operacional e a eficiência catalítica na produção de fruto-oligosacarídeos. Essa abordagem permite a reutilização das células e a manutenção de elevada atividade enzimática ao longo de múltiplos ciclos reacionais (Ferreira *et al.*, 2023). Em sistemas contínuos, como reatores de leito fixo, a imobilização celular tem sido associada à maior estabilidade operacional e à redução de custos do processo (Santos *et al.*, 2023).

Neste tipo de biocatalisadores, a porosidade do suporte exerce influência decisiva sobre o seu desempenho, afetando simultaneamente a adesão celular, a difusão de substratos e produtos e a resistência mecânica do material. Porosidades intermediárias promovem uma relação adequada entre área superficial e transferência de massa, enquanto valores muito baixos restringem o acesso dos reagentes e valores muito altos comprometem a integridade estrutural, especialmente em reatores de leito fixo. (Braga *et al.*, 2023; Cabrera-Orosco *et al.*, 2017; Dalvi; Thorat, 2012). Estudos indicam que suportes com rede porosa interconectada otimizam a difusão e a conversão enzimática, e materiais como esponja de fibra vegetal, vidro poroso e zeólitas têm se destacado na imobilização de células para produção de FOS, apresentando elevada retenção de atividade e estabilidade operacional (Almeida *et al.*, 2023; Banerjee *et al.*, 2023; Pereira

et al., 2023).

A fabricação de suportes por impressão 3D tem se mostrado uma técnica promissora para imobilização celular por permitir o controle preciso da morfologia, geometria interna e porosidade, fatores diretamente relacionados à transferência de massa e à estabilidade operacional do biocatalisador. Entre os materiais poliméricos, o poli(ácido láctico) (PLA) destaca-se por ser biodegradável e biocompatível, apresentar boa processabilidade por impressão de filamento fundido (FDM – *Fused Deposition Modeling* ou FFF – *Fused Filament Fabrication*), estabilidade dimensional e custo relativamente baixo, além de origem renovável, atributos que favorecem sua aplicação em bioprocessos e dispositivos impressos com porosidade e arquitetura projetadas (Joseph *et al.*, 2023; Khouri *et al.*, 2024; Pose-Boirazian *et al.*, 2022). Evidências recentes mostram que a impressão 3D ampliou o escopo da imobilização enzimática e celular, com PLA atuando como matriz ou “*carrier*” em sistemas de biocatálise, incluindo placas e macroscaffolds que preservam a atividade e a estabilidade operacional das enzimas, e estudos com imobilização covalente em PLA confirmam a viabilidade e a robustez do material em condições reacionais (De Lima Junior *et al.*, 2025; Remonato *et al.*, 2023; Skonta *et al.*, 2022).

Entretanto, o desempenho das células imobilizadas como biocatalisadores na produção de FOS depende diretamente do sistema de reação empregado. Reatores em batelada são amplamente utilizados em processos de síntese de FOS por permitirem o controle rigoroso das condições operacionais, como temperatura, pH e tempo de reação. Além disso, possibilitam o monitoramento detalhado do consumo de sacarose e da formação dos oligossacarídeos ao longo do tempo, sendo ideais para estudos cinéticos e de otimização do processo. Trabalhos recentes demonstraram que, em sistemas batelada, a variação da velocidade de agitação exerce influência direta sobre a difusão do substrato até o biocatalisador, enquanto a concentração de sacarose define a proporção relativa entre as reações de síntese e hidrólise catalisadas pela frutossiltransferase. (Patel *et al.*, 2021; Vallecilla-Yeppez *et al.*, 2022). Nessas condições, foram observados altos rendimentos de FOS quando se utilizou *Aureobasidium pullulans* cultivado em meio de melaço de cana-de-açúcar, com valores otimizados de agitação e oxigenação, destacando a eficiência do sistema batelada em escalas laboratoriais e piloto.

Por outro lado, reatores de leito fixo (*Packed Bed Reactors* – PBR) têm se mostrado promissores para a produção contínua de FOS, principalmente quando combinados com células imobilizadas em suportes porosos. Nesses sistemas, o substrato

é continuamente alimentado através do leito contendo o biocatalisador, permitindo operação estável e prolongada. As variáveis mais relevantes nesse tipo de reator são o tempo de residência do substrato e a massa de biocatalisador, que afetam diretamente a conversão de sacarose e a manutenção da atividade catalítica ao longo do tempo. Ensaio recentes mostraram que biocatalisadores de *A. oryzae* podem manter atividade constante por até 24 horas de operação contínua em reatores PBR, (Almeida *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2023). Assim, a estabilidade operacional, associada à possibilidade de escalonamento, torna esse tipo de reator uma alternativa eficiente para aplicações industriais.

Dessa forma, compreender o comportamento dessas variáveis na atividade de transfrutossilagem é fundamental para o aprimoramento do processo de produção de FOS em diferentes configurações de reatores (Almeida *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2023; Vallecilla-Yepez *et al.*, 2022).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é estudar e maximizar a atividade de transfrutossilagem de células *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes de PLA fabricados por impressão 3D, com diversas porosidades, visando a produção de FOS em reatores de leito fixo e batelada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a reação de transfrutoseilação da sacarose em sistemas de reação batelada e contínuo, catalisada por células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes 3D de PLA fabricados com diferentes porosidades.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar e classificar os suportes conforme a influência da sua porosidade na imobilização e atividade enzimática das células;
- Avaliar e classificar os biocatalisadores conforme a influência da sua porosidade na reação de transfrutoseilação em biorreatores batelada e de leito fixo;
- Maximizar a atividade de transfrutoseilação em reatores batelada mediante otimização das variáveis características de cada sistema reacional, usando um biocatalisador com porosidade selecionada;
- Maximizar a atividade de transfrutoseilação em reatores de leito fixo mediante otimização das variáveis características de cada sistema reacional, usando um biocatalisador com porosidade selecionada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fruto-oligossacarídeos (FOS)

Os fruto-oligossacarídeos, conhecidos pela sigla FOS, são oligossacarídeos formados essencialmente por cadeias de unidades de frutose ligadas a uma glicose terminal por ligações do tipo β (2 \rightarrow 1), que não são hidrolisadas pelas enzimas digestivas humanas (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022). Por esta razão, os FOS chegam intactos ao intestino grosso, onde atuam como prebióticos, promovendo seletivamente o crescimento de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, contribuindo para a manutenção da saúde intestinal, modulação do sistema imunológico, melhora na digestão e prevenção de doenças metabólicas, como diabetes, obesidade e até alguns tipos de câncer, como o colorretal (Corrêa *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2021).

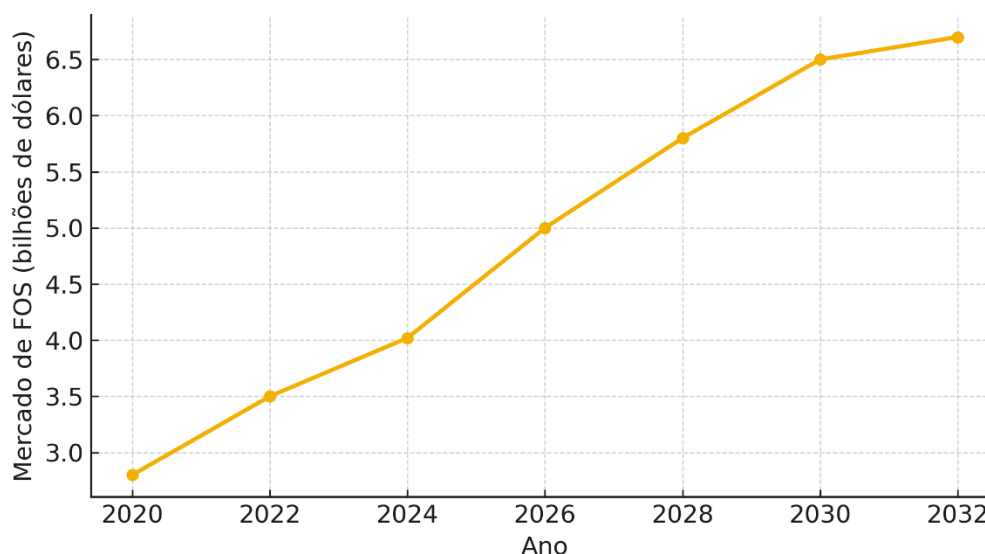
Além dos benefícios biológicos, os FOS possuem baixo valor calórico, não são cariogênicos, auxiliam na absorção de minerais como cálcio, ferro e magnésio, e estão associados à melhora do perfil lipídico e à prevenção de osteoporose, hipertensão e disbiose intestinal (Choukade *et al.*, 2021; Nobre *et al.*, 2018).

O mercado global de fruto-oligossacarídeos reflete o crescimento da busca por alimentos saudáveis e funcionais. De acordo com dados da Verified Market Reports (2023) e da Mordor intelligence (2022), o mercado global de FOS foi avaliado em 2,8 bilhões de dólares em 2020, com uma expectativa de alcançar 6,5 bilhões até o ano de 2030. Esse aumento é impulsionado pela demanda crescente nos mercados da América do Norte, Europa e Ásia-Pacífico, além do aumento do consumo de prebióticos por parte dos consumidores preocupados com a saúde intestinal e o bem-estar geral.

Por outro lado, no Brasil, a produção industrial de FOS ainda é incipiente, dependendo majoritariamente da importação, o que eleva custos e limita o acesso da indústria local ao insumo (Aranda, 2024; Barbosa, 2022). Isso evidencia a necessidade urgente de desenvolvimento de tecnologias nacionais para produção eficiente, sustentável e economicamente viável de FOS.

A projeção do mercado global de fruto-oligossacarídeos entre 2020 e 2032 demonstra uma tendência de expansão contínua, impulsionada pelo crescente interesse em ingredientes funcionais e prebióticos na indústria alimentícia (Figura 1).

Figura 1 - Crescimento estimado do mercado global de fruto-oligossacarídeos de 2020 a 2032



Fonte: Dados originais adaptados de Verified Market Reports (2023) e Mordor Intelligence (2022), com adição de estimativas recentes de mercado FOS (Maximize Market Research, 2024).

3.2 Produção enzimática de FOS

A produção de fruto-oligossacarídeos ocorre predominantemente pela via enzimática, através da reação de transfrutossilacção catalisada pela enzima frutossiltransferase, classificada como EC 2.4.1.9, que utiliza a sacarose como substrato para a formação dos oligossacarídeos kestose, nistose e frutofuranosilnistose (Castro *et al.*, 2017; Perna *et al.*, 2018).

O fungo *Aspergillus oryzae*, especialmente a cepa IPT-301, destaca-se como uma das principais fontes microbianas de frutossiltransferase, devido à sua elevada atividade catalítica, segurança, e robustez operacional (Araújo *et al.*, 2022; Cuervo-Fernandez *et al.*, 2007). A enzima FTase pode ser secretada para o meio de cultura, sendo considerada solúvel, ou pode permanecer aderida à parede celular, caracterizando-se como FTase micelial (Cunha *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021).

Diversos parâmetros operacionais impactam diretamente o desempenho da reação de transfrutossilacção. Estudos demonstram que o pH ideal está na faixa de 5,0 a 5,5, enquanto a temperatura ótima situa-se entre 50 °C e 60 °C (Gonçalves *et al.*, 2020; Maiorano *et al.*, 2020). Além disso, a concentração de sacarose deve ser elevada, entre 300 e 500 g·L⁻¹, a fim de favorecer a síntese de FOS sobre a hidrólise. Também, tempos de reação muito longos aumentam a produção de glicose e frutose livres, devido à ação

hidrolítica da FTase (Mohidem *et al.*, 2023).

Apesar da eficácia do uso de FTase livre para produção de FOS, esse modelo apresenta limitações operacionais significativas, como baixa estabilidade térmica e operacional, dificuldade de recuperação e impossibilidade de reutilização, além dos altos custos de purificação enzimática (Sheldon, 2007; Souza *et al.*, 2017). Estas limitações conduzem à busca por processos mais robustos e sustentáveis, como a imobilização de células inteiras contendo a enzima.

Adicionalmente, destaca-se que a produção de FOS pode ser realizada tanto com enzimas purificadas quanto com células inteiras contendo a enzima FTase aderida à parede celular, conhecida como FTase micelial. Esta abordagem apresenta vantagens operacionais significativas, tais como eliminação das etapas de purificação enzimática, maior estabilidade térmica e facilidade de imobilização em suportes estruturados (Cunha *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020).

Do ponto de vista mecanístico, a reação catalisada pela frutossiltransferase envolve a clivagem da ligação glicosídica da sacarose, com formação de um intermediário fruto-sil-enzimático, seguido da transferência do resíduo frutofuranosil para um aceptor adequado. Quando a molécula aceitadora é outra molécula de sacarose ou um oligossacarídeo em crescimento, ocorre a reação de transfrutossililação, resultando na formação sequencial de kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosilnistose (GF₄). Em contrapartida, quando a água atua como aceitadora, predomina a reação de hidrólise, levando à liberação de glicose e frutose livres como subprodutos do processo (Maiorano *et al.*, 2020; Mohidem *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021).

3.2.1 Efeito inibitório da glicose na atividade de transfrutossililação

Durante a síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos, a formação de glicose ocorre como consequência das reações de hidrólise que acompanham a transfrutossililação catalisada pela frutossiltransferase (Maiorano *et al.*, 2020; Mohidem *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021). Embora não constitua o produto desejado do processo, sua presença no meio reacional exerce influência direta sobre o desempenho catalítico do sistema (Banerjee; Saha, 2022; Lin *et al.*, 2023).

Estudos recentes indicam que a glicose atua como inibidor da atividade da frutossiltransferase, reduzindo a eficiência da conversão da sacarose em FOS à medida que sua concentração se eleva no meio (Banerjee; Saha, 2022; Lin *et al.*, 2023). Esse

efeito está associado à interferência no balanço entre as rotas de síntese e hidrólise, favorecendo a formação de açúcares livres em detrimento da produção de oligossacarídeos (Chen *et al.*, 2021; Mohidem *et al.*, 2023).

Sob a perspectiva cinética, o acúmulo de glicose tem sido apontado como um dos fatores limitantes do rendimento global do processo, uma vez que sua presença contribui para a redução progressiva da taxa de transfrutossilacção ao longo do tempo reacional (Costa *et al.*, 2024; Lin *et al.*, 2023). Esse comportamento é particularmente relevante em sistemas nos quais não há remoção contínua dos produtos formados, resultando em aumento gradual da concentração do subproduto no meio.

Investigações recentes também demonstraram que estratégias voltadas à redução da glicose acumulada podem levar a incrementos na produtividade de FOS, reforçando seu papel como variável determinante no desempenho de sistemas baseados em frutossiltransferase (Banerjee; Saha, 2022; Costa *et al.*, 2024).

3.3 Imobilização celular em suportes porosos

A imobilização de células com atividade de frutossiltransferase surge como uma estratégia eficiente para aumentar a estabilidade do biocatalisador, permitir sua reutilização e viabilizar processos industriais contínuos (Guisan *et al.*, 2013; Karel *et al.*, 1985). O processo consiste na fixação das células em matrizes sólidas, que podem ser de natureza orgânica, inorgânica ou polimérica.

Os suportes para imobilização devem apresentar elevada porosidade (30-70%), boa resistência mecânica, estabilidade química e térmica, biocompatibilidade e baixo custo (Brena *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2017). Materiais como esponja vegetal, poliuretano, óxido de alumínio, óxido de titânio e poli(ácido láctico) (PLA) são amplamente explorados devido às suas propriedades específicas (Ureta *et al.*, 2021).

Recentemente, a impressão 3D tem revolucionado a produção de suportes, permitindo a fabricação de estruturas com geometria e porosidade altamente controláveis, além de garantir melhor distribuição das células no interior da matriz (Gonçalves *et al.*, 2023; Guio *et al.*, 2023). Este nível de personalização proporciona otimização na transferência de massa, aumento na estabilidade do biocatalisador e melhoria significativa no desempenho operacional.

Os estudos de Amaral (2025), utilizando esponja vegetal e poliuretano, e de Santos (2024), utilizando óxidos de titânio e alumínio, evidenciaram que a escolha do

suporte impacta diretamente a eficiência da imobilização, a estabilidade térmica e a resistência operacional durante múltiplos ciclos de uso.

Além da natureza do material e do método de fabricação, a porosidade dos suportes exerce papel fundamental no desempenho dos biocatalisadores imobilizados. Estudos recentes indicam que suportes com porosidade intermediária, especialmente na faixa de 50–70%, apresentam equilíbrio adequado entre retenção celular, estabilidade estrutural e desempenho operacional, sendo particularmente adequados para aplicações em reatores batelada e de leito fixo. Arquiteturas internas homogêneas e com canais interconectados favorecem a distribuição das células no interior da matriz e contribuem para a manutenção da atividade catalítica ao longo de múltiplos ciclos reacionais, sem comprometer a resistência mecânica do suporte. Resultados obtidos por Santos (2024) demonstraram que suportes cerâmicos com porosidade nessa faixa mantiveram atividade estável por vinte ciclos consecutivos em reatores batelada e por até vinte e quatro horas em operação contínua, enquanto Amaral (2025).

3.4 Poli(ácido lático) (PLA) como material suporte em sistemas de imobilização

O poli(ácido lático) (PLA) tem sido progressivamente investigado como material estrutural em sistemas de imobilização voltados à biocatálise, sobretudo em aplicações que requerem estabilidade operacional e possibilidade de reuso do biocatalisador. Trata-se de um poliéster alifático obtido a partir de monômeros derivados da fermentação de açúcares, como glicose e sacarose provenientes de biomassa vegetal, característica que o insere no contexto de materiais de origem renovável aplicáveis a processos biotecnológicos (Khouri *et al.*, 2024; Pose-Boirazian *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, estruturas de PLA têm sido empregadas como matrizes para imobilização enzimática e celular, especialmente quando fabricadas por manufatura aditiva. Trabalhos recentes demonstraram a viabilidade de suportes produzidos por impressão 3D em PLA na imobilização de enzimas como lacase e β -galactosidase, com manutenção da atividade catalítica associada a ganhos em estabilidade operacional quando comparados às formas livres (De Lima Junior *et al.*, 2025; Remonato *et al.*, 2023). Esses sistemas têm sido explorados também em configurações contínuas, evidenciando potencial de reutilização do biocatalisador ao longo de múltiplos ciclos operacionais sem perdas expressivas de desempenho (Joseph *et al.*, 2023; Skonta *et al.*, 2022).

Do ponto de vista físico, o PLA apresenta propriedades favoráveis para sua utilização como suporte, incluindo resistência mecânica adequada, estabilidade dimensional nas faixas de temperatura típicas de processos enzimáticos e boa processabilidade por deposição de filamento fundido (FDM). Essas características permitem a obtenção de estruturas reprodutíveis e com geometrias controladas, contribuindo para sua crescente adoção em sistemas de imobilização (Joseph *et al.*, 2023; Khouri *et al.*, 2024).

Nesse contexto, o PLA tem sido descrito como uma matriz promissora para biocatálise heterogênea, possibilitando o desenvolvimento de suportes com elevada integridade estrutural ao longo da operação. Revisões recentes destacam sua aplicação como uma das abordagens emergentes na interface entre manufatura aditiva e bioprocessos, sobretudo em sistemas que demandam estabilidade operacional e compatibilidade com condições reacionais prolongadas (Khouri *et al.*, 2024; Pose-Boirazian *et al.*, 2022).

3.5 Impressão 3D aplicada à síntese de suportes para imobilização celular

A impressão tridimensional tem se consolidado, nos últimos anos, como uma tecnologia promissora para a síntese de suportes destinados à imobilização de células em processos biotecnológicos. Essa abordagem permite a fabricação de estruturas com geometrias complexas, elevada reprodutibilidade e controle preciso de parâmetros estruturais, como porosidade global, distribuição dos poros e conectividade dos canais, aspectos essenciais para o desempenho operacional dos biocatalisadores imobilizados (Gonçalves *et al.*, 2023; Guio *et al.*, 2023).

Diferentemente dos métodos convencionais de obtenção de suportes, a impressão 3D possibilita a personalização das arquiteturas internas de acordo com as exigências específicas do processo, favorecendo a distribuição homogênea das células no interior da matriz e contribuindo para maior estabilidade do biocatalisador durante a operação. Além disso, a flexibilidade do processo permite a adaptação do suporte a diferentes configurações de reatores, como sistemas batelada e de leito fixo, ampliando o potencial de aplicação industrial dessa tecnologia (Guio *et al.*, 2023; Ureta *et al.*, 2021).

Materiais poliméricos e cerâmicos têm sido amplamente explorados na fabricação de suportes por impressão 3D, com destaque para o poli(ácido lático) (PLA) e óxidos metálicos, devido à sua biocompatibilidade, estabilidade química e facilidade

de processamento. Estudos recentes demonstram que suportes produzidos por manufatura aditiva apresentam desempenho operacional superior ou equivalente aos suportes convencionais, mantendo elevada estabilidade térmica e resistência mecânica ao longo de múltiplos ciclos de uso (Amaral, 2025; Gonçalves *et al.*, 2023).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada neste estudo foi dividida em três etapas principais: (i) preparação dos biocatalisadores heterogêneos por meio da imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em três suportes com diferentes porosidades; (ii) realização de ensaios em reator batelada; e (iii) condução de ensaios em reator de leito fixo.

4.1 Preparação dos biocatalisadores

4.1.1 Fabricação dos suportes de PLA e determinação da porosidade

Os suportes foram projetados no Laboratório de Tecnologias Computacionais – LABTEC, da Universidade Federal do Tocantins, e produzidos por meio de manufatura aditiva, utilizando impressoras 3D do modelo Creality K1C, na Universidade Federal de Alfenas. O material empregado foi o poli(ácido lático) (PLA). Foram projetadas estruturas cilíndricas, com dimensões de 1,0 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro, variando-se a morfologia para obtenção de diferentes níveis de porosidade interna. A Figura 2 apresenta os suportes de poli(ácido lático) (PLA) obtidos por impressão 3D.

Após a fabricação, os suportes foram submetidos a um processo inicial de limpeza, sendo lavados com água destilada para remoção de possíveis resíduos provenientes do processo de impressão. Em seguida, foram secos em estufa a 50 °C até massa constante, etapa realizada previamente a qualquer procedimento de esterilização ou caracterização.

Figura 2 - Suportes tridimensionais de poli(ácido lático) (PLA) fabricados por impressão 3D, designados como suporte 1 (à esquerda), suporte 2 (ao centro) e suporte 3 (à direita)



Fonte: Autora (2025).

A porosidade aparente foi determinada por meio do método de deslocamento de líquido, técnica fundamentada no princípio de Arquimedes. Nesse procedimento, cada

suporte foi previamente seco em estufa a 50 °C e, posteriormente, pesado em balança analítica. Em seguida, os suportes foram imersos individualmente em água destilada, previamente degaseificada, e mantidos sob leve agitação para garantir o preenchimento completo dos poros. O volume de líquido deslocado foi registrado, permitindo o cálculo do volume de poros e, conseqüentemente, da porosidade do material, expressa como a razão entre o volume de vazios e o volume total da amostra sólida. Essa metodologia é amplamente reconhecida pela simplicidade operacional e boa reprodutibilidade, sendo recomendada para materiais porosos, rígidos e com baixa absorção superficial (Altinkaya, 2024; De Gregorio *et al.*, 2022). A Figura 3 ilustra o procedimento empregado para a determinação da porosidade aparente dos suportes de PLA.

Figura 3 - Determinação da porosidade aparente dos suportes de PLA por método de deslocamento de líquido



Fonte: Autora (2025).

4.1.2 Cultivo e imobilização celular

A cepa fúngica *Aspergillus oryzae* IPT-301, proveniente do banco de culturas do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP), foi inicialmente ressuspensa em água destilada estéril. Alíquotas de aproximadamente 100 µL foram inoculadas em meio sólido (ágar batata dextrose – BDA) e incubadas por 7 dias a 30 °C para esporulação. Os esporos foram colhidos por raspagem, suspensos em solução estéril de NaCl 0,95 % (m/v) e Tween-80 0,1 % (v/v), filtrados em lã de vidro e transferidos para tubos Falcon de 50 mL em câmara de fluxo laminar. A concentração de esporos foi determinada em câmara de Neubauer, padronizando-se para 1×10^7 esporos·mL⁻¹. Em seguida, adicionou-se glicerina a 20 % (m/v) como crioprotetor, e o inóculo foi armazenado a -12 °C até o momento de uso (Cunha *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2021).

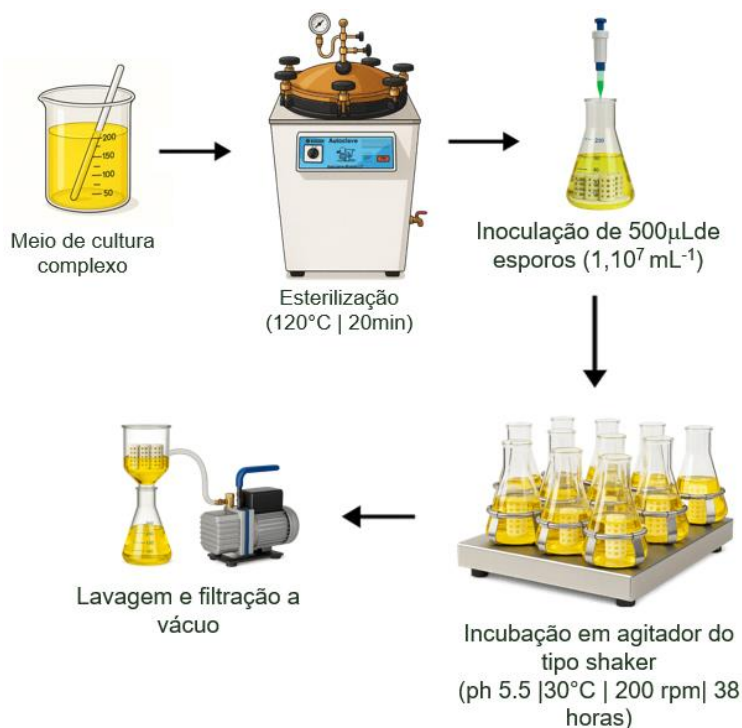
A produção das células imobilizadas foi realizada por meio de cultivo submerso

do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, utilizando um meio de cultura complexo, com pH ajustado para 5,5. A composição do meio incluiu sacarose ($150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), nitrato de sódio (NaNO_3 , $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), fosfato monopotássico (KH_2PO_4 , $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), cloreto de manganês tetra hidratado ($\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Alíquotas de 50 mL do meio foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, vedados com tampas de algodão hidrófilo e esterilizados em autoclave (Phoenix Lufarco®, modelo AV) por 20 minutos, a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e 2,022 atm.

Após resfriamento, cinco suportes foram adicionados aos frascos contendo o meio estéril, seguidos da inoculação de 500 μL de suspensão esporal de *A. oryzae*, previamente padronizada para 1×10^7 esporos $\cdot\text{mL}^{-1}$. Os cultivos foram conduzidos em incubadora com agitação orbital (Tecnal®, modelo TE-4200), a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm, por 38 horas, tempo previamente determinado, conforme descrito no item 5.2.

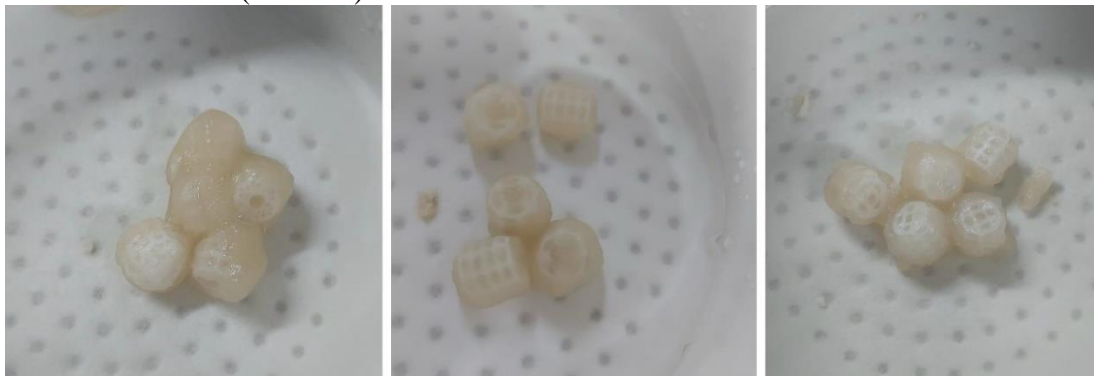
Todo o conteúdo dos frascos foi filtrado a vácuo, e o material retido, correspondente às células catalíticas imobilizadas nos suportes, foi lavado com água destilada e novamente filtrado. As etapas de cultivo submerso, imobilização celular e filtração estão representadas no fluxograma da Figura 4. A Figura 5 ilustra os biocatalisadores lavados e preparados para as análises subsequentes, incluindo a determinação do crescimento de biomassa nos suportes e os ensaios de atividade enzimática (conforme item 4.4.1) realizados em reatores batelada e de leito fixo.

Figura 4 - Fluxograma do cultivo submerso e imobilização celular



Fonte: Autora (2025).

Figura 5 - Biocatalisadores, biocatalisador 1 (à esquerda), biocatalisador 2 (ao centro) e biocatalisador 3 (à direita)



Fonte: Autora (2025).

A concentração efetiva de células imobilizadas nos suportes porosos ($G_{célula} \cdot G_{suporte}^{-1}$) será determinada mediante a razão entre a massa celular seca e a massa do suporte presente no meio de cultivo, conforme descrito na Equação 1.

$$C = \frac{G_{célula}}{G_{suporte}} \quad (1)$$

Onde C refere-se à concentração efetiva de células imobilizadas; $g_{(célula)}$ é a massa seca, obtida após os ensaios de atividade enzimática, mediante secagem das células imobilizadas em estufa por 24 h a 50 °C; e $g_{(suporte)}$ é a massa do suporte,

representada pela massa inicial das peças porosas antes do cultivo.

A escolha pela realização dos ensaios subsequentes em reatores batelada e de leito fixo foi fundamentada nas vantagens e limitações operacionais discutidas no item 3.5. Enquanto o reator batelada permite maior controle em estudos exploratórios, o sistema de leito fixo apresenta potencial de aplicação contínua em escala industrial, especialmente quando combinado com biocatalisadores imobilizados.

4.1.3 Determinação da influência da porosidade na imobilização celular e atividade de transfrutossilação

Os testes preliminares foram conduzidos com biocatalisadores imobilizados em três suportes de poli(ácido lático) (PLA), produzidos por impressão 3D, que se diferenciavam exclusivamente quanto à porosidade. O objetivo principal desta etapa foi duplo: (i) avaliar o impacto da porosidade na atividade catalítica do sistema imobilizado e (ii) identificar o tempo de cultivo submerso mais adequado para a obtenção de biocatalisadores ativos.

Para isso, os biocatalisadores foram obtidos a partir de cultivos submersos conduzidos por 32 e 38 horas, conforme descrito no item 4.1.2. o intervalo de 38 horas foi adotado como padrão experimental nas etapas seguintes.

Os biocatalisadores imobilizados foram adicionados a uma solução de sacarose comercial a 47% (m/v) e tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5,5, contida em tubos Falcon de 50 mL. As reações de transfrutossilação foram realizadas em reator batelada, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 1 hora, conforme as condições descritas no item 4.4.1. Em seguida, foram determinadas as concentrações de sacarose, glicose e açúcares redutores, utilizadas para o cálculo da atividade enzimática. Os materiais de suporte foram, então, classificados de acordo com a atividade obtida, permitindo a comparação do desempenho em função da porosidade.

4.2 Ensaios catalíticos em sistemas batelada

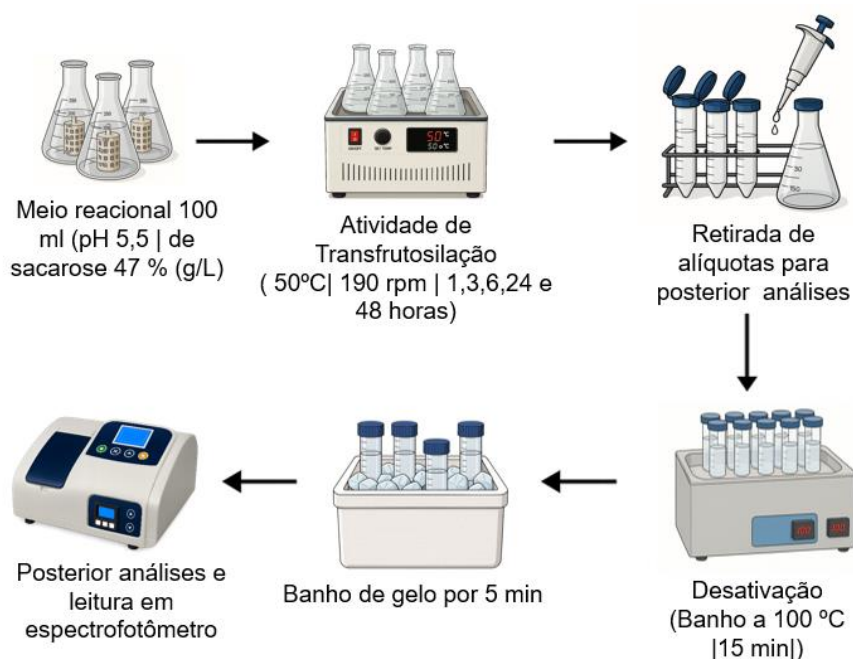
4.2.1 Influência da porosidade do biocatalisador na atividade de transfrutossilação em função do tempo de reação

Os biocatalisadores, imobilizados nos três tipos de suportes avaliados foram adicionados a uma solução reacional composta por sacarose comercial a 47% (m/v), em

tampão Tris-acetato $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5,5, acondicionada em frascos Erlenmeyer de 250 mL. As reações enzimáticas foram conduzidas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, por tempos previamente estabelecidos de 1, 3, 6, 24 e 48 horas, sendo cada condição realizada em triplicata para os diferentes suportes, a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Após cada período reacional, os biocatalisadores foram lavados, filtrados e submetidos à determinação da atividade de transfrutossilação, conforme o método padrão descrito no item 4.4.1. Ao final do processo, foram determinadas as concentrações de açúcares redutores e glicose, bem como a atividade enzimática, permitindo a comparação e classificação dos suportes com base no desempenho catalítico observado. A Figura 6 ilustra o fluxograma metodológico que sintetiza as etapas experimentais apresentadas.

Figura 6 - Fluxograma metodológico das etapas do processo de produção e análise da atividade catalítica



Fonte: Autora (2025).

4.2.2 Ensaios de maximização da atividade de transfrutossilação e influência de variáveis operacionais

A influência das variáveis concentração de sacarose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e velocidade de agitação (rpm) na atividade de transfrutossilação foi determinada mediante um delineamento experimental do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), totalizando 11 pontos experimentais, dos quais três correspondem ao ponto central, fixado nas condições de 175 rpm e $400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose. As repetições do ponto

central foram realizadas em triplicata, com o objetivo de assegurar a confiabilidade estatística e a reprodutibilidade dos dados obtidos. Cada ensaio experimental foi conduzido por um período total de 6 horas.

O delineamento experimental foi construído com o auxílio da plataforma online Protimiza Experimental Design (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>), que permite a geração automatizada de planos experimentais, com cálculo dos valores codificados e reais, definição de pontos axiais e centrais e exportação de tabelas para análise estatística e construção de superfícies de resposta. Essa ferramenta tem sido amplamente empregada na otimização de processos enzimáticos e fermentativos, destacando-se por sua acessibilidade e confiabilidade (Moura *et al.*, 2020; Protimiza, 2024).

O modelo ajustado foi do tipo quadrático de segunda ordem, possibilitando a análise dos efeitos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes (X_1 = velocidade de agitação, rpm; X_2 = concentração de sacarose, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). A adoção desse delineamento permitiu a avaliação sistemática dos efeitos individuais e combinados das variáveis sobre a reação de transfrutossilacção, conduzida com biocatalisadores imobilizados de diferentes porosidades.

Para os ensaios descritos os biocatalisadores foram testados em reações de transfrutossilacção, realizadas em reator batelada e conduzidas pelo período de 6 horas.

A descrição completa das combinações experimentais testadas, incluindo os níveis reais e codificados das variáveis independentes, bem como os valores de atividade enzimática obtidos, é apresentada na Tabela 1, no item 5.3.2. A partir da definição dos fatores independentes e da execução dos ensaios previstos pelo DCCR, os resultados foram analisados estatisticamente por meio do ajuste do modelo quadrático e da análise de variância (ANOVA). A condução experimental seguiu a mesma sequência metodológica anteriormente descrita, sendo igualmente representada pelo fluxograma apresentado na Figura 6.

4.2.3 Validação experimental da condição ótima de maximização da atividade de transfrutossilacção

As reações enzimáticas destinadas à validação da condição ótima de operação foram conduzidas em reator batelada, sob velocidade de agitação de 175 rpm e concentração de sacarose de $400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, valores definidos a partir da etapa de

maximização por delineamento composto central rotacional (DCCR). Os ensaios foram realizados à temperatura de 50 °C, mantendo-se essas condições constantes ao longo de todo o período reacional, procedimento comumente adotado em estudos de validação experimental de condições ótimas obtidas por planejamento estatístico, nos quais a repetição do experimento em ponto fixo permite avaliar a confiabilidade e a aplicabilidade prática do modelo ajustado (Campos *et al.*, 2024; Dias *et al.*, 2022; Gonçalves *et al.*, 2020).

O tempo total de reação foi de 35 horas, com retirada de amostras nos tempos de 1, 3, 6, 11, 25 e 35 horas, para determinação da atividade de transfrutossilacção. Cada ensaio foi conduzido em duplicata.

Ao final de cada intervalo reacional, os biocatalisadores foram separados do meio reacional por filtração, submetidos à lavagem e, em seguida, utilizados para a determinação da atividade de transfrutossilacção, conforme o procedimento descrito no item 4.4.1. Após a determinação da atividade, as amostras foram submetidas à desativação térmica, seguida de resfriamento, e posteriormente encaminhadas para análises espectrofotométricas. A condução experimental seguiu a mesma sequência metodológica anteriormente descrita, sendo igualmente representada pelo fluxograma apresentado na Figura 6.

4.3 Ensaios catalíticos em reator de leito fixo

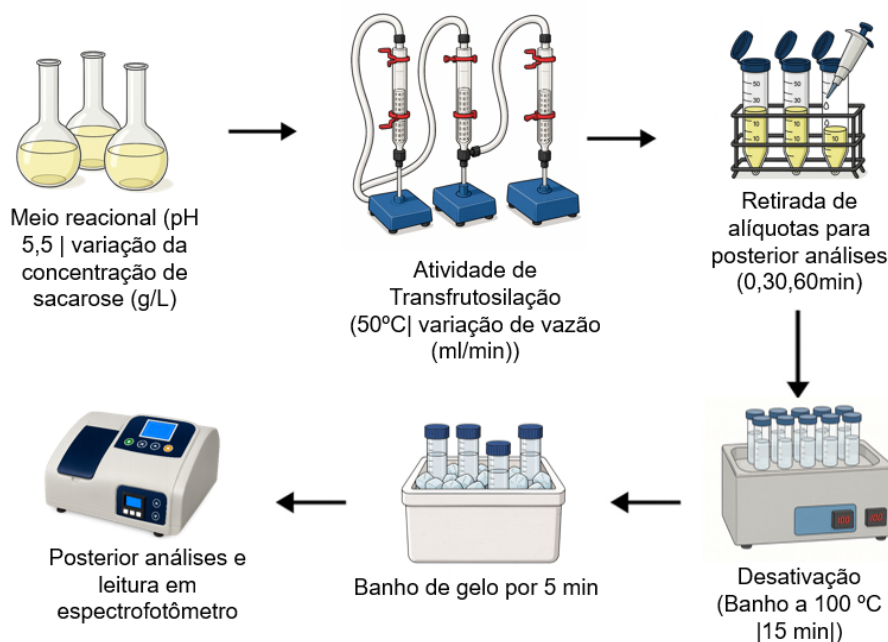
4.3.1 Ensaios de maximização da atividade de transfrutossilacção e influência de variáveis operacionais

O reator consistiu em uma coluna de vidro de 12 mm de diâmetro com jaqueta de vidro, mantida a 50 °C mediante recirculação de água bombeada por banho termostaticado, e alimentado por bomba peristáltica com controle de vazão.

O planejamento experimental seguiu o mesmo delineamento composto central rotacional (DCCR), descrito anteriormente (item 4.2.2), totalizando 11 ensaios experimentais, dos quais três corresponderam ao ponto central. As variáveis independentes avaliadas foram a concentração inicial de sacarose (X_1 , g·L⁻¹) e a vazão de alimentação (X_2 , mL·min⁻¹), que variaram entre 200 e 600 g·L⁻¹ e 2 e 6 mL·min⁻¹, respectivamente. O delineamento foi elaborado utilizando a plataforma Protimiza Experimental Design, empregada para geração automática dos níveis codificados e reais, pontos axiais e centrais, e posterior análise estatística.

Cada ensaio foi conduzido em duplicata, utilizando cinco partículas de biocatalisadores (suportes com biomassa aderida) como fase ativa do leito, enquanto o volume restante foi preenchido com esferas de vidro,. A solução reacional foi composta por sacarose comercial a 47% (m/v) em tampão Tris-acetato $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 5,5), preparada conforme as condições adotadas nos ensaios em reator batelada. A Figura 7 apresenta o fluxograma metodológico referente aos ensaios.

Figura 7 - Fluxograma metodológico dos ensaios de de maximização da atividade de transfrutossilacção e influência de variáveis operacionais em reator de leito fixo



Fonte: Autora (2025).

4.3.2 Validação experimental da condição ótima de maximização da atividade de transfrutossilacção

As reações enzimáticas destinadas à validação da condição ótima de operação em reator de leito fixo foram conduzidas sob as condições de concentração de sacarose e vazão volumétrica definidas a partir da etapa de maximização por delineamento composto central rotacional (DCCR), conforme descrito no item 4.3.1. Os ensaios foram realizados à temperatura constante de 50 °C, mantendo-se fixos os parâmetros operacionais ao longo de todo o período reacional, procedimento amplamente adotado em estudos de validação experimental de sistemas biocatalíticos com biocatalisadores imobilizados (Campos *et al.*, 2024; Dias *et al.*, 2022; Gonçalves *et al.*, 2020).

Os ensaios de validação experimental foram realizados no mesmo reator de leito fixo operado em regime contínuo descrito anteriormente. As condições operacionais

consistiram na alimentação de uma solução de sacarose preparada em tampão Tris-acetato $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 5,5), nas concentrações definidas pelo delineamento composto central rotacional, mantendo-se a temperatura constante de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ao longo de todo o período reacional.

O tempo total de operação foi de 35 horas, com retirada de alíquotas do efluente nos tempos de 1, 3, 6, 11, 25 e 35 horas, com o objetivo de avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador sob as condições ótimas estabelecidas. Cada ensaio foi conduzido em duplicata.

Após a coleta, as amostras foram submetidas à desativação térmica, seguida de resfriamento em banho de gelo, e posteriormente encaminhadas para análises espectrofotométricas destinadas à determinação da atividade de transfrutoseilação, conforme descrito no item 4.4. A concordância entre os valores experimentais obtidos e aqueles preditos pelo modelo estatístico foi utilizada como critério para validar experimentalmente a condição ótima de maximização da atividade no sistema de leito fixo, conforme metodologia empregada em estudos similares envolvendo processos enzimáticos contínuos (Almeida *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2023; Vallecilla-Yépez *et al.*, 2022). A condução experimental seguiu a mesma sequência metodológica anteriormente descrita, sendo igualmente representada pelo fluxograma apresentado na Figura 7.

4.4 Métodos analíticos e análise estatística

4.4.1 Determinação da atividade de transfrutoseilação

As atividades enzimáticas de transfrutoseilação foram determinadas conforme procedimento descrito por Cunha *et al.* (2019), Garcia *et al.* (2021), Gonçalves *et al.* (2020) e. Para isso, três suportes porosos contendo biomassa imobilizada foram incubados com 3,7 mL de solução de sacarose a 48% (m/v) e 1,2 mL de tampão Tris-acetato $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5,5. A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Lab-Line®, modelo 3540), a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e 190 rpm, por 60 minutos, sendo interrompida pela imersão do meio reacional em água fervente por 10 minutos, seguida de resfriamento em banho de água e gelo por 5 minutos, para inativação enzimática.

Com base nos resultados obtidos para as concentrações de frutose transfrutoseilada transferida e frutose liberada, foram determinadas as atividades enzimáticas de transfrutoseilação (AT) e hidrolítica (AH), usando as Equações (2) e (3).

Uma unidade de AT e AH é definida, respectivamente, como a quantidade de enzima que transfere ou libera um micromol (1 μmol) de frutose por minuto, sob as condições experimentais utilizadas (Cunha *et al.*, 2019; Faria *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Ottoni *et al.*, 2012; Prata, 2020).

$$A_T = \frac{[\text{FT}]Q}{m_{\text{biomassa}}} \quad (2)$$

$$A_H = \frac{[\text{F}]Q}{m_{\text{biomassa}}} \quad (3)$$

Onde Q refere-se a vazão volumétrica do substrato e m_{biomassa} à massa de biomassa seca presente no leito catalítico.

4.4.2 Determinação da concentração de açúcares

Após a atividade enzimática, as amostras foram utilizadas para quantificação colorimétrica das concentrações de glicose (G), utilizando o método GOD/PAP® (kit enzimático glicose-oxidase), e de açúcares redutores (AR), através do método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Os dados experimentais obtidos foram utilizados para calcular as concentrações de frutose liberada no meio reacional (F) e de frutose transfrutossilada transferida (FT), empregando as Equações (4) e (5) (Chen, 1996; Cunha *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Miller, 1959; Ottoni *et al.*, 2012).

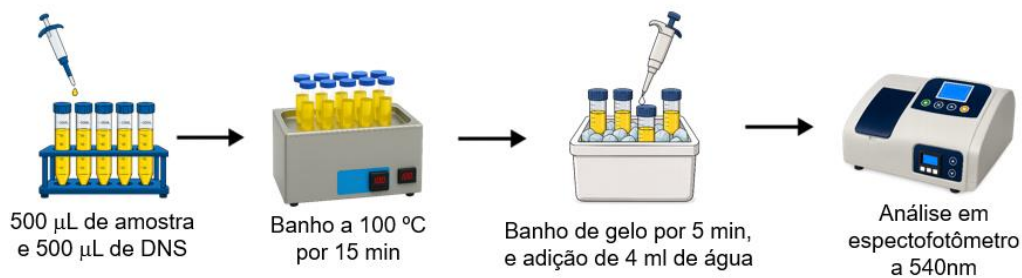
$$[\text{F}] = [\text{AR}] - [\text{G}] \quad (4)$$

$$[\text{FT}] = [\text{G}] - [\text{F}] \quad (5)$$

4.4.2.1 Determinação da concentração de açúcares redutores (AR)

A quantificação dos açúcares redutores (AR) foi realizada pelo método colorimétrico de 3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme procedimento clássico descrito por Miller (1959) e adaptado por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013). As amostras foram reagidas com a solução de DNS e aquecidas em banho-maria a 100 °C por 10 minutos, promovendo o desenvolvimento da coloração característica. Após resfriamento, as leituras de absorvância foram efetuadas em espectrofotômetro (Bel®, modelo UVM51) a 540 nm. As concentrações de AR foram calculadas com base na curva de calibração construída a partir de padrões de glicose. A Figura 11 ilustra o procedimento adotado para a quantificação de açúcares redutores pelo método do DNS.

Figura 11 - Quantificação de açúcares redutores pelo método de DNS

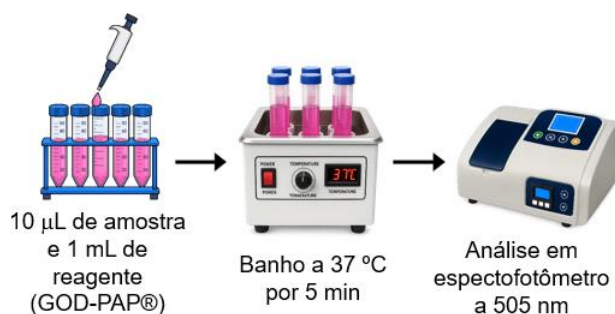


Fonte: Autora (2025).

4.4.2.2 Determinação da concentração de glicose (G)

A concentração de glicose (G) foi determinada pelo método enzimático GOD-PAP®, conforme descrito por Cunha *et al.* (2019), Dias *et al.* (2022), Ganaie *et al.* (2014), Garcia *et al.* (2021), Gonçalves *et al.* (2020), Vega e Zúniga-Hansen (2011). As amostras foram tratadas com o reagente enzimático do kit comercial (Laborlab®) e incubadas a 37 °C por 5 minutos. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Bel®, modelo UV-M51) a 505 nm, e as concentrações de glicose foram calculadas a partir do fator de calibração fornecido pelo fabricante, utilizando água destilada como branco. A Figura 12 apresenta o procedimento experimental empregado para a quantificação da glicose.

Figura 12 - Quantificação da concentração de glicose por meio do kit enzimático GOD- PAP®



Fonte: Autora (2025).

4.4.3 Determinação da atividade absoluta

A atividade absoluta do biocatalisador foi definida como a quantidade total de frutose transfrutossilada produzida pelo sistema imobilizado, considerando simultaneamente a atividade específica e a massa de biomassa seca efetivamente retida no suporte.

Essa grandeza foi calculada a partir da multiplicação da atividade específica de

transfrutossilacão ($U \cdot g^{-1}$) pela massa seca de biomassa imobilizada presente em cada suporte, conforme descrito na Equação (6) abordagem amplamente utilizada na avaliação do desempenho global de biocatalisadores imobilizados (Brena; Batista-Viera, 2013; Guisan, 2013).

$$A_{abs} = A_{esp} \cdot m_{biomassa} \quad (6)$$

Onde, A_{abs} corresponde à atividade absoluta (U); A_{esp} é a atividade específica de transfrutossilacão ($U \cdot g^{-1}$); $m_{biomassa}$ representa a massa seca de biomassa efetivamente imobilizada no suporte (g).

4.4.4 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata, conforme o sistema avaliado. Os dados experimentais foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 5%, sendo aplicado o teste de Tukey quando pertinente para comparação entre médias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

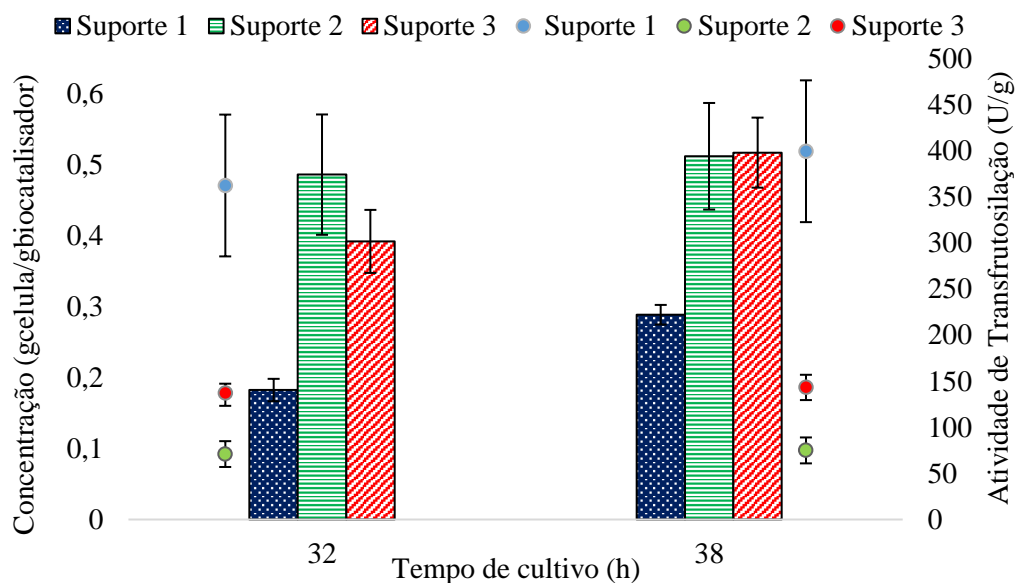
5.1 Porosidade dos suportes

Os suportes produzidos por manufatura aditiva apresentaram porosidades de 49,0% v/v, 61,8% v/v e 64,3% v/v (Suportes 1,2 e 3, do menos ao mais poroso), valores compatíveis com os intervalos relatados por Bártolo *et al.* (2021) e Danilevicius *et al.* (2022) para estruturas de PLA (30–70%). O aumento da porosidade está diretamente associado à maior contato de substrato e células imobilizadas, o que favorece a atividade catalítica do biocatalisador. Segundo Belmonte-Izquierdo *et al.* (2023), a elevada permeabilidade interna é determinante para reduzir resistências difusionais e ampliar a área de contato efetiva entre as células e o meio reacional. Entretanto, conforme Santos *et al.* (2021), esse ganho deve ser equilibrado com a integridade mecânica e a capacidade de retenção de biomassa, fatores essenciais para a estabilidade operacional em processos prolongados.

5.2 Determinação da influência da porosidade na imobilização celular e atividade de transfrutossilção

A Figura 13 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de cultivo submerso, comparando os tempos de 32 e 38 horas para os biocatalisadores imobilizados em suportes com diferentes porosidades. Os resultados indicam que todas as porosidades avaliadas permitiram a imobilização eficiente de células de *A. oryzae* IPT-301, resultando em elevada atividade de transfrutossilção tanto em 32 h quanto em 38 h, com valores superiores aos reportados recentemente para sistemas imobilizados de *A. oryzae*. A literatura indica que atividades entre 60 e 80 U·g⁻¹ são classificadas como altas para biocatalisadores imobilizados aplicados à síntese de FOS (Almeida *et al.*, 2023; Banerjee *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2024).

Figura 13 - Concentração de biomassa imobilizada (pontos) e atividade específica de transfrutoseilação (barras) ($U\ g^{-1}$) nos tempos de cultivo de 32 e 38 h



Fonte: Autora (2025).

No entanto, os biocatalisadores produzidos em 38 h apresentaram maior atividade enzimática como mostrado na Tabela 1, sendo este tempo de cultivo adotado para ensaios posteriores.

Tabela 1 - Atividade específica e atividade absoluta dos biocatalisadores imobilizados em suportes com diferentes porosidades

Biocatalisador	Atividade Específica ($U\cdot g^{-1}$)	Atividade Absoluta (U)	M.biomassa (seca)(g)
1 (49%)	222,18 ± 10,65	169,96	0,765
2 (61,8%)	394,14 ± 57,82	66,62	0,169
3 (64,3%)	398,09 ± 37,99	43,03	0,108

Fonte: Autora 2025.

Observa-se que os suportes mais porosos exibiram valores mais elevados de atividade específica. À primeira impressão, esses resultados poderiam levar à interpretação de que o aumento da porosidade estaria associado a um desempenho enzimático superior. Contudo, quando se analisa a atividade absoluta, que representa a quantidade total de produto formada e foi calculada a partir da multiplicação da atividade específica pela massa de biomassa seca efetivamente retida em cada suporte, verifica-se o comportamento oposto.

A diferença entre atividade específica e absoluta indica que o aumento observado na atividade específica dos suportes mais porosos não reflete uma maior capacidade global de conversão do sistema, mas está relacionado principalmente à menor

quantidade de biomassa imobilizada nessas estruturas. Suportes com porosidades elevadas tendem a apresentar paredes mais delgadas e menor densidade estrutural, reduzindo o número de sítios internos disponíveis para a adesão e retenção celular. Como consequência, a massa total de biomassa imobilizada diminui, elevando proporcionalmente o valor da atividade específica, sem que isso represente necessariamente melhor desempenho global. Estudos recentes enfatizam essa relação inversa entre porosidade elevada e retenção celular, apontando que suportes mais densos tendem a reter maiores quantidades de biomassa, resultando em maior atividade absoluta, enquanto suportes mais porosos favorecem difusão, mas apresentam menor ocupação celular (Cheng *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2024).

Por outro lado, o suporte de menor porosidade apresentou maior retenção de biomassa, o que pode ser associado a um crescimento e imobilização maior das células causado pela maior presença de filamentos de PLA na estrutura interna da partícula de suporte (Rodrigues *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2018). Essa relação inversa entre porosidade e retenção celular indica que a otimização da estrutura deve contemplar a combinação adequada entre acessibilidade interna e estabilidade física do biocatalisador, assegurando elevada atividade reacional e possibilidade de reuso sucessivo, sem perda significativa de atividade.

Embora os suportes mais porosos apresentem maiores valores de atividade específica, o suporte menos poroso foi o que registrou a maior atividade absoluta, evidenciando que a quantidade de biomassa retida influencia diretamente o desempenho final do biocatalisador. Assim, a interpretação dos resultados deve considerar simultaneamente a atividade específica, a atividade absoluta e a relação entre porosidade e retenção celular, evitando conclusões baseadas apenas em valores expressos por grama de biomassa.

Além disso, foi realizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey, conforme descrito no item 4.4.4, e os resultados demonstraram que as diferenças entre os suportes foram estatisticamente significativas tanto para a atividade de transfrutoseilação quanto para a concentração celular. Isso indica que as características estruturais dos materiais influenciaram de maneira relevante não apenas o comportamento enzimático, mas também a quantidade de biomassa efetivamente imobilizada. Abordagens estatísticas semelhantes, envolvendo ANOVA e teste de Tukey para comparação entre biocatalisadores imobilizados em suportes com diferentes propriedades físicas, têm sido amplamente aplicadas em estudos recentes que investigam a relação entre estrutura do

suporte, retenção celular e desempenho em sistemas imobilizados operando em batelada ou leito fixo (Carvalho *et al.*, 2024; Ranieri *et al.*, 2024; Soares *et al.*, 2022).

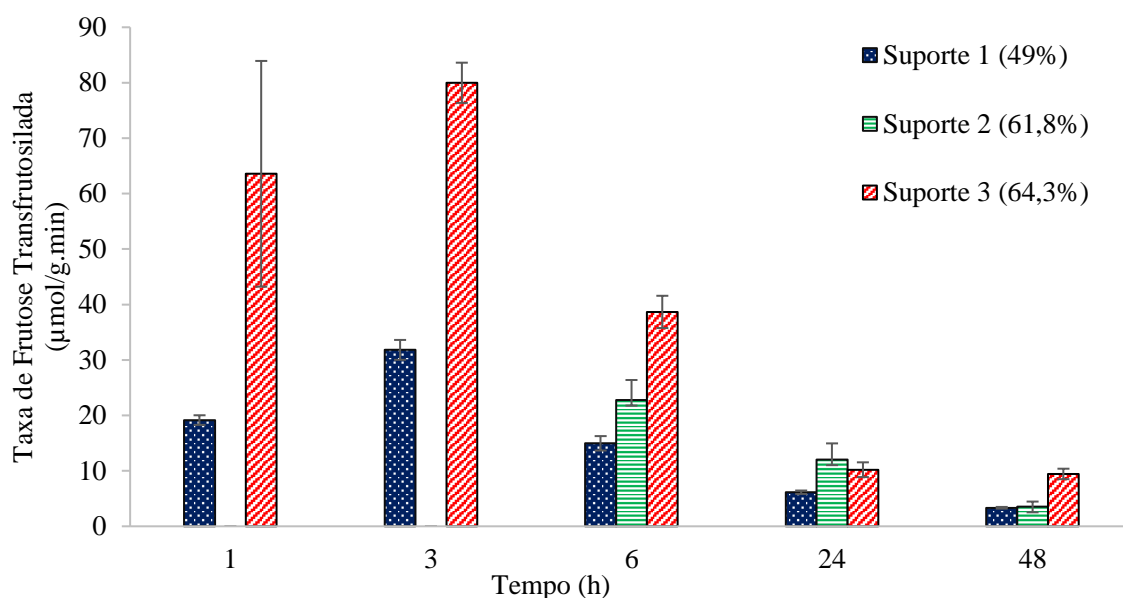
5.3 Ensaios catalíticos em reator batelada

5.3.1 Influência da porosidade do biocatalisador na atividade de transfrutossilação em função do tempo de reação

As Figuras 14 e 15 apresentam, respectivamente, a taxa de frutose transfrutossilada ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) e a concentração de glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ao longo dos diferentes tempos de reação (1, 3, 6, 24 e 48 horas) para os biocatalisadores imobilizados nos três tipos de suportes de PLA avaliados.

A Figura 14 mostra que o suporte mais poroso (64,3%) apresentou a maior taxa inicial de transfrutossilação, atingindo $79,99 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \pm 3,62$ em 3 h de reação. Essa resposta pode estar associada à ampliação da área superficial da biomassa imobilizada, facilitando o contato entre as moléculas do substrato com os sítios ativos das enzimas. Chen *et al.* (2021) e Mallappa *et al.* (2023) relataram comportamento semelhante em sistemas porosos, destacando o efeito da estrutura aberta na mitigação das limitações difusionais. No entanto, ressalta-se que os biocatalisadores obtidos neste estudo consistem em células imobilizadas cujo crescimento pode ocasionar o bloqueio parcial dos poros internos do suporte, resultando predominantemente em transferência de massa externa à partícula do biocatalisador. Já o suporte menos poroso (49%) exibiu menor taxa inicial, alcançando $31,82 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \pm 1,79$ em 3 h e mantendo-se estável. Essa estabilidade pode estar relacionada à maior fixação celular e à menor perda de enzimas do suporte durante o processo reacional, conforme observado por Lourenço *et al.* (2019) e Rodrigues *et al.* (2021).

Figura 14 - Taxa de Frutose transfrutossilada ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$) dos biocatalisadores imobilizados em diferentes suportes de PLA ao longo dos tempos de reação (1, 3, 6, 24 e 48 horas)



Fonte: Autora (2025).

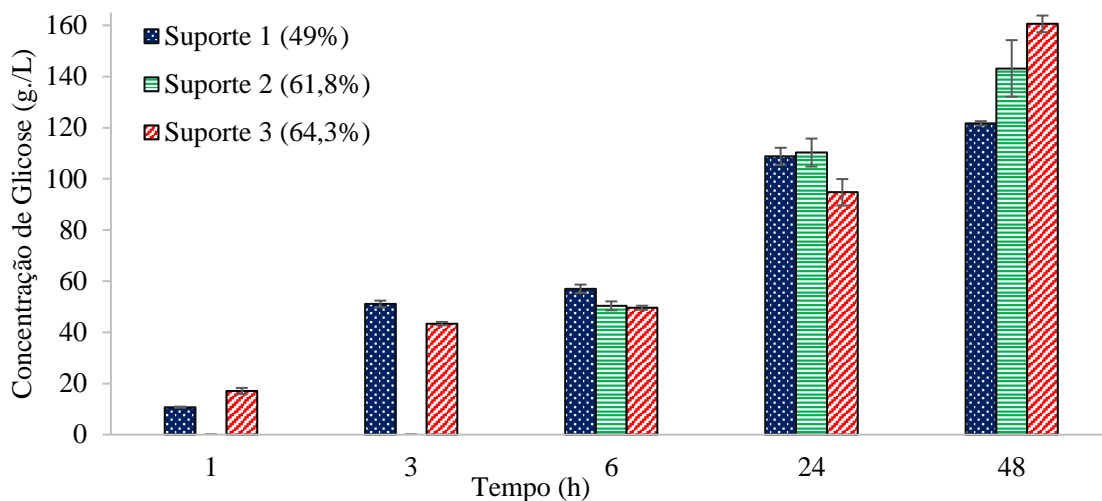
Na Figura 15 é possível observar o aumento progressivo da concentração de glicose ao longo das 48 horas de reação, o que pode ser atribuído à sua formação como principal subproduto do processo de síntese de fruto-oligossacarídeos (FOS). Como o sistema reacional opera em regime de batelada, não há remoção contínua dos produtos formados, resultando em acúmulo gradativo de glicose no meio.

O suporte menos poroso (49%) manteve produção, atingindo $121,69 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \pm 0,842$, enquanto o suporte mais poroso (64,3%) apresentou atividade de $160,58 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 3,26$. Esses resultados indicam que suportes mais porosos favorecem maiores taxas iniciais de reação, enquanto suportes mais densos podem apresentar maior retenção de biomassa e menor perda enzimática, características frequentemente associadas a materiais com menor porosidade (Mallappa *et al.*, 2023; Morais *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2018).

Além disso, o acúmulo de glicose ao longo da reação exerce efeito inibitório sobre as frutossiltransferases, reduzindo a taxa de transfrutossilção conforme o produto se acumula no meio. A glicose atua como inibidor competitivo da sacarose, ocupando o sítio ativo e diminuindo a eficiência catalítica, efeito que se intensifica em sistemas batelada devido à ausência de remoção contínua dos produtos. Assim, suportes que liberam mais glicose nas primeiras horas tendem a apresentar queda mais rápida na atividade, enquanto suportes menos porosos mantêm taxas mais estáveis. Esse comportamento é amplamente

descrito na literatura recente (Banerjee & Saha, 2022; Costa *et al.*, 2024; Chen *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2023).

Figura 15 - Concentração de glicose (g/L) ao longo do tempo de reação para biocatalisadores imobilizados em diferentes suportes de PLA



Fonte: Autora (2025).

5.3.2 Ensaios de maximização da atividade de transfrutossilação e influência de variáveis operacionais

As Equações (6) e (7) descrevem a relação entre as variáveis de velocidade de agitação (X_1) e concentração de sacarose (X_2) sobre a atividade de transfrutossilação (\hat{Y}) para os suportes de 49 % e 64,3 % de porosidade, respectivamente.

$$AT_1 = 341,60 - 94x_1^2 + 30,37x_1 - 85,04x_2^2 \quad (6)$$

$$AT_3 = 554,30 - 113,73x_1^2 - 123,81x_2^2 \quad (7)$$

Em ambos os modelos, a presença de termos quadráticos negativos caracteriza superfícies de resposta com curvatura côncava, nas quais a atividade de transfrutossilação aumenta até uma região ótima e passa a decrescer quando a velocidade de agitação e a concentração de sacarose se afastam dos níveis centrais. Para o suporte de 49 % de porosidade, além dos efeitos quadráticos, observa-se contribuição positiva do termo linear de concentração de sacarose (X_2), indicando que incrementos moderados de substrato favorecem a resposta antes que predomine o efeito inibitório associado ao termo X_2^2 . Já o suporte de 64,3 % é descrito exclusivamente pelos efeitos quadráticos de X_1 e X_2 , sugerindo comportamento mais simétrico em torno da condição central e maior robustez frente a pequenas variações operacionais. Tendência semelhante, com predominância de

termos quadráticos em sistemas imobilizados suportados em matrizes porosas, tem sido relatada em estudos recentes de otimização de bioprocessos enzimáticos (Carvalho *et al.*, 2024; Dias *et al.*, 2022; Mahak *et al.*, 2023; Moura *et al.*, 2020).

Em seguida, a Tabela 2 apresenta as condições experimentais e os valores de atividade de transfrutoseilação observados e preditos pelos modelos ajustados para ambos os suportes. Essa comparação evidencia boa concordância entre os valores médios experimentais e aqueles obtidos pelas Equações (6) e (7) ao longo da faixa estudada de velocidade de agitação e concentração de sacarose, reforçando a capacidade preditiva dos modelos quadráticos para descrever o comportamento catalítico dos biocatalisadores imobilizados.

Tabela 2 - Condições do DCCR, atividade experimental e predita (\hat{Y}) para os suportes 1 (49%) e 3 (64,3%)

Ensaio	Velocidade de Agitação (X_1 , rpm)	Sacarose (X_2 , g·L ⁻¹)	Atividade experimental (1) (U/g)	Atividade predita (1) (\hat{Y} , U/g)	Atividade experimental (3) (U/g)	Atividade predita (3) (\hat{Y} , U/g)
1	100 (-1)	200 (-1)	198,55 ± 15,91	132,19	269,76 ± 13,20	316,76
2	250 (+1)	200 (-1)	89,35 ± 8,25	132,19	300,77 ± 40,44	316,76
3	100 (-1)	600 (+1)	211,29 ± 5,58	192,93	357,3 ± 22,69	316,76
4	250 (+1)	600 (+1)	216,67 ± 9,64	192,93	327,49 ± 28,31	316,76
5	68,93 (-1,41)	400 (0)	121,74 ± 11,18	154,72	358,75 ± 45,12	328,19
6	281,07 (+1,41)	400 (0)	152,64 ± 9,70	154,52	300,77 ± 40,44	328,19
7	175 (0)	117,16 (-1,41)	118,74 ± 15,97	129,71	321,21 ± 43,28	308,15
8	175 (0)	682,84 (+1,41)	191,49 ± 15,57	215,35	297,99 ± 31,25	308,15
9	175 (0)	400 (0)	313,86 ± 24,14	341,60	605,88 ± 52,89	554,30
10	175 (0)	400 (0)	361,85 ± 7,92	341,60	557,79 ± 41,28	554,30
11	175 (0)	400 (0)	349,08 ± 3,74	341,60	499,24 ± 9,52	554,30

Fonte: Autora (2025).

Nota: Condições experimentais do delineamento composto central rotacional (DCCR), com os níveis codificados e reais das variáveis de velocidade de agitação (X_1 , rpm) e concentração de sacarose (X_2 , g·L⁻¹), e respectivos valores médios de atividade de transfrutoseilação (U·g⁻¹) obtidos experimentalmente e preditos (\hat{Y}) pelos modelos quadráticos ajustados para os suportes 1 (menos poroso) e 3 (mais poroso).

As atividades máximas de $605,88 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 52,89$ (64,3 %) e $361,85 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 7,91$ (49 %) foram obtidas em condições próximas ao ponto central de 175 rpm e $400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, indicando que a faixa operacional selecionada favoreceu a conversão sem evidências de inibição pronunciada por excesso de substrato. A combinação de concentrações intermediárias de sacarose e níveis moderados de agitação parece proporcionar balanço adequado entre disponibilidade de substrato e transferência de massa, evitando tanto restrições operacionais associadas ao contato entre o meio e o biocatalisador quanto possíveis danos mecânicos às células imobilizadas, como observado em outros estudos de síntese de FOS com planejamento experimental (Campos *et al.*, 2024; Dias *et al.*, 2022; Gonçalves *et al.*, 2020). A análise de variância, apresentada nas Tabelas 3 e 4, confirma a significância estatística dos modelos ajustados para ambos os suportes.

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático ajustado ao suporte 1 (49%)

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	77636,3	3	25878,8	18,1	0,00112
Resíduos	10015,8	7	1430,8	-	-
Falta de Ajuste	8780,3	5	1756,1	2,8	0,28046
Erro Puro	1235,5	2	617,8	-	-
Total	87652,1	10	-	-	-

Fonte: Autora (2025).

Nota: Análise de variância (ANOVA) referente ao modelo quadrático ajustado ao suporte 1 (menos poroso). São apresentados os valores de soma dos quadrados, graus de liberdade, quadrado médio, valor de F calculado (F_{calc}) e o respectivo p-valor, utilizados para avaliar a significância e adequação do modelo.

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático ajustado ao suporte 3 (64,3%)

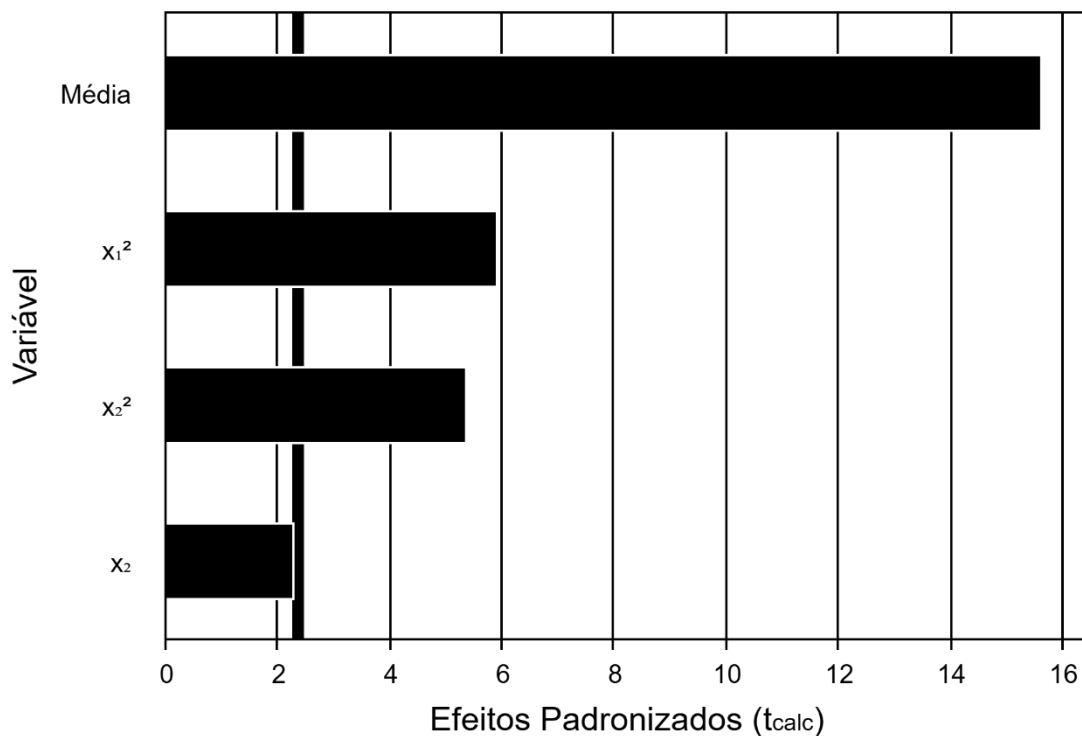
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	123524,7	2	61762,4	41,5	0,00006
Resíduos	11912,1	8	1489,0	-	-
Falta de Ajuste	6207,8	6	1034,6	0,4	0,85847
Erro Puro	5704,3	2	2852,1	-	-
Total	135436,8	10	-	-	-

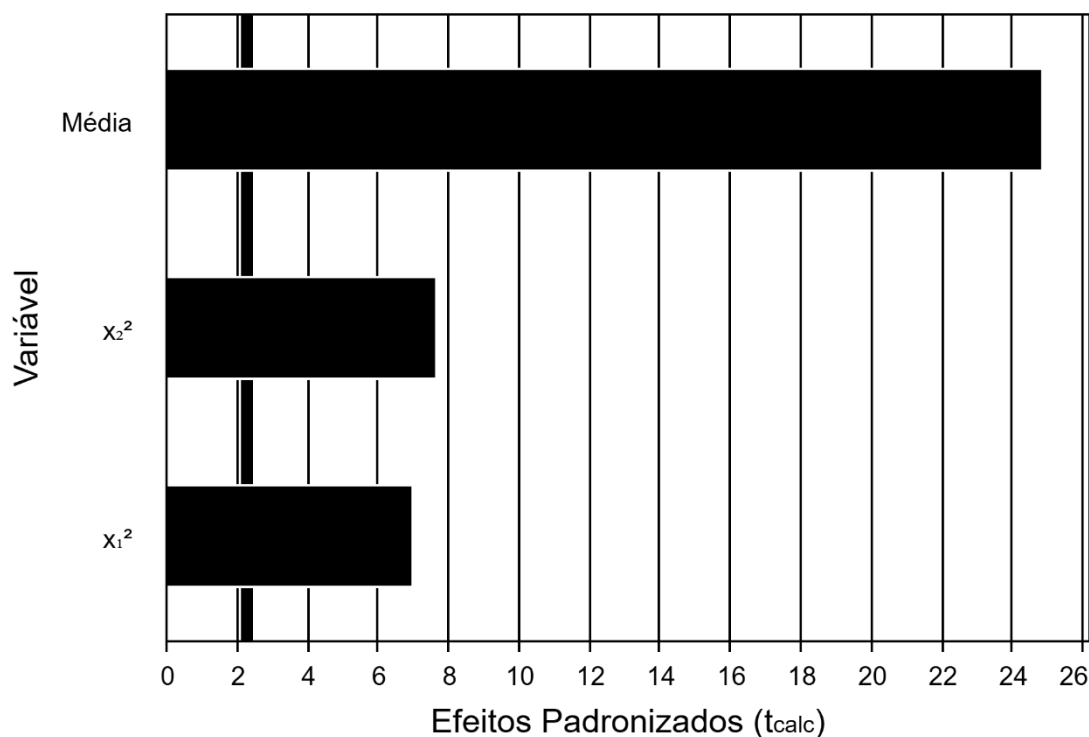
Fonte: Autora (2025).

Nota: Análise de variância (ANOVA) referente ao modelo quadrático ajustado ao suporte 3 (mais poroso). São apresentados os valores de soma dos quadrados, graus de liberdade, quadrado médio, valor de F calculado (F_{calc}) e o respectivo p-valor, indicando a significância estatística e a adequação do modelo.

Para o suporte de 49 % de porosidade, a regressão apresentou $p = 0,00112$ e $R^2 = 88,57\%$, com quadrado médio dos resíduos ($QM_{res} = 1430,8$) refletindo maior dispersão experimental ao longo dos ensaios. Já o suporte de 64,3 % apresentou $p = 0,00006$ e $R^2 = 91,20\%$, com $QM_{res} = 1489,0$, porém acompanhado de menor variabilidade relativa e melhor alinhamento entre valores observados e preditos. Esse padrão tem sido descrito em estudos recentes envolvendo suportes poliméricos e estruturas obtidas por manufatura aditiva, nos quais maior uniformidade estrutural e regularidade do material tendem a favorecer respostas experimentais mais consistentes e modelos estatísticos com ajuste superior (Bai *et al.*, 2025; Eixenberger *et al.*, 2023; Luo *et al.*, 2025; Remonato *et al.*, 2023). Para ambos os suportes, a falta de ajuste não foi significativa ($p = 0,28046$ para 49 % e $p = 0,85847$ para 64,3 %), confirmando que as superfícies de resposta representam adequadamente o comportamento observado dentro da região experimental avaliada. Na Figura 16 são apresentados os gráficos de Pareto dos efeitos padronizados nos modelos quadráticos ajustados.

Figura 16 - Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados nos modelos quadráticos ajustados





Fonte: Autora (2025).

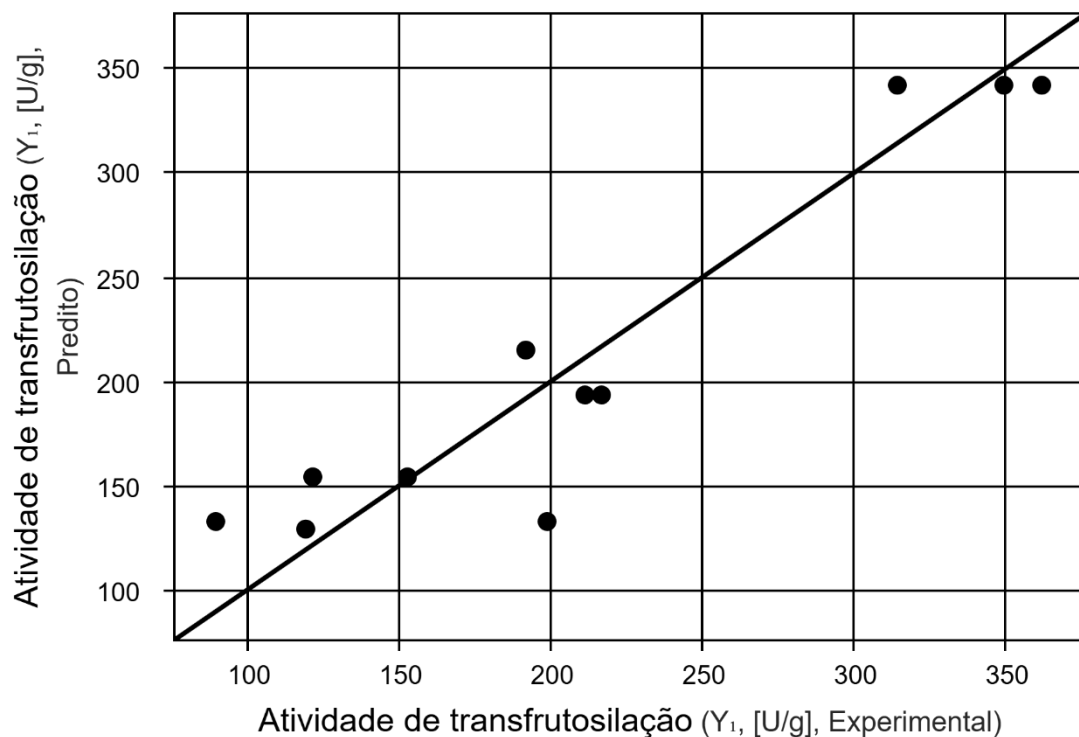
Nota: Gráficos de Pareto obtidos para os suportes 1 (menos poroso) e 3 (mais poroso), dispostos verticalmente. Cada gráfico mostra a magnitude e a significância estatística dos efeitos padronizados das variáveis independentes (velocidade de agitação e concentração de sacarose) e suas interações sobre a atividade de transfrutossilção. Os termos quadráticos X_1^2 (velocidade de agitação) e X_2^2 (concentração) apresentaram os maiores efeitos, indicando comportamento curvilíneo e predominância de limitações difusionais.

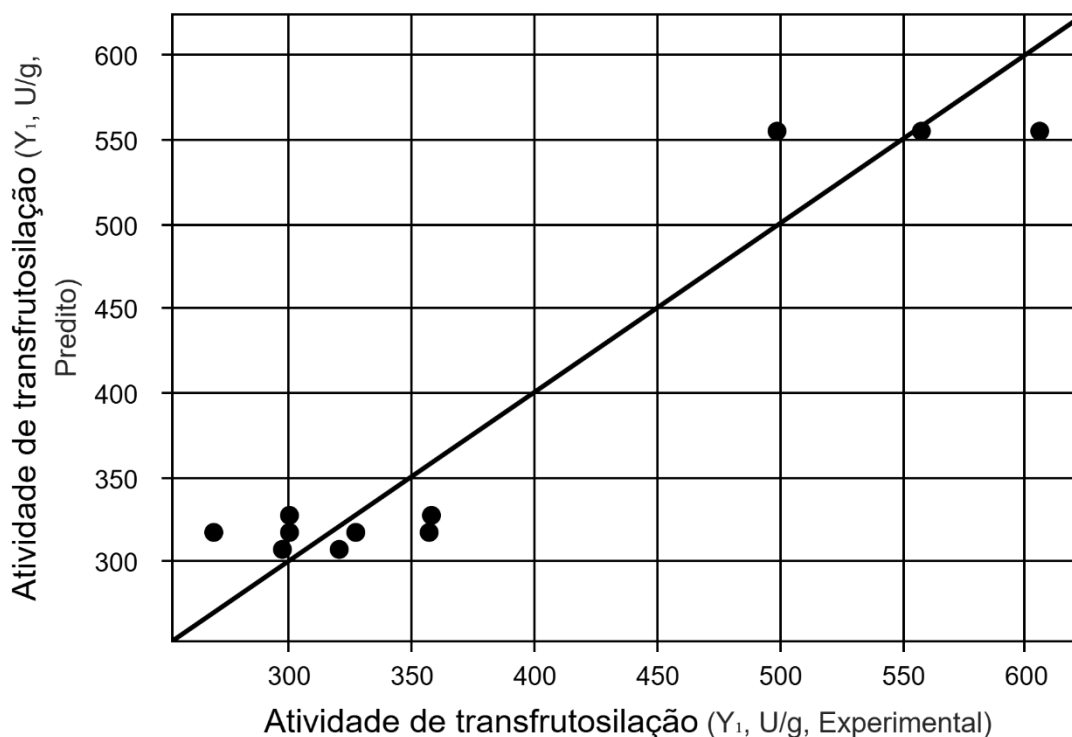
Na Figura 16 são apresentados os gráficos de Pareto dos efeitos padronizados para os dois suportes, nos quais se observa que os termos quadráticos X_1^2 e X_2^2 foram os mais influentes sobre a atividade de transfrutossilção. Para o suporte de 49 %, o termo linear de concentração de sacarose (X_2) também contribuiu de forma significativa, embora em menor magnitude que os efeitos quadráticos. Já no suporte de 64,3 % predominam exclusivamente os termos X_1^2 e X_2^2 , reforçando a natureza essencialmente curvilínea da resposta. Esse comportamento indica que a maximização da atividade depende de um intervalo estreito de velocidade de agitação e concentração de sacarose em torno das condições ótimas, padrão frequentemente relatado em sistemas enzimáticos heterogêneos em que a intensificação do gradiente de velocidade ou o aumento da viscosidade do meio podem dificultar o acesso do substrato as células imobilizadas (Chen *et al.*, 2021; Fernandes; Oliveira; Souza, 2022; Wu *et al.*, 2022).

Os termos quadráticos negativos de velocidade de agitação (X_1^2) indicam que agitações excessivas tendem a reduzir a atividade de transfrutossilção, efeito associado

ao aumento do cisalhamento e a possíveis danos à estrutura celular ou ao biofilme formado sobre o suporte. De maneira análoga, o termo quadrático de concentração de sacarose (X_2^2) sugere que concentrações muito elevadas de substrato podem aumentar a viscosidade do meio e dificultar o acesso da sacarose aos sítios ativos, resultando em queda da taxa de transfrutossilagem. A influência desses efeitos de segunda ordem em sistemas de FOS e em outros bioprocessos com células imobilizadas tem sido reportada em reatores agitados e contínuos, destacando o papel da hidrodinâmica e da difusão na definição da região ótima de operação (Dias *et al.*, 2022; Morais *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2023; Ribeiro *et al.*, 2024). Na sequência, a Figura 17 mostra a correlação entre os valores experimentais e os preditos pelos modelos quadráticos para os dois suportes.

Figura 17 - Correlação entre valores experimentais e preditos da atividade de transfrutossilagem





Fonte: Autora (2025).

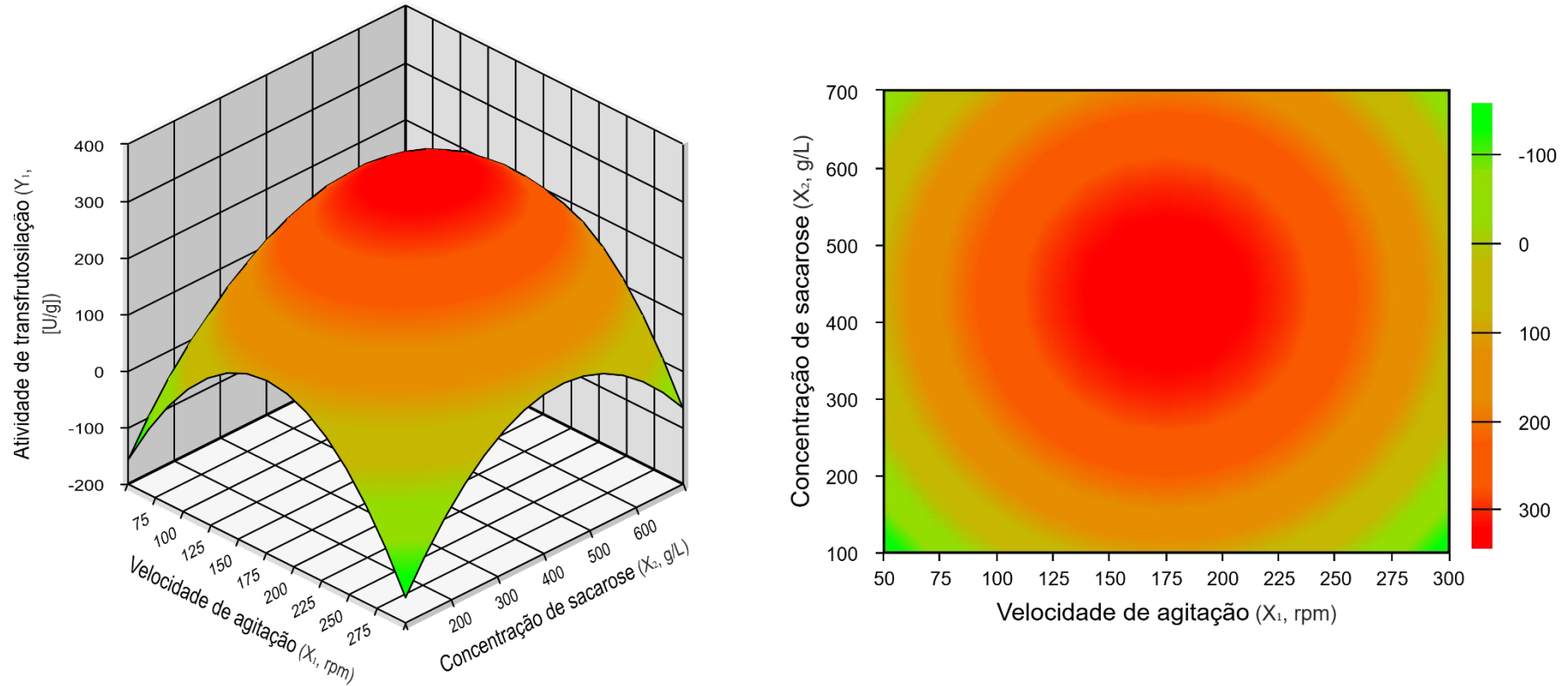
Nota: Correlação entre os valores experimentais observados e os valores preditos pelos modelos quadráticos ajustados, para os suportes 1 (gráfico superior) e 3 (gráfico inferior). Os pontos próximos à linha de identidade indicam elevado grau de ajuste e precisão preditiva. O suporte 3 apresenta menor dispersão residual, refletindo maior reprodutibilidade e estabilidade catalítica em função de sua estrutura mais porosa.

Observa-se que os pontos experimentais se distribuem próximos à linha de identidade, com dispersão relativamente baixa em todo o intervalo de atividade avaliado. Esse comportamento confirma a boa capacidade preditiva das Equações (6) e (7) e indica que os resíduos se distribuem de forma aleatória, sem tendência sistemática ao longo da faixa de resposta. Estudos recentes de modelagem de bioprocessos com suporte em DCCR reportam padrões similares de correlação, associando a proximidade dos pontos à linha de 45° à adequação estatística do modelo e à confiabilidade das predições para fins de otimização (Campos *et al.*, 2024; Ribeiro *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2025).

As Figuras 18 e 19 exibem, respectivamente, as superfícies de resposta tridimensionais (à esquerda) e os gráficos de contorno bidimensionais (à direita) referentes à atividade de transfrutossilção (\hat{Y} , U·g⁻¹) em função das variáveis de velocidade de agitação (X_1) e concentração de sacarose (X_2) para os suportes de 49 % e 64,3 % de porosidade. As superfícies revelam zonas de máxima atividade bem definidas entre aproximadamente 150 e 200 rpm de agitação e 350 a 450 g·L⁻¹ de sacarose, com declínio progressivo da resposta quando as condições se afastam dessa região. Para ambos

os suportes, as regiões em vermelho concentram as maiores atividades preditas, situadas próximas aos níveis centrais do DCCR (175 rpm; 400 g·L⁻¹), coerentes com os valores máximos observados experimentalmente.

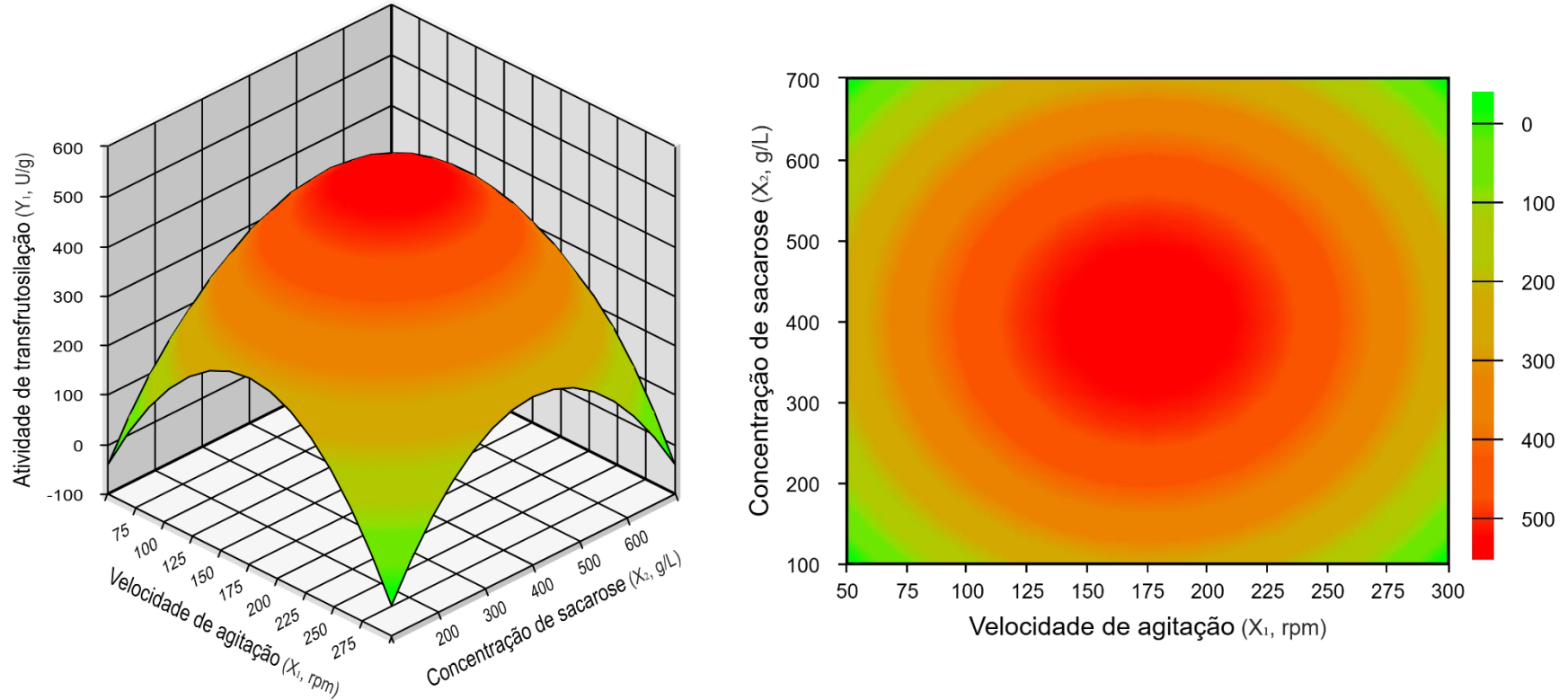
Figura 18 - Superfície de resposta da atividade de transfrutossiliação para o suporte menos poroso (49%)



Fonte: Autora (2025).

Nota: Superfície tridimensional (à esquerda) e gráfico de contorno (à direita) da atividade de transfrutossiliação (\hat{Y} , $U \cdot g^{-1}$) em função das variáveis de velocidade de agitação (X_1 , rpm) e concentração de sacarose (X_2 , $g \cdot L^{-1}$) para o suporte de PLA menos poroso (49%). As regiões em vermelho indicam as condições de maior resposta predita, situadas próximas aos níveis centrais do DCCR (175 rpm; $400 g \cdot L^{-1}$).

Figura 19 - Superfície de resposta da atividade de transfrutossiliação para o suporte mais poroso (64,3%)



Fonte: Autora (2025).

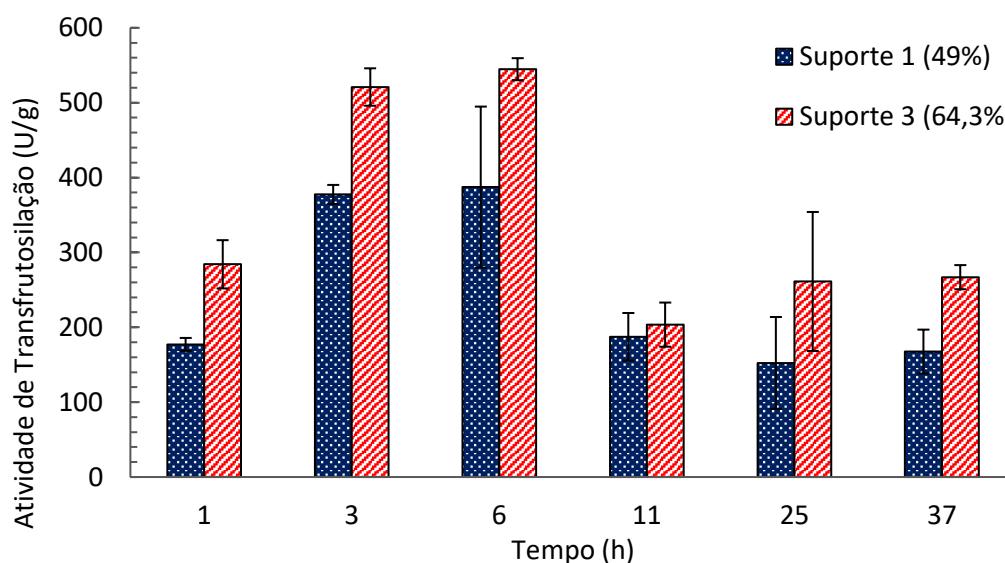
Nota: Superfície tridimensional (à esquerda) e gráfico de contorno (à direita) da atividade de transfrutossiliação (\hat{Y} , $U \cdot g^{-1}$) em função das variáveis de velocidade de agitação (X_1 , rpm) e concentração de sacarose (X_2 , $g \cdot L^{-1}$) para o suporte de PLA mais poroso (64,3%). As regiões em vermelho indicam as condições de maior resposta prevista, próximas aos níveis centrais do DCCR (175 rpm; 400 $g \cdot L^{-1}$). O perfil suavizado e a amplitude da zona ótima podem indicar menor resistência difusional e melhor acessibilidade do substrato à biomassa imobilizada.

O suporte com porosidade de 64,3 % apresenta curvatura mais ampla e suave nas superfícies de resposta, denotando uma região ótima com maior extensão e menor sensibilidade a pequenas variações de velocidade de agitação e concentração de sacarose. Esse comportamento sugere que a estrutura mais aberta facilita a circulação do meio reacional e o acesso das moléculas à superfície ativa do material, reduzindo gradientes de concentração. Em contrapartida, o suporte de 49 % de porosidade mostra redução mais acentuada da atividade nas regiões extremas de agitação e concentração, característica de sistemas em que a estrutura física impõe maior resistência à interação entre o meio reacional e a biomassa imobilizada. Tendências semelhantes, relacionando o aumento da porosidade e da conectividade dos poros a superfícies de resposta mais suaves e a maior estabilidade operacional, têm sido relatadas em suportes poliméricos e estruturas produzidas por manufatura aditiva (De Gregorio *et al.*, 2022; Eixenberger *et al.*, 2023; Guio *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2024).

5.3.3 Validação experimental da condição ótima de maximização da atividade de transfrutossilacção

A Figura 20 apresenta a evolução da atividade de transfrutossilacção ao longo do tempo para os biocatalisadores imobilizados nos suportes de 49 % (Suporte 1) e 64,3 % (Suporte 3), operando na condição ótima definida pelo DCCR (175 rpm e 400 g·L⁻¹ de sacarose). Para ambos os suportes, observa-se aumento inicial da atividade, seguido de redução gradual ao longo do período reacional.

Figura 20 - Evolução temporal da atividade de transfrutossilacção na condição ótima definida pelo DCCR



Fonte: Autora (2026).

No Suporte 1 (49 %), a maior atividade média foi registrada em 6 horas de reação, atingindo $387,77 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 13,52$ com queda progressiva em tempos mais longos. Já o Suporte 3 (64,3 %) apresentou valores de atividade sistematicamente superiores ao longo de todo o ensaio, alcançando máximo de $544,72 \pm 14,71 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ em 6 horas, mantendo desempenho mais elevado inclusive nos tempos finais de 25 e 37 horas.

A maior resposta inicial observada para o suporte mais poroso está de acordo com estudos que relatam melhor desempenho catalítico inicial em estruturas com maior área de contato entre a biomassa imobilizada e o meio reacional, favorecendo a interação entre substrato e sítios ativos das enzimas (Banerjee *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2021; Mallappa *et al.*, 2023). No entanto, a redução da atividade após o pico inicial, observada para ambos os suportes, é compatível com o acúmulo progressivo de subprodutos da reação, especialmente glicose, fenômeno amplamente descrito em sistemas batelada de produção de FOS (Banerjee & Saha, 2022; Lin *et al.*, 2023; Morais *et al.*, 2020).

Mesmo com a redução da atividade ao longo do tempo, o Suporte 3 apresentou valores sistematicamente superiores aos do Suporte 1 em todos os tempos avaliados, evidenciando maior estabilidade da resposta catalítica na condição ótima estabelecida. Esse comportamento está de acordo com estudos que relatam que suportes com maior porosidade tendem a apresentar manutenção mais consistente da atividade ao longo do tempo em sistemas batelada de produção de FOS, especialmente quando comparados a matrizes mais densas, nas quais a queda de desempenho ocorre de forma mais acentuada em tempos prolongados (Banerjee & Saha, 2022; Lin *et al.*, 2023, Morais *et al.*, 2020).

A validação experimental confirma que a condição de 175 rpm e $400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, definida a partir do DCCR, apresenta boa concordância com os valores máximos obtidos na etapa de maximização, demonstrando a confiabilidade do modelo estatístico empregado. A repetição dos ensaios nessa condição resultou em perfis de atividade compatíveis com aqueles observados no ponto central do planejamento. Observou-se ainda que os valores de atividade obtidos na validação foram próximos aos registrados na etapa de otimização quando avaliados no tempo de 6 horas de reação, correspondente ao tempo total adotado nos ensaios do planejamento experimental. Esse resultado demonstra que a condição ótima prevista pelo DCCR se mantém quando avaliada em ensaios experimentais realizados separadamente da etapa de otimização, característica fundamental para a aplicação do processo em estudos subsequentes (Campos *et al.*, 2024; Dias *et al.*, 2022; Gonçalves *et al.*, 2020).

5.4 Ensaios em biorreator de leito fixo

5.4.1 Ensaios de maximização da atividade de transfrutossilacção e influência de variáveis operacionais

A Equação (8) apresenta o modelo quadrático ajustado para a atividade de transfrutossilacção (\hat{Y}) em função das variáveis de concentração de sacarose (X_1) e vazão (X_2) em reator de leito fixo.

$$\hat{Y} = 48,96 - 12,05X_1^2 - 12,97X_2^2 \quad (8)$$

A atividade de transfrutossilacção no reator de leito fixo foi descrita pelo modelo quadrático reduzido, no qual apenas os termos referentes às componentes quadráticas de concentração de sacarose (X_1^2) e vazão (X_2^2) permaneceram significativos. A presença de coeficientes negativos para esses termos indica uma superfície de resposta côncava, característica comum de sistemas contínuos operando em regime estável, nos quais a distribuição do escoamento ao longo do leito tende a gerar uma região operacional ótima entre os extremos avaliados. Trabalhos recentes destacam que a estabilização hidrodinâmica em leitos fixos frequentemente produz superfícies com máximos centrais, especialmente em processos envolvendo células imobilizadas ou biocatalisadores estruturados (Campos *et al.*, 2024; Pereira *et al.*, 2025; Zhang *et al.*, 2021).

Em seguida, a Tabela 5 apresenta as condições experimentais do DCCR em sistema de leito fixo, bem como os valores observados e preditos (\hat{Y}) de atividade de transfrutossilacção obtidos após 60 minutos de reação.

Tabela 5 - Condições do DCCR, atividade experimental e predita (\hat{Y})

Ensaio	Sacarose (X_2 , g·L ⁻¹)	Vazão (X_1 , ml·min ⁻¹)	Atividade experimental (64,3) (U/g)	Atividade predita (64,3) (\hat{Y} , U/g)
1	200 (-1)	2 (-1)	23,74 ± 2,59	23,94
2	600 (+1)	2 (-1)	20,56 ± 0,59	23,94
3	200 (-1)	6 (+1)	26,73 ± 2,30	23,94
4	600 (+1)	6 (+1)	20,59 ± 3,28	23,94
5	117,6(-1,41)	4 (0)	26,28 ± 2,59	25,00
6	682,84(+1,41)	4 (0)	25,46 ± 3,51	25,00
7	400 (0)	1,17(-1,41)	25,50 ± 3,55	23,18
8	400 (0)	6,83(+1,41)	22,58 ± 0,46	23,18
9	400 (0)	4 (0)	49,86 ± 11,88	48,96
10	400 (0)	4 (0)	44,70 ± 25,27	48,96
11	400 (0)	4 (0)	52,30 ± 9,04	48,96

Fonte: Autora (2025).

A maior atividade foi observada no ponto central do planejamento $400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose e $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de vazão, $52,30 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \pm 9,04$, valor que se aproxima da previsão do modelo quadrático. A concordância entre os dados observados e estimados indica que, em concentrações intermediárias e em vazão moderada, o fluido atravessa o leito com eficiência suficiente para promover maior contato entre substrato e biocatalisador. Estudos recentes demonstram que regiões centrais costumam favorecer desempenho catalítico por proporcionarem condições mais equilibradas de operação, sem comprometer o tempo de residência, o que também foi relatado em reatores contínuos empregados na síntese de oligossacarídeos e outros bioprodutos (Almeida *et al.*, 2023; Morais *et al.*, 2020; Raval *et al.*, 2020). A Tabela 6 apresenta a análise de variância (ANOVA) correspondente ao modelo quadrático ajustado, utilizada para verificar a significância estatística dos efeitos e a adequação do modelo.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático ajustado ao reator de leito fixo

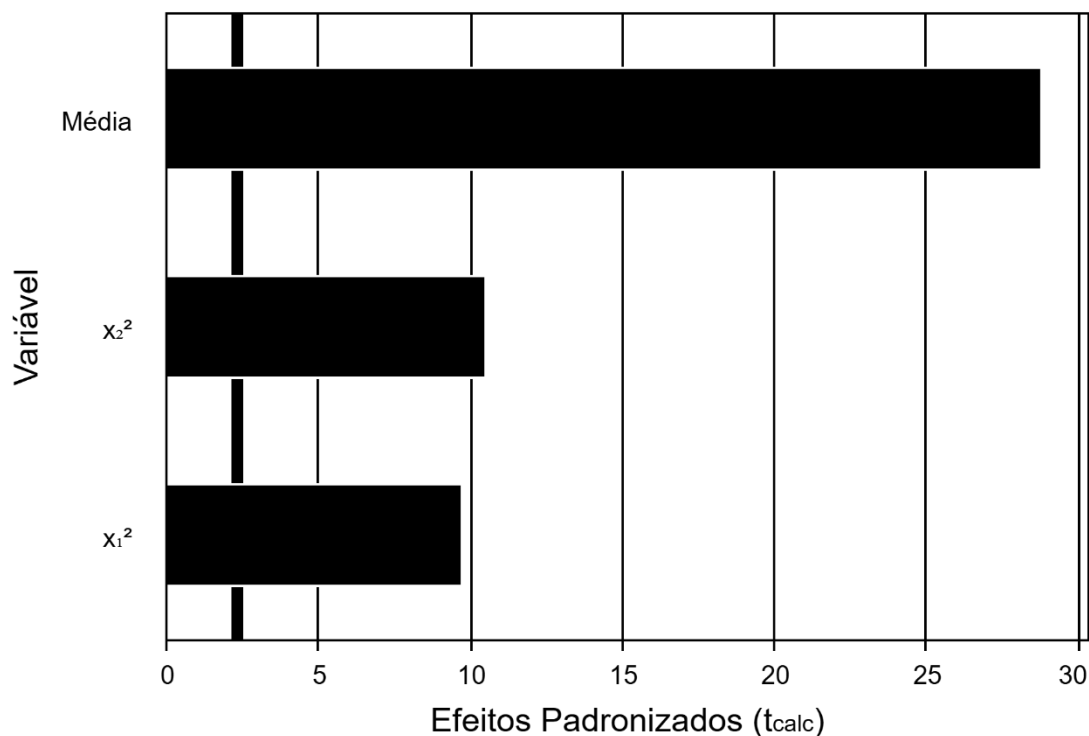
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	1369,7	2	684,8	79,1	0,00001
Resíduos	69,3	8	8,7	-	-
Falta de ajuste	39,2	6	6,5	0,4	0,81846
Erro puro	30,1	2	15	-	-
Total	1439,0	10	-	-	-

Fonte: Autora (2025).

A ANOVA confirma que o modelo quadrático apresenta boa capacidade de explicar a variabilidade experimental. O valor de F para regressão elevado (79,1) e o p-valor inferior a 0,05 demonstram que os termos retidos no modelo são estatisticamente relevantes. Os resíduos apresentaram baixo valor de soma de quadrados, indicando que o erro experimental é pequeno em relação à variabilidade explicada. Além disso, o teste de falta de ajuste não foi significativo ($p = 0,81846$), indicando que o modelo se ajusta adequadamente aos dados. O coeficiente de determinação ($R^2 = 95,19\%$) reforça que a equação descreve com precisão o comportamento da resposta no intervalo avaliado. Resultados semelhantes foram reportados por Chen *et al.* (2021), Zhang *et al.* (2025) e Carvalho *et al.* (2024) em modelagens de sistemas contínuos empregando catalisadores imobilizados, nos quais os modelos apresentaram excelente desempenho preditivo. A

Figura 21 apresenta o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados, que permite avaliar a magnitude e a significância dos termos do modelo sobre a atividade de transfrutosilação.

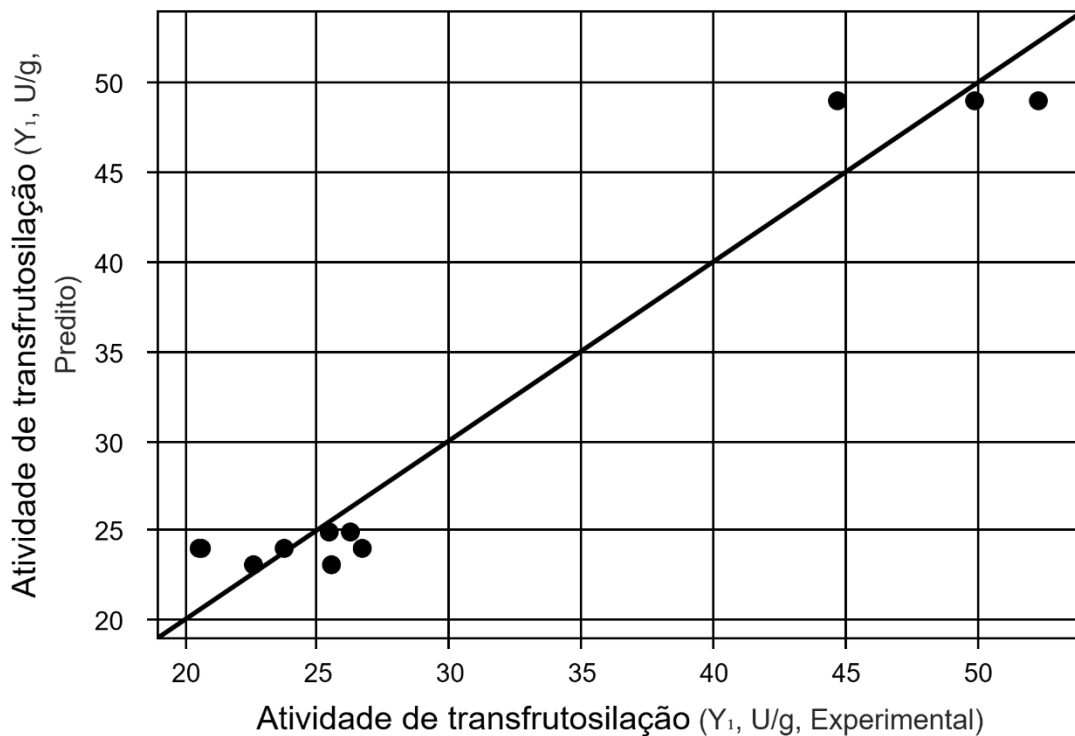
Figura 21 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados sobre a atividade de transfrutosilação



Fonte: Autora (2025).

O gráfico de Pareto mostra que os termos quadráticos foram os únicos responsáveis pela variação significativa da atividade, enquanto os demais efeitos não apresentaram contribuição estatística relevante. Esse padrão sugere que o sistema responde predominantemente à intensidade individual de cada variável, sem dependência considerável de efeitos lineares ou interações, comportamento também observado em sistemas de fluxo contínuo com estruturação interna estável (Pereira *et al.*, 2023; Ranieri *et al.*, 2024). A Figura 22 apresenta o gráfico de correlação entre os valores experimentais e preditos da atividade de transfrutosilação, permitindo avaliar a precisão do modelo quadrático ajustado.

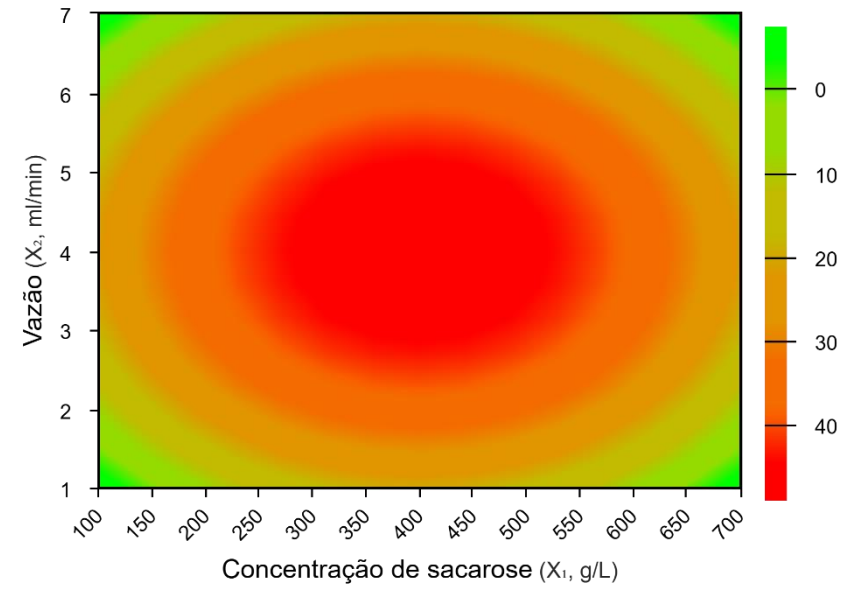
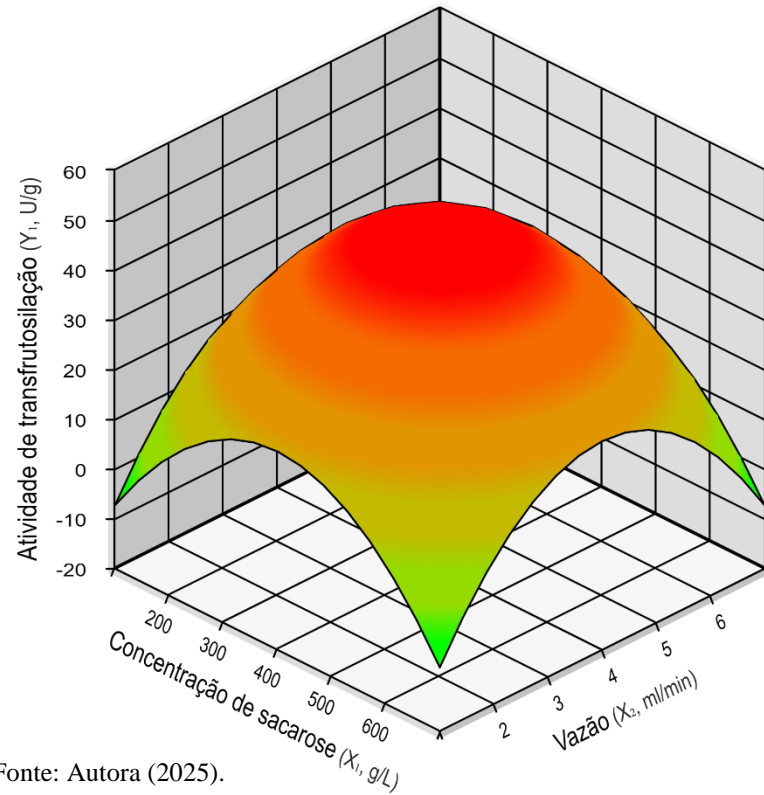
Figura 22 - Correlação entre valores experimentais e preditos da atividade de transfrutossilagem



Fonte: Autora (2025).

A comparação entre valores experimentais e previstos demonstra forte alinhamento em torno da linha de identidade, reforçando a consistência do ajuste e a capacidade preditiva do modelo. Essa proximidade é compatível com estudos recentes que investigam o desempenho de reatores contínuos na produção de FOS e mostram que modelos quadráticos reduzidos tendem a apresentar elevada correspondência com os valores experimentais quando as condições operacionais permanecem estáveis ao longo do processo (Oliveira *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2025). A Figura 23 apresenta a superfície tridimensional e o gráfico de contorno bidimensional da atividade de transfrutossilagem (\hat{Y} , $U \cdot g^{-1}$) em função da concentração de sacarose (X_1) e da vazão (X_2).

Figura 23 - Superfície de resposta tridimensional da atividade de transfrutossilção (\hat{Y} , $U \cdot g^{-1}$) em função da concentração de sacarose (X_1) e da vazão (X_2)



Fonte: Autora (2025).

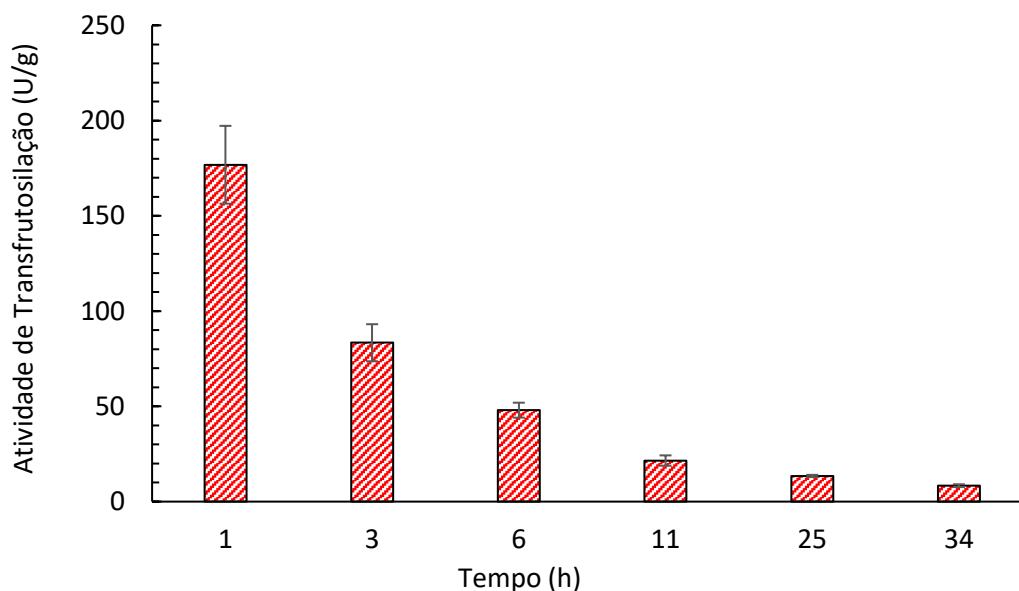
A superfície tridimensional e o gráfico de contorno evidenciam uma região de máximo bem definida ao redor do ponto central. A suavidade das curvas de nível sugere que pequenas variações nas condições operacionais não provocam alterações abruptas na atividade, o que é desejável para processos contínuos. Tanto concentrações muito elevadas quanto vazões extremas reduzem a resposta, o que provavelmente reflete a perda das condições operacionais que favorecem a distribuição uniforme do fluido ao longo do leito. Em concentrações muito altas, a solução tende a apresentar maior viscosidade relativa e a modificar o perfil hidráulico, o que pode afetar a regularidade do escoamento. Em vazões muito elevadas, por outro lado, a redução acentuada do tempo de residência limita o período disponível para que a reação ocorra antes da saída do meio reacional. Esses efeitos macroscópicos tornam o desempenho menos eficiente quando o sistema é operado muito distante das condições centrais. Pesquisas recentes em reatores de leito fixo reforçam esse padrão, destacando que o equilíbrio entre carga de substrato e tempo de contato é decisivo para maximizar o rendimento de bioconversões (Almeida *et al.*, 2023; Costa *et al.*, 2024).

No gráfico de contorno, observa-se uma faixa operacional estável, na qual aumentos adicionais de concentração ou vazão não resultam em ganho significativo de atividade, definindo o limite ótimo de operação (Almeida *et al.*, 2023).

5.4.2 Validação experimental da condição ótima de maximização da atividade de transfrutosilação

A Figura 24 ilustra o perfil temporal da atividade de transfrutosilação obtida no reator de leito fixo operado sob as condições ótimas previstas pelo modelo estatístico (pH, temperatura, concentração de sacarose e vazão volumétrica), com amostragem em 1, 3, 6, 11, 25 e 35 horas. Observou-se que a maior atividade de transfrutosilação ocorreu na primeira hora de operação ($176,8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \pm 20,42$), seguida de uma queda progressiva ao longo do tempo, até o valor de $8,37 \pm 0,72 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ na 35ª hora.

Figura 24 - Evolução temporal da atividade de transfrutossilação na condição ótima definida pelo DCCR



Fonte: Autora 2026.

A tendência observada na Figura 24, caracterizada por elevada atividade inicial seguida de decaimento progressivo ao longo da operação contínua, não corresponde ao comportamento de regime quase estacionário frequentemente descrito para reatores de leito fixo contendo biocatalisadores imobilizados. Como hipótese inicial, esse perfil pode estar relacionado a características intrínsecas do sistema catalítico avaliado, uma vez que comportamentos semelhantes, com atividade inicial elevada seguida de redução ao longo do tempo, têm sido reportados para células de *Aspergillus oryzae* imobilizadas operando em regime contínuo (De Santis *et al.*, 2020; Dias *et al.*, 2022).

Considerando que o mesmo comportamento foi observado na duplicata experimental, a redução progressiva da atividade pode ser atribuída à atuação de mecanismos sistemáticos ao longo da operação contínua, e não apenas a variações experimentais pontuais. Nesse contexto, não se pode descartar a ocorrência de desativação gradual do biocatalisador, uma vez que processos de desativação térmica, química ou metabólica podem se manifestar mesmo em sistemas com células imobilizadas, resultando em diminuição da atividade catalítica aparente ao longo do tempo de operação (Bié *et al.*, 2022; Michaud *et al.*, 2024).

Adicionalmente, deve-se considerar a possibilidade de ocorrência de arraste de

biomassa ou de frações catalíticas ao longo da operação contínua. Em sistemas de leito fixo contendo células imobilizadas, forças hidrodinâmicas associadas ao escoamento do meio reacional podem promover a remoção gradual de células fracamente aderidas ou de material biocatalítico superficialmente associado ao suporte, contribuindo para a redução progressiva da atividade observada ao longo do tempo. Esse fenômeno tem sido descrito como um dos fatores que podem impactar o desempenho de sistemas contínuos com biocatalisadores imobilizados, mesmo quando estes apresentam boa estabilidade estrutural (Bié *et al.*, 2022; Guisan, 2013; Sheldon; Van Pelt, 2013). Dessa forma, o arraste progressivo de biomassa constitui uma hipótese adicional para explicar o comportamento observado, especialmente em condições nas quais a operação contínua impõe tensões de cisalhamento sobre o leito catalítico.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu avaliar o desempenho de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes tridimensionais de poli(ácido láctico) (PLA) com diferentes porosidades (49,0%, 61,8% e 64,3%), aplicadas à reação de transfrutossilacção da sacarose em sistemas batelada e de leito fixo.

A variação da porosidade influenciou diretamente a quantidade de biomassa imobilizada e o desempenho catalítico dos biocatalisadores. Os suportes mais porosos apresentaram maiores valores de atividade específica, atingindo $394,14 \pm 57,82 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ e $398,09 \pm 37,99 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, enquanto o suporte de menor porosidade apresentou a maior atividade absoluta (169,96 U), associada à maior retenção de biomassa, em comparação com 66,62 U e 43,03 U para os suportes de maior porosidade.

Nos ensaios em reator batelada, o delineamento composto central rotacional permitiu identificar a influência da concentração de sacarose e da velocidade de agitação sobre a atividade de transfrutossilacção. As maiores atividades foram observadas em condições próximas a 175 rpm e $400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, com valores máximos de $361,85 \pm 7,92 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ para o suporte de 49,0% e $605,88 \pm 52,89 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ para o suporte de 64,3%. Na validação experimental, foram obtidas atividades de $386,97 \pm 12,74 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ e $520,94 \pm 24,98 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, no tempo de 3 horas, confirmando a concordância entre os valores preditos pelo modelo estatístico e os resultados experimentais.

Para o sistema em reator de leito fixo, a aplicação do planejamento experimental permitiu definir condições operacionais que resultaram em atividade máxima de $49,86 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. Durante a validação experimental, a atividade variou entre $176,8 \pm 20,42$ e $8,37 \pm 0,72 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ao longo de 35 horas de operação contínua, evidenciando a estabilidade inicial do sistema seguida de redução progressiva da atividade.

De forma integrada, os resultados demonstram a viabilidade da utilização de suportes de PLA produzidos por impressão 3D para imobilização de células de *A. oryzae* IPT-301 e sua aplicação na produção de FOS em sistemas batelada e de leito fixo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. S. *et al.* **Desenvolvimento de suportes vegetais para imobilização de células fúngicas visando à produção de fruto-oligosacarídeos.** *Revista Brasileira de Biotecnologia Aplicada*, v. 22, n. 3, p. 45–54, 2023.
- ALMEIDA, L. M. *et al.* **Continuous production of oligosaccharides using immobilized fungal cells: hydrodynamic and mass-transfer considerations.** *Biochemical Engineering Journal*, 2023.
- ALMEIDA, R. A.; SOUSA, M. C.; LIMA, G. F. **Advances in enzyme immobilization using natural and synthetic polymers.** *Journal of Applied Sciences*, v. 140, p. 1–15, 2023.
- ALTINKAYA, S. A. **Recent advances in biocatalyst immobilization: design of support materials.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 205, p. 108553, 2024.
- AMARAL, C. **Avaliação da estabilidade de biocatalisadores imobilizados em diferentes suportes porosos.** 2025. Relatório técnico – Universidade Federal de Alfenas, [s. l.], 2025.
- ARAÚJO, L. C. *et al.* **Produção de enzimas fúngicas por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em condições otimizadas.** *Revista de Biotecnologia Industrial*, v. 11, n. 1, p. 40–50, 2022.
- ARANDA, C. A. **Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos utilizando planejamento experimental.** 2024. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2024.
- BANERJEE, G.; SAHA, B. **Fructosyltransferase mediated synthesis of fructooligosaccharides: recent advances and future perspectives.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 40, p. 102319, 2022.
- BANERJEE, R.; SINGH, A.; GHOSH, S. **Bioprocess strategies for enhanced production of fructooligosaccharides: recent advances.** *Biotechnology Advances*, v. 42, p. 107589, 2023.
- BANERJEE, S.; SAHA, B. C. **Product inhibition effects during enzymatic synthesis of fructooligosaccharides in continuous systems.** *Food and Bioproducts Processing*, v. 134, p. 86–95, 2022.
- BANERJEE, S. *et al.* **Immobilization of microbial cells in biopolymer matrices for enhanced oligosaccharide production.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 228, p. 412–420, 2023.
- BARBOSA, L. M. **Produção de FOS com células imobilizadas em esponjas de poliuretano.** 2022. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2022.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 3. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007.

BÁRTOLO, P. J. *et al.* **Biomechanical performance of PLA scaffolds for tissue engineering fabricated by fused deposition modeling**. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 115, p. 104282, 2021.

BELMONTE-IZQUIERDO, R. *et al.* **Advances in chitosan-based systems for enzyme immobilization in biotechnological applications**. *Carbohydrate Polymers*, v. 312, p. 120721, 2023.

BIÉ, J. *et al.* **Packed-bed reactors for biocatalysis: design, operation and stability considerations**. *Chemical Engineering Journal*, v. 431, p. 134089, 2022.

BIZERRA, A. R. **Avaliação estatística de parâmetros operacionais em processos de biocatálise enzimática**. *Journal of Bioprocess Engineering*, v. 15, n. 2, p. 77–91, 2024.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery**. 2. ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2005.

BRAGA, R. F. *et al.* **Structural design of porous matrices for cell immobilization: impact on mass transfer and reaction kinetics**. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 140, n. 7, p. e53672, 2023.

BRENA, B. M.; GÜELL, C.; LLORENS, J. **Immobilization of enzymes and cells**. In: GÜELL, C. *et al.* **Food bioprocessing**. [s. l.]: Springer, 2013. p. 123–152.

BRENA, B.; BATISTA-VIERA, F. **Immobilization of enzymes: a literature survey**. *Methods in Molecular Biology*, 2013.

CABRERA-OROZCO, I. *et al.* **Influence of support porosity on cell immobilization efficiency and performance in bioprocesses**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 120, p. 87–94, 2017.

CAMPOS, A. R. *et al.* **Modeling of packed-bed bioreactors for carbohydrate biotransformations**. *Chemical Engineering Science*, 2024.

CAMPOS, D. A. *et al.* **Modelagem quadrática e validação preditiva em processos enzimáticos heterogêneos**. *Revista Brasileira de Bioprocessos e Biotecnologia*, v. 18, n. 2, p. 97–108, 2024.

CAMPOS, L. S. *et al.* **Validation of optimal operating conditions for enzymatic processes using response surface methodology in continuous reactors**. *Biochemical Engineering Journal*, 2024.

- CARVALHO, G. F. *et al.* **Statistical optimization and modeling of continuous bioreactors containing immobilized enzymes.** *Process Biochemistry*, 2024.
- CARVALHO, R. B. *et al.* **Statistical modeling of operational parameters in immobilized enzyme systems using silica-based hybrid supports.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 205, p. 109213, 2024.
- CATALYSTS. **Recent advances in genetic and metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* for enhanced enzyme production.** *Catalysts*, v. 13, n. 4, p. 621–633, 2023.
- CASTRO, R. J. S. *et al.* **Produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) por transfrutolização utilizando enzimas microbianas.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 37, n. 2, p. 203–211, 2017.
- CHEN, H. **Optimization of transfructosylation activity for fructooligosaccharide production.** *Journal of Food Engineering*, v. 29, n. 2, p. 209–214, 1996.
- CHEN, X. *et al.* **Advances in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides: catalytic mechanisms and process optimization.** *Carbohydrate Polymers*, v. 277, p. 118818, 2021.
- CHEN, X. *et al.* **Engineering porous scaffolds for enhanced biocatalyst performance in continuous bioprocesses.** *Biotechnology Advances*, v. 49, p. 107754, 2021.
- CHEN, Y. *et al.* **Hydrodynamic stability and modeling of fixed-bed bioreactors for enzymatic synthesis.** *Bioresource Technology*, 2021.
- CHENG, H. *et al.* **Enhancement of biofilm formation and metabolic activity of immobilized *Aspergillus oryzae* by surface modification of carriers.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 144, p. 205–213, 2019.
- CHOUKADE, S. *et al.* **Fructooligosaccharides: recent applications and prebiotic efficacy.** *Food Bioscience*, v. 42, p. 101160, 2021.
- CORRÊA, L. F. *et al.* **Fruto-oligossacarídeos: propriedades funcionais e aplicações clínicas.** *Revista de Nutrição Funcional*, v. 33, n. 1, p. 20–30, 2024.
- COSTA, R. S. *et al.* **Impact of product accumulation on enzymatic fructooligosaccharide synthesis: recent insights into process performance.** *Process Biochemistry*, v. 132, p. 101–110, 2024.
- COSTA, V. P. *et al.* **Performance of packed-bed reactors for the synthesis of functional carbohydrates.** *Food Bioprocess Technology*, 2024.
- CUERVO-FERNANDEZ, N. *et al.* **Production of fructooligosaccharides by *Aspergillus oryzae* IPT-301 and characterization of its fructosyltransferase.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 142, p. 263–276, 2007.

CUNHA, F. M. *et al.* **Fruto-oligossacarídeos: aspectos bioquímicos e aplicações industriais.** *Revista Brasileira de Biociências*, v. 17, n. 2, p. 89–97, 2019.

CYWIŃSKA-ANTONIK, M. *et al.* **Inhibitory effects of glucose on fructosyltransferase activity during fructooligosaccharide synthesis.** *Food Chemistry*, v. 430, p. 137120, 2024.

DANIELY, E. **Avaliação da porosidade de suportes cerâmicos para imobilização celular e impacto na produção de FOS.** 2024. Relatório técnico – Universidade Federal de Alfenas, [s. l.], 2024.

DANILEVICIUS, P. *et al.* **Porosity analysis of 3D-printed PLA structures for biomedical applications.** *Materials Today: Proceedings*, v. 49, p. 47–51, 2022.

DE GREGORIO, P. R. *et al.* **Evaluation of physical properties of 3D printed supports for enzymatic immobilization.** *Materials Today Communications*, v. 31, p. 103478, 2022.

DE LIMA JÚNIOR, D. S. *et al.* **Covalent immobilization of glucoamylase on 3D-printed PLA carriers.** *Biochemical Engineering Journal*, 2025.

DE LIMA JÚNIOR, J. A. *et al.* **Additive manufactured polymeric supports for enzyme immobilization: stability and reuse performance.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 213, p. 109521, 2025.

DE SANTIS, P. *et al.* **Continuous-flow biocatalysis in packed-bed reactors: operational stability and challenges.** *Reaction Chemistry & Engineering*, v. 5, n. 9, p. 1613–1628, 2020.

DIAS, R. F. *et al.* **Transfructosylation activity of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells in a packed-bed reactor aiming at fructooligosaccharide production.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 45, n. 6, p. 1057–1068, 2022.

DIAS, T. C. *et al.* **Avaliação de parâmetros operacionais na produção de fruto-oligossacarídeos.** *Química Nova*, v. 45, n. 1, p. 22–28, 2022.

EIXENBERGER, D. C. *et al.* **Polymer-grafted 3D-printed material for enzyme immobilization: structural effects on catalytic performance and reuse stability.** *Polymers*, v. 15, n. 3, p. 445–459, 2023.

FARIA, F. J. *et al.* **Stability and reusability of biocatalysts immobilized on biodegradable polymers.** *Process Biochemistry*, v. 103, p. 47–55, 2021.

FERNANDES, L. M.; OLIVEIRA, P. H.; SOUZA, R. C. **Efeitos da agitação e concentração de substrato na hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos.** *Bioresource Technology Reports*, v. 19, p. 101123, 2022.

FERREIRA, A. C. *et al.* **Utilização de células imobilizadas de *Aspergillus oryzae* na produção de fruto-oligossacarídeos: estudo comparativo com células livres.** *Revista de Biotecnologia e Bioprocessos*, v. 9, n. 2, p. 61–70, 2023.

FOGLER, H. S. **Elements of chemical reaction engineering**. 5. ed. Boston: Pearson, 2021.

GANAIÉ, M. A. *et al.* **Glucose oxidase: a versatile enzyme for biosensor and biofuel applications**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 70, p. 66–80, 2014.

GARCIA, S. G. *et al.* **Characterization of *Aspergillus oryzae* biocatalysts: immobilization and activity**. *Biotechnology Reports*, v. 30, e00623, 2021.

GONÇALVES, M. A. *et al.* **Otimização da produção de fruto-oligossacarídeos por *Aspergillus oryzae* utilizando planejamento experimental**. *Revista Processos Biotecnológicos*, v. 16, n. 1, p. 58–67, 2020.

GONÇALVES, M. A. *et al.* **3D-printed PLA-based supports for fungal cell immobilization in FOS production**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 204, p. 109249, 2023.

GUIO, R. C. *et al.* **Printed 3D structured supports: a new frontier for biocatalyst immobilization and scale-up**. *Process Biochemistry*, v. 127, p. 97–106, 2023.

GUISAN, J. M. *et al.* **Immobilization of enzymes and cells**. 3. ed. New York: Humana Press, 2013.

JOSEPH, A.; MATHEW, B.; MATHEW, J. **Recent developments in 3D printed biocatalytic supports: materials and applications**. *Materials Today Sustainability*, v. 23, p. 100372, 2023.

KAREL, S. F.; CHIN, C. P.; STANBURY, P. F. **Immobilization of microbial cells: principles and applications**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 7, n. 6, p. 260–270, 1985.

LEFEBVRE, B. **Diffusion phenomena and mass transfer in heterogeneous biocatalytic systems**. *Chemical Engineering Journal*, v. 430, p. 133086, 2019.

LI, H. *et al.* **Enhanced catalytic performance of immobilized fungal cells by biofilm engineering**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 110, p. 49–57, 2016.

LI, J.; LIN, H. *et al.* **Porosity-controlled biocatalyst supports improve substrate diffusion and catalytic performance**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 212, p. 109754, 2025.

LIN, H. *et al.* **Engineering of hierarchical porous scaffolds for enhanced mass-transfer efficiency in immobilized enzyme systems**. *Chemical Engineering Journal*, v. 491, p. 141225, 2024.

LIN, Y. *et al.* **Continuous fructooligosaccharide production using immobilized fructosyltransferase: operational stability and product inhibition effects**. *Bioresource Technology*, 2023.

- LIN, Y. *et al.* **Hydrodynamic optimization of immobilized enzyme reactors using 3D porous matrices.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 212, p. 109925, 2024.
- LIN, Y. *et al.* **Kinetic behavior and inhibition effects in enzymatic production of fructooligosaccharides.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 215, p. 112569, 2023.
- LOURENÇO, N. D. *et al.* **Strategies for improving stability of immobilized enzymes in continuous bioprocesses.** *Journal of Biotechnology*, v. 298, p. 1–12, 2019.
- MAHAK, T. *et al.* **AI-based modeling and optimization of enzymatic synthesis of FOS.** *Artificial Intelligence in Chemical Engineering*, v. 3, n. 1, p. 44–56, 2023.
- MAIORANO, A. E. *et al.* **Influência do pH e da temperatura na atividade de FTase produzida por *Aspergillus oryzae*.** *Revista de Enzimologia Aplicada*, v. 5, n. 2, p. 101–108, 2020.
- MAIORANO, A. E. *et al.* **Recent advances in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides.** *Biotechnology Advances*, v. 44, p. 107608, 2020.
- MAIORANO, G. *et al.* **High-performance liquid chromatography analysis of FOS from enzymatic hydrolysis.** *Food Chemistry*, v. 321, p. 126675, 2020.
- MALLAPPA, R. H. *et al.* **Effect of support porosity on the operational stability of immobilized biocatalysts.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 46, p. 387–396, 2023.
- MATTIETTO, R. A.; MATTA, S. L. P. **Aplicação do delineamento composto central rotacional (DCCR) na otimização de bioprocessos.** *Revista Brasileira de Engenharia Química*, v. 29, p. 123–132, 2012.
- MICHAUD, J. M. *et al.* **Operational stability and performance decay in packed-bed bioreactors with immobilized biocatalysts.** *Processes*, v. 12, n. 2, p. 315, 2024.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MOHIDEM, M. M. *et al.* **Process optimization and kinetics of fructooligosaccharides synthesis by fungal fructosyltransferase.** *Journal of Food Engineering*, v. 343, p. 111335, 2023.
- MOHIDEM, N. A. *et al.* **Enzymatic production of fructooligosaccharides: process parameters and limitations.** *Food Chemistry*, v. 405, p. 134844, 2023.
- MOHIDEM, N. A. *et al.* **Selective synthesis of fructooligosaccharides: controlling transfructosylation and hydrolysis reactions.** *Food Chemistry*, v. 405, p. 134842, 2023.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments.** 9. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017.

- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 10. ed. Hoboken: Wiley, 2020.
- MORAIS, A. P. *et al.* **Performance and stability of immobilized fungal cells in packed-bed reactors for fructooligosaccharide production**. *Process Biochemistry*, v. 92, p. 1–9, 2020.
- MORAIS, D. P. *et al.* **Influence of flow regime and substrate load on immobilized enzyme activity in packed-bed reactors**. *Process Biochemistry*, v. 112, p. 48–56, 2020.
- MORAIS, J. M. *et al.* **Optimization of enzyme activity in 3D-printed supports with variable porosity**. *Chemical Engineering Journal*, v. 394, p. 124981, 2020.
- MORAIS, M. A. *et al.* **Continuous-flow packed-bed systems with immobilized catalysts: effects of mass transfer and hydrodynamics**. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2020.
- MORDOR INTELLIGENCE. **Fructooligosaccharides market – growth, trends, and forecast (2022–2030)**. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com>. Acesso em: 20 jul. 2025.
- MOURA, M. L. *et al.* **Uso de planejamento experimental na biotecnologia: foco no DCCR**. *Ciência & Engenharia*, v. 29, n. 1, p. 15–25, 2020.
- NOBRE, C. *et al.* **Functional oligosaccharides and their health benefits**. *Carbohydrate Polymers*, v. 194, p. 308–318, 2018.
- NYENHUIS, J.; HEUER, C.; BAHNEMANN, J. **3D printing in biocatalysis and biosensing: from general concepts to practical applications**. *Chemistry – An Asian Journal*, 2024.
- OLIVEIRA, D. S. *et al.* **Aplicação de planejamento experimental na produção de bioprodutos**. *Revista de Ciência & Tecnologia*, v. 10, n. 3, p. 65–72, 2018.
- OLIVEIRA, D. *et al.* **Predictive modeling of FOS synthesis in continuous reactors**. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022.
- OLIVEIRA, J. M. *et al.* **Efeitos prebióticos dos fruto-oligosacarídeos na saúde intestinal: uma revisão sistemática**. *Revista de Ciências da Saúde*, v. 18, n. 1, p. 33–42, 2023.
- OTTONI, J. R. *et al.* **Bioconversion of sucrose into FOS by immobilized enzymes**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 78, p. 34–40, 2012.
- PALOMO, J. M. *et al.* **Enzyme stabilization using porous supports: effects on mass transfer**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 6, p. 861–867, 2002.
- PATEL, A. *et al.* **Advances in bioreactor designs for improved enzyme production and bioconversion processes**. *Biotechnology Advances*, v. 56, p. 107927, 2021.

- PEREIRA, R. F. *et al.* **Comparative performance of fixed-bed reactors in the continuous production of FOS using immobilized fungal cells.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 46, p. 121–132, 2023.
- PEREIRA, R. F. *et al.* **Desenvolvimento de reatores de leito fixo com biocatalisadores imobilizados para produção de FOS.** *Revista de Biotecnologia Industrial*, v. 12, n. 1, p. 19–29, 2025.
- PEREIRA, T. *et al.* **Fixed-bed bioreactor operation for production of fructooligosaccharides: modeling and optimization.** *Biotechnology Reports*, 2023.
- PERNA, R. F. *et al.* **Produção de fruto-oligossacarídeos com enzimas de *Aspergillus oryzae*.** *Revista Processos Bioquímicos*, v. 22, p. 43–51, 2018.
- POSE-BOIRAZIAN, T. *et al.* **3D printing: an emerging technology for biocatalyst immobilization.** *Macromolecular Bioscience*, v. 22, n. 9, p. 2200110, 2022.
- POSE-BOIRAZIAN, T. *et al.* **Sustainable polymer supports in biocatalysis: recent trends and future outlook.** *Green Chemistry*, v. 24, p. 5152–5171, 2022.
- PRATA, A. S. **Avaliação de enzimas imobilizadas em sistemas contínuos: atividade e estabilidade.** *Revista Brasileira de Engenharia Química*, v. 37, n. 2, p. 205–214, 2020.
- PROTIMIZA. **Plataforma Protimiza experimental design.** Disponível em: <https://experimental-design.protimiza.com.br/>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- RANIERI, C. *et al.* **Quadratic modeling of continuous bioreactors under steady-state conditions.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2024.
- RANIERI, R. *et al.* **Performance comparison of immobilized yeast cells in different reactor configurations for arabitol production.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 47, p. 129–142, 2024.
- RAVAL, V. *et al.* **Optimization of continuous reactors containing immobilized biocatalysts.** *Journal of Molecular Catalysis B*, 2020.
- RAVAL, V. *et al.* **Residence time distribution and mass transfer in fixed-bed enzyme reactors.** *Process Biochemistry*, v. 112, p. 101–109, 2020.
- REMONATTO, D. *et al.* **3D printed polymeric matrices for enzyme immobilization: performance evaluation and stability studies.** *Chemical Engineering Journal*, v. 452, p. 139422, 2023.
- REMONATTO, D. *et al.* **Three-dimensional printing as an emerging strategy for enzyme immobilization: advances, challenges and perspectives.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 202, p. 109115, 2023.
- RIBEIRO, E. F. *et al.* **Statistical modeling of operational parameters in continuous enzymatic systems.** *Journal of Biotechnology Reports*, v. 54, p. 102–110, 2024.

- RODRIGUES, D. S. *et al.* **Lixiviação de enzimas em biocatalisadores porosos: um estudo experimental.** *Química Nova*, v. 44, n. 8, p. 885–891, 2021.
- RYBARCZYK, A. *et al.* **3D printed polylactide scaffolding for laccase immobilization.** *Bioresource Technology*, v. 372, p. 133998, 2023.
- SANTOS, J. C. *et al.* **Effect of support material properties on the performance of immobilized microbial cells for biotransformation processes.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 172, p. 108031, 2021.
- SANTOS, L. F. *et al.* **Produção de fruto-oligossacarídeos com células imobilizadas: avanços e perspectivas.** *Jornal Brasileiro de Biotecnologia*, v. 31, n. 2, p. 98–108, 2023.
- SHELDON, R. A. **Enzyme immobilization: the quest for optimum performance.** *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. **Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how.** *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6223–6235, 2013.
- SHEN, R. *et al.* **Immobilized cell technology using halloysite nanotubes for enhanced ethanol fermentation from lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v. 364, p. 128023, 2022.
- SILVA, A. F. *et al.* **Aplicações dos fruto-oligossacarídeos em alimentos funcionais.** *Revista de Alimentos e Nutrição Funcional*, v. 12, n. 1, p. 22–32, 2023.
- SILVA, G. L. *et al.* **Propriedades prebióticas dos FOS e aplicações na saúde intestinal.** *Revista de Ciências da Vida*, v. 41, p. 33–42, 2021.
- SILVA, J. F.; MARTINS, A. P.; CARVALHO, L. **Revisões recentes sobre imobilização de enzimas: avanços e desafios na otimização de sistemas catalíticos.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 195, p. 455–478, 2023.
- SINGH, R. *et al.* **Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* for improved enzyme production: a review.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, p. 8129–8143, 2021.
- SKONTA, A. *et al.* **3D-printed PLA well plates for enzyme inhibition studies.** *Catalysts*, v. 12, n. 4, p. 432, 2022.
- SKONTA, F. *et al.* **Additive manufacturing of biocatalytic supports: advances in structure and application.** *ACS Applied Polymer Materials*, v. 4, p. 7893–7905, 2022.
- SOUZA, A. P. *et al.* **Imobilização de células e enzimas: métodos e aplicações em bioprocessos industriais.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 43, p. 21–30, 2017.

THORAT, B. N.; DALVI, A. D. **Design and operation of fixed-bed reactors with immobilized biocatalysts.** *Chemical Engineering Journal*, v. 192, p. 319–329, 2012.

URETA, M. M. *et al.* **Evaluation of novel porous supports for microbial immobilization in continuous bioprocesses.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 48, n. 5–6, p. kuab040, 2021.

VALLECILLA-YEPEZ, L. A. *et al.* **Utilização de reatores de batelada na produção de FOS: estudos com fungos e substratos alternativos.** *Química Nova*, v. 45, n. 8, p. 953–961, 2022.

VASCONCELOS, A. L.; PINTO, L. M. A.; ARAGÃO, G. M. F. **Adaptation of DNS method for microplate format.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, p. 347–351, 2013.

VEGA, R.; ZÚÑIGA-HANSEN, M. E. **GOD-PAP method for glucose quantification in food matrices.** *Food Analytical Methods*, v. 4, p. 180–187, 2011.

VERIFIED MARKET REPORTS. **Fructooligosaccharides market size, growth & forecast 2023–2030.** Disponível em: <https://www.verifiedmarketreports.com>. Acesso em: 20 jul. 2025.

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

WU, L. *et al.* **Mass-transfer effects in porous immobilized biocatalysts under dynamic operation.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 189, p. 108826, 2022.

WU, X. *et al.* **Recent advances in enzyme immobilization based on novel porous materials.** *Catalysis Reviews*, v. 64, p. 123–158, 2022.

ZHANG, J. *et al.* **Modeling curved response surfaces in packed-bed bioreactors.** *Biochemical Engineering Journal*, 2021.

ZHANG, J. *et al.* **Predictive modeling of immobilized-cell reactors for carbohydrate transformations.** *Process Biochemistry*, 2025.

ZHANG, Q. *et al.* **Flow distribution and catalytic performance of immobilized systems: modeling and experimental validation.** *Chemical Engineering Science*, v. 276, p. 119386, 2025.

ZHANG, T. *et al.* **Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides: reaction mechanisms and influencing factors.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 213, p. 1018–1026, 2021.

ZHANG, Y. *et al.* **Mechanistic insights into fructosyltransferase-catalyzed reactions for functional oligosaccharide production.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 183, p. 1585–1594, 2021.

ZHANG, Y. *et al.* **Review of porous microspheres for enzyme immobilization.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 236, p. 113553, 2025.

ZHAO, J. *et al.* **Influence of carrier porosity on enzyme leakage and catalytic efficiency.** *Process Biochemistry*, v. 72, p. 45–53, 2018.

ZHAO, M. *et al.* **Advances in biodegradable 3D-printed supports for enzyme immobilization.** *Materials Today Bio*, v. 25, p. 100624, 2024.

.