

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ISABELLA CRISTINA AZARIAS PINTO

**PRODUÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM
CULTIVOS MODO BATELADA E BATELADA-ALIMENTADA**

POÇOS DE CALDAS/MG

2026

ISABELLA CRISTINA AZARIAS PINTO

**PRODUÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM
CULTIVOS MODO BATELADA E BATELADA-ALIMENTADA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área
de concentração: Engenharia Química.
Orientador: Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano.
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna.

POÇOS DE CALDAS/MG

2026

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

Pinto, Isabella Cristina Azarias.

Produção de frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em cultivos modo batelada e batelada-alimentada / Isabella Cristina Azarias Pinto. - Poços de Caldas, MG, 2026.

112 f. : il. -

Orientador(a): Alfredo Eduardo Maiorano.

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

Bibliografia.

1. Frutossiltransferase. 2. *Aspergillus oryzae* IPT-301. 3. Biorreator. 4. Batelada. 5. Batelada Alimentada. I. Maiorano, Alfredo Eduardo, orient. II. Título.

PRODUÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM CULTIVOS MODO BATELADA E BATELADA-ALIMENTADA

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: 14 de maio de 2026.

Dr. Alfredo Eduardo Maiorano

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo

Dra. Elda Sabino da Silva

Instituição: Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo

Dr. Sérgio Fernandes

Instituição: Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo



Documento assinado eletronicamente por **Alfredo Eduardo Maiorano, Usuário Externo**, em 22/05/2026, às 14:11, 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 **1783054** e o código CRC **110A4EAA**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por todas as bênçãos recebidas durante essa jornada e pela saúde concedida durante a realização desse trabalho.

À minha querida *roomie*, Geovanna, que gentilmente me emprestou seu computador para que fosse possível eu me inscrever no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química durante o nosso intercâmbio.

Ao meu namorado, Gabriel, que me auxiliou, apoiou e incentivou durante toda a caminhada desde o primeiro dia. Obrigada por ter sido meu parceiro, por não me deixar desistir nos dias difíceis e ter sido meu apoio emocional. Nada disso seria possível sem você!

Aos meus pais, por todo o amor, apoio, incentivo e valores que me ensinaram ao longo de toda minha vida. Obrigada por acreditarem em mim, por serem minha base e por me ensinarem que a dedicação e a perseverança são os caminhos para realizar grandes sonhos.

Ao meu querido orientador, Alfredo, por todo suporte, apoio e confiança no meu trabalho. Meus dias foram melhores e mais leves graças a sua orientação e suporte. Não tenho palavras para agradecer por todo conhecimento muito além do laboratório compartilhado.

Ao meu coorientador, Rafael, pela confiança, suporte e oportunidade de desenvolver meu projeto no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) no IPT.

À Elda, que gentilmente me recebeu e acolheu desde meu primeiro dia em São Paulo. Foi um grande privilégio aprender ao seu lado. Obrigada por me inspirar a ser uma pesquisadora melhor.

À Maria Filomena, Leila, Sergio, Fernando e Hilea por todo conhecimento compartilhado, por todas as trocas e por terem me ensinado muito além do conhecimento técnico.

Aos técnicos, Renatinho, Luana e Valter, por toda paciência em me ensinar e auxiliar durante toda minha jornada, por não terem medido esforços em cada noite que passaram no laboratório cuidando dos ensaios.

À todos do LBI que pelo acolhimento, companheirismo e ambiente de trabalho colaborativo que tornou essa experiência ainda mais enriquecedora.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e digo, ele não seria possível sem cada um de vocês. Obrigada por sonharem

junto comigo e terem tornado esse sonho realidade. Sou um ser humano e profissional melhor graças a cada um de vocês!

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

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.”
(Provérbios 16:3)

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001 e Processo nº 88887.990057/2024-00), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processos nº 404912/2021-4, nº 305029/2024-0 e nº 403007/2025-9), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Processo nº APQ-00085-21, nº BPD-00030-22 e nº APQ-00793-24) e pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT-SP, Processo nº 82050).

RESUMO

Os frutooligossacarídeos (FOS) destacam-se por suas propriedades prebióticas sendo amplamente utilizados pelas indústrias alimentícia e farmacêutica devido aos seus benefícios para saúde e nutrição humana. Entre as rotas de obtenção desses açúcares, são comercialmente produzidos via rota enzimática, utilizando a sacarose como substrato e enzimas de origem microbiana denominadas Frutossiltransferases (FTases). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de FTase por fermentação submersa utilizando *Aspergillus oryzae* IPT-301 em biorreator, investigando diferentes estratégias operacionais visando ao aumento da atividade de transfrutosilação (AT). Os experimentos foram conduzidos em biorreatores de 5 e 15 L, empregando cultivos em batelada e batelada alimentada. Durante os ensaios, foram monitorados parâmetros relacionados ao crescimento celular, consumo de substrato, Atividade de Transfrutosilação (AT) e Atividade Hidrolítica (AH) e a razão (AT/AH). Entre os ensaios realizados, o cultivo em batelada conduzido no biorreator de 15 L apresentou os melhores resultados, atingindo $AT_{micelial\ máx\ (EB04)} = 3514,2 \pm 205,5$ U/g em 32 h de cultivo, evidenciando maior estabilidade operacional. Além disso, a estratégia de corte de 50% do meio fermentativo destacou-se por elevar em $AT_{micelial\ máx\ (EB07)} = 4956,9 \pm 216,9$ U/g em 33,5 h, representando um aumento de 41% em relação a batelada. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram o potencial da aplicação de estratégias operacionais em biorreatores para otimização da produção de FTase, contribuindo para o avanço do conhecimento em uma área ainda pouco explorada na literatura. Além disso, o estudo fornece subsídios para futuras etapas de otimização e ampliação de escala visando à viabilidade industrial da produção de FTase.

Palavras-chave: Frutossiltransferase; *Aspergillus oryzae* IPT-301; Biorreator; Batelada; Batelada Alimentada.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) have gained considerable attention due to their prebiotic properties and are widely applied in the food and pharmaceutical industries because of their beneficial effects on human health and nutrition. Among the available production routes, FOS are commercially obtained through enzymatic synthesis using sucrose as substrate and microbial enzymes known as fructosyltransferases (FTases). In this context, the present study aimed to evaluate FTase production by submerged fermentation using *Aspergillus oryzae* IPT-301 in bioreactors, investigating different operational strategies to enhance transfructosylation activity (TA). Assays were carried out in 5 and 15 L bioreactors under batch and fed-batch cultivation modes. Throughout the assays, parameters related to cell growth, substrate consumption, Transfructosylation Activity (TA), Hydrolytic Activity (HA), and the TA/HA ratio were monitored. Among the evaluated conditions, batch cultivation performed in the 15 L bioreactor achieved the best performance, reaching a maximum mycelial TA (RB04) of 3514.2 ± 205.5 U/g after 32 h of cultivation, demonstrating greater operational stability. Furthermore, the strategy involving 50% replacement of the fermentation broth resulted in a maximum mycelial TA (RB07) of 4956.9 ± 216.9 U/g after 33.5 h, corresponding to a 41% increase compared with the conventional batch process. Overall, the results demonstrate the potential application of operational strategies in bioreactors for FTase production optimization, contributing to the advancement of knowledge in a research area that remains scarcely explored in the literature. In addition, this study provides a basis for future optimization and scale-up strategies aimed at the industrial feasibility of FTase production.

Keywords: Fructosyltransferase; *Aspergillus oryzae* IPT-301; Bioreactor; Batch fermentation; Fed-batch fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural dos frutooligossacarídeos (FOS) com os componentes: (A) 1-kestose, (B) 1-nistose e (C) 1- β -frutofuranosilnistose.	20
Figura 2 - Fluxograma do processo de amostragem em biorreator ilustrando a coleta de amostras ao longo do processo fermentativo.	29
Figura 3 - Fluxograma do método DNS.....	34
Figura 4 - Fluxograma do método GOD/PAP.....	35
Figura 5 - Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 72h de cultivo do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada em reator de 5L.	40
Figura 6 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada em reator de 5L.	42
Figura 7 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada.	43
Figura 8 - Perfil das Atividades Transfrutossilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada.	44
Figura 9 - Perfil das Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada.	46
Figura 10 - Perfil das Atividades Transfrutossilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada.....	47
Figura 11 - Evolução morfológica do cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em biorreator de 5L ao longo de 72 horas de fermentação em modo batelada.	49
Figura 12 - (A) Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 72h de cultivo do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada alimentada em pulso em reator de 5L e (B) Sonda de pO ₂ coberta pelo microrganismo no término do ensaio.	51
Figura 13 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada alimentada por pulso em reator de 5L.	52

Figura 14 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada alimentada em pulsos.	53
Figura 15 - Perfil das Atividades Transfrutossilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada alimentada em pulsos.	54
Figura 16 - Perfil das Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada alimentada em pulsos.....	55
Figura 17 - Perfil das Atividades Transfrutossilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada alimentada em pulsos.....	56
Figura 18 - Evolução morfológica do cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em biorreator de 5L ao longo de 72 horas de fermentação em modo batelada alimentada por pulsos.	57
Figura 19 - (A) Concentração Celular (X) e (B) Perfil da Atividade Transfrutossilação (AT) micelial em 72h de cultivo do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada e batelada alimentada em pulso em reator de 5 L.	58
Figura 20 - Atividade de Transfrutossilação micelial (AT) e Atividade Hidrolítica micelial (AH) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 5 L	60
Figura 21 - Perfil de síntese de Frutooligossacarídeos (FOS) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 5 L	61
Figura 22 - Atividade de Transfrutossilação extracelular (AT) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 5 L	62
Figura 23 - Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 72h de cultivo do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada em reator de 15 L.	64
Figura 24 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada em reator de 15 L. ..	66
Figura 25 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada.....	66

Figura 26 - Perfil das Atividades Transfrutossilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada.	67
Figura 27 - Perfil das Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada.	69
Figura 28 - Perfil das Atividades Transfrutossilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 72h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada.	70
Figura 29 - (A) Concentração Celular (X) e (B) Perfil da Atividade Transfrutossilação (AT) micelial em 72h de cultivo do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada em reator de 5,0 L e 15 L.	71
Figura 30 - Atividade de Transfrutossilação extracelular (AT_{extra}) em modo batelada em reator de 5 e 15L em função do tempo de fermentação.	72
Figura 31 - Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 48,8 h de cultivo do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada alimentada em pulso em reator de 15 L.	74
Figura 32 - Velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}) do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada alimentada por pulso em reator de 15 L.	75
Figura 33 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 48,8 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em pulsos.	76
Figura 34 - Perfil das Atividades Transfrutossilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 48,8 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em pulsos.	77
Figura 35 - Perfil das Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 48,8 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em pulsos.	79
Figura 36 - Perfil das Atividades Transfrutossilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 48,8 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em pulsos.	80

Figura 37 - (A) Concentração Celular (X) e (B) Perfil da Atividade Transfrutossilação (AT) micelial ao longo do cultivo do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada e batelada alimentada em pulso em reator de 15 L.	81
Figura 38 - Atividade de Transfrutossilação micelial (AT) e Atividade Hidrolítica micelial (AH) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 15 L	83
Figura 39 - Perfil de síntese de Frutooligossacarídeos (FOS) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 15 L	84
Figura 40 - Atividade de Transfrutossilação extracelular (AT) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 15 L	85
Figura 41 - Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 50 h de cultivo do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada alimentada com corte de 80% em reator de 15 L. A linha contínua do OD foi traçada com os valores obtidos no MFCS e os pontos representam os valores amostrados durante o ensaio.	87
Figura 42 - Velocidade específica máxima de crescimento celular no segundo corte ($\mu_{\text{máx}(2)}$) do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada alimentada em corte 80% em reator de 15 L	89
Figura 43 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 50 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 80%.	90
Figura 44 - Perfil das Atividades Transfrutossilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 50 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 80%.....	92
Figura 45 - Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 50 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 80%.....	93
Figura 46 - Perfil das Atividades Transfrutossilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 50 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15,0 L em modo batelada alimentada em corte 80%.	94

Figura 47 - Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 50 h de cultivo do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada alimentada com corte de 50% em reator de 15 L.....	96
Figura 48 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) na batelada inicial (A) e após o terceiro corte (B) do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada alimentada em corte 50% em reator de 15 L.	97
Figura 49 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 50 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 50%.	98
Figura 50 - Perfil das Atividades Transfrutossilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 50 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 50%.....	100
Figura 51 - Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 50 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 50%.....	101
Figura 52 - Perfil das Atividades Transfrutossilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 50 h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 50%.....	102
Figura 53 - (A) Concentração Celular (X) e (B) Perfil da Atividade Transfrutossilação (AT) micelial ao longo do cultivo do microrganismo <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em modo batelada e batelada alimentada em corte 50% em reator de 15 L. Os pontos destacados representam o momento que foi feito os sucessivos cortes.	103

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Condições operacionais e descrição dos ensaios conduzidos em biorreator para produção de FTase por <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301.....	38
Tabela 2 - Parâmetros de produção enzimática de FTase em batelada (EB02) e batelada alimentada em pulsos (EB03) em reator de 5 L, incluindo concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$), tempo para atingir a concentração celular máxima ($t_{X_{\text{máx}}}$), atividade máxima de transfrutossilação micelial ($AT_{\text{micelial máx}}$), tempo para atingir a atividade máxima de transfrutossilação micelial ($t_{AT_{\text{micelial máx}}}$), atividade hidrolítica micelial (AH_{micelial}), a razão entre as atividades de transfrutossilação e hidrolítica (AT/AH), produtividade da enzima micelial (P_{micelial}) e Atividade Total micelial (AT_{TOTAL}).....	63
Tabela 3 - Parâmetros de produção enzimática de FTase em batelada em biorreator de 5,0 L (EB02) e 15 L (EB04), incluindo concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$), tempo para atingir a concentração celular máxima ($t_{X_{\text{máx}}}$), Produtividade celular máxima ($P_{X_{\text{máx}}}$), Atividade de Transfrutossilação micelial máxima ($AT_{\text{micelial máx}}$), tempo para atingir a atividade máxima de transfrutossilação micelial ($t_{AT_{\text{micelial máx}}}$), atividade hidrolítica micelial (AH_{micelial}), a razão entre as atividades de transfrutossilação e hidrolítica (AT/AH), produtividade da enzima micelial (P_{micelial}) e Atividade Total micelial (AT_{TOTAL}).....	72
Tabela 4 - Parâmetros de produção enzimática de FTase em batelada (EB04) e batelada alimentada em pulsos (EB05) em reator de 15 L, incluindo concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$), tempo para atingir a concentração celular máxima ($t_{X_{\text{máx}}}$), atividade máxima de transfrutossilação micelial ($AT_{\text{micelial máx}}$), tempo para atingir a atividade máxima de transfrutossilação micelial ($t_{AT_{\text{micelial máx}}}$), atividade hidrolítica micelial (AH_{micelial}), a razão entre as atividades de transfrutossilação e hidrolítica (AT/AH), produtividade da enzima micelial (P_{micelial}) e Atividade Total micelial (AT_{TOTAL}).....	86
Tabela 5 - Parâmetros de produção enzimática de FTase em batelada (EB04) e batelada alimentada em corte 50% (EB07) em reator de 15 L, incluindo concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$), tempo para atingir a concentração celular máxima ($t_{X_{\text{máx}}}$), atividade máxima de transfrutossilação micelial ($AT_{\text{micelial máx}}$), tempo para atingir a atividade máxima de transfrutossilação micelial ($t_{AT_{\text{micelial máx}}}$), atividade hidrolítica micelial (AH_{micelial}), a razão entre as atividades de transfrutossilação e hidrolítica (AT/AH), produtividade da enzima micelial (P_{micelial}) e Atividade Total micelial (AT_{TOTAL}).....	105

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)	20
3.2. ENZIMAS E SUA IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA	21
3.3. FRUTOSILTRANSFERASE (FTASE)	22
3.4. MERCADO MUNDIAL DE FOS	23
3.5. PRODUÇÃO DE FTASE EM BIORREATOR	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	27
4.1.1. Microrganismo	27
4.1.2. Preparação do inóculo	27
4.1.3. Processo fermentativo	28
4.1.4. Biorreatores utilizados	30
4.1.5. Estratégias de alimentação	30
4.2. METODOLOGIA ANALÍTICA	31
4.2.1. Quantificação da biomassa celular	31
4.2.2. Determinação das atividades enzimáticas	32
4.2.3. Quantificação dos açúcares para determinação das atividades enzimáticas	34
4.2.4. Quantificação dos açúcares para acompanhamento do ensaio em biorreator	35
4.3. TRATAMENTO DE DADOS EXPERIMENTAIS	36
4.4. ENSAIOS REALIZADOS	37

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. BATELADA EM REATOR DE 5 L (EB02).....	39
5.2. BATELADA ALIMENTADA EM PULSOS EM REATOR DE 5 L (EB03).....	50
5.2.1. Batelada x batelada alimentada em pulsos em reator de 5L (EB02 x EB03).....	57
5.3. BATELADA EM REATOR DE 15 L (EB04).....	64
5.3.1. Batelada em reator de 5L x 15 L (EB02 X EB04)	70
5.4. BATELADA ALIMENTADA EM PULSOS EM REATOR DE 15 L (EB05)...	73
5.4.1. Batelada x batelada alimentada em pulsos em reator 15 L (EB04 x EB05).....	80
5.5. BATELADA ALIMENTADA COM CORTE DE 80% EM REATOR DE 15 L (EB06).....	86
5.6. BATELADA ALIMENTADA COM CORTE DE 50% EM REATOR DE 15 L (EB07).....	95
5.6.1. Batelada x batelada alimentada com corte de 50% em reator de 15L (EB04 x EB07)	102
6. CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	109

1. INTRODUÇÃO

Os Frutooligossacarídeos (FOS) constituem uma classe de carboidratos funcionais amplamente reconhecida pelo potencial prebiótico e pelas aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Esses compostos não são digeridos pelas enzimas gastrointestinais, favorecendo seletivamente o crescimento de bifidobactérias da microbiota intestinal, além de contribuírem para a redução de colesterol, triacilgliceróis, fosfolipídios no sangue e são apropriados para o consumo de diabéticos (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023).

Embora os FOS sejam produzidos naturalmente por enzimas presentes em diversos vegetais, esses açúcares são disponibilizados comercialmente por meio da produção sintética via rota enzimática, utilizando a sacarose como substrato e enzimas de origem microbiana denominadas β -fructofuranosidases (FFase, E.C. 3.2.1.26) e frutossiltransferases (FTase, E.C. 2.4.1.9) (ROMANO *et al.*, 2016). As enzimas microbianas produtoras de FOS são excretadas para fora das células como enzimas extracelulares e/ou retidas no interior celular como enzimas miceliais (Cuervo *et al.*, 2007; Ganaie e Gupta, 2014).

Apesar da crescente demanda mundial por ingredientes prebióticos e saudáveis, o Brasil ainda não possui produção industrial de FOS, sendo totalmente dependente da importação. Esse contexto evidencia a necessidade do desenvolvimento de processos fermentativos economicamente viáveis, capazes de produzir FTase em elevada produtividade e em condições de aplicação industrial. Nesse contexto, microrganismos do gênero *Aspergillus*, têm recebido destaque devido à elevada capacidade de síntese enzimática em processos fermentativos. Entre eles, *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresenta potencial promissor para produção de FTase, sendo previamente investigado em estudos conduzidos no Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP) e na Universidade Federal de Alfenas (Maiorano *et al.*, 2020).

Embora a literatura apresente numerosos estudos relacionados à síntese de FOS em escala laboratorial, ainda são relativamente escassos os trabalhos voltados especificamente à produção de FTase em biorreatores, sobretudo envolvendo estratégias de cultivo em batelada e batelada-alimentada. Essa limitação torna-se ainda mais relevante quando considerados os desafios inerentes ao escalonamento de processos fermentativos, uma vez que fatores como agitação, aeração,

transferência de oxigênio, viscosidade do meio e morfologia micelial exercem influência direta sobre o crescimento celular, atividade enzimática e o rendimento do processo.

Dessa forma, a presente dissertação propõe investigar a produção de FTase por fermentação submersa utilizando *Aspergillus oryzae* IPT-301 em cultivos conduzidos em biorreator nos modos batelada e batelada-alimentada, empregando açúcar VHP (Very High Polarization) como fonte de carbono. A proposta diferencia-se dos processos convencionalmente reportados na literatura por utilizar matéria-prima de menor custo, ampla disponibilidade no setor sucroenergético brasileiro e menor custo em comparação à sacarose refinada. Além disso, o trabalho visa avaliar diferentes estratégias operacionais em biorreator, buscando contribuir para o desenvolvimento de um processo tecnicamente viável e potencialmente aplicável na produção de FTase.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a produção das enzimas frutotransferase (FTase) micelial e extracelular por fermentação submersa em biorreator em modo batelada e batelada-alimentada a partir do cultivo do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 utilizando açúcar VHP como fonte de carbono.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

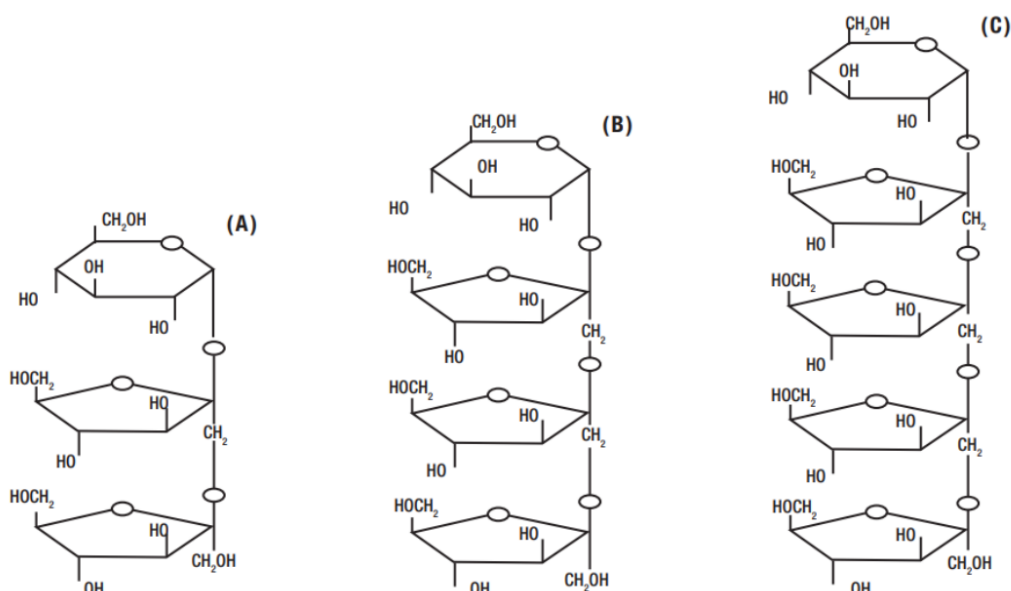
- a) avaliar o cultivo em batelada utilizando açúcar VHP, monitorar o consumo de substrato, formação de produtos e produção da enzima FTase, atividade da enzima;
- b) avaliar a produção da FTase no cultivo em modo batelada-alimentada, utilizando o VHP como solução de alimentação, visando um maior rendimento e produtividade das enzimas FTase micelial e extracelular;
- c) determinar as atividades de transfrutoseilação (AT) e hidrolítica (AH) das enzimas produzidas e a razão entre as atividades (AT/AH) para os cultivos em batelada e batelada-alimentada utilizando o açúcar VHP como fonte de carbono.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Os Frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros formados por unidades de glicose (G) e frutose (F), caracterizados por suas cadeias curtas compostas por 1-kestose (GF2), 1-nistose (GF3) e 1-β-frutofuranosilnistose (GF4). Nessas estruturas, as unidades frutose encontram-se ligadas à sacarose pela posição β (2→1), conforme representado na Figura 1 (Yun, 1996).

Figura 1 - Fórmula estrutural dos frutooligossacarídeos (FOS) com os componentes: (A) 1-kestose, (B) 1-nistose e (C) 1-β-frutofuranosilnistose.



Fonte: Fortes e Muniz, 2009.

Os FOS podem ser encontrados naturalmente em diversas plantas, frutas e vegetais como trigo, centeio, raiz de chicória, algas marinhas, tomate, nectarina, bagaço de cana-de-açúcar, alho, cebola, resíduos de mandioca, farelo de arroz, farelo de milho, palha de arroz, bagaço de maçã, mamão, cascas de beterraba e cascas de banana (Cunha *et al.*, 2019). Entretanto, são encontradas em concentrações muito reduzidas, o que impede que exerçam efeitos significativos no organismo humano e inviabilizam sua extração e aplicação em escala industrial (Choukade e Kango, 2021).

Os FOS são açúcares reconhecidos pelo seu potencial prebiótico, pois seu consumo é altamente benéfico para a saúde e nutrição humana (Choukade e Kango, 2021). Apresentam baixo valor calórico, são não cariogênicos, contribuem para a redução dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e fosfolipídios na corrente sanguínea e podem ser consumidos com segurança por indivíduos diabéticos. Além disso, as enzimas gastrointestinais não os hidrolisam e estimulam seletivamente o crescimento de bifidobactérias na microbiota intestinal, auxiliando na eliminação de microrganismos patogênicos e na prevenção do câncer de cólon (Dias *et al.*, 2025).

Esses oligômeros possuem aproximadamente 40–60% do poder adoçante da sacarose e são amplamente utilizados pelas indústrias alimentícia e farmacêutica como açúcares funcionais (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023).

Embora os FOS sejam produzidos naturalmente por enzimas presentes em diversas fontes vegetais (Cunha *et al.*, 2019), comercialmente são sintetizados por meio de uma rota enzimática utilizando sacarose como substrato, catalisada por enzimas de origem microbiana conhecidas como β -frutofuranosidases (FFase, E.C.2.3.2.1.26) e frutotransferases (FTase, E.C. 2.4.1.9), que são produzidas por linhagens fúngicas (Chien *et al.*, 2001; Choukade e Kango, 2021)

3.2. ENZIMAS E SUA IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA

As enzimas são proteínas de natureza catalítica, cuja principal função é acelerar reações químicas específicas sem serem consumidas durante o processo. Essa atividade ocorre por meio da redução da energia de ativação necessária para a reação, o que confere maior rapidez e eficiência aos processos metabólicos. A especificidade enzimática está diretamente relacionada à sua conformação tridimensional e ao sítio ativo, que interage seletivamente com o substrato, originando os produtos desejados (Marzzoco e Torres, 2007).

No corpo humano, as enzimas desempenham papéis essenciais em funções vitais como digestão, respiração celular, síntese de macromoléculas e regulação metabólica. Já em escala industrial, sua aplicação é ampla e estratégica, abrangendo setores como a produção de alimentos e bebidas, fármacos, detergentes, biocombustíveis e biopolímeros.

Outro aspecto relevante relacionado às enzimas refere-se à sua suscetibilidade a compostos inibidores. Alterações em parâmetros como temperatura, pH,

disponibilidade de substrato e presença de metabólitos podem modificar significativamente a atividade catalítica. Os inibidores enzimáticos, por exemplo, desempenham importante papel no controle metabólico celular, podendo atuar de maneira reversível ou irreversível sobre a enzima (Marzzoco e Torres, 2007). Em processos fermentativos industriais, fenômenos de inibição podem impactar diretamente o crescimento celular, o consumo de substrato e a formação de produtos, tornando o controle das condições operacionais um fator determinante para o desempenho do bioprocessamento.

Entre as diversas enzimas de interesse industrial, destaca-se a frutossiltransferase (FTase, E.C. 2.4.1.9), responsável pela conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (FOS) por meio da reação de transfrutosilação. Devido aos vários benefícios à saúde proporcionado pelo FOS, a produção de FTase torna-se um tema de interesse crescente, tanto para o avanço científico quanto para o desenvolvimento de aplicações industriais em larga escala.

3.3. FRUTOSILTRANSFERASE (FTASE)

A Frutossiltransferase (FTase, E.C. 2.4.1.9) é uma enzima pertencente à classe das transferases, responsável por catalisar a reação de transfrutosilação a partir da sacarose, originando frutooligossacarídeos (FOS) de cadeia curta, como 1-kestose (GF2), 1-nistose (GF3) e 1- β -frutofuranosilnistose (GF4).

Estudos envolvendo microrganismos relatam principalmente duas enzimas associadas à atividade de transfrutosilação, as Frutossiltransferases (FTases) e as β -Frutofuranosidases (FFases), ambas relacionadas à produção de FOS. Entretanto, as distinções funcionais e estruturais entre essas enzimas ainda não estão completamente esclarecidas na literatura, dificultando a diferenciação entre elas (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023).

Supõe-se que essas enzimas apresentem tanto potencial hidrolítico quanto potencial de transfrutosilação (Choukade e Kango, 2021). Nesse contexto, a atividade de transfrutosilação (AT), a atividade hidrolítica (AH) e, principalmente, a razão entre essas atividades (AT/AH) constituem parâmetros relevantes para avaliação do potencial de síntese de FOS (Romano *et al.* 2016).

O mecanismo de transfrutosilação ocorre em duas etapas principais. Inicialmente, a molécula de sacarose é hidrolisada, gerando espécies derivadas

(Glicose e Frutose). Em seguida, a frutose liberada é transferida para uma molécula aceptora, formando ligações glicosídicas $\beta(2\rightarrow1)$ e/ou $\beta(2\rightarrow6)$. Dessa forma, a produção de FTase em fermentação submersa é descrita na literatura por Choukade e Kango (2021), em duas etapas. Inicialmente ocorre a produção microbiana de FTase e, posteriormente, a conversão da sacarose em FOS catalisada pela enzima produzida

Diversos microrganismos, especialmente fungos filamentosos e bactérias, são capazes de produzir FTase. Entre eles, destacam-se espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Aureobasidium* e *Fusarium*, sendo o *Aspergillus oryzae* amplamente estudado devido à sua elevada capacidade de síntese de FTase e ao status de microrganismo seguro para aplicações industriais (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023).

A relevância da FTase está diretamente associada às propriedades funcionais dos FOS produzidos, pois apresentam aplicações crescentes na indústria alimentícia e farmacêutica, sendo incorporados em produtos destinados à melhora da saúde intestinal, à redução do colesterol sérico e ao fortalecimento do sistema imunológico. Nesse cenário, considerando ainda a limitada produção nacional de FOS em escala industrial, o estudo da produção e otimização de FTase torna-se estratégico, tanto do ponto de vista científico quanto tecnológico, por possibilitar o desenvolvimento de processos mais eficientes e economicamente viáveis para obtenção desses compostos funcionais.

3.4. MERCADO MUNDIAL DE FOS

A crescente demanda por alimentos funcionais e ingredientes capazes de promover benefícios à saúde tem aumentado significativamente nos últimos anos, o que tem favorecido a expansão do mercado mundial de prebióticos. Esse crescimento também pode ser atrelado a doenças gastrointestinais, obesidade e diabetes (Mordor Intelligence, 2026).

Além disso, o aumento dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D), aliado à crescente disposição dos consumidores em adquirir alimentos com propriedades funcionais, tem favorecido a incorporação de prebióticos em diferentes segmentos da indústria alimentícia. Entre suas diversas aplicações, os prebióticos atuam como agentes adoçantes e intensificadores de textura em alimentos e bebidas. Nesse contexto, ingredientes como os frutooligossacarídeos (FOS) têm se destacado

por possibilitarem a formulação de produtos com sabor adocicado e menor teor calórico, atendendo à crescente demanda por alimentos mais saudáveis e contribuindo para a expansão desse mercado (Grand View Research, 2026).

Como reflexo desse cenário, o mercado mundial de prebióticos foi avaliado em US\$ 11,1 bilhões em 2025, com previsão de alcançar US\$ 12,7 bilhões em 2026 e US\$ 32,9 bilhões em 2033, o que representa uma taxa de crescimento anual de 14,6% de 2026 a 2033 (Grand View Research, 2026). Esses dados evidenciam o elevado potencial econômico dos FOS e reforçam o interesse crescente no desenvolvimento de processos produtivos mais eficientes e competitivos. Nesse contexto, o mercado mundial de FOS em 2025 ficou avaliado em US\$ 3,74 bilhões, com expectativa de atingir US\$ 4,05 bilhões em 2026 (Mordor Intelligence, 2026). Assim, os FOS representam aproximadamente 32% do mercado global de prebióticos, evidenciando sua relevância econômica dentro desse setor.

Os FOS não são produzidos industrialmente no Brasil, um dos maiores produtores mundiais de sacarose, matéria-prima essencial à obtenção do açúcar funcional, sendo o seu uso totalmente dependente de importação. O país carece de tecnologia capaz de produzi-los a baixo custo, em larga escala e com rendimentos satisfatórios, visto que o alto custo para a produção da enzima microbiana ainda torna o processo biotecnológico economicamente inviável para a obtenção de FOS em escala comercial (Mussato e Teixeira, 2010). Além disso, a utilização de meios de cultura sintéticos pode elevar significativamente os custos operacionais do processo, reforçando a importância do desenvolvimento de estratégias que aumentem a produtividade enzimática e reduzam os custos de produção.

3.5. PRODUÇÃO DE FTASE EM BIORREATOR

A produção de frutossiltransferase (FTase) em biorreatores representa uma etapa estratégica para a viabilização industrial da síntese de FOS, especialmente devido à crescente demanda por prebióticos obtidos por rotas biotecnológicas. Embora diversos estudos abordem a produção de FOS em escala laboratorial utilizando frascos agitados, ainda são relativamente escassos os trabalhos voltados especificamente à produção da enzima FTase em sistemas biorreatores, sobretudo abordando diferentes estratégias de cultivo e/ou produção da enzima.

De modo geral, a produção de FTase em fermentação submersa ocorre em duas etapas principais: inicialmente, há o crescimento microbiano e a síntese da enzima; posteriormente, ocorre a reação de transfrutossilacção da sacarose para formação de FOS. Dessa forma, fatores operacionais como concentração de sacarose, pH, temperatura, aeração, velocidade de agitação e morfologia celular exercem influência direta tanto sobre a atividade enzimática quanto sobre os rendimentos de FOS obtidos. Além disso, a elevada concentração de sacarose normalmente empregada nos processos industriais contribui para o aumento da viscosidade do meio, dificultando a homogeneização e a transferência de oxigênio no interior do biorreator. (De la Rosa *et al.*, 2022).

Entre os estudos encontrados, Salinas e Perotti (2009) investigou a produção de FTase por *Aureobasidium sp.* ATCC 20524 em biorreator de tanque agitado de 1 L, comparando cultivos em batelada convencional e em batelada em pulsos. Os resultados demonstraram que a estratégia em pulsos proporcionou aumento expressivo da produção enzimática, atingindo 523 U/mL de FTase, valor aproximadamente 80,5% superior ao observado no cultivo em batelada simples. Além disso, a concentração máxima de FOS obtida foi de 161,4 g/L, enquanto no sistema convencional foram produzidos 126,4 g/L. Entretanto, segundo os autores, o crescimento celular foi inibido pelo aumento da pressão osmótica ocasionado pelos pulsos.

Resultados semelhantes quanto à influência das condições operacionais foram observados por De la Rosa *et al.* (2022), que avaliaram a produção de FOS por *Aspergillus oryzae* DIA-MF utilizando diferentes meios contendo aguamiel e melaço. Em escala de frascos agitados, os autores verificaram elevados rendimentos de FOS, alcançando valores próximos de 0,64 gFOS/g sacarose inicial. Entretanto, durante o escalonamento para biorreator, observou-se redução no desempenho fermentativo e aumento do tempo necessário para atingir o rendimento máximo de FOS. Os autores atribuíram esse comportamento principalmente às diferenças hidrodinâmicas entre os sistemas, destacando que a elevada viscosidade do meio dificultou a homogeneização da biomassa e comprometeu a transferência de oxigênio.

Nesse contexto, o trabalho de Maiorano *et al.* (2020) pode ser considerado um dos estudos mais próximos da presente proposta de pesquisa, em que foi apresentado os efeitos da velocidade de agitação e da taxa de aeração na produção de frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em biorreator de tanque agitado.

Embora a literatura apresente diversos trabalhos relacionados à síntese de FOS e à caracterização de FTases, ainda são escassos os estudos que investigam de forma aprofundada o comportamento operacional do processo em biorreatores, incluindo parâmetros como agitação, aeração, e estratégias de alimentação. Assim, o estudo desenvolvido por Maiorano (2020) reforça a relevância do avanço das pesquisas nessa área, especialmente no que se refere à otimização e ao escalonamento de bioprocessos voltados à produção de FTase.

Apesar dos avanços observados, os estudos disponíveis ainda demonstram grande variabilidade nos resultados obtidos em biorreatores, principalmente em função das diferenças entre microrganismos, meios de cultivo, estratégias operacionais e configurações dos sistemas fermentativos. Enquanto alguns trabalhos relatam aumento no rendimento de FOS após o escalonamento, outros observam perdas significativas de produtividade em decorrência das limitações hidrodinâmicas do processo. Tal comportamento reforça a complexidade associada à produção de FTase e FOS em escala ampliada.

Além disso, observa-se que grande parte dos trabalhos concentra-se na produção de FOS propriamente dita, enquanto estudos direcionados especificamente à cinética de produção de FTase, ao perfil de expressão enzimática e à influência das condições hidrodinâmicas sobre a atividade da enzima ainda permanecem limitados. Essa escassez de informações dificulta a consolidação de parâmetros operacionais robustos para o escalonamento industrial do processo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste projeto de pesquisa englobou:

- I. Metodologia Experimental: Refere-se ao preparo do inóculo e processo fermentativo;
- II. Metodologia analítica: Quantificação de Biomassa, determinação das atividades enzimáticas e quantificação de açúcares.
- III. Tratamento dos dados experimentais: Organização, sistematização e análise dos dados obtidos, incluindo a realização de cálculos, a elaboração de gráficos e a interpretação dos resultados.

4.1. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1.1. Microrganismo

O microrganismo responsável pela produção da enzima FTase por fermentação submersa em biorreator em modo batelada e batelada-alimentada foi cedido pelo banco de cultura do Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). Foi fornecida a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 na forma de esporos liofilizados. O microrganismo foi usado primeiramente para a produção de amilase (MAIORANO, 1982) e pectinase (MAIORANO, 1990). Posteriormente, a linhagem foi testada para a produção de FTase, obtendo-se resultados promissores em estudos desenvolvidos em escala de bancada no IPT/SP (Cuervo *et al.*, 2007; Ottoni *et al.*, 2012) e no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG (Prado *et al.*, 2016).

4.1.2. Preparação do inóculo

Os esporos liofilizados do microrganismo foram suspensos em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 100 µL inoculadas em meio sólido constituído por ágar batata dextrose 2,0 % (m/v), glicerina 2,5 % (m/v), extrato de levedura 0,5 % (m/v) e glicose 2,5 % (m/v). Após incubação por 7 dias a 30 °C, os esporos produzidos foram suspensos em solução de NaCl 0,95 % (m/v) e Tween® 80 a 0,1 % (v/v) (Garcia *et al.*, 2021). A suspensão obtida foi filtrada com o auxílio de um tubo Falcon e uma seringa

com lâ de vidro. Em seguida, adicionou-se solução de glicerina a 20% (m/v) para conservação da suspensão de esporos. O ajuste da concentração foi realizado por contagem direta em microscópio óptico, utilizando a Câmara de Neubauer, sendo ajustada para 1×10^8 esporos·mL⁻¹.

Finalmente, o inóculo preparado foi armazenado em tubos Eppendorf estéreis de 5 mL e armazenado sob refrigeração a -80 °C e utilizados, posteriormente, no biorreator para a produção da enzima. O volume de inóculo empregado em cada cultivo foi calculado para atingir uma concentração final de 1×10^5 esporos·mL⁻¹ no biorreator.

4.1.3. Processo fermentativo

As enzimas FTase micelial e extracelular foram produzidas a partir da linhagem de *Aspergillus oryzae* IPT-301 mediante fermentação aeróbia submersa de meio de cultura com a seguinte composição (g/L): Extrato de levedura 5,0; NaNO₃ 5,0; KH₂PO₄ 2,0; MgSO₄·7H₂O 0,5; MnCl₂·4H₂O 0,3; FeSO₄·7H₂O 0,01 (Cavini, 2024). O meio de cultura e a solução de sacarose inicial (açúcar VHP) a uma concentração de 150 g/L foram previamente esterilizados a 121°C por 20 min separadamente.

O processo fermentativo foi conduzido sob as condições operacionais de agitação a 800 rpm, temperatura de 30 °C, pH 5,5 e taxa de aeração de 0,75 vvm (volume de ar por volume de meio de cultura por minuto) por um período de 72 horas (Maiorano *et al.*, 2020). O pH do meio reacional foi mantido constante por meio da adição automática de soluções de NaOH 4 M e/ou H₂SO₄ 4 M.

Inicialmente, o cultivo foi realizado em modo batelada, com o objetivo de avaliar o crescimento do microrganismo e determinar o tempo de máxima atividade enzimática. A partir desses resultados, foram definidas e aplicadas estratégias de alimentação em modo batelada alimentada, visando à otimização da produção da enzima FTase. (Seção 4.1.5)

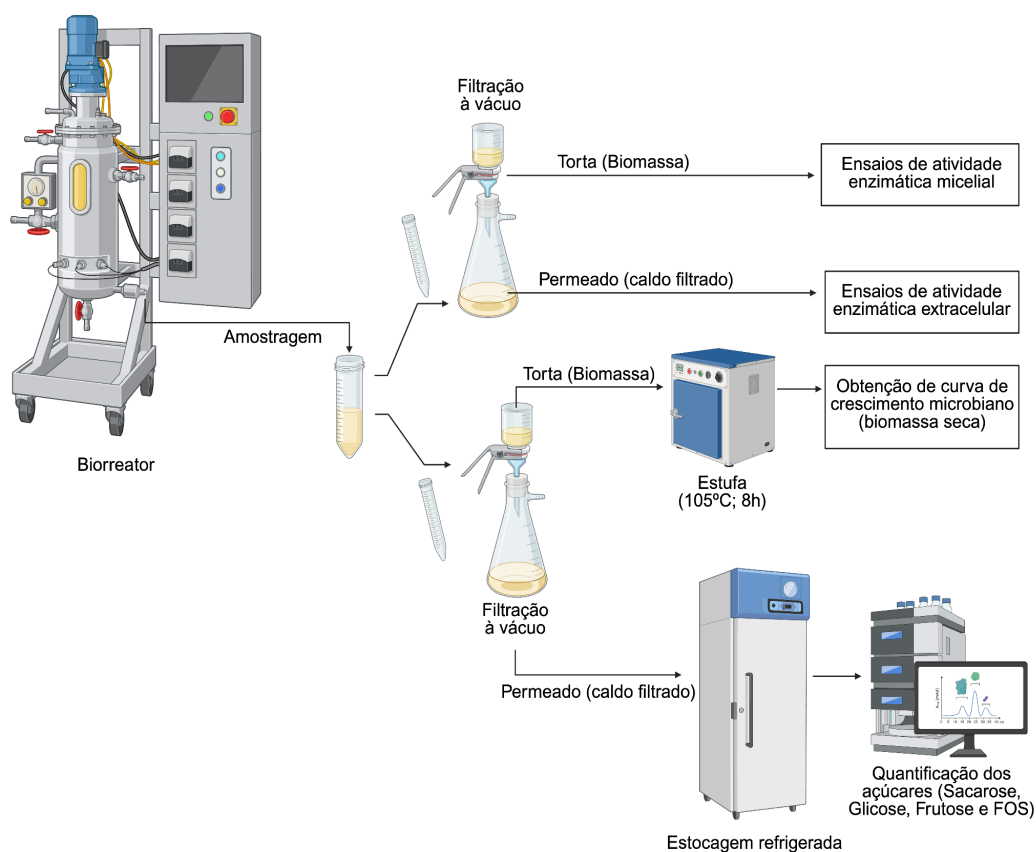
Para as fermentações em modo batelada e batelada-alimentada, foram estudadas as cinéticas de crescimento do microrganismo (produção de biomassa celular), produção das enzimas FTases micelial e extracelular e hidrolítica, consumo de substrato (sacarose), formação de produtos (FOS) e subprodutos (glicose e frutose).

Para a realização dos estudos descritos acima, foi necessário monitorar o processo e coletar amostras no decorrer da fermentação visando:

- I. Análises de massa seca para a determinação da concentração da biomassa e obtenção das curvas de crescimento;
- II. Análises de açúcares para monitoramento do consumo de substrato e geração de produtos e subprodutos;
- III. Coleta de amostras para ensaios de atividade enzimática micelial, extracelular e hidrolítica.

As amostras coletadas para análise foram filtradas à vácuo. No caldo fermentado (permeado) foi quantificado os açúcares (sacarose, glicose, frutose e FOS) e as atividades extracelulares da FTase e hidrolítica; enquanto a biomassa obtida (torta) foi utilizada para a determinação da concentração celular e da atividade FTase e hidrolítica micelial. O procedimento para a coleta de amostras no biorreator (batelada e batelada-alimentada) está ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma do processo de amostragem em biorreator ilustrando a coleta de amostras ao longo do processo fermentativo.



Fonte: Autora, 2026.

4.1.4. Biorreatores utilizados

Para a realização dos ensaios experimentais foram utilizados dois modelos de biorreatores:

I. Biorreator modelo B (5L)

Biorreator marca Sartorius, com volume nominal de 5,0 L, em que foi utilizado um volume inicial de trabalho de 3,0 L, com controle de pH (Sensor 405-DPAS-SC-K8S/325), de temperatura e de pO_2 (Sensor INPRO 6820/12/320 (T-82)). O biorreator, nos ensaios, foi inoculado com 3 mL de uma suspensão de esporos de 1×10^8 esporos.mL⁻¹, conforme item 4.1.2.

II. Biorreator modelo C (15L)

Biorreator marca Sartorius, com volume nominal de 15 L, em que foi utilizado um volume inicial de trabalho de 7,0 L, com controle de pH (Sensor 405-DPAS-SC-K8S/125), de temperatura e de pO_2 (Sensor INPRO 6820/12/120 (T-82)). O biorreator, nos ensaios, foi inoculado com 7 mL de uma suspensão de esporos de 1×10^8 esporos.mL⁻¹, conforme item 4.1.2.

4.1.5. Estratégias de alimentação

Foram desenvolvidas algumas estratégias de alimentação com o objetivo de maximizar a produção da enzima FTase. Para estes experimentos, as condições de cultivo como suplementação do açúcar VHP foram definidas de acordo com os melhores resultados de atividade enzimática obtidos nos cultivos em batelada, porém, mantendo-se os parâmetros operacionais de 800 rpm, 0,75 v.v.m, 30°C e pH 5,5.

Com isso, as estratégias implementadas foram:

(1) Alimentação em Pulso: Foi realizado dois ensaios utilizando essa estratégia, sendo um no reator I (5L) e o outro no reator II (15L). Nesses ensaios foram realizados dois pulsos de açúcar VHP com solução de alimentação em altas concentrações, a alimentação foi iniciada ao final da fase log ou exponencial de crescimento visando induzir o fungo a produzir as enzimas FTases micelial e extracelular. Os pulsos foram

feitos com o objetivo de voltar a concentração inicial de sacarose no reator (150 g/L) a fim de maximizar a produção de FTase.

(2) Corte 80%: Aplicado no reator II (15L) com um volume inicial de 7,0 L, essa estratégia consistiu na retirada de 80% do volume reacional, seguida da reposição de 80% de um novo meio composto por 3,6 L de meio de cultura e 2,0 L de solução de sacarose a uma concentração de 525 g/L, com o objetivo de atingir a concentração inicial de 150 g/L dentro do reator. Foram realizados dois cortes: o primeiro ocorreu por volta de 30 h de cultivo, tomando como referência o tempo de máxima atividade da FTase observado nos ensaios em batelada, enquanto o segundo foi realizado quando a concentração de sacarose no reator estava praticamente esgotada. Essa estratégia foi adotada com o intuito de reiniciar a batelada com uma concentração de células elevada, reduzindo o tempo global do processo e maximizar a produtividade enzimática. Dessa forma o ensaio foi finalizado com 50h de cultivo.

(3) Corte 50%: Também conduzido no reator II (15L) com um volume inicial de 7,0 L, essa estratégia consistiu na retirada de 50% do volume reacional, seguida da reposição de 50% de um novo meio sendo 1,5 L de meio de cultura e 2,0 L de solução de sacarose a uma concentração de 525 g/L, com o objetivo de atingir a concentração inicial de 150 g/L dentro do reator. Foram realizados três cortes, o primeiro corte foi realizado com no momento de máxima atividade da FTase por volta de 30h, segundo e o terceiro corte foi realizado quando a concentração de sacarose dentro do reator estava praticamente esgotada. O ensaio foi encerrado com 50h de cultivo, assim como na estratégia (2).

4.2. METODOLOGIA ANALÍTICA

4.2.1. Quantificação da biomassa celular

As amostras de biomassa, coletadas no biorreator, foram filtradas à vácuo em papel de filtro Whatman™ nº1 e as tortas, obtidas da filtração, foram lavadas com água destilada para posterior secagem em estufa a 105 °C por 8 horas. As tortas foram resfriadas em dessecador por 15 minutos e pesadas em balança analítica.

4.2.2. Determinação das atividades enzimáticas

As Frutossiltransferases (FTases) produzidas exibe, majoritariamente, atividade de transfrutossilação (A_T) ao clivar as ligações do tipo β (2 $\rightarrow$ 1) nas moléculas de sacarose. Por meio da reação enzimática, são liberadas moléculas de glicose como subprodutos no meio reacional e geradas moléculas de FOS com diferentes tamanhos de cadeia polimérica, devido a transferência de grupos frutossil entre moléculas de sacarose promovida pela enzima. Além disso, por apresentarem menor afinidade pelas moléculas de água, as FTases são consideradas enzimas que apresentam baixa atividade hidrolítica (A_H), o que as tornam biocatalisadores potencialmente aplicáveis à produção de FOS.

Portanto, foram quantificadas ambas as atividades para a enzima livre, presente no meio de cultura (atividade extracelular) e aderida ao micélio fúngico (atividade micelial).

Os ensaios de atividade enzimáticas micelial e extracelular foram conduzidos pela adição de 0,1 mL da enzima livre (caldo fermentado) ou 0,05 g de micélio (base úmida) em meio reacional constituído por 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (63,6 %, m/v) e 1,2 mL de tampão citrato 0,1 M (pH 5,5). As análises foram realizadas em triplicata, com o objetivo de assegurar a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados.

As reações foram incubadas por 60 minutos em banho Dubnoff com agitação de 190 rpm, temperatura controlada de 50°C e, finalizadas em banho termostatizado (água em ebulição) por 10 minutos, seguido por resfriamento em banho com água e gelo por 5 minutos, com o objetivo de promover a desnaturação térmica e consequente inativação enzimática.

Dessa forma, define-se uma unidade de atividade transfrutossilação (1U) como a quantidade de enzima capaz de formar um micromol (1 μ mol) de frutose transferida por minuto, sob condições experimentais estabelecidas.

$$1U = \text{Frutose Transferida } \mu\text{mol. min}^{-1} \quad (1)$$

O método de determinação da atividade hidrolítica micelial e extracelular foi conduzido pela adição de 0,1 mL da enzima livre (caldo fermentado) ou 0,05 g de micélio (base úmida) em meio reacional constituído por 3,7 mL de solução de sacarose

P.A. (0,5 %, m/v) e 1,2 mL de tampão citrato 0,1 M (pH 5,5). As análises também foram realizadas em triplicata e nas mesmas condições utilizadas para a determinação da atividade de transfrutossilação (A_T), ou seja, foram incubadas por 60 minutos em banho Dubnoff com agitação de 190 rpm, temperatura de 50°C e, finalizadas em banho termostatizado (água em ebulição) por 10 minutos, seguido por resfriamento em banho com água e gelo por 5 minutos.

A unidade de atividade hidrolítica (1U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar micromol (1 μ mol) glicose por minuto, a partir da hidrólise da sacarose, nas mesmas condições experimentais.

Ao término dos ensaios de atividade enzimática, a solução (meio reacional) foi filtrada, diluída com água destilada e os açúcares (frutose e glicose) foram quantificados por método espectrofotométrico (DNS e GOD/PAP).

A concentração de frutose transfrutossilada (transferida) (FT) no meio reacional será determinada pela Equação (2) (Chen *et al.*, 1996; Cunha *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020).

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

Em que:

[FT] - Concentração de frutose transfrutossilada (transferida);

[G] - Concentração de Glicose;

[AR] - Concentração de Açúcares Redutores.

A Atividade de Transfrutossilação micelial ($AT_{micelial}$) foi quantificada pela Equação (3) (CAVINI, 2024)

$$AT_{micelial} = \frac{[FT] \cdot V_R}{m_{micelial} \cdot t_R} \quad (3)$$

$AT_{micelial}$ - Atividade de transfrutossilação micelial ($U \cdot g^{-1}$);

[FT] - Concentração de frutose transfrutossilada ($g \cdot L^{-1}$);

V_R - Volume do meio reacional (L);

t_R - Tempo de reação (min);

$m_{micelial}$ - Massa de micélio (base seca) (g).

A Atividade de Transfrutossilação (AT_{extra}) foi quantificada pela Equação (4) (Cavini, 2024)

$$AT_{extra} = \frac{[FT] \cdot V_R}{t_r \cdot V_{enzima}} \quad (4)$$

AT_{extra} - Atividade de transfrutossilação micelial ($U \cdot mL^{-1}$);

[FT] - Concentração de frutose transfrutossilada ($g \cdot L^{-1}$);

V_R - Volume do meio reacional (L);

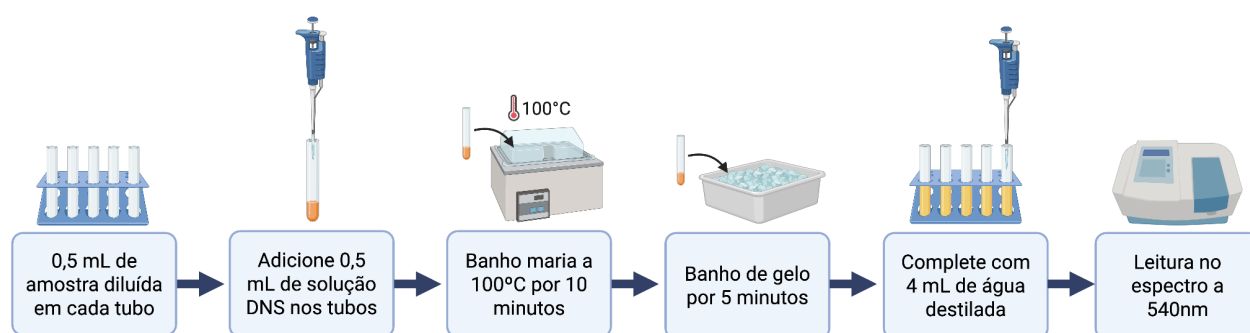
t_r - Tempo de reação (min);

V_{enzima} - Volume do caldo fermentado (mL).

4.2.3. Quantificação dos açúcares para determinação das atividades enzimáticas

Os açúcares, presentes nas amostras de determinação das atividades enzimáticas ao longo dos cultivos em biorreator foram quantificados por métodos colorimétricos, utilizando-se o método GOD/PAP® (kit enzimático glicose-oxidase) para a determinação de glicose e o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para a quantificação de açúcares redutores a partir de uma curva de calibração do método DNS construída na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 g/L, utilizando-se uma solução de 1,0 g/L de Glicose como padrão (MILLER, 1959). As análises foram conduzidas de acordo com a metodologia padronizada no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI/IPT-SP) conforme ilustrado nas figuras 3 e 4.

Figura 3 - Fluxograma do método DNS.



Fonte: Autora, 2026.

Figura 4 - Fluxograma do método GOD/PAP.



Fonte: Autora, 2026.

4.2.4. Quantificação dos açúcares para acompanhamento do ensaio em biorreator

As amostras coletadas ao longo dos ensaios em biorreator foram analisadas quanto às concentrações de sacarose, glicose, frutose e frutooligossacarídeos (FOS) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) com detecção por índice de refração (RID).

A quantificação de sacarose, glicose e frutose foi realizada utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (7,8 × 300 mm) acoplada a um sistema cromatográfico Waters. Como fase móvel, utilizou-se solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,01 N, com vazão de 0,6 mL·min⁻¹. A temperatura do forno da coluna foi mantida em 30 °C e o volume de injeção utilizado foi de 10 µL.

A determinação dos FOS foi realizada utilizando duas colunas Shodex SC1011 (8 × 300 mm; 6 µm) conectadas em série e acopladas a uma pré-coluna Shodex SC1011 (50 mm), também empregando detector de índice de refração. A fase móvel utilizada consistiu em solução de EDTA-CaNa₂ 5 mM, com vazão de 0,4 mL·min⁻¹. As colunas foram mantidas a 72 °C, enquanto a temperatura do detector foi ajustada para 45 °C. O volume de injeção foi de 10 µL e o tempo total de corrida cromatográfica foi de 60 min.

A quantificação dos açúcares foi realizada por meio de curvas de calibração externas, preparadas na faixa de concentração de 0,1 a 10 g/L, utilizando-se como padrões sacarose, glicose e frutose (Sigma-Aldrich) e os padrões de frutooligossacarídeos comerciais FOS WAKO®, incluindo 1-kestose (GF2), 1-nistose (GF3) e 1F-β-frutofuranosilnistose (GF4).

4.3. TRATAMENTO DE DADOS EXPERIMENTAIS

Os dados experimentais obtidos durante a condução dos ensaios foram organizados, sistematizados e tratados em planilhas eletrônicas, com o objetivo de garantir a confiabilidade, a rastreabilidade e a adequada interpretação das informações geradas. Inicialmente, os dados foram transcritos para as planilhas eletrônicas, passando por etapas de conferência, padronização de unidades e verificação de consistência, a fim de minimizar erros decorrentes de coleta ou registro experimental.

Após a organização dos dados, foram realizados os cálculos necessários para a determinação dos parâmetros cinéticos e enzimáticos, incluindo crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos, atividades de transfrutossilção (A_T) e hidrolítica (A_H), bem como a razão entre essas atividades (A_T/A_H) e a produtividade total. Esses cálculos permitiram a obtenção de informações quantitativas fundamentais para a avaliação do desempenho do processo fermentativo nos diferentes modos de operação estudados.

A partir dos dados tratados, foram elaborados gráficos e tabelas que possibilitaram a visualização dos perfis cinéticos ao longo do tempo de cultivo, facilitando a identificação de tendências, pontos de máximo e fases de maior produtividade. A análise e interpretação desses resultados subsidiaram a discussão apresentada no capítulo de Resultados e Discussão, o que permitiu correlacionar o comportamento do microrganismo, a produção enzimática e o consumo de substrato sob cada uma das condições experimentais avaliadas.

As equações de produtividade são descritas abaixo. A produtividade celular (P_x) foi calculada a partir da razão entre a concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$) obtida e o tempo necessário para atingir esse valor, conforme a Equação (5). Esse parâmetro expressa a eficiência do processo em converter substrato em biomassa ao longo do cultivo.

$$P_x = \frac{X_{m\acute{a}x}}{t_{X_{m\acute{a}x}}} \quad (5)$$

P_x – Produtividade celular (g/L·h);

$X_{m\acute{a}x}$ – Concentração celular máxima (g·L⁻¹);

$t_{X_{m\acute{a}x}}$ – Tempo em que o sistema alcança $X_{m\acute{a}x}$ (h);

A produtividade enzimática foi determinada a partir da relação entre a atividade enzimática obtida e o tempo correspondente de cultivo, conforme a Equação (6). Esse parâmetro foi utilizado para avaliar a eficiência temporal da produção de FTase durante os diferentes modos operacionais estudados.

$$P_{micelial} = \frac{AT_{micelial\ máx}}{t} \quad e \quad AT_{extra} = \frac{AT_{extra\ máx}}{t} \quad (6)$$

$P_{micelial}$ – Produtividade enzimática micelial (g/L·h);

P_{extra} – Produtividade enzimática extracelular (g/mL·h);

$AT_{micelial}$ – Atividade de transfrutossilação micelial máxima (U·g⁻¹);

AT_{extra} – Atividade de transfrutossilação extracelular máxima (U·mL⁻¹);

t – Tempo de cultivo correspondente à atividade máxima (h).

Adicionalmente, Atividade Total de Transfrutossilação micelial (AT_{TOTAL}) foi calculada a partir da Equação (7) (Maiorano *et al.*, 2020). Esse parâmetro representa a atividade enzimática total presente no reator no instante de máxima atividade específica, sendo obtido pelo produto entre a máxima atividade de transfrutossilação micelial e a concentração celular nesse instante.

$$AT_{TOTAL} = AT_{micelial\ máx} \cdot X_{AT\ máx} \quad (7)$$

AT_{TOTAL} - Atividade Total de Transfrutossilação micelial (U·L⁻¹);

$AT_{micelial}$ - Atividade de transfrutossilação micelial máxima (U·g⁻¹);

$X_{AT\ máx}$ – Concentração celular no instante em que ocorre a atividade transfrutossilação micelial máxima (g·L⁻¹).

4.4. ENSAIOS REALIZADOS

A Tabela 1 apresenta os ensaios conduzidos ao longo deste trabalho, incluindo o modo operacional empregado, o volume útil do biorreator, o tempo total de cultivo e as principais observações experimentais associadas a cada condição avaliada.

Tabela 1 - Condições operacionais e descrição dos ensaios conduzidos em biorreator para produção de FTase por *Aspergillus oryzae* IPT-301.

Ensaio	Estratégia	Volume	Tempo de Cultivo	Observações
EB02	Batelada	5,0 L	72 h	Agitação inicial de 300 rpm; após o primeiro pulso (25,3 h), a agitação foi elevada para 800 rpm.
EB03	Pulsos	5,0 L	72 h	
EB04	Batelada	15 L	72 h	
EB05	Pulsos	15 L	49 h	
EB06	Corte 80%	15 L	50 h	
EB07	Corte 50%	15 L	50 h	

Fonte: Autora, 2026.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios experimentais foram conduzidos inicialmente em um biorreator de bancada com volume nominal de 5,0 L (Biorreator I), operado nos modos batelada e batelada alimentada em pulso. Posteriormente, os experimentos passaram a ser realizados em um biorreator com volume nominal de 15 L (Biorreator II), no qual foram avaliados os modos de operação batelada, batelada alimentada em pulso e estratégias de alimentação associadas a diferentes cortes de meio reacional.

A implementação dessas diferentes configurações operacionais teve como objetivo investigar o comportamento do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301, produtor da frutossiltransferase (FTase). Para isso, foram analisados não apenas os perfis de produção enzimática, mas também os parâmetros cinéticos relacionados ao crescimento celular, consumo de substrato e à dinâmica de formação de produtos ao longo do processo fermentativo.

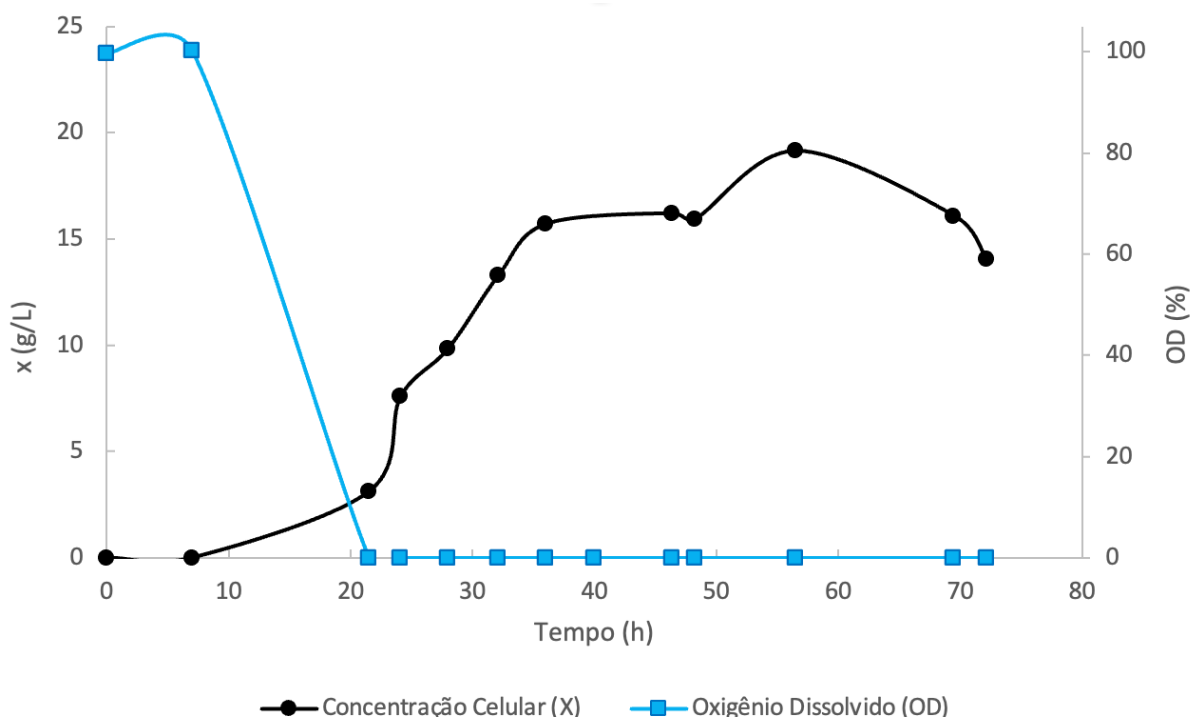
Inicialmente, foi conduzido um ensaio em modo batelada, considerado preliminar, com a finalidade de estabelecer as condições de cultivo mais adequadas e caracterizar o comportamento do sistema biológico em regime descontínuo. Com base nesses resultados, foram implementadas estratégias de operação em modo batelada alimentada, visando avaliar possíveis incrementos na produtividade enzimática e na eficiência global do processo fermentativo.

Para melhor compreensão do desempenho do processo fermentativo sob as diferentes condições operacionais avaliadas, os resultados obtidos são apresentados nas seções subsequentes.

5.1. BATELADA EM REATOR DE 5 L (EB02)

O ensaio discutido foi realizado em modo batelada em Biorreator I com capacidade nominal de 5,0 L. A Figura 5 apresenta o perfil de crescimento celular observado ao longo das 72 h de cultivo, que evidencia um comportamento típico em sistema descontínuo, com fase exponencial bem definida seguida por desaceleração de crescimento e declínio da biomassa.

Figura 5 - Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 72h de cultivo do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada em reator de 5L.



Fonte: Autora, 2026.

A concentração celular máxima foi estimada a partir da média dos pontos experimentais obtidos no intervalo entre 36 e 57 h de cultivo, resultando em $X_{\text{máx}} = 16,8 \pm 1,5$ g/L (tempo médio de 46,3 h). Esse resultado indica que as condições operacionais adotadas foram inicialmente favoráveis ao crescimento de *Aspergillus oryzae* IPT-301, refletindo adequada disponibilidade de substrato (Figura 7) e oxigênio nas fases iniciais do cultivo.

Entretanto, a análise integrada do perfil de oxigênio dissolvido (OD) revela um aspecto crítico do processo: a rápida queda do OD nas primeiras 20 h de cultivo, atingindo valores próximos a zero, sugere forte limitação por transferência de oxigênio durante a fase exponencial. Esse comportamento está diretamente associado ao elevado consumo de oxigênio pelo microrganismo, em que a demanda metabólica excede a capacidade de transferência de oxigênio do sistema (kLa), fenômeno amplamente descrito para cultivos de fungos filamentosos (Maiorano *et al.*, 2020).

De acordo com Maiorano (2020), durante a fase exponencial ocorre consumo acelerado de oxigênio, podendo resultar em níveis críticos de OD quando a velocidade de transferência não acompanha a demanda metabólica, o que impacta negativamente a formação de biomassa. Conforme observado neste estudo, a queda

abrupta do OD coincide com o início do crescimento mais acentuado, indicando que o processo pode ter operado sob limitação de oxigênio já nas fases iniciais.

Com o OD próximo a zero ao longo de grande parte do cultivo, indica uma condição prolongada de limitação por oxigênio, nessas condições, o crescimento celular tende a desacelerar progressivamente, não necessariamente por esgotamento de substrato, mas por restrições metabólicas impostas pela baixa disponibilidade de oxigênio, essencial para processos respiratórios e geração de energia.

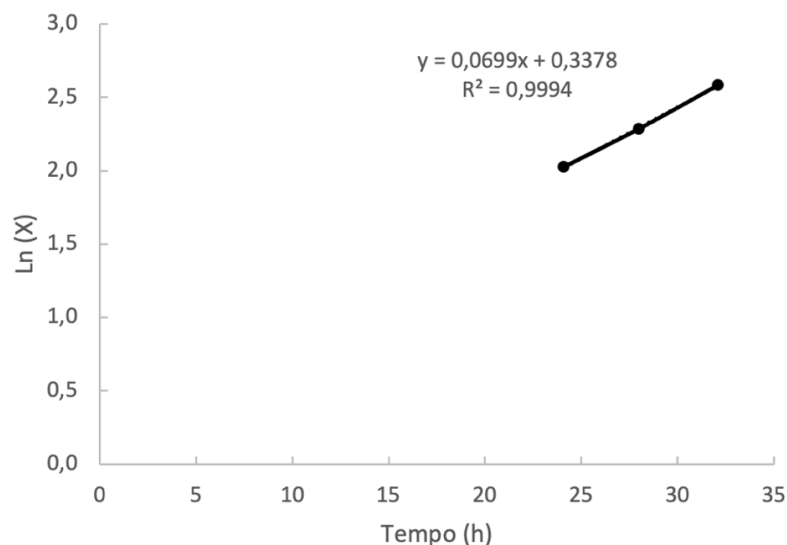
Dessa forma, a máxima produtividade em células ($P_{x_{\max}}$) foi alcançada em 46,3 h de cultivo, atingindo 0,36 g/L·h. Esse valor é superior ao reportado por Maiorano (2020), que observou produtividade de 0,25 g/L·h nas mesmas condições de operação.

Entretanto, a análise da produtividade não é suficiente para uma compreensão completa do desempenho do sistema, sendo necessário avaliar também os parâmetros cinéticos associados ao crescimento microbiano.

Nesse contexto, destaca-se a velocidade específica de crescimento celular (μ) que é um dos principais parâmetros cinéticos utilizados na caracterização de processos fermentativos. Em condições ideais, durante a fase exponencial de crescimento, μ atinge seu valor máximo ($\mu_{\max}$), e é determinado a partir da inclinação da reta obtida pela linearização do crescimento celular em escala logarítmica ($\ln(x)$ vs. Tempo), sendo fundamental para avaliar o desempenho do microrganismo e a eficiência das condições operacionais empregadas.

A Figura 6 representa a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\max}$) do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301, em que foi obtido um $\mu_{\max} = 0,07 \text{ h}^{-1}$. Esse parâmetro é central na análise cinética do processo, pois reflete a capacidade do microrganismo em converter substrato em biomassa sob condições específicas de cultivo. Além disso, o elevado coeficiente de correlação ($R^2 > 0,99$) indica que houve um bom ajuste linear, o que sugere que os intervalos selecionados representam adequadamente trechos da fase exponencial.

Figura 6 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada em reator de 5L.



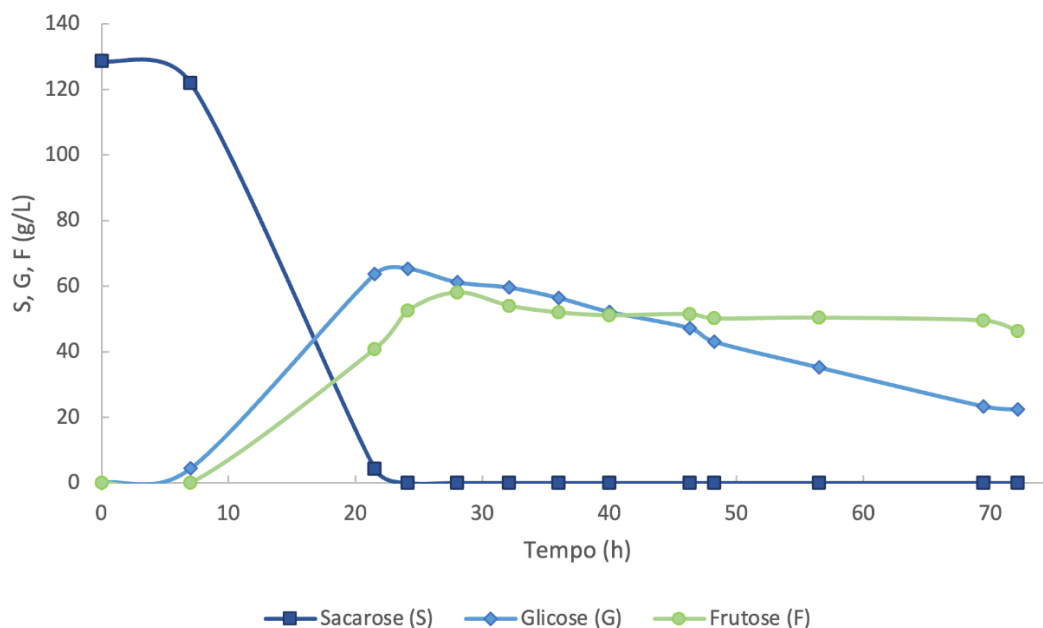
Fonte: Autora, 2026.

A Figura 7 apresenta o perfil das concentrações de sacarose, glicose, frutose ao longo do cultivo. O comportamento observado reflete a complexidade das reações catalisadas pela FTase, em concordância com descrito na literatura por Maiorano *et al.* (2020) e Šedová *et al.* (2014). Durante o processo, ocorrem simultaneamente a hidrólise da sacarose em glicose e frutose, a transferência de unidades de frutose para formação de FOS, o consumo dos monossacarídeos para crescimento e manutenção celular e a hidrólise dos FOS previamente sintetizados, liberando novamente glicose e frutose no meio.

A rápida redução da concentração de sacarose nas primeiras 20 horas indica rápida hidrólise de sacarose sendo completamente esgotada em 24h, o que resultou em uma velocidade de hidrólise de 5,3 g/L.h, quando ocorre uma mudança significativa na dinâmica do sistema.

Esse comportamento inicial está diretamente associado à atividade hidrolítica da enzima, responsável pela clivagem da sacarose em glicose e frutose. Como consequência, observa-se um aumento acentuado na concentração desses monossacarídeos entre 10 e 25 horas.

Figura 7 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada.



Fonte: Autora, 2026.

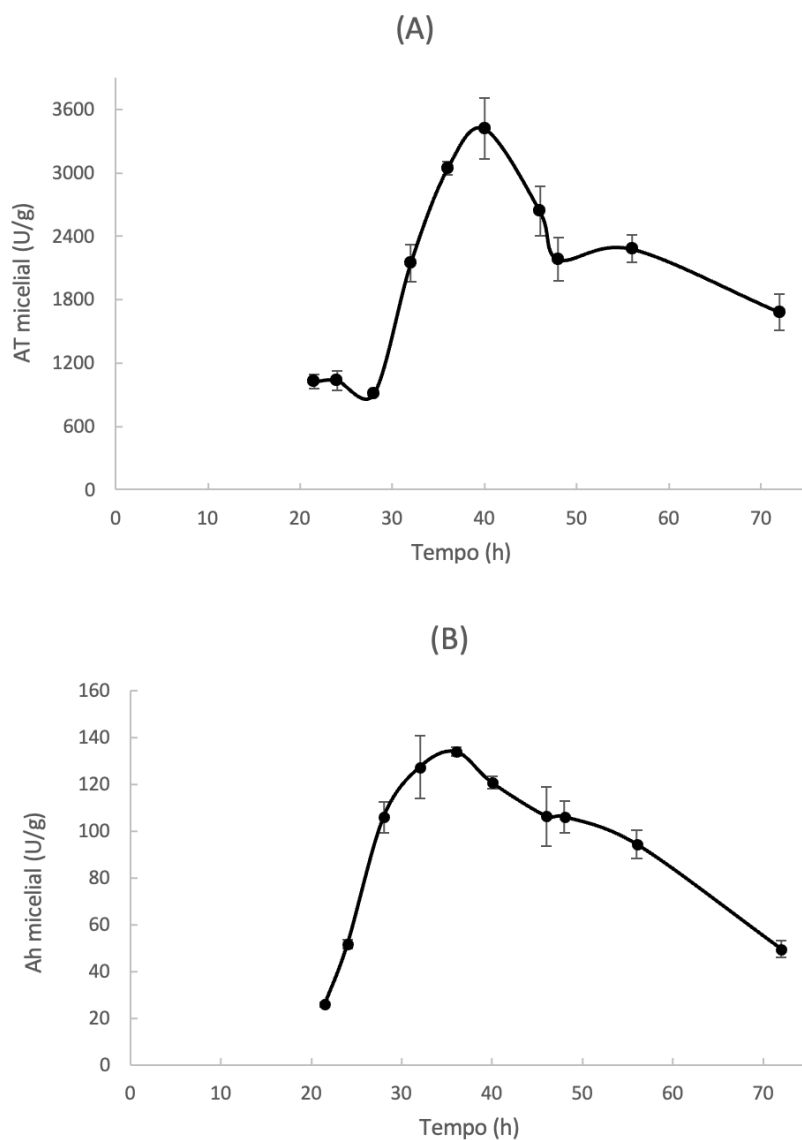
A concentração de glicose atinge um máximo (65,3 g/L) e passa a ser consumida progressivamente, enquanto a frutose tende a se manter em níveis relativamente elevados por um período mais prolongado. Esse comportamento diferencial pode ser explicado pela preferência metabólica do microrganismo pela glicose, fenômeno amplamente descrito como consumo preferencial ou repressão catabólica. Nessa condição, a glicose é rapidamente assimilada, enquanto a frutose é metabolizada de forma mais lenta.

Outro aspecto relevante é que o esgotamento precoce da sacarose sugere que o processo operou com limitação de substrato nas fases posteriores do ensaio em relação a indução da enzima FTase. Essa condição pode impactar diretamente a produção enzimática, uma vez que a síntese de FTase está associada à presença do substrato indutor (Yun, 1996; Romano *et al.*, 2016). Esse comportamento reforça a importância da adoção de estratégias de alimentação (batelada alimentada), capazes de manter níveis adequados de sacarose no meio e, consequentemente, sustentar a produção enzimática e a formação de FOS por períodos mais prolongados.

A Figura 8 apresenta o perfil das Atividades de Transfrutossilação (AT) e Hidrolítica (AH) micelial ao longo do cultivo. Observa-se que, nas primeiras 20 horas de fermentação, ambas as atividades enzimáticas permaneceram em níveis

reduzidos, o que podem ser atribuídos à fase lag, caracterizada pela germinação dos esporos e adaptação metabólica ao meio.

Figura 8 - Perfil das Atividades Transfrutoseilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada.



Fonte: Autora, 2026.

A partir de 20 horas ocorreu um aumento expressivo da FTase e em 40h foi atingido o valor máximo de $3418,2 \pm 289,6$ U/g (Figura 8A) e produtividade enzimática micelial ($P_{micelial}$) é de $85,5$ U/g.h, esse comportamento sugere que, nesse intervalo, o metabolismo microbiano esteve direcionado à síntese de enzimas, favorecendo a produção da FTase. Além disso, a Atividade de Transfrutoseilação Total micelial

(AT_{Total}) obtida foi de 57.573,5 U/L, esse valor é 2,5 vezes maior que o valor descrito na literatura em Maiorano, 2020.

A atividade hidrolítica (AH) também teve um aumento a partir de 20h, com valor médio de $130,6 \pm 4,7$ U/g em torno de 32 horas (Figura 8B).

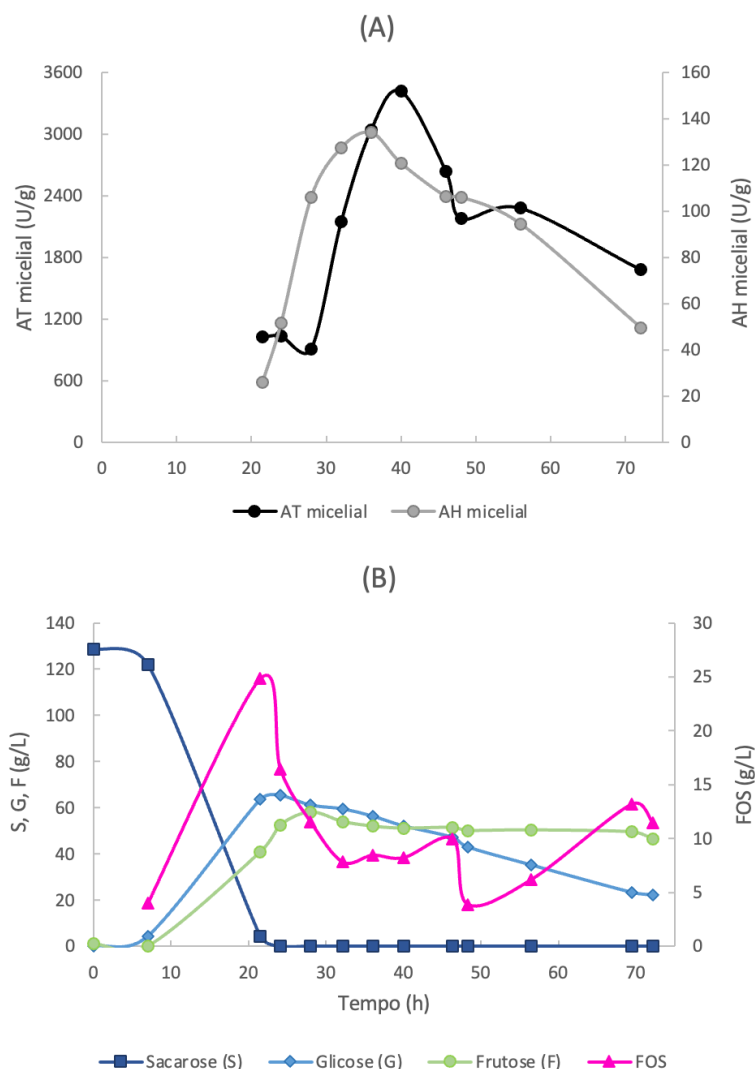
Na fase final do ensaio, embora tenha havido oscilações, a FTase manteve-se em valores elevados comparado a Maiorano (2020) com 2200 a 1700 U/g, enquanto a AH permaneceu relativamente estável de 100 a 90 U/g.

A partir de 70 horas, tanto a FTase quanto a atividade hidrolítica apresentaram queda acentuada, característica da fase estacionária e de declínio do crescimento microbiano conforme observado na Figura 8. Nesse estágio, fatores como esgotamento de nutrientes e acúmulo de metabólitos inibitórios contribuem para a redução da atividade enzimática (Yun, 1996; Romano *et al.*, 2016).

Esse comportamento evidencia uma regulação coordenada entre as atividades de transfrutossilação e hidrolítica. Inicialmente, a atividade hidrolítica desempenha papel fundamental na disponibilização de substratos para o crescimento celular. Entretanto, à medida que o cultivo avança e apesar de menor disponibilidade de sacarose e acúmulo de glicose e frutose, observa-se um redirecionamento parcial da atividade enzimática para a transfrutossilação, favorecendo a formação de FOS (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023). Além disso, essa proporção entre as atividades de transfrutossilação e hidrolítica (AT/AH) é descrita na literatura como um dos critérios mais importantes para avaliar a produção de FOS a partir de enzimas microbianas. Maiores proporções AT/AH indicam maior atividade de transfrutossilação, permitindo maior conversão de sacarose em FOS (Choukade e Kango, 2021).

A Figura 9 evidencia esse comportamento mencionado na literatura, quando a razão máxima obtida entre as atividades foi em 21,5h (AT/AH_{máx} = 39,8) onde é possível observar (Figura 9B) também a maior formação de FOS obtida durante todo o ensaio que foi de 24,8 g/L. A redução da concentração de FOS logo em seguida pode ser atribuída, principalmente, à limitação de sacarose no meio reacional, juntamente com a diminuição da razão entre as atividades de transfrutossilação e hidrolítica (AT/AH) que favorece a predominância de reações de hidrólise do FOS previamente formado, resultando no aumento das concentrações de frutose e glicose no meio (Romano *et al.*, 2016).

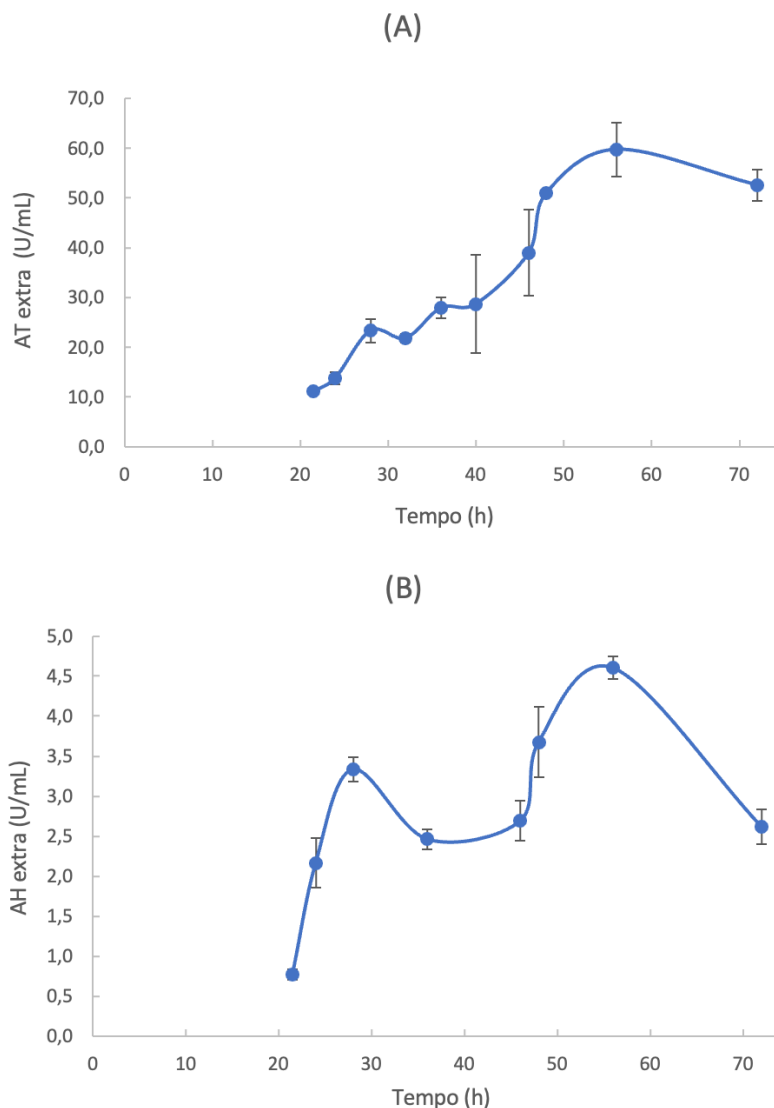
Figura 9 - Perfil das Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada.



Fonte: Autora, 2026.

A FTase produzida durante o processo fermentativo pode estar presente tanto na forma micelial, associada à biomassa fúngica ($AT_{micelial}$), quanto na forma extracelular, sendo secretada para o meio de cultura (AT_{extra}), conforme apresentado na Figura 10. Assim como observado para a atividade micelial, as primeiras 20 horas caracterizaram-se por baixos níveis enzimáticos, o que pode ser atribuído à fase lag e ao início da fase exponencial de crescimento, período no qual a atividade metabólica ainda está predominantemente direcionada à adaptação celular.

Figura 10 - Perfil das Atividades Transfrutoseilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada.



Fonte: Autora, 2026.

Entre 20 e 30 horas, a atividade de transfrutoseilação extracelular (AT_{extra}) atingiu $23,3 \pm 2,4$ U/mL, evidenciando o início da secreção enzimática para o meio de cultivo. Esse comportamento indica que, à medida que a biomassa se desenvolve e a atividade micelial se intensifica, parte da enzima produzida passa a ser secretada para o meio extracelular.

No intervalo de 30 a 50 horas, ambas as atividades apresentaram oscilações, porém mantiveram-se em níveis crescentes, destacando o valor máximo da AT_{extra} com $59,7 \pm 5,4$ U/mL em 56,5 h, concomitantemente ao máximo de atividade hidrolítica extracelular (AH_{extra}) em $4,6 \pm 0,14$ U/mL. Nesse ponto, observa-se também a máxima

produtividade enzimática, ($P_{\text{extra}} = 1,1 \text{ U/mL}\cdot\text{h}$), indicando que a taxa de secreção da enzima atingiu seu ponto mais elevado.

Após 65 horas, ambas as atividades (AT_{extra} e AH_{extra}) apresentaram tendência de redução, possivelmente em função da exaustão do substrato e do acúmulo de glicose no meio. Apesar disso, os valores de FTase permaneceram relativamente estáveis em aproximadamente em $52,5 \pm 3,2 \text{ U/mL}$ até 72 horas.

Assim, o intervalo até 56 horas destaca-se como o mais adequado para a finalização do ensaio quando o objetivo é a utilização da FTase extracelular, enquanto períodos posteriores podem apresentar redução gradativa de sua eficiência catalítica.

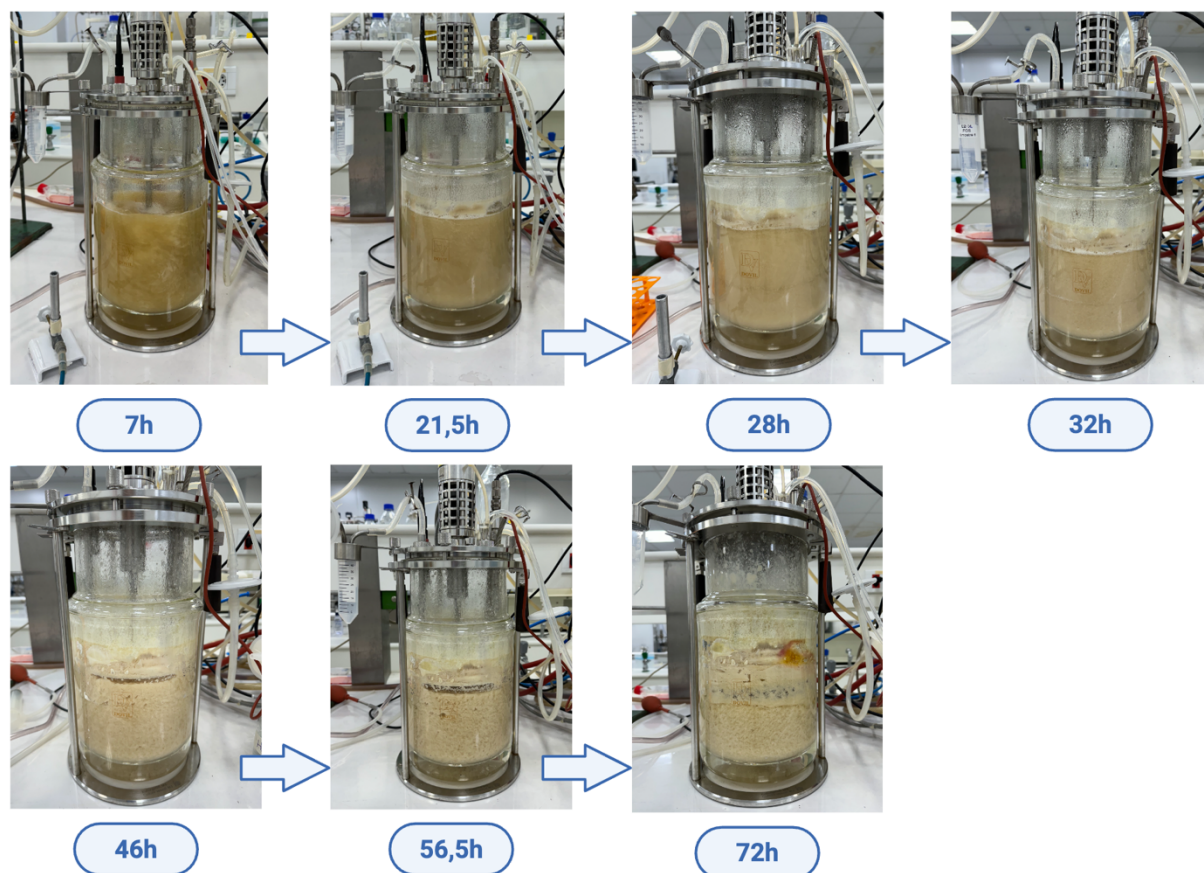
A análise das produtividades totais das enzimas nos pontos de máxima atividade fornece uma visão mais abrangente do desempenho global do processo fermentativo. A FTase micelial apresentou velocidade média de $4080,5 \text{ U/h}$ em 40 horas de cultivo, enquanto a FTase extracelular atingiu $2924,6 \text{ U/h}$ em 56,5 horas. Observa-se que a produtividade máxima da AT_{micelial} além de ser relativamente mais elevada, ocorre em um estágio intermediário do cultivo (40h), enquanto a AT_{extra} atinge seu máximo em um período mais tardio, apenas em 56,5h.

Esse comportamento evidencia diferenças importantes na dinâmica de produção e localização da enzima. Uma vez que, a elevada produtividade enzimática micelial em 40 horas está parcialmente associada à fase exponencial de crescimento, na qual o metabolismo celular se encontra altamente ativo, favorecendo a síntese intracelular de enzimas. Por outro lado, a máxima produtividade extracelular em 56,5 horas sugere que a secreção da FTase para o meio ocorre de forma mais gradual, possivelmente dependente de mecanismos de transporte.

Dessa forma, a definição do tempo ótimo de operação deve considerar não apenas os valores absolutos de atividade, mas também a estratégia de recuperação e aplicação pretendida para a FTase.

A Figura 11 evidencia a evolução morfológica do cultivo ao longo do tempo, representando o crescimento do microrganismo durante as 72 horas de ensaio. Nas primeiras horas de cultivo, até 21,5h nota-se um meio reacional relativamente homogêneo, característico da fase lag e início da germinação dos esporos, em que ainda não há formação significativa de estruturas miceliais.

Figura 11 - Evolução morfológica do cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em biorreator de 5L ao longo de 72 horas de fermentação em modo batelada.



Fonte: Autora, 2026.

A partir de 28 horas, verifica-se o início da formação de agregados miceliais, com aumento progressivo da turbidez do meio. Esse comportamento pode estar associado à fase exponencial de crescimento. Através da transferência de massa, essa mudança morfológica pode impactar negativamente a eficiência de transferência de oxigênio, contribuindo para a redução do oxigênio dissolvido observada nesse período.

Observa-se, visualmente, um aumento da heterogeneidade do meio de cultivo a partir das 40 horas. Esse comportamento pode estar relacionado tanto ao aumento da concentração celular quanto à produção de metabólitos extracelulares, que alteram as propriedades reológicas do meio. Além disso, a formação de estruturas miceliais mais compactas pode introduzir resistências difusionais internas, limitando a transferência de oxigênio, o que pode impactar diretamente no metabolismo celular e, consequentemente, na produção enzimática.

Na fase final do cultivo, após 56 horas, a manutenção de uma biomassa viscosa e heterogênea, associada à possível exaustão de substrato, sugere a entrada na fase estacionária, com redução da atividade metabólica e possíveis alterações na estabilidade enzimática. Essas observações reforçam a importância do controle da morfologia do microrganismo, uma vez que esta influencia diretamente parâmetros críticos, como transferência de oxigênio, viscosidade do meio e produtividade enzimática.

5.2. BATELADA ALIMENTADA EM PULSOS EM REATOR DE 5 L (EB03)

O ensaio em batelada alimentada com estratégia de alimentação em pulsos foi conduzido em biorreator de bancada (Biorreator I), com capacidade nominal de 5,0 L. A determinação do tempo de aplicação dos pulsos foi baseada no acompanhamento da concentração dos açúcares por análise cromatográfica (HPLC) realizadas ao longo do cultivo. Dessa forma, os pulsos foram efetuados quando a concentração de sacarose no meio era próxima ou inferior a 20 g/L, condição adotada para minimizar a limitação do substrato indutor da FTase e restabelecer sua concentração aos níveis iniciais de cultivo.

A Figura 12A apresenta os perfis de crescimento celular e de oxigênio dissolvido (OD) ao longo de 72 horas de cultivo. Nas primeiras 18,5 horas, observa-se uma queda acentuada do OD, atingindo valores próximos de zero, o que evidencia a rápida intensificação do metabolismo celular durante a transição da fase lag para a fase exponencial.

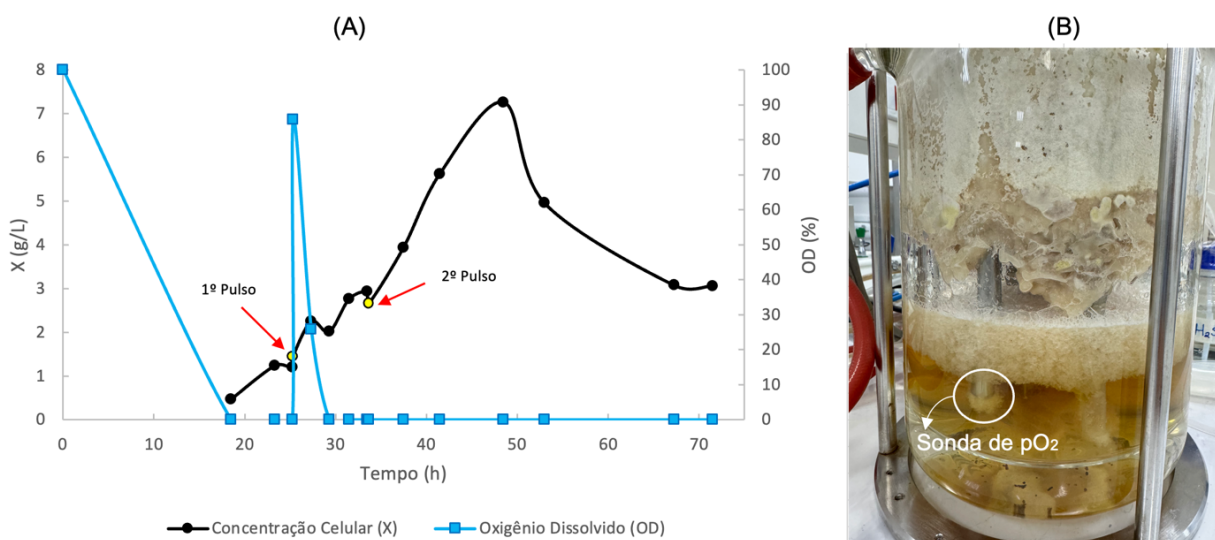
Após o primeiro pulso de alimentação, em 25,3 h de cultivo, observou-se um aumento moderado na concentração celular, de 1,4 g/L para 2,9 g/L, acompanhado por um aumento transitório do OD, seguido de rápida depleção. Esse comportamento sugere uma resposta fisiológica do microrganismo ao súbito aumento da concentração de sacarose. Essa elevação momentânea do OD pode ser interpretada como uma redução temporária do consumo de oxigênio, possivelmente associado ao estresse osmótico imposto pelo meio. Nessas condições, a elevação da pressão osmótica exige que as células redirecionem seu metabolismo para mecanismos de adaptação às novas condições do meio, o que implica menor disponibilidade energética para o crescimento.

Após o segundo pulso de alimentação, realizado em 33,7 h, verificou-se um aumento significativo da biomassa, que atinge o valor máximo de 7,3 g/L em 48,5 h, com produtividade volumétrica máxima de biomassa ($P_{x_{\max}}$) de 0,15 g/L·h. Esse comportamento sugere que, nesse estágio, o microrganismo se encontra metabolicamente adaptado às condições do meio, apresentando maior capacidade de assimilação do substrato e conversão em biomassa. Tal interpretação é confirmada pela análise do incremento da concentração celular logo após os pulsos, em que no 1º pulso $\Delta x_1 = 0,8$ g/L, enquanto no 2º Pulso $\Delta x_2 = 1,3$ g/L, representando de aproximadamente 1,6 vezes na resposta celular após o segundo pulso.

A partir de 50 horas de ensaio, verifica-se uma redução progressiva da concentração celular, possivelmente associada ao acúmulo de metabólitos inibitórios. Esse cenário indica a transição para a fase estacionária seguida de declínio.

Entretanto, as leituras de OD podem ter sido influenciadas pela formação de agregados miceliais aderidos na superfície da sonda de pO_2 (Figura 12B), o que pode ter comprometido as medições no decorrer do ensaio.

Figura 12 - (A) Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 72h de cultivo do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada alimentada em pulso em reator de 5L e (B) Sonda de pO_2 coberta pelo microrganismo no término do ensaio.

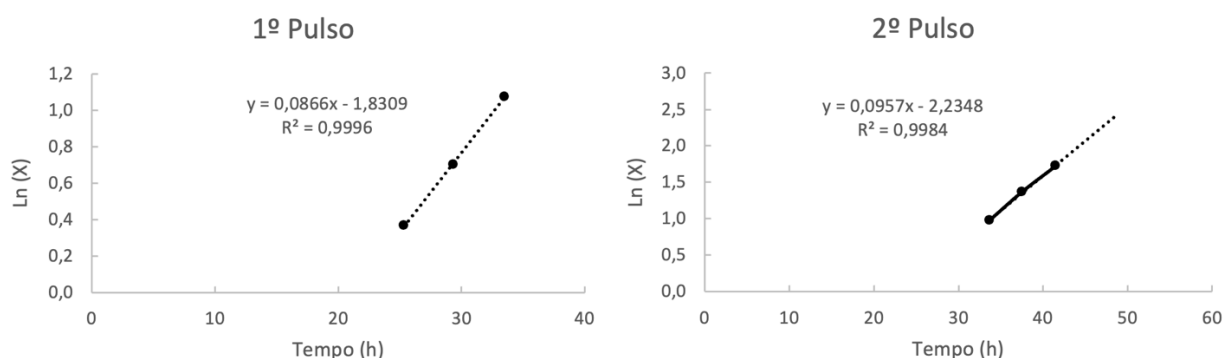


Fonte: Autora, 2026.

A Figura 13 representa a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\max}$) do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301. Foram obtidos os valores de $\mu_{\max 1} = 0,087$ h⁻¹, após o primeiro pulso de alimentação, e $\mu_{\max 2} = 0,096$ h⁻¹ após o

segundo pulso. Os elevados coeficientes de correlação ($R^2 > 0,99$) indicam bom ajuste linear, confirmando que os intervalos selecionados representam adequadamente trechos da fase exponencial de crescimento.

Figura 13 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\max}$) do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada alimentada por pulso em reator de 5L.



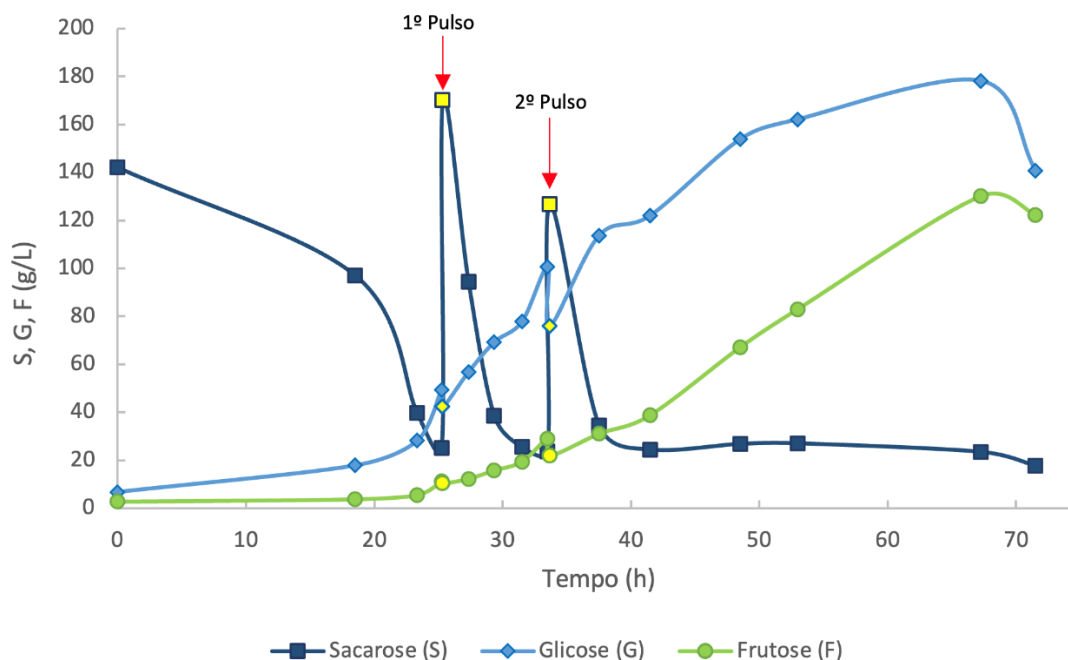
Fonte: Autora, 2026.

Além disso, o aumento de $\mu_{\max 2}$ no segundo pulso indica uma resposta fisiológica mais eficiente do microrganismo ao fornecimento de substrato, evidenciando um estado metabólico mais adaptado às novas condições do meio. Esse comportamento reforça a hipótese observada no perfil de crescimento celular previamente discutido, no qual o incremento de biomassa (Δx_2) foi superior após o segundo pulso.

Ressalta-se que não foi possível determinar a velocidade específica de crescimento no início do cultivo (antes da aplicação dos pulsos), em razão do número insuficiente de pontos experimentais na região correspondente à fase exponencial, o que inviabiliza a obtenção de estimativas confiáveis de $\mu_{\max}$.

A Figura 14 mostra a evolução das concentrações de sacarose, glicose e frutose ao longo do ensaio em batelada alimentada por pulsos. Nas primeiras 25h de cultivo, há um consumo acentuado de sacarose, com uma velocidade inicial de hidrólise de 4,6 g/L·h.

Figura 14 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada alimentada em pulsos.



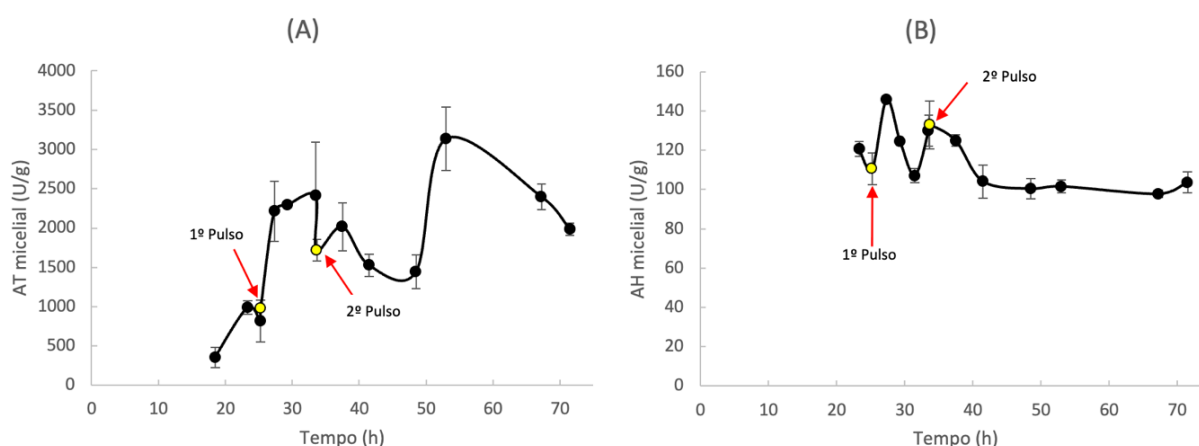
Fonte: Autora, 2026.

A aplicação do primeiro pulso, em 25,3 h, quando a concentração de sacarose se encontrava reduzida, em aproximadamente 20 g/L, promoveu um aumento elevado desse substrato no meio, seguido por conversão em glicose e frutose. A elevada velocidade de hidrólise observada 5 minutos após o pulso (177,21 g/L·h) sugere alta capacidade catalítica do sistema (Figura 15A). No entanto, esse comportamento também pode refletir um regime transiente, no qual a disponibilização de substrato supera momentaneamente a capacidade de assimilação celular e pode ser parcialmente atribuído ao rápido aumento da pressão osmótica decorrente do acréscimo repentino da concentração de sacarose, que impacta a atividade metabólica e redirecionam o fluxo energético para mecanismos de adaptação celular.

Enquanto o segundo pulso, realizado em 33,7 h nas mesmas condições, observa-se um comportamento distinto, caracterizado por maior eficiência na conversão do substrato e maior concentração de frutose. A velocidade de hidrólise ainda mais elevada (245,3 g/L·h), após 10 minutos, sugere não apenas manutenção, mas possível intensificação da atividade enzimática. Esse resultado indica que o microrganismo se encontra metabolicamente adaptado, com maior capacidade de resposta ao fornecimento de substrato.

A Figura 15 apresenta o perfil das Atividades de Transfrutossilação (AT) e Hidrolítica (AH) micelial ao longo do cultivo. Nas primeiras 20 horas de fermentação, ambas as atividades enzimáticas permaneceram em níveis reduzidos, o que é consistente com a fase lag, caracterizada pela germinação dos esporos e adaptação metabólica ao meio.

Figura 15 - Perfil das Atividades Transfrutossilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada alimentada em pulsos.



Fonte: Autora, 2026.

Após o primeiro pulso de alimentação, verifica-se um aumento em ambas as atividades. Contudo, a AT exibiu uma resposta mais relevante à adição de substrato. A atividade média máxima associada ao primeiro pulso foi de 2309,2 U/g e produtividade da enzima micelial ($P_{\text{micelial}(1)}$) é de 84,5 U/g·h e atividade total ($AT_{\text{Total}(1)}$) de 5.189,6 U/L, o que indica que a elevada da concentração de sacarose atua como forte indutor da FTase, direcionando o metabolismo para reações de transfrutossilação. Esse padrão é amplamente reportado na literatura para sistemas com alta disponibilidade de sacarose (Yun, 1996).

O segundo pulso de alimentação induziu um aumento adicional na AT, levando a um máximo de $3137,9 \pm 405,6$ U/g em 53 h de cultivo e $AT_{\text{Total}(2)} = 15.555,2$ U/L. Entretanto, observa-se redução em $P_{\text{micelial}(2)} = 59,2$ U/g.h, o que sugere que, embora a atividade enzimática seja maior, a formação da enzima diminuiu. Esse comportamento pode ser interpretado como a atuação de fatores limitantes intrínsecos ao processo fermentativo, incluindo alterações na morfologia micelial (Figura 18), limitações difusionais decorrentes da formação de pellets e o possível acúmulo de glicose, os quais tendem a reduzir a atividade metabólica nas fases mais avançadas

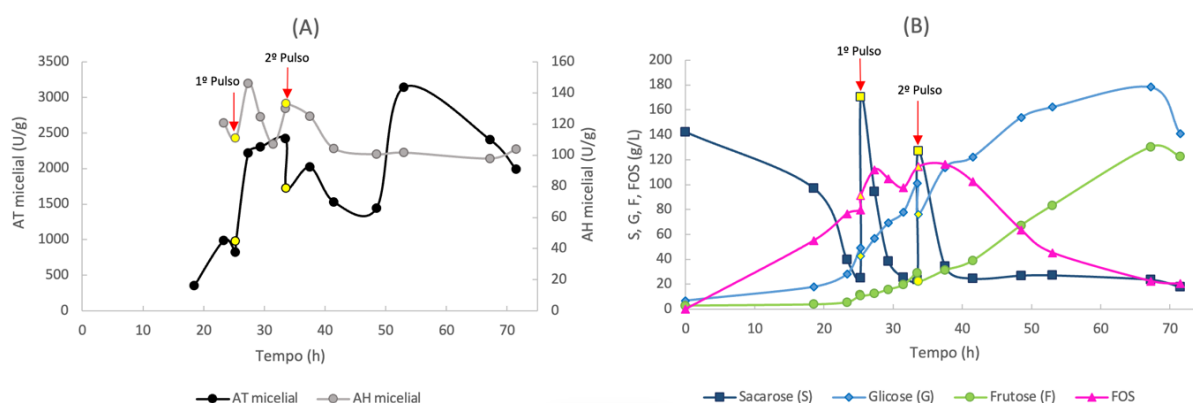
do cultivo. Assim, o aumento da AT parece estar mais associado ao acúmulo de enzima previamente produzida do que a uma intensificação da síntese da enzima.

Entretanto, a AH apresenta variações menos expressivas ao longo do processo, mantendo-se relativamente estável após os pulsos de alimentação (Figura 15B). Essa resposta enzimática diferencial indica que os pulsos de sacarose podem aumentar preferencialmente a atividade de transfrutoseilação em relação à atividade hidrolítica, potencialmente melhorando a relação AT/AH ao longo do processo.

A Figura 16B evidencia esse fenômeno em que sistemas com elevada concentração de sacarose, tende a favorecer reações de transfrutoseilação, com formação de FOS, conforme amplamente descrito na literatura para enzimas do tipo FTase (ROMANO et al., 2016). Nesse contexto, a máxima concentração de FOS foi obtida após o segundo pulso de alimentação, atingindo 116 g/L em 37,5 h de cultivo, o que indica que nesse intervalo as condições do meio (elevada disponibilidade de sacarose) foram favoráveis à transferência de unidades frutoseil.

Entretanto, a partir de 40 h verifica-se a possível hidrólise secundária de FOS previamente formados, evidenciada pelo aumento da concentração de frutose no meio. Esse comportamento pode ter sido influenciado pela redução na concentração de sacarose, uma vez que nesse instante atinge valores próximos de 20 g/L.

Figura 16 - Perfil das Atividades Transfrutoseilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada alimentada em pulsos.

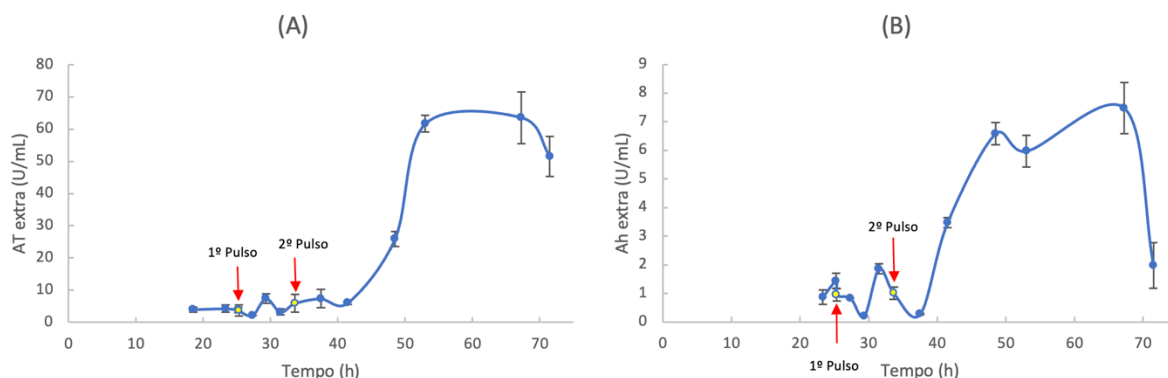


Fonte: Autora, 2026.

A Figura 17 evidencia o perfil das atividades extracelulares de transfrutoseilação (AT) e hidrolítica (AH) ao longo do cultivo em regime de batelada alimentada em pulsos. Observa-se que, até 40 h, ambas as atividades permanecem em níveis relativamente reduzidos e com oscilações após os pulsos de alimentação. Esse

comportamento sugere que, embora a adição de sacarose atue como indutor metabólico, a secreção de FTase para o meio extracelular não é imediata.

Figura 17 - Perfil das Atividades Transfrutossilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 5,0 L em modo batelada alimentada em pulsos.



Fonte: Autora, 2026.

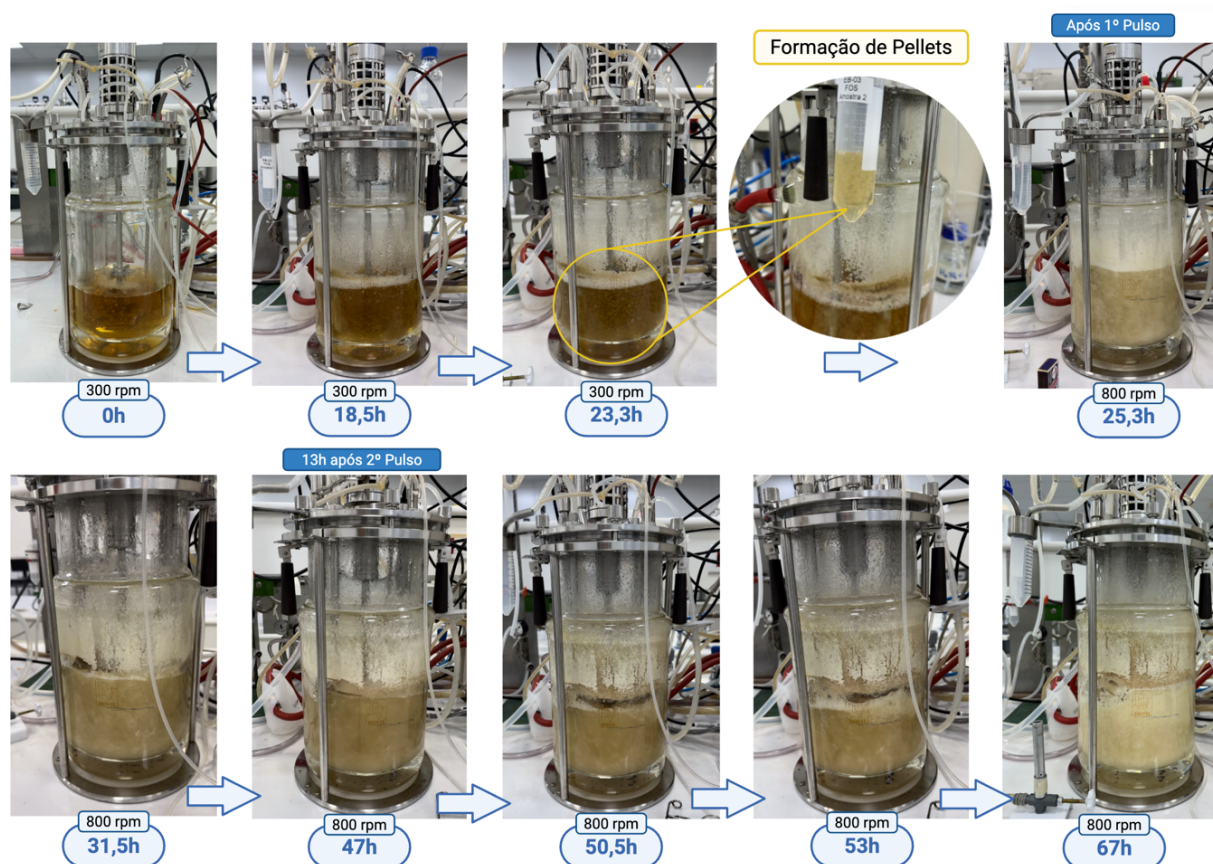
A partir de 53 h, verifica-se um aumento acentuado da AT extracelular (Figura 16A), atingindo atividade média máxima de $62,7 \pm 5,3$ U/mL e nesse ponto, observa-se também a máxima produtividade da enzima, ($P_{\text{extra}} = 1,2$ U/mL·h). Enquanto, a AH_{extra} (Figura 17B) apresenta aumento mais gradual.

Portanto, esses resultados reforçam que estratégias de alimentação para enzima extracelular deve-se considerar não apenas a indução enzimática, mas também o tempo necessário para secreção efetiva da FTase, sendo o intervalo entre 50 e 70 h mais relevante para maximização dessa enzima.

A evolução morfológica do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 ao longo do cultivo, apresentada na Figura 18, evidencia mudanças estruturais diretamente relacionadas às condições do sistema.

Esse ensaio foi conduzido com agitação de 300 rpm até a adição do pulso, pois o meio reacional estava na altura da pá, uma agitação muito elevada faria com que o meio de cultura fosse projetado por toda parte do reator. Portanto, nas primeiras horas de cultivo, até 18,5 h nota-se um meio reacional relativamente homogêneo, característico da fase lag e início da germinação dos esporos, em que ainda não há formação significativa de estruturas miceliais.

Figura 18 - Evolução morfológica do cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em biorreator de 5L ao longo de 72 horas de fermentação em modo batelada alimentada por pulsos.



Fonte: Autora, 2026.

A partir das 23,3 h, verifica-se a formação de pellets, possivelmente devido a reduzida agitação. Após o primeiro pulso de alimentação em 25,3 h de ensaio, concomitante ao aumento da agitação para 800 rpm devido ao aumento do volume do reator com a adição da solução de sacarose, observa-se uma modificação na morfologia dos agregados, com tendência à fragmentação parcial dos pellets e formação de estruturas mais irregulares.

Entre 31,5 h até o fim do ensaio (72h) nota-se um aumento da viscosidade aparente do meio.

5.2.1. Batelada x batelada alimentada em pulsos em reator de 5L (EB02 x EB03)

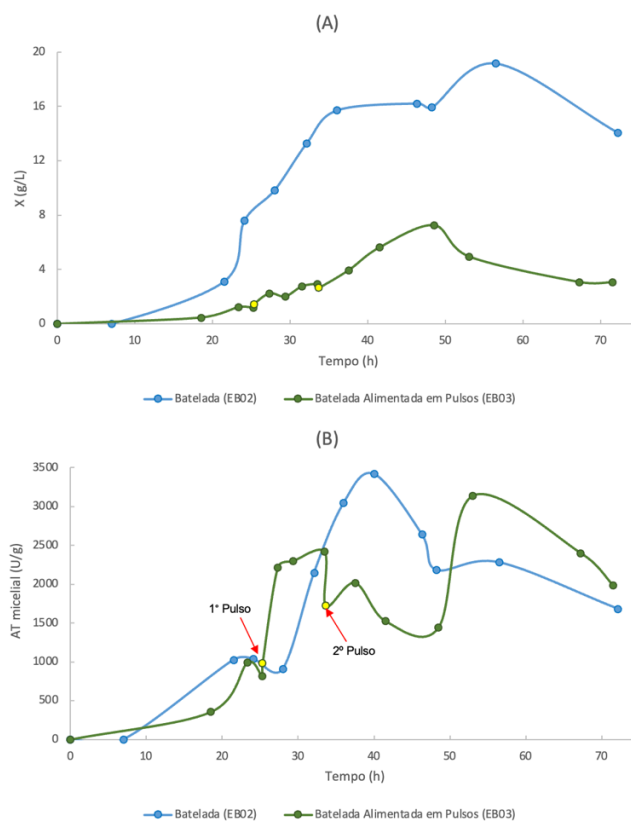
Os ensaios foram conduzidos em um biorreator de bancada de 5,0 L (Biorreator I), operado em condições de batelada e batelada alimentada em pulsos ao longo de 72 h, com o objetivo de otimizar a produção da enzima FTase.

No ensaio de batelada alimentada, foram aplicados dois pulsos de 0,5 L cada de solução de sacarose VHP à 750 g/L, visando restabelecer a concentração inicial de 150 g/L, a fim de prolongar a disponibilidade de substrato e avaliar a resposta metabólica do microrganismo. Os perfis de concentração celular e Atividade de Transfrutossilação micelial (AT) em função do tempo de cultivo em ambos os modos são apresentados na Figura 18.

No ensaio em batelada (Figura 19A), observou-se maior crescimento celular, atingindo uma média de $16,8 \pm 1,5$ g/L em 46,3 h, enquanto no cultivo alimentado por pulsos, a concentração celular máxima foi relativamente inferior, com $X_{\text{máx}} = 7,3$ g/L em 48,5 h. Esse resultado indica que a estratégia de alimentação por pulsos adotada não favoreceu a conversão de substrato em biomassa.

Além disso, conforme descrito na literatura por Hiss (2001), um determinado consumo de substrato, não produzirá sempre um aumento proporcional na quantidade de biomassa. Uma vez que, uma parcela significativa da energia derivada do carbono é utilizada para o metabolismo de manutenção das funções vitais do microrganismo.

Figura 19 - (A) Concentração Celular (X) e (B) Perfil da Atividade Transfrutossilação (AT) micelial em 72h de cultivo do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada e batelada alimentada em pulso em reator de 5 L.



Fonte: Autora, 2026.

Nesse contexto, a elevada concentração de sacarose adicionada nos pulsos pode ter provocado um estresse osmótico significativo, redirecionando o metabolismo celular para mecanismos de adaptação, em detrimento da síntese de biomassa. Esse comportamento está de acordo com descrito em Salinas e Perotti (2009), que relatam que altas concentrações de sacarose atuam como indutoras da produção de frutotransferase, mas não promovem, necessariamente, aumento proporcional da biomassa devido a inibição causada por esse aumento na pressão osmótica.

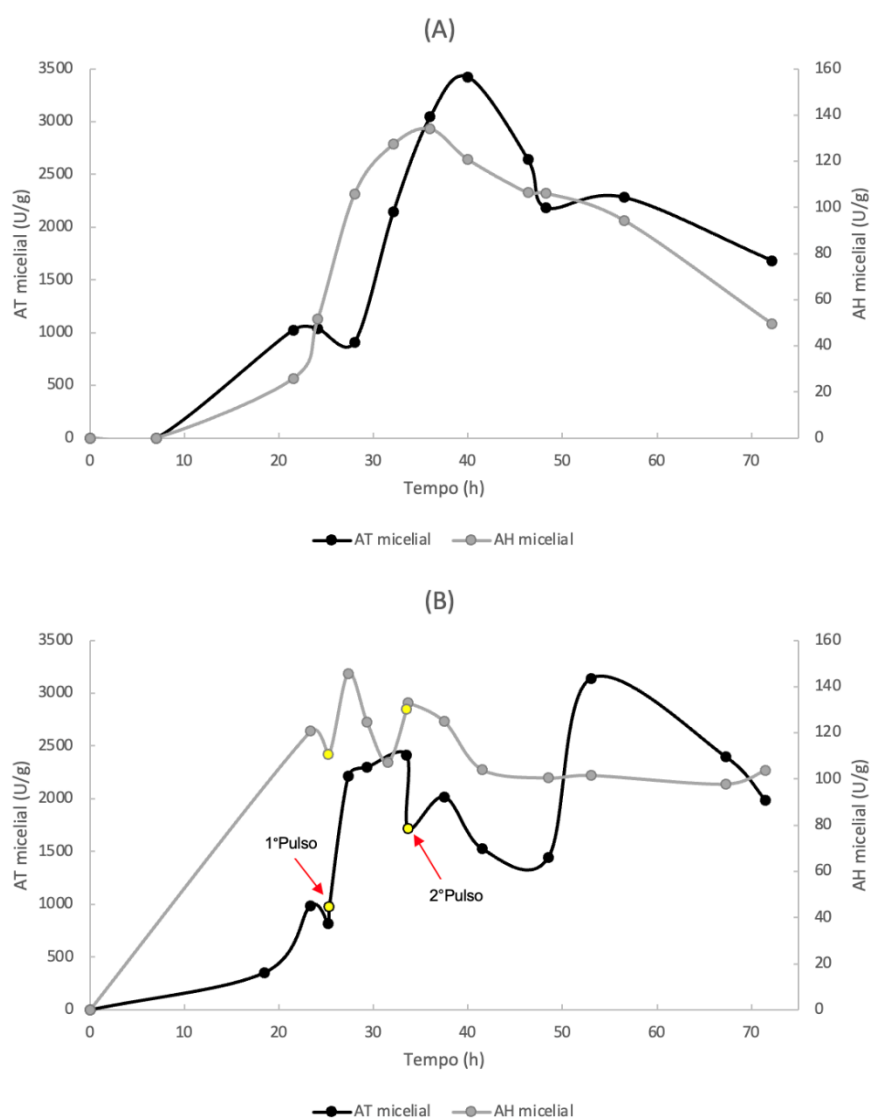
Entretanto, um comportamento distinto foi observado ao analisar o perfil da atividade de transfrutossilação micelial (Figura 19B). No processo em batelada, a atividade micelial máxima atingiu $3418,2 \pm 289,6$ U/g em 40 h, seguida por uma redução gradual, possivelmente relacionada a efeitos de repressão catabólica, alterações morfológicas no micélio ou limitações na transferência de oxigênio. No modo de cultivo em batelada alimentada por pulsos, embora a atividade máxima atingida com o primeiro pulso tenha sido ligeiramente inferior à da batelada, observou-se um aumento acentuado após o segundo pulso, alcançando $3137,9 \pm 405,6$ U/g em 53 h. Este comportamento sugere que os pulsos de sacarose forneceram um estímulo adicional para a síntese de FTase.

Após o primeiro pulso de alimentação, AT atingiu um máximo médio de $2309,2 \pm 367,8$ U/g em 27 h de cultivo, correspondendo a uma produtividade da enzima micelial de 84,5 U/g.h. Este valor é comparável à produtividade máxima observada no cultivo em batelada ($P_{\text{micelial}} = 85,5$ U/g.h), conforme apresentado na Tabela 2. No entanto, observou-se uma diferença relevante quanto ao tempo necessário para atingir esse desempenho: no sistema em batelada, a atividade máxima foi alcançada em 40 h, enquanto no processo de batelada alimentada por pulsos, níveis de produtividade comparáveis foram obtidos 13 horas antes, mas com uma concentração maior de sacarose.

A análise comparativa dos perfis enzimáticos (Figura 20) revela o comportamento da FTase e hidrolítica em resposta ao modo de operação. No cultivo em batelada (Figura 20A), a Atividade de Transfrutossilação (AT) apresentou um aumento progressivo, atingindo um valor máximo de aproximadamente $3418,2 \pm 289,6$ U/g em torno de 40 h de fermentação, seguido por um declínio gradual. Em contrapartida, a atividade hidrolítica (AH) aumentou durante os estágios iniciais do cultivo, atingindo seu valor máximo antes do máximo de AT e, diminuiu de forma constante ao longo do restante do período de fermentação.

Sob condições de batelada alimentada por pulsos (Figura 20B), um comportamento cinético distinto foi observado. Após o primeiro pulso de alimentação, tanto AT quanto AH aumentaram; no entanto, a AT apresentou uma resposta mais relevante à adição de substrato. O segundo pulso de alimentação induziu um aumento adicional em AT, levando a um máximo em 53 h de cultivo, enquanto AH permaneceu relativamente estável. Essa resposta enzimática diferencial indica que os pulsos de sacarose aumentaram preferencialmente a transfrutossilação em relação à atividade hidrolítica, potencialmente melhorando a relação AT/AH ao longo do processo.

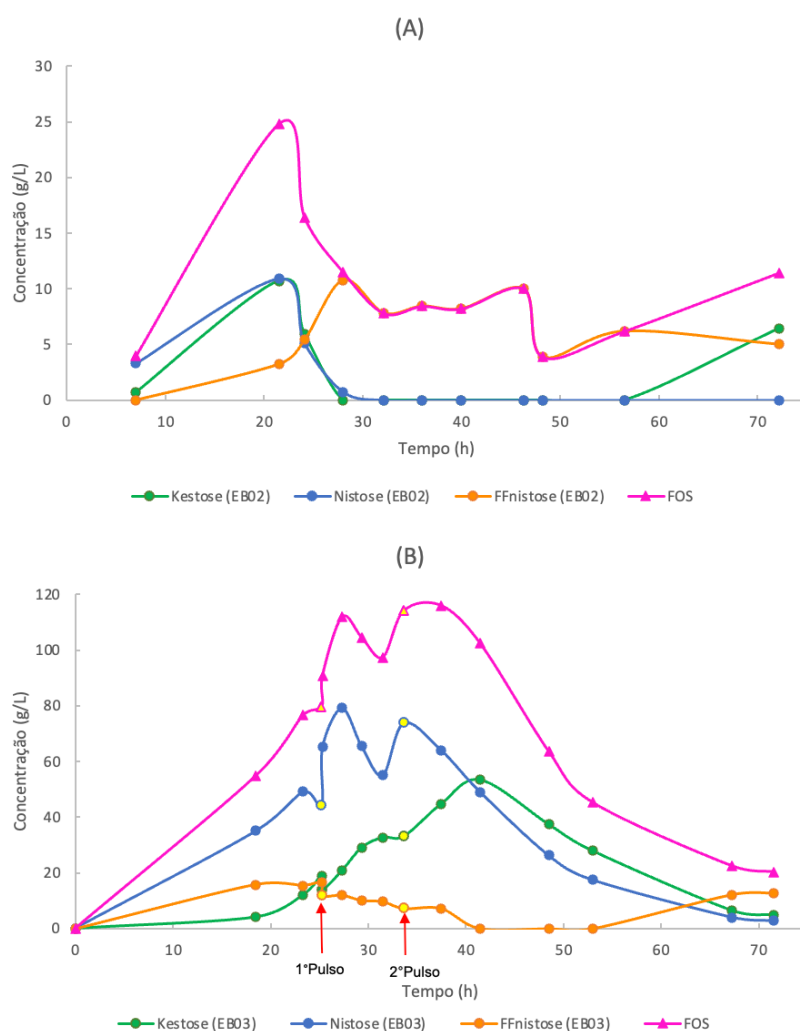
Figura 20 - Atividade de Transfrutossilação micelial (AT) e Atividade Hidrolítica micelial (AH) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 5 L



Fonte: Autora, 2026.

A Figura 21 apresenta o perfil de síntese de FOS em cada modo de operação do biorreator. Na Figura 21A, o cultivo em batelada mostrou algumas limitações inerentes à exaustão precoce do substrato, atingindo uma produção máxima de FOS de 24,8 g/L em 21,5 h. Enquanto, a implementação da estratégia de batelada alimentada por pulsos (Figura 21B) atingiu aproximadamente 116 g/L em 37,5 h, poucas horas após o segundo pulso. Esse incremento representa 4,6 vezes maior que o máximo atingido na batelada.

Figura 21 - Perfil de síntese de Frutooligossacarídeos (FOS) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 5 L



Fonte: Autora, 2026.

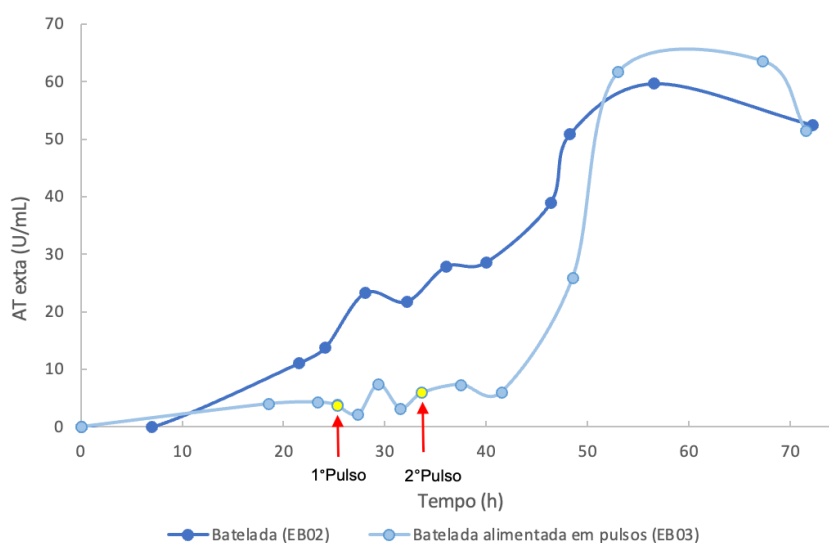
A comparação do perfil de atividade extracelular de FTase entre os modos de batelada (EB02) e batelada alimentada em pulsos (EB03) está representada pela Figura 22, em que é possível observar algumas divergências entre os dois modos de operação.

No cultivo em batelada, a atividade de transfrutossilação extracelular (AT_{extra}) apresentou aumento gradual ao longo do tempo, evidenciando um perfil contínuo de secreção da FTase para o meio de cultivo. Em contrapartida, na estratégia de batelada alimentada por pulsos, esse perfil não foi observado. Após cada alimentação, a atividade extracelular manteve-se em níveis reduzidos, aumentando apenas posteriormente. Esse intervalo pode estar relacionado à necessidade de adaptação do microrganismo às novas condições do meio, bem como ao tempo requerido para a biossíntese, processamento intracelular e posterior secreção da FTase.

Após 45h de ensaio, observa-se um aumento da AT_{extra} no EB03, atingindo valores superiores aos da batelada. Esse comportamento sugere uma mudança de regime metabólico, em que o microrganismo passa a direcionar mais intensamente seu metabolismo para a produção e secreção de FTase. Esse fenômeno pode ser explicado pela manutenção de alta concentração de sacarose no meio, favorecendo a indução contínua da FTase, conforme amplamente descrito na literatura para sistemas produtores de FOS.

Em comparação as produtividades enzimáticas no período de máxima atividade de ambos os modos de operação foram muito semelhantes, sendo $P_{extra} = 1,1 \text{ U/mL.h}$ para a batelada e $1,2 \text{ U/mL.h}$ para batelada alimentada em pulsos.

Figura 22 - Atividade de Transfrutossilação extracelular (AT) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 5 L



Fonte: Autora, 2026.

A Tabela 2 sintetiza os principais parâmetros de produção de ambos os modos operacionais. O cultivo em batelada resultou em uma máxima concentração celular de

16,8 g/L, sendo relativamente maior em comparação com o modo de alimentação em pulsos (7,3 g/L), indicando maior acúmulo de biomassa. Enquanto, a atividade micelial máxima ($AT_{micelial\ máx}$) também foi superior no cultivo em batelada ($3418,2 \pm 289,6$ U/g) do que na batelada alimentada em pulsos ($3137,9 \pm 405,6$ U/g). Consequentemente, a produtividade máxima da enzima ($P_{micelial}$) foi maior no processo em batelada, sofrendo uma queda de aproximadamente 30,7% no modo em pulso (85,45 U/g·h versus 59,20 U/g·h).

No processo em batelada alimentada, após o primeiro pulso, a razão AT/AH foi de 17,30, valor inferior ao obtido no cultivo em batelada. Esse resultado sugere que o aumento da concentração de sacarose não se traduz imediatamente em maior eficiência de transfrutossilação, possivelmente devido ao período de adaptação fisiológica do microrganismo e ao tempo necessário para indução, síntese e secreção da FTase.

Após o segundo pulso, a razão AT/AH aumentou significativamente para 30,89, superando os valores observados em batelada. Esse aumento decorreu principalmente da elevação expressiva da atividade de transfrutossilação ($3137,9 \pm 405,6$ U/g), concomitante à redução da atividade hidrolítica (101,56 U/g), evidenciando à atividade de transfrutossilação.

Tabela 2 - Parâmetros de produção enzimática de FTase em batelada (EB02) e batelada alimentada em pulsos (EB03) em reator de 5 L, incluindo concentração celular máxima ($X_{máx}$), tempo para atingir a concentração celular máxima ($t_{Xmáx}$), atividade máxima de transfrutossilação micelial ($AT_{micelial\ máx}$), tempo para atingir a atividade máxima de transfrutossilação micelial ($t_{ATmicelial\ máx}$), atividade hidrolítica micelial ($AH_{micelial}$), a razão entre as atividades de transfrutossilação e hidrolítica (AT/AH), produtividade da enzima micelial ($P_{micelial}$) e Atividade Total micelial (AT_{TOTAL}).

Ensaio	$X_{máx}$ (g/L)	$t_{Xmáx}$ (h)	$AT_{micelial\ máx}$ (U/g)	$t_{ATmicelial\ máx}$ (h)	$AH_{micelial}$ (U/g)	AT/AH	$P_{micelial}$ (U/g.h)	AT_{TOTAL} (U/L)
Batelada (EB02)	16,8	46,3	$3418,2 \pm 289,6$	40	120,7	28,3	85,5	57422
1º Pulso - Batelada Alimentada (EB03)	2,9	33,5	$2309,2 \pm 367,8$	27	133,4	17,3	84,5	5189
2º Pulso - Batelada Alimentada (EB03)	7,3	48,5	$3137,9 \pm 405,6$	59	101,6	30,9	59,2	15555

Fonte: Autora, 2026.

Sob a perspectiva cinética e operacional, o modo de batelada alimentada em pulsos apresenta uma vantagem estratégica, ou seja, a capacidade de atingir níveis elevados de atividade enzimática em menor tempo de processo, cerca de 27 h. Essa antecipação do pico de atividade enzimática implica redução do tempo necessário para alcançar produtividades comparáveis às da batelada convencional, o que é

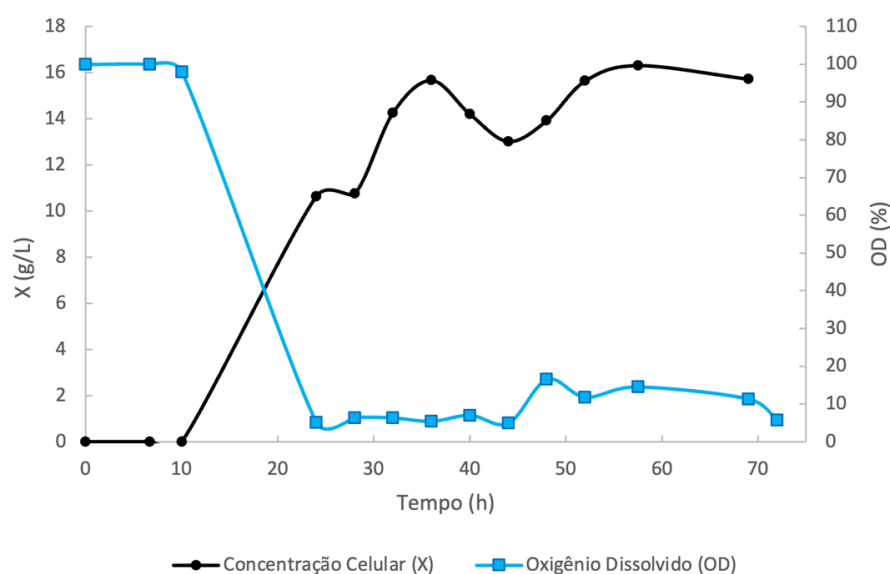
altamente relevante em escala industrial. A diminuição do tempo de ciclo permite aumentar o número de bateladas processadas em um mesmo intervalo operacional, elevando a produtividade volumétrica global do sistema.

Portanto, embora o cultivo em batelada apresente valores máximos absolutos superiores de biomassa e atividade enzimática, a batelada alimentada em pulsos demonstra maior eficiência temporal na indução e expressão da FTase. Esse resultado reforça o papel da estratégia de alimentação como ferramenta de intensificação de processos, capaz de modular não apenas a disponibilidade de substrato, mas também o direcionamento metabólico e o desempenho catalítico do sistema.

5.3. BATELADA EM REATOR DE 15 L (EB04)

O ensaio foi conduzido em modo batelada no Biorreator II, com capacidade nominal de 15,0 L. A Figura 23 apresenta o perfil de crescimento celular ao longo de 72 h de cultivo, em que pode-se apontar a presença de uma fase exponencial, através da Figura 24, bem definida, seguida por uma etapa de desaceleração do crescimento e posterior declínio da biomassa. Esse padrão reflete a dinâmica típica do processo fermentativo, na qual a progressiva limitação de nutrientes e/ou oxigênio, associada ao acúmulo de metabólitos, conduz à redução da atividade metabólica e à transição para a fase estacionária.

Figura 23 - Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 72h de cultivo do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada em reator de 15 L.



Fonte: Autora, 2026.

Nas primeiras horas de processo, o oxigênio dissolvido (OD) permanece em níveis elevados, indicando baixa atividade respiratória, compatível com a fase lag e início da germinação dos esporos. A partir das 10 h, ocorre uma queda acentuada do OD, atingindo valores próximos de zero. Esse comportamento é indicativo de elevada demanda metabólica por oxigênio, na qual a velocidade de consumo de oxigênio pelas células supera a taxa de transferência do sistema (kLa) (Maiorano et al., 2020).

Apesar dessa limitação aparente de oxigênio, verifica-se que a biomassa continua a aumentar de forma significativa, atingindo uma concentração celular máxima de 15,7 g/L em 36 h, a partir desse momento é possível observar um aumento parcial do OD, assim como descrito na literatura em Maiorano *et al.* (2020). Esse comportamento pode ser interpretado como resultado da redução da velocidade específica de crescimento, associada à diminuição da disponibilidade de substrato (Figura 25) e possivelmente ao acúmulo de metabólitos inibitórios.

A estabilização ou leve declínio da concentração de biomassa, associada a níveis moderados de OD, caracteriza a transição para a fase estacionária e declínio, na qual a atividade metabólica é reduzida. Essa fase é marcada pela exaustão de nutrientes essenciais, o que reforça a necessidade de estratégias de alimentação para prolongar a fase produtiva.

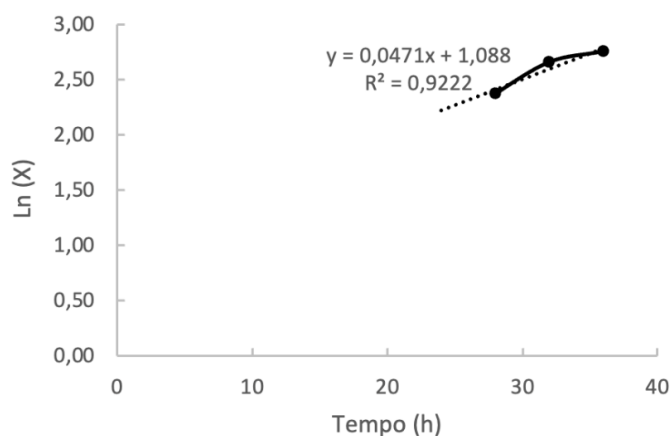
Dessa forma, a máxima produtividade em células obtida foi de $P_{x_{\text{máx}}} = 0,44 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ em 36 h de cultivo. Esse valor supera o reportado por Maiorano *et al.* (2020), que observou produtividade de $0,25 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ sob as mesmas condições operacionais, representando um aumento de aproximadamente 1,8 vezes.

A Figura 24 apresenta a determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301, em que foi obtido um valor de $\mu_{\text{máx}} = 0,047 \text{ h}^{-1}$, esse parâmetro reflete a capacidade do microrganismo em converter substrato em biomassa nas condições experimentais avaliadas. O coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9222$), embora inferior ao idealmente esperado para crescimento exponencial bem definido, ainda indica ajuste satisfatório, sugerindo que o intervalo selecionado representa parcialmente a fase exponencial. Ressalta-se ainda, que essa determinação foi realizada sem réplicas experimentais, o que pode ter contribuído para uma maior variabilidade dos dados e, consequentemente, influenciado o coeficiente de correlação obtido.

O ensaio foi realizado sem réplicas experimentais, de modo que eventuais variações inerentes ao processo fermentativo e às determinações analíticas podem

ter influenciado o ajuste do modelo. A realização de experimentos em replicata tende a reduzir a variabilidade experimental e aumentar a confiabilidade dos parâmetros cinéticos estimados.

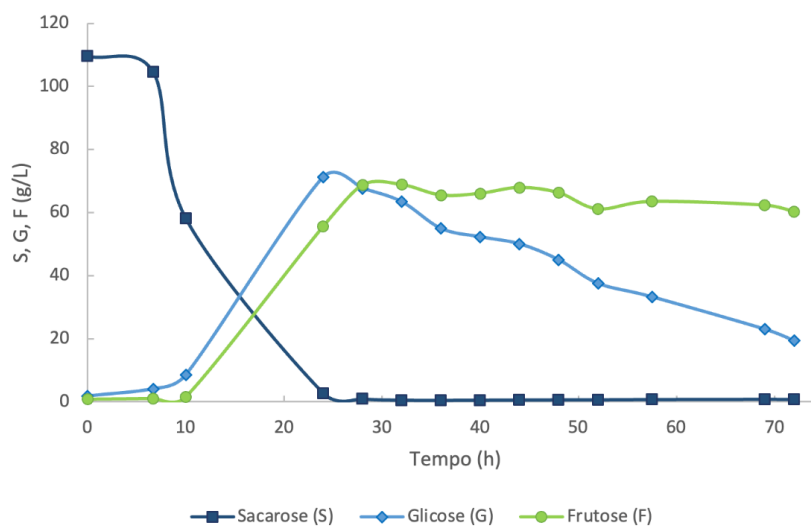
Figura 24 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada em reator de 15 L.



Fonte: Autora, 2026.

A Figura 25 apresenta o perfil de açúcares ao longo do experimento. A rápida redução da concentração de sacarose nas primeiras 20 horas indica rápida hidrólise de sacarose sendo completamente esgotada em 24h, o que resultou em uma velocidade de hidrólise de 4,5 g/L·h, quando ocorre uma mudança significativa na dinâmica do sistema.

Figura 25 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada.



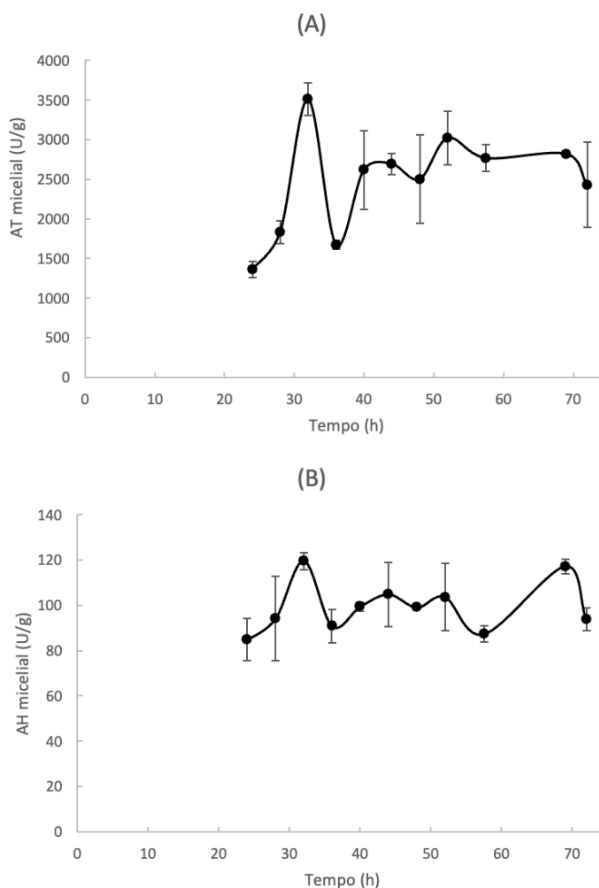
Fonte: Autora, 2026.

Esse comportamento inicial está diretamente associado à atividade hidrolítica da enzima, responsável pela clivagem da sacarose em glicose e frutose. Como consequência, observa-se um aumento acentuado na concentração desses monossacarídeos entre 10 e 25 horas.

A concentração de glicose atinge um máximo 71,2 g/L em 24h e passa a ser consumida de forma progressiva, enquanto a frutose permanece em níveis relativamente elevados e mais estáveis por um intervalo de tempo mais prolongado. Esse comportamento diferencial está relacionado a preferência metabólica do microrganismo pela glicose. Nessas condições, a glicose é rapidamente assimilada como fonte de carbono, à medida que a frutose é metabolizada de forma mais lenta.

A Figura 26 apresenta a evolução das AT e AH associadas ao micélio ao longo do cultivo. Observa-se que, nas primeiras 20 horas de fermentação, ambas as atividades enzimáticas permaneceram em níveis mais baixos, o que é compatível com cerca de 10 h de fase lag.

Figura 26 - Perfil das Atividades Transfrutossilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada.



Fonte: Autora, 2026.

A partir de 28 horas ocorreu um aumento expressivo da AT e em 32h foi atingido o valor máximo de $3514,2 \pm 205,5$ U/g (Figura 25A), com produtividade específica da enzima micelial ($P_{micelial}$) de 109,8 U/g·h. Esse comportamento sugere que, nesse intervalo, o metabolismo microbiano esteve direcionado à síntese enzimática voltada a transfrutoseilação. Além disso, a AT_{Total} atingiu 50123,1 U/L, valor aproximadamente 2,2 vezes superior ao reportado por Maiorano *et al.*, 2020, evidenciando maior eficiência do sistema sob as condições operacionais adotadas.

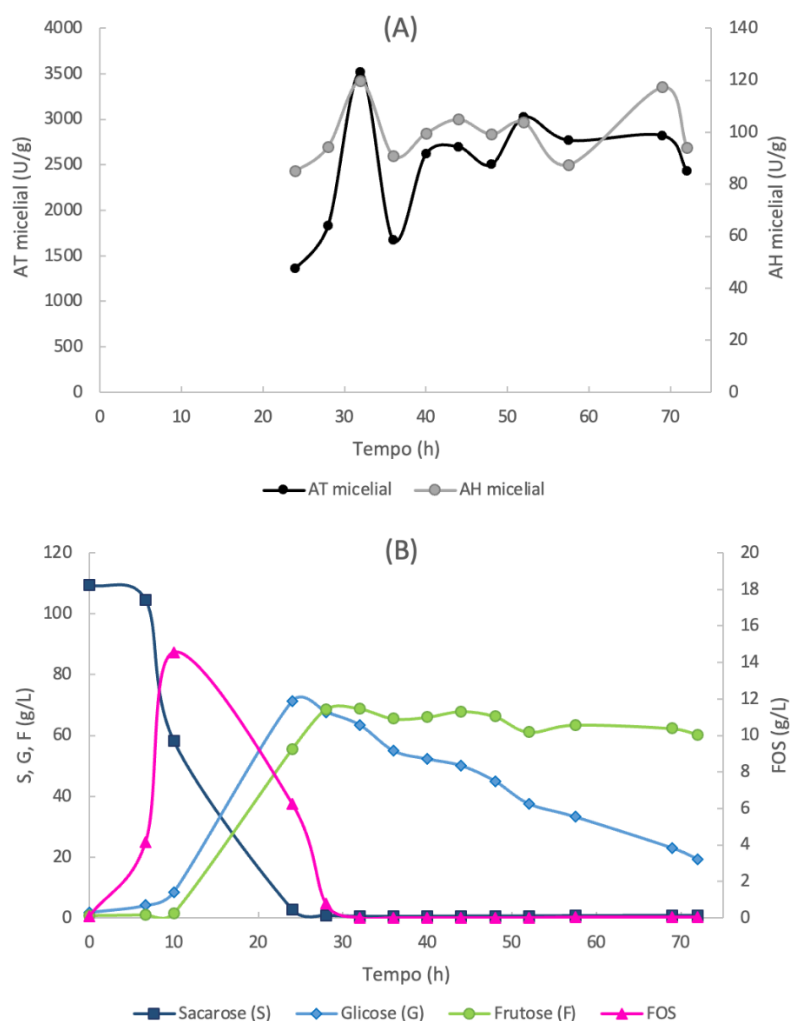
De forma análoga, a atividade hidrolítica (AH) também teve um aumento a partir de 28h, com valor máximo de $119,6 \pm 3,7$ U/g em 32 horas (Figura 25B). Essa relação $AT/AH = 29,4$ é determinante para a eficiência do processo, uma vez que favorece a síntese de FOS.

Ao longo do restante do ensaio, a AT manteve-se em níveis elevados, com valores médios entre 2400 e 3000 U/g, enquanto a AH permaneceu relativamente estável, com variações entre 90 e 115 U/g.

A Figura 27 apresenta a dinâmica enzimática de AT e AH micelial (A) e a conversão de sacarose em glicose, frutose e FOS (B). Nesse contexto, a formação de FOS apresenta um perfil típico, em que há um aumento acentuado na concentração de FOS logo nas primeiras 20 horas, seguido por sua hidrólise em 30 h. Esse comportamento indica que, após a redução da sacarose ocorre predominância de reações secundárias de hidrólise dos FOS previamente formados, convertendo-os novamente em monossacarídeos. Esse comportamento favorece o acúmulo progressivo de frutose e a redução de glicose ao longo do tempo reforçam a ideia de consumo preferencial de glicose.

Dessa forma, a máxima concentração de FOS obtida foi de 14,5 g/L, o que indica que nesse intervalo a elevada disponibilidade de sacarose foi favorável à transferência de unidades frutossil.

Figura 27 - Perfil das Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada.

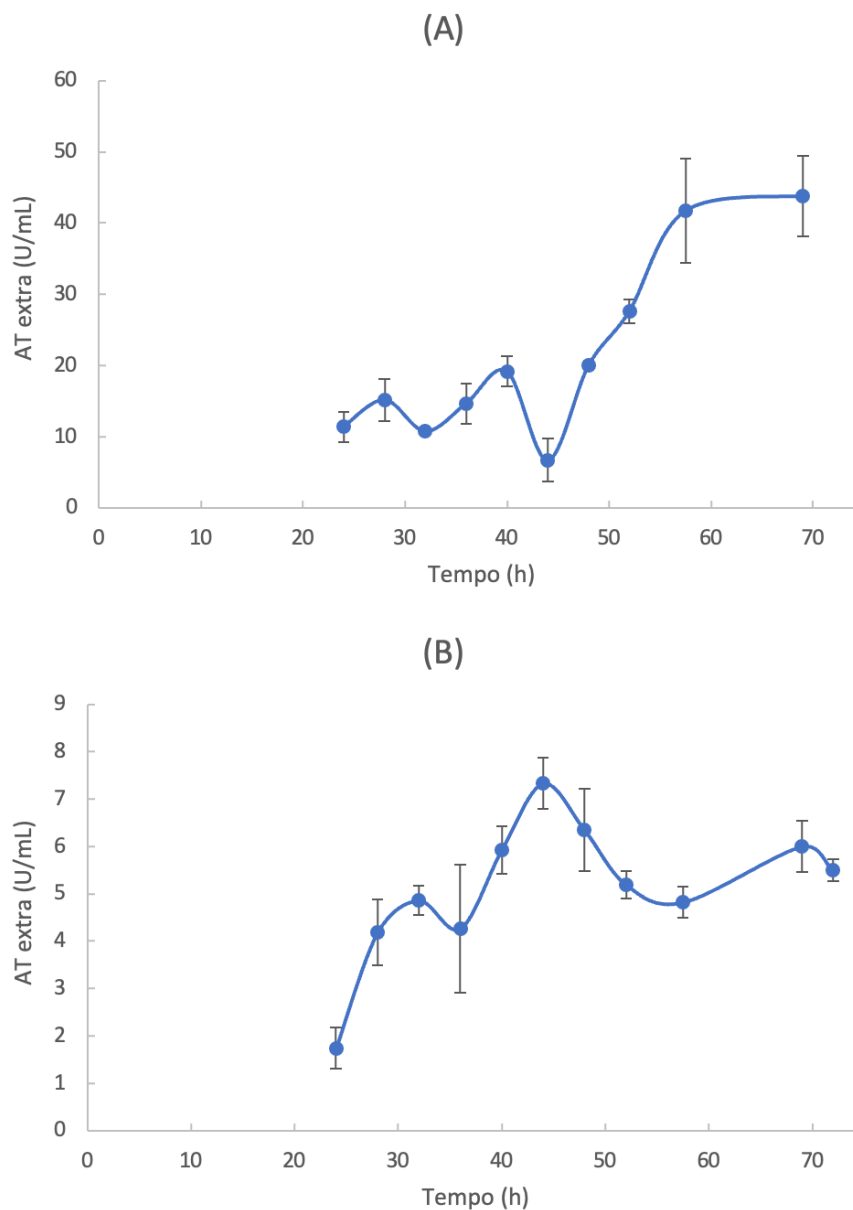


Fonte: Autora, 2026.

A Figura 28 evidencia o perfil das atividades de transfrutossilação extracelulares (AT_{extra}) e hidrolítica (AH_{extra}) ao longo do cultivo de 72h em regime de batelada. Verifica-se na Figura 27A que a AT_{extra} apresenta um período inicial de baixa atividade, seguido por um aumento progressivo a partir de 48 h, atingindo um valor médio máximo de $42,8 \pm 6,5$ U/mL em 57,5 h. Esse comportamento sugere que a secreção da FTase extracelular é gradual, estando provavelmente associada a estágios mais avançados do crescimento, quando o microrganismo já se encontra metabolicamente adaptado. Nesse ponto, a máxima produtividade da enzima foi de $P_{extra} = 0,74$ U/mL·h.

Por outro lado, o perfil da AH_{extra} (Figura 27B) revela um aumento significativo já a partir de 24 h de cultivo, atingindo seu máximo com $7,3 \pm 0,5$ U/mL em 44 h, seguido de leve declínio e estabilização.

Figura 28 - Perfil das Atividades Transfrutoseilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 72h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada.



Fonte: Autora, 2026.

5.3.1. Batelada em reator de 5L x 15 L (EB02 X EB04)

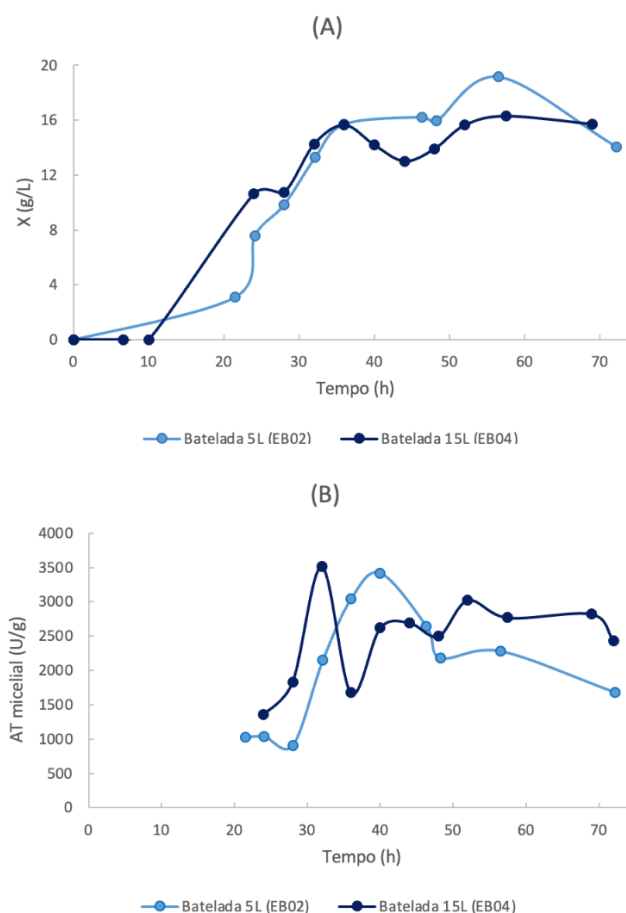
Os ensaios foram conduzidos em um biorreator de bancada de 5,0 L (Biorreator I) e 15 L (Biorreator II) ambos operados em modo batelada ao longo de 72 h, com o objetivo de servir de base comparativa com as estratégias de alimentação adotada.

No que se refere ao crescimento celular (Figura 29A), observa-se que o cultivo conduzido no biorreator de 15 L atingiu a concentração celular máxima em um menor intervalo de tempo quando comparado ao sistema de 5 L, o que pode indicar uma

cinética inicial de crescimento mais rápida. Entretanto, esse comportamento pode estar associado às diferenças hidrodinâmicas decorrentes do aumento de escala e das características construtivas de cada biorreator, que influenciam a mistura, a transferência de oxigênio e, conseqüentemente, o crescimento celular do microrganismo.

Apesar dessa diferença na velocidade de crescimento, ambos os sistemas apresentaram perfis cinéticos semelhantes e concentrações celulares da mesma ordem de grandeza, indicando desempenho global equivalente quanto ao desenvolvimento da biomassa. De maneira análoga, ao analisar a atividade de transfrutoseilação micelial (Figura 29B), observa-se que o cultivo em 15 L também atingiu seu valor máximo em menor tempo quando comparado ao sistema de 5 L. Contudo, as atividades máximas obtidas foram semelhantes, reforçando que o aumento de escala não comprometeu a capacidade de produção de FTase.

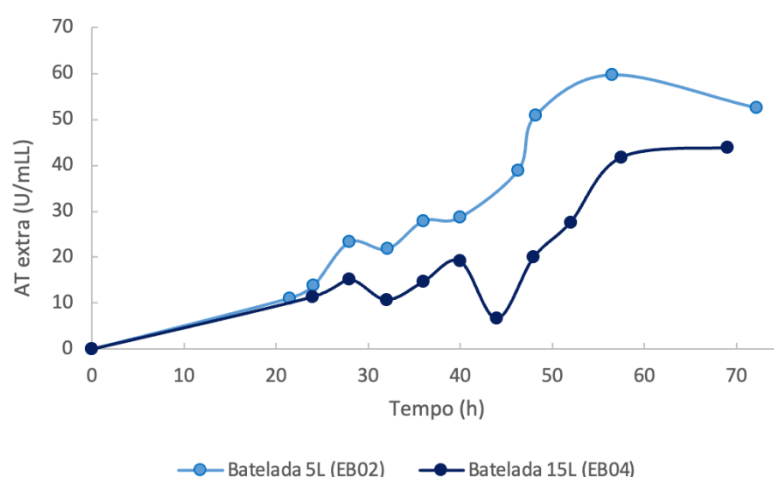
Figura 29 - (A) Concentração Celular (X) e (B) Perfil da Atividade Transfrutoseilação (AT) micelial em 72h de cultivo do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada em reator de 5,0 L e 15 L.



Fonte: Autora, 2026.

A comparação da evolução da atividade de transfrutoseilação extracelular entre os modos batelada de 5 e 15 L está representada pela Figura 30, em que é possível observar praticamente o mesmo comportamento, porém em quantidades reduzidas após o aumento de escala. Em termos de produtividade enzimática a batelada de 5 L teve $P_{extra} (EB02) = 1,1 \text{ U/mL.h}$, enquanto a batelada de 15 L alcançou $0,74 \text{ U/mL.h}$

Figura 30 - Atividade de Transfrutoseilação extracelular (AT_{extra}) em modo batelada em reator de 5 e 15L em função do tempo de fermentação.



Fonte: Autora, 2026.

A Tabela 3 apresenta os parâmetros cinéticos entre os cultivos realizados em biorreatores de 5 L e 15 L, evidenciando a robustez do processo de produção de FTase por *A. oryzae* IPT-301 sob condições de escalonamento. A manutenção de níveis similares de biomassa máxima ($X_{m\acute{a}x}$ próximo de 16 g/L) e de $AT_{micelial}$ em torno de 3500 U/g, o que indica que as condições de transferência de massa e calor foram preservadas satisfatoriamente durante a transição de escala.

Tabela 3 - Parâmetros de produção enzimática de FTase em batelada em biorreator de 5,0 L (EB02) e 15 L (EB04), incluindo concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$), tempo para atingir a concentração celular máxima ($t_{X_{m\acute{a}x}}$), Produtividade celular máxima ($P_{X_{m\acute{a}x}}$), Atividade de Transfrutoseilação micelial máxima ($AT_{micelial \acute{m}ax}$), tempo para atingir a atividade máxima de transfrutoseilação micelial ($t_{AT_{micelial \acute{m}ax}}$), atividade hidrolítica micelial ($AH_{micelial}$), a razão entre as atividades de transfrutoseilação e hidrolítica (AT/AH), produtividade da enzima micelial ($P_{micelial}$) e Atividade Total micelial (AT_{TOTAL}).

Ensaio	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$t_{X_{m\acute{a}x}}$ (h)	$P_{X_{m\acute{a}x}}$ (g/L.h)	$AT_{micelial \acute{m}ax}$ (U/g)	$t_{AT_{micelial \acute{m}ax}}$ (h)	$AH_{micelial}$ (U/g)	AT/AH	$P_{micelial}$ (U/g.h)	AT_{TOTAL} (U/L)
Batelada 5L (EB02)	16,8	46,3	0,36	$3418 \pm 289,6$	40	120,7	28,3	85,5	57422
Batelada 15L (EB04)	15,7	36	0,44	$3514 \pm 205,5$	32	119,6	29,4	109,8	50123

Fonte: Autora, 2026.

Embora as concentrações finais de biomassa tenham sido equivalentes, observa-se uma maior velocidade de crescimento no reator de 15 L, que atingiu $X_{\text{máx}}$ em 36 h, enquanto o reator de 5 L levou 46,3 h para atingir seu máximo. Este decréscimo de aproximadamente 22% no tempo de cultivo resultou em uma elevação da produtividade celular máxima ($P_{x_{\text{máx}}}$) de 0,36 para 0,44 g/L.

A estabilidade dos valores de atividade de transfrutossilação (AT) e hidrolítica (AH), bem como a manutenção da razão AT/AH (entre 28 e 29), demonstra que a seletividade enzimática não foi afetada pelas alterações nas dimensões do equipamento. Além disso, produtividade enzima micelial (P_{micelial}) foi de 85,5 U/g.h para 109,8 U/g.h no reator de maior volume.

Ao analisar a atividade total micelial, observa-se que o reator de 5 L atingiu 57.422 U/L, enquanto o reator de 15 L foi ligeiramente inferior, de 50.123 U/L, representando uma redução de aproximadamente 12,7%. Considerando a natureza biológica do processo, as diferenças estruturais e hidrodinâmicas entre os biorreatores, essa variação é relativamente pequena e compatível com a variabilidade experimental esperada para esse tipo de cultivo.

Portanto, os resultados indicam que os ensaios podem ser considerados equivalentes quanto ao desempenho da produção de FTase, evidenciando boa reprodutibilidade do processo mesmo após a ampliação de escala.

5.4. BATELADA ALIMENTADA EM PULSOS EM REATOR DE 15 L (EB05)

O ensaio em batelada alimentada com estratégia de alimentação em pulsos foi conduzido em biorreator com capacidade nominal de 15 L (Biorreator II). Contudo, uma falha no fornecimento de energia elétrica implicou a interrupção do cultivo em 48,8 h, antes do tempo previsto de 72 h. Essa descontinuidade operacional não deve ser tratada apenas como uma limitação experimental, mas também como um fator com impacto direto sobre a interpretação cinética do processo.

A Figura 31 apresenta os perfis de crescimento celular e de oxigênio dissolvido (OD) ao longo do cultivo. Nas primeiras 20 horas, observa-se uma queda acentuada do OD, atingindo valores próximos de zero, o que evidencia a rápida intensificação do metabolismo celular durante a transição da fase lag para a fase exponencial.

O primeiro pulso de alimentação foi realizado em em 28,3 h de ensaio, quando observou-se um aumento significativo na concentração celular, de 1,2 g/L para 6,0

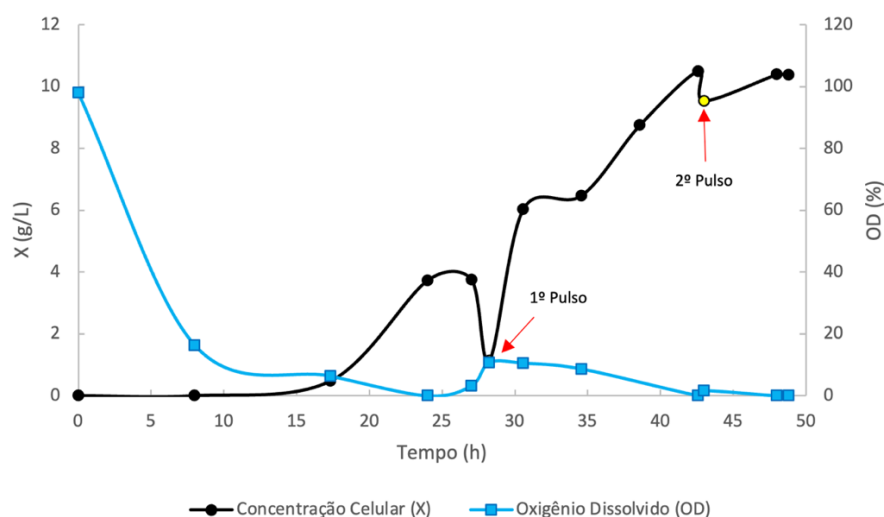
g/L, acompanhado por um aumento transitório do OD. Esse comportamento sugere uma resposta fisiológica do microrganismo ao aumento repentino da concentração de sacarose no meio de cultivo. Essa elevação momentânea do OD pode ser interpretada como uma redução temporária do consumo de oxigênio, possivelmente associado ao estresse osmótico imposto pelo meio.

O segundo pulso de alimentação, efetuado em 43 h, ocorre em um estágio no qual a biomassa já se encontrava elevada e metabolicamente ativa. Dessa forma, verificou-se um aumento moderado, de 9,5 g/L para o valor máximo de 10,4 g/L em 48 h. Diferentemente do primeiro pulso, a variação de OD também foi inferior, mantendo-se próximo a zero.

A interrupção do ensaio em 48,8 h impede a observação da evolução do crescimento celular nas horas seguintes, sendo difícil analisar um possível incremento ou estabilização da biomassa durante a transição para a fase estacionária após o segundo pulso.

Em síntese, a produtividade volumétrica máxima de biomassa alcançada após ambos os pulsos apresentou valores bastante próximos, indicando que a segunda alimentação não promoveu aumento significativo na eficiência global de formação celular dentro do intervalo experimental avaliado. Após o primeiro pulso, $P_{x_{\max}(1)} = 0,25$ g/L·h, quando atingiu $X_{\max(1)} = 10,5$ g/L em 42,6 h de cultivo. Enquanto após o segundo pulso, considerando o período analisado antes da interrupção do ensaio em 48,8 h, foi observado $P_{x_{\max}(2)} = 0,22$ g/L·h quando $X_{\max(2)} = 10,4$ g/L em 48 h.

Figura 31 - Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 48,8 h de cultivo do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada alimentada em pulso em reator de 15 L.



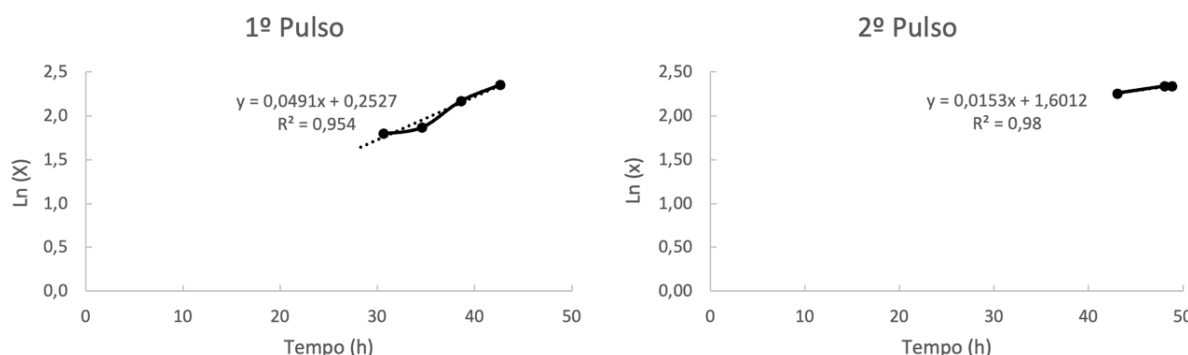
Fonte: Autora, 2026.

A Figura 32 representa a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em função dos pulsos de alimentação. Ressalta-se que não foi possível estimar $\mu_{\text{máx}}$ no início do cultivo (anterior aos pulsos), devido ao número insuficiente de pontos experimentais na região correspondente à fase exponencial, o que inviabilizou a obtenção de estimativas confiáveis de $\mu_{\text{máx}}$.

Dessa forma, foram determinados valores de $\mu_{\text{máx}1} = 0,049 \text{ h}^{-1}$, após o primeiro pulso, e $\mu_{\text{máx}2} = 0,015 \text{ h}^{-1}$ após o segundo pulso. Os elevados coeficientes de correlação ($R^2 > 0,95$) indicam adequado ajuste linear, confirmando que os intervalos selecionados são representativos de trechos da fase exponencial de crescimento.

Além disso, o valor obtido de $\mu_{\text{máx}2}$ foi inferior a $\mu_{\text{máx}1}$, pode ter sido influenciado pela interrupção repentina do ensaio. Uma vez que, provavelmente nesse intervalo o cultivo ainda estava em uma fase ativa do metabolismo, o que pode ter limitado a avaliação do potencial máximo de crescimento do microrganismo.

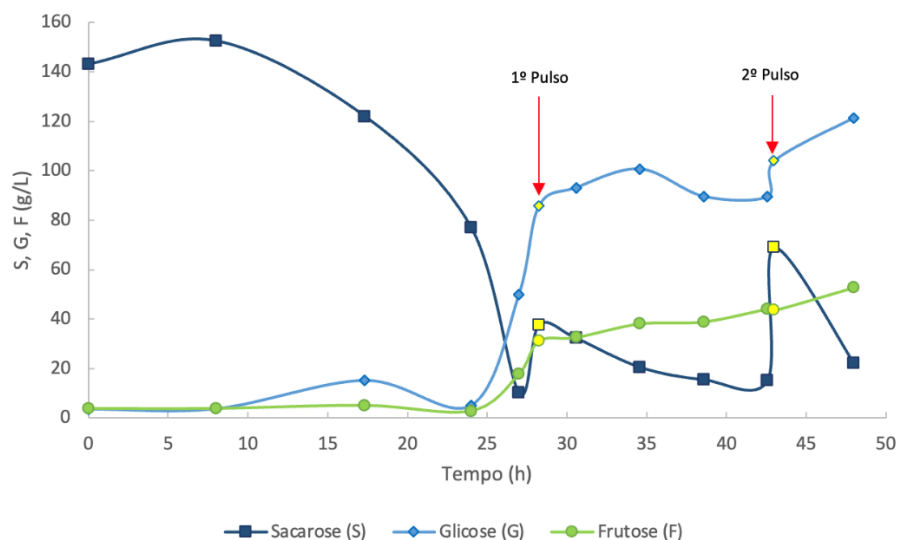
Figura 32 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada alimentada por pulso em reator de 15 L.



Fonte: Autora, 2026.

A Figura 33 mostra a evolução das concentrações de sacarose, glicose e frutose ao longo do ensaio. Nas primeiras 24 h, há um consumo moderado de sacarose, com uma velocidade inicial de hidrólise de $2,7 \text{ g/L} \cdot \text{h}$.

Figura 33 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 48,8 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em pulsos.



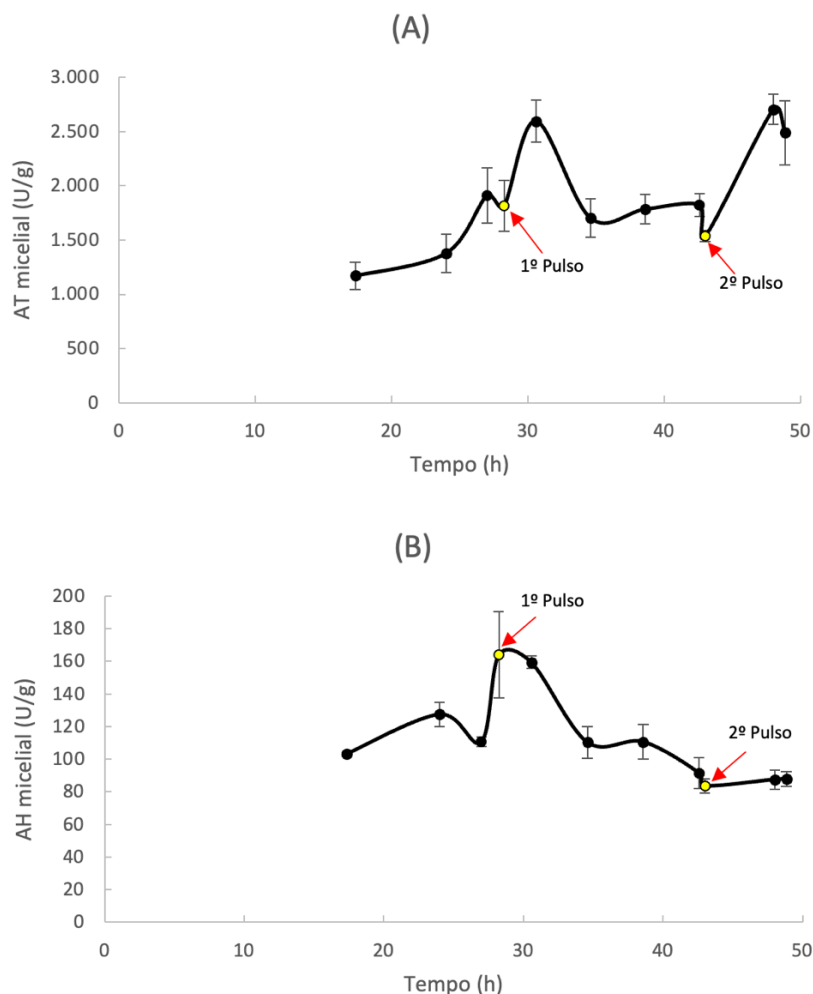
Fonte: Autora, 2026.

A aplicação do primeiro pulso, em 28,3 h, quando a concentração de sacarose se encontrava inferior a 10 g/L, promoveu um aumento desse substrato no meio, seguido por conversão em glicose e frutose. A velocidade de hidrólise observada entre a amostra antes do pulso e após, cerca de 1,25 h depois foi de 72,1 g/L·h. No entanto, esse comportamento também pode refletir um regime transiente, no qual a disponibilização de substrato supera momentaneamente a capacidade de assimilação celular e pode ser parcialmente atribuído ao rápido aumento da concentração celular decorrente do acréscimo repentino da concentração de sacarose, que impacta a atividade metabólica e redirecionam o fluxo energético para mecanismos de adaptação celular.

Enquanto o segundo pulso, realizado em 43 h nas mesmas condições, observa-se uma velocidade de hidrólise mais elevada, de 144,4 g/L·h, com retirada de amostra após 25 minutos, sugere possível intensificação da atividade enzimática (Figura 34A). Esse resultado indica que o microrganismo se encontra metabolicamente adaptado, com maior capacidade de resposta ao fornecimento de substrato.

A Figura 34 apresenta os perfis das Atividades de Transfrutoseilação (AT) e Hidrolítica (AH) micelial ao longo do cultivo. Nas primeiras 20 horas de fermentação, ambas as atividades enzimáticas permaneceram em níveis reduzidos, o que é coerente com a fase lag, caracterizada pela germinação dos esporos e adaptação metabólica ao meio.

Figura 34 - Perfil das Atividades Transfrutoseilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 48,8 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em pulsos.



Fonte: Autora, 2026.

Após o primeiro pulso de alimentação, verifica-se um aumento significativo de AT à adição de substrato. A atividade máxima atingida após o primeiro pulso foi de $2596,5 \pm 191,1$ U/g e produtividade da enzima micelial ($P_{\text{micelial (1)}}$) é de $84,9$ U/g·h e atividade total ($AT_{\text{Total(1)}}$) de $15.685,8$ U/L. Os resultados sugerem que o aumento da disponibilidade de sacarose favorece a síntese de FTase, promovendo maior predominância das reações de transfrutoseilação.

O segundo pulso de alimentação induziu um aumento adicional na AT, levando a um máximo de $2705,3 \pm 140,7$ U/g em 48 h de cultivo e $AT_{\text{Total(2)}} = 28.121,5$ U/L. Entretanto, observa-se uma redução considerável em $P_{\text{micelial (2)}} = 56,4$ U/g·h, o que sugere que, embora a atividade enzimática seja maior, a formação da enzima diminuiu. Esse comportamento pode ser interpretado como consequência da transição para estágios mais avançados do cultivo, nos quais fatores como limitação de oxigênio

e possível acúmulo de metabólitos inibitórios passam a restringir a atividade celular. Assim, o aumento da AT parece estar mais associado ao acúmulo de enzima previamente produzida do que a uma intensificação da síntese da enzima.

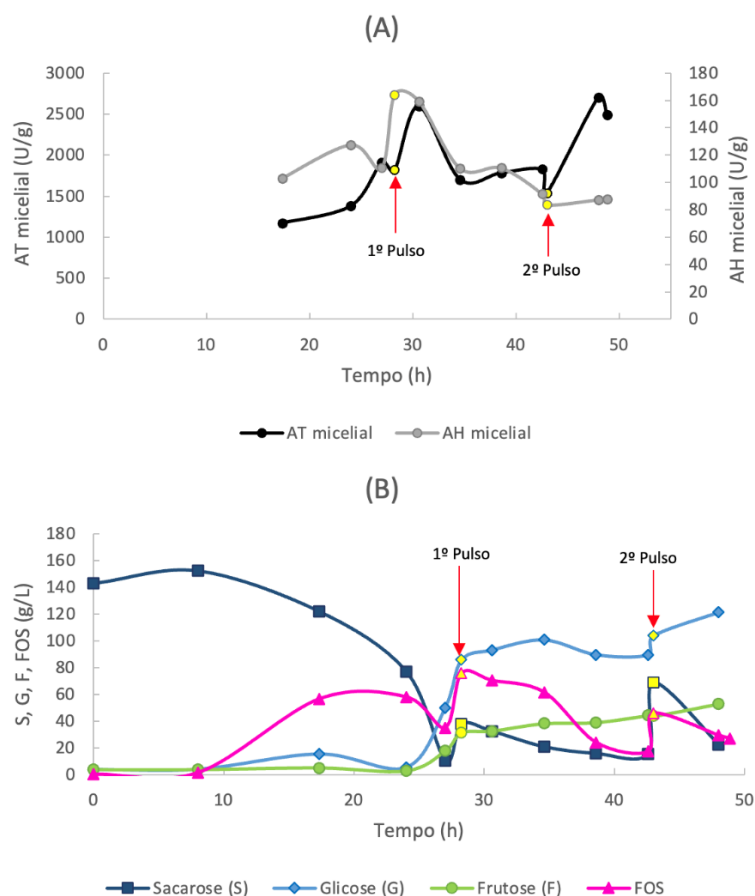
A atividade hidrolítica (AH), por sua vez, apresenta comportamento distinto, com menor variação ao longo do tempo, mantendo-se relativamente estável após os pulsos de alimentação (Figura 34B). Essa resposta enzimática pode indicar que os pulsos de sacarose são capazes de aumentar preferencialmente a transfrutossilação em relação à atividade hidrolítica, potencialmente melhorando a relação AT/AH ao longo do processo.

A Figura 35 integra os perfis de atividades enzimáticas (AT e AH micelial) e de açúcares (sacarose, glicose, frutose e FOS) ao longo do cultivo. No que se refere ao perfil enzimático (Figura 35A), observa-se que, após o primeiro pulso, há um incremento simultâneo de ambas as atividades, com predominância relativa da AT, indicando indução do sistema enzimático pela elevação da concentração de substrato. Esse comportamento está de acordo com a função da sacarose como indutora da FTase, favorecendo a formação de ligações β -(2 $\rightarrow$ 1).

A integração com o perfil de açúcares (Figura 35B) evidencia esse fenômeno em que sistemas com elevadas concentrações de sacarose favorecem reações de transfrutossilação, com consequente formação de FOS, conforme amplamente descrito para enzimas do tipo FTase (Romano *et al.*, 2016). Nesse contexto, a máxima concentração de FOS foi observada após o primeiro pulso de alimentação, atingindo 75,6 g/L em 28,3 h, o que representa o dobro do valor obtido antes da alimentação, reforçando que nesse intervalo as condições do meio (elevada disponibilidade de sacarose) foram favoráveis à transferência de unidades frutossil.

Entretanto, após o segundo pulso, embora seja possível verificar um novo incremento na concentração de sacarose e formação de monossacarídeos, o acúmulo de FOS é menor. De acordo com a literatura, altas concentrações de sacarose são determinantes para sustentar a transfrutossilação, enquanto sua redução favorece a hidrólise de FOS previamente formados. Portanto, embora o segundo pulso reponha o substrato, a partir de 43 h verifica-se a possível hidrólise secundária de FOS previamente formados, evidenciada pelo aumento da concentração de frutose no meio (Romano *et al.*, 2016).

Figura 35 - Perfil das Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 48,8 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em pulsos.

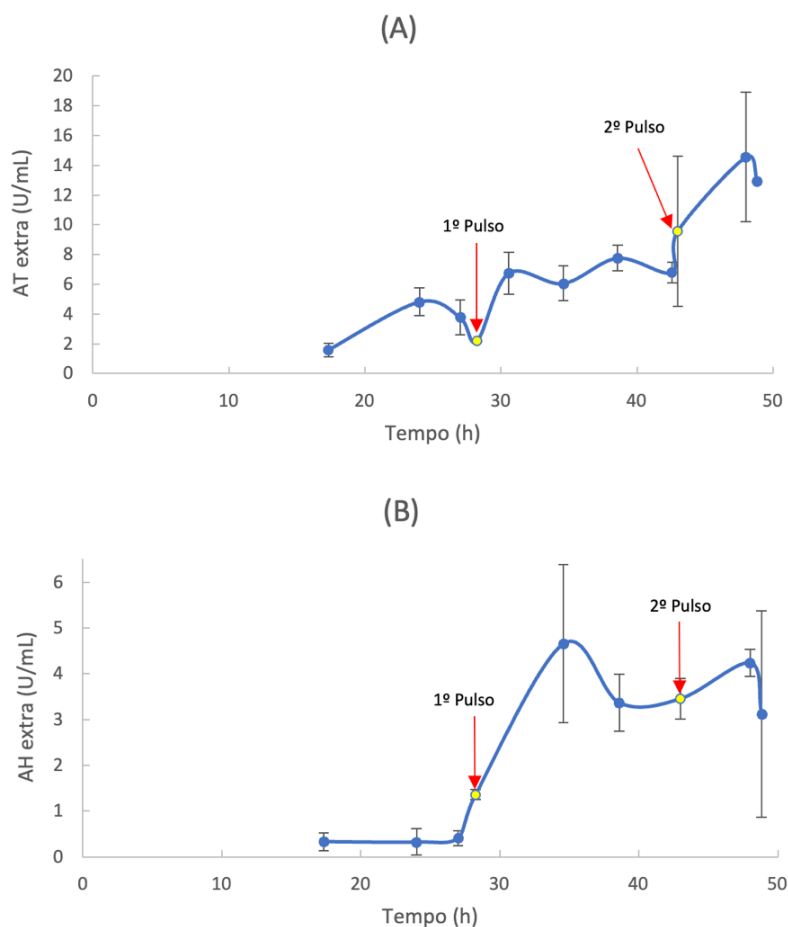


Fonte: Autora, 2026.

A Figura 36 evidencia a evolução das atividades extracelulares de transfrutossilação (AT) e hidrolítica (AH) ao longo do cultivo em regime de batelada alimentada em pulsos. Inicialmente, verifica-se que a atividade extracelular (Figura 36A) é baixa nas primeiras 25 h e a partir do primeiro pulso, ocorre aumento sutil e progressivo da AT_{extra} . Enquanto após o segundo pulso, em 43h, há um aumento mais relevante, sugerindo que, embora a adição de sacarose atue como indutor metabólico, a secreção de FTase para o meio extracelular não é imediata. Nesse ponto a AT_{extra} atinge um valor máximo médio de $13,8 \pm 4,3$ U/mL em 48 h com uma produtividade máxima da enzima de $P_{extra} = 0,29$ U/mL·h.

Por outro lado, a atividade hidrolítica extracelular (Figura 35B) apresenta comportamento distinto. Embora também aumente após as alimentações, seu perfil é mais irregular, com oscilações maiores.

Figura 36 - Perfil das Atividades Transfrutossilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 48,8 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em pulsos.



Fonte: Autora, 2026.

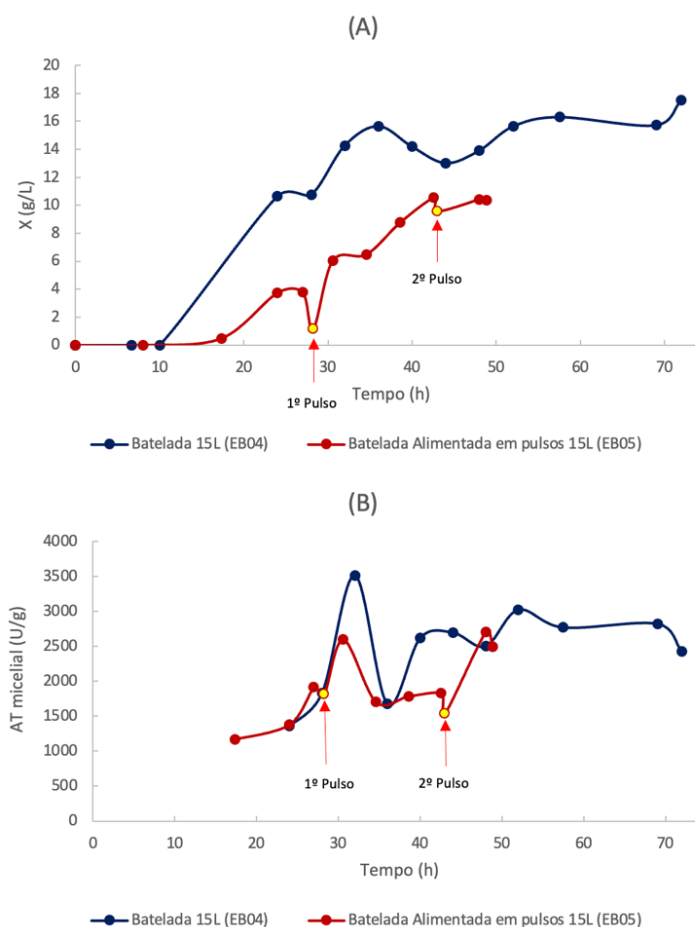
Por fim, destaca-se que a interrupção do ensaio em 48,8 h restringe a análise do comportamento da produção de FTase nas fases mais avançadas do cultivo. Considerando que, nos demais experimentos deste estudo, a atividade máxima de FTase extracelular foi atingida após 50 h de fermentação. Assim, é provável que valores mais elevados de atividade extracelular pudessem ser alcançados caso o cultivo tivesse sido conduzido até o tempo originalmente previsto, o que deve ser considerado na interpretação dos resultados e na comparação de dados.

5.4.1. Batelada x batelada alimentada em pulsos em reator 15 L (EB04 x EB05)

Os ensaios foram conduzidos em um biorreator de 15 L (Biorreator II), operado em condições de batelada e batelada alimentada em pulsos ao longo do ensaio de 72 h e 48,8 h devido a falha elétrica, respectivamente.

No ensaio de batelada alimentada, foram aplicados dois pulsos de solução de sacarose VHP a 700 g/L, visando restabelecer a concentração inicial de 150 g/L, a fim de prolongar a disponibilidade de substrato e avaliar a resposta metabólica do microrganismo. Os perfis de concentração celular e Atividade de Transfrutossilação micelial (AT) em função do tempo de cultivo em ambos os modos são apresentados na Figura 37.

Figura 37 - (A) Concentração Celular (X) e (B) Perfil da Atividade Transfrutossilação (AT) micelial ao longo do cultivo do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada e batelada alimentada em pulso em reator de 15 L.



Fonte: Autora, 2026.

No ensaio em batelada observou-se maior crescimento celular (Figura 37A), atingindo $X_{\text{máx}} = 15,7$ g/L em 36 h, enquanto no cultivo alimentado por pulsos, a concentração celular máxima foi relativamente inferior, com $X_{\text{máx}} = 10,5$ g/L em 42,6 h. Esse resultado indica que a estratégia de alimentação por pulsos adotada não favoreceu a conversão de substrato em biomassa.

Embora a disponibilidade de sacarose tenha sido restabelecida após cada alimentação, esse incremento não se refletiu em maior crescimento celular, sugerindo

que parte do substrato consumido foi direcionada para outras demandas metabólicas. Hiss (2001) destaca que nem todo o substrato assimilado é convertido em crescimento celular, uma vez que parcela da energia assimilada pode ser utilizada para manutenção celular. Além disso, Salinas e Perotti (2009) relatam que elevadas concentrações de sacarose favorecem a produção de frutotransferase, embora esse efeito não seja necessariamente acompanhado por incremento na biomassa.

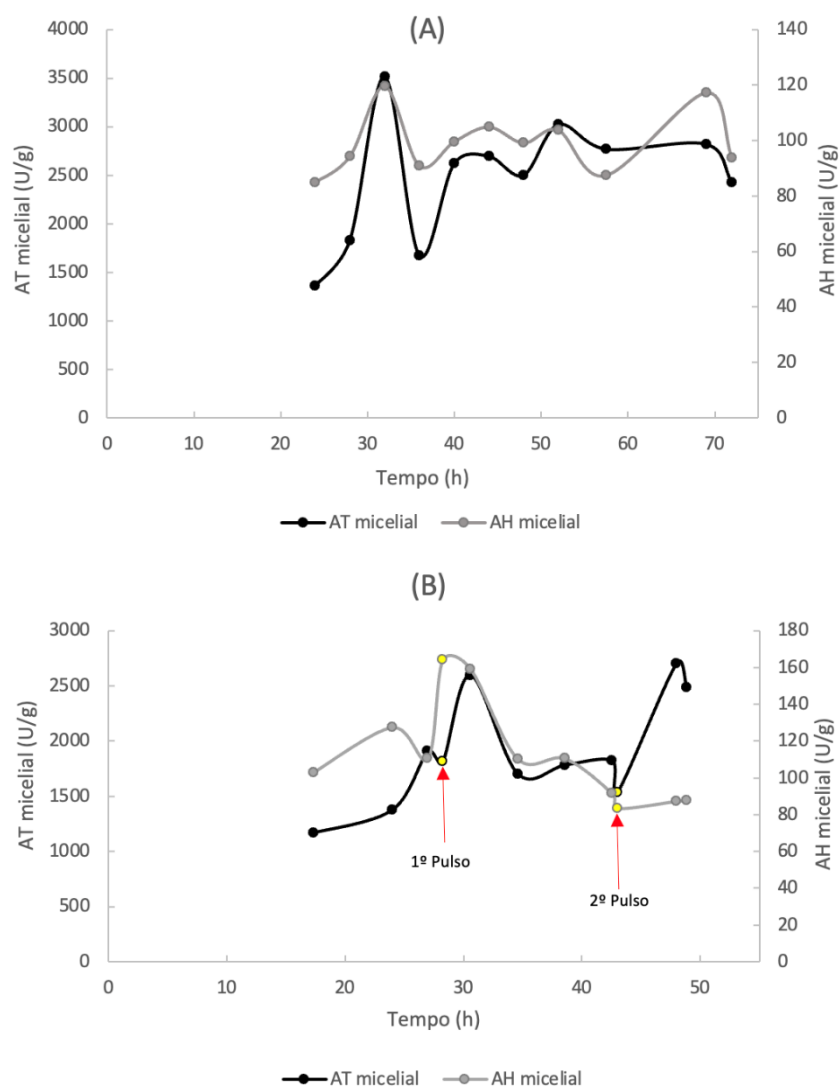
Entretanto, um desempenho distinto foi observado ao analisar o perfil da atividade de transfrutossilação micelial (Figura 37B). No processo em batelada, a atividade micelial máxima atingiu $3514,2 \pm 205,5$ U/g em 32 h, seguida por uma redução gradual, possivelmente relacionada limitações na transferência de oxigênio e/ou acúmulo de metabólitos inibitórios. Enquanto, no modo em batelada alimentada por pulsos, a atividade máxima atingida em ambas as alimentações foi inferior quando comparado ao modo em batelada.

Após o primeiro pulso, $AT_{micelial\ máx(1)} = 2596,5 \pm 191,1$ U/g em 30,6 h de cultivo, correspondendo a uma produtividade da enzima micelial de 84,9 U/g.h. Este valor é muito inferior quando comparado à produtividade máxima observada no cultivo em batelada ($P_{micelial} = 109,8$ U/g.h), conforme apresentado na Tabela 4.

A análise comparativa dos perfis enzimáticos (Figura 38) revela o comportamento da FTase em resposta ao modo de operação. No cultivo em batelada (Figura 38A), AT e AH apresentaram um aumento progressivo, atingindo seus valores máximos em 32 h de fermentação, seguido por algumas oscilações e declínio.

Sob condições de batelada alimentada por pulsos (Figura 38B), um comportamento cinético distinto foi observado. Após o primeiro pulso de alimentação, tanto AT quanto AH aumentaram; no entanto, a AT apresentou uma resposta mais relevante à adição de substrato. O segundo pulso de alimentação induziu um aumento adicional em AT, levando a um máximo em 48 h de cultivo, enquanto AH permaneceu relativamente estável. Essa resposta enzimática diferencial indica que os pulsos de sacarose aumentaram preferencialmente a transfrutossilação em relação à atividade hidrolítica, potencialmente melhorando a relação AT/AH ao longo do processo.

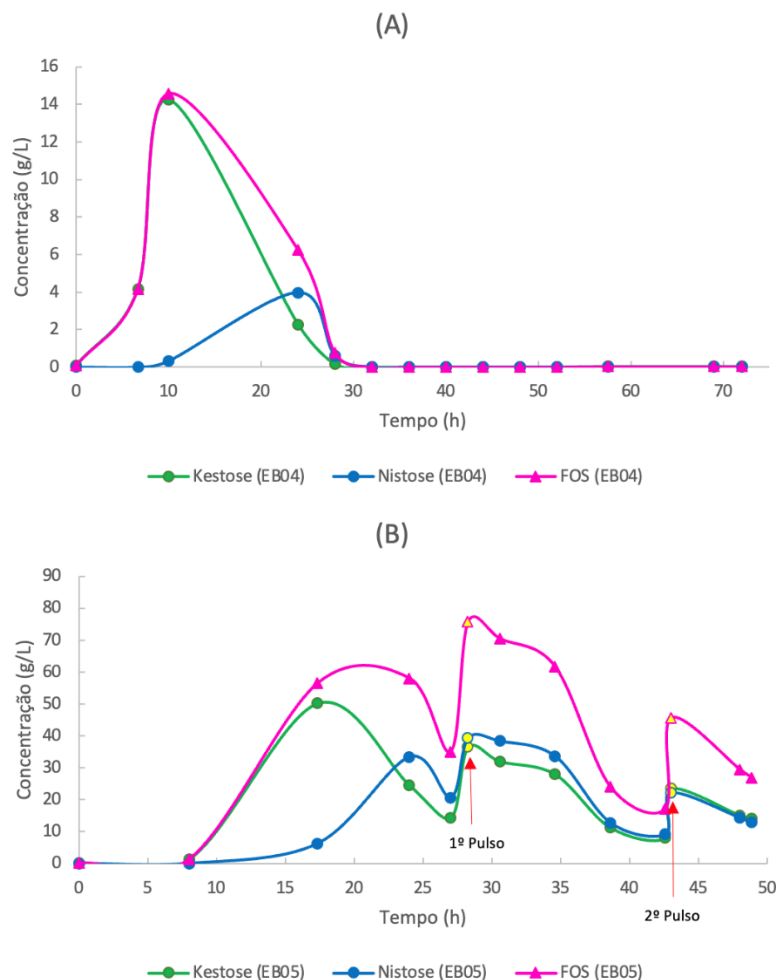
Figura 38 - Atividade de Transfrutoseilação micelial (AT) e Atividade Hidrolítica micelial (AH) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 15 L



Fonte: Autora, 2026.

A Figura 39 apresenta o perfil de síntese de FOS em cada modo de operação do biorreator. Na Figura 39A, o cultivo em batelada mostrou algumas limitações inerentes à exaustão precoce do substrato, atingindo uma produção máxima de FOS de 14,6 g/L. Enquanto, a implementação da estratégia de batelada alimentada por pulsos (Figura 39B) atingiu 75,6 g/L em 28,3 h. Esse incremento representa 5,2 vezes maior que o máximo atingido na batelada.

Figura 39 - Perfil de síntese de Frutooligossacarídeos (FOS) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 15 L



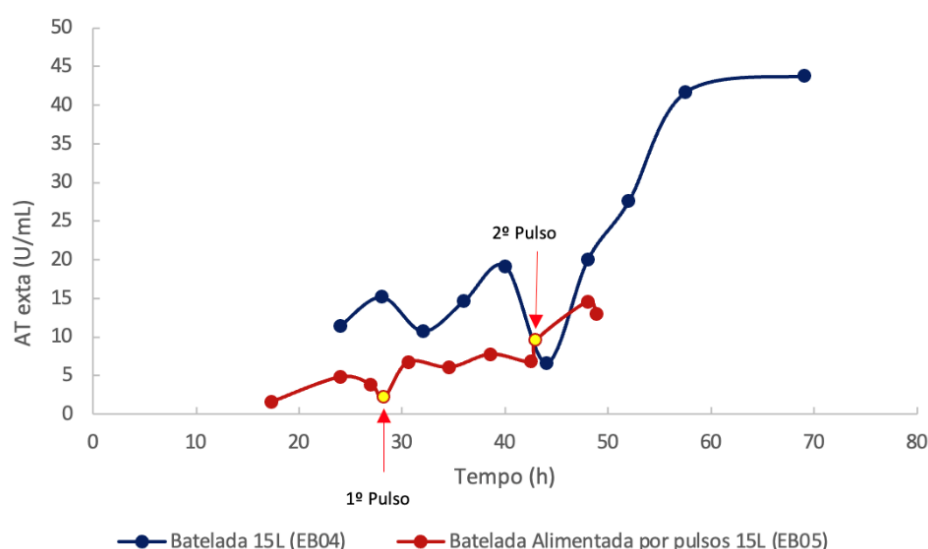
Fonte: Autora, 2026.

A Figura 40 mostra a comparação entre o perfil de atividade extracelular de FTase entre os modos de batelada (EB04) e batelada alimentada em pulsos (EB05). No cultivo em batelada, verifica-se um aumento progressivo da Atividade de Transfrutossilação extracelular (AT_{extra}) ao longo do tempo, alcançando valores máximos significativamente superiores. Isso sugere que, sob consumo progressivo de sacarose, ocorre uma transição gradual para condições que favorecem a secreção enzimática, possivelmente associada à redução da pressão osmótica e à estabilização do metabolismo celular. Além disso, a secreção de FTase tende a se intensificar em fases mais tardias do cultivo quando a atividade micelial se intensifica, quando há menor disponibilidade de substrato e maior acúmulo de biomassa metabolicamente ativa.

No regime de batelada alimentada em pulsos, a atividade extracelular apresenta valores bastante inferiores. Esse fenômeno pode ser atribuído ao fato dessa enzima ser mais sensível a altas concentrações de sacarose como descrito por Cunha *et al.* (2019), favorecendo predominantemente a atividade micelial nas fases intermediárias do processo. E também, os pulsos sucessivos podem induzir o aumento da pressão osmótica no meio, promovendo redirecionamento metabólico para adaptação celular.

Em comparação as produtividades enzimáticas no período de máxima atividade de ambos os modos de operação foram $P_{\text{extra}} = 0,74 \text{ U/mL.h}$ para a batelada e $0,29 \text{ U/mL.h}$ para batelada alimentada em pulsos.

Figura 40 - Atividade de Transfrutossilação extracelular (AT) em cultivo em (A) batelada e (B) batelada alimentada por pulsos em função do tempo de fermentação em reator de 15 L



Fonte: Autora, 2026.

Deve-se considerar, ainda, que o ensaio em batelada alimentada foi interrompido em 48,8 h, o que limita a avaliação completa do comportamento da atividade extracelular. Como a secreção de FTase frequentemente atinge seus máximos em tempos mais avançados de cultivo, é coerente que os valores observados em EB05 estejam subestimados em relação ao seu potencial real. Esse fator experimental deve ser levado em conta na comparação direta entre os modos operacionais, uma vez que o cultivo em batelada dispõe de um tempo maior para atingir o regime de máxima produção extracelular.

A Tabela 4 sintetiza os principais parâmetros de produção de ambos os modos operacionais. O cultivo em batelada resultou em uma máxima concentração celular de 15,7 g/L, sendo relativamente maior em comparação com o modo de alimentação em pulsos (10,5 g/L), indicando maior conversão de substrato em biomassa. Enquanto, a atividade micelial máxima ($AT_{micelial\ máx}$) também foi superior no cultivo em batelada (3514,2 U/g) do que na batelada alimentada em pulsos (2705,26 U/g). Consequentemente, a produtividade máxima da enzima ($P_{micelial}$) foi maior no processo em batelada, sofrendo uma queda de aproximadamente 48,6% no modo em pulso (109,8 U/g·h versus 56,4 U/g·h).

Tabela 4 - Parâmetros de produção enzimática de FTase em batelada (EB04) e batelada alimentada em pulsos (EB05) em reator de 15 L, incluindo concentração celular máxima ($X_{máx}$), tempo para atingir a concentração celular máxima ($t_{Xmáx}$), atividade máxima de transfrutossilação micelial ($AT_{micelial\ máx}$), tempo para atingir a atividade máxima de transfrutossilação micelial ($t_{ATmicelial\ máx}$), atividade hidrolítica micelial ($AH_{micelial}$), a razão entre as atividades de transfrutossilação e hidrolítica (AT/AH), produtividade da enzima micelial ($P_{micelial}$) e Atividade Total micelial (AT_{TOTAL}).

Ensaio	$X_{máx}$ (g/L)	$t_{Xmáx}$ (h)	$AT_{micelial\ máx}$ (U/g)	$t_{ATmicelial\ máx}$ (h)	$AH_{micelial}$ (U/g)	AT/AH	$P_{micelial}$ (U/g.h)	AT_{TOTAL} (U/L)
Batelada (EB04)	15,7	36	3514,2 ± 205,5	32	119,6	29,4	109,8	50123
1º Pulso - Batelada Alimentada (EB05)	10,5	42,6	2596,5 ± 191,1	30,6	159,4	16,3	84,9	15685
2º Pulso - Batelada Alimentada (EB05)	10,4	48	2705,2 ± 140,7	48	87,4	28,4	56,4	28121

Fonte: Autora, 2026.

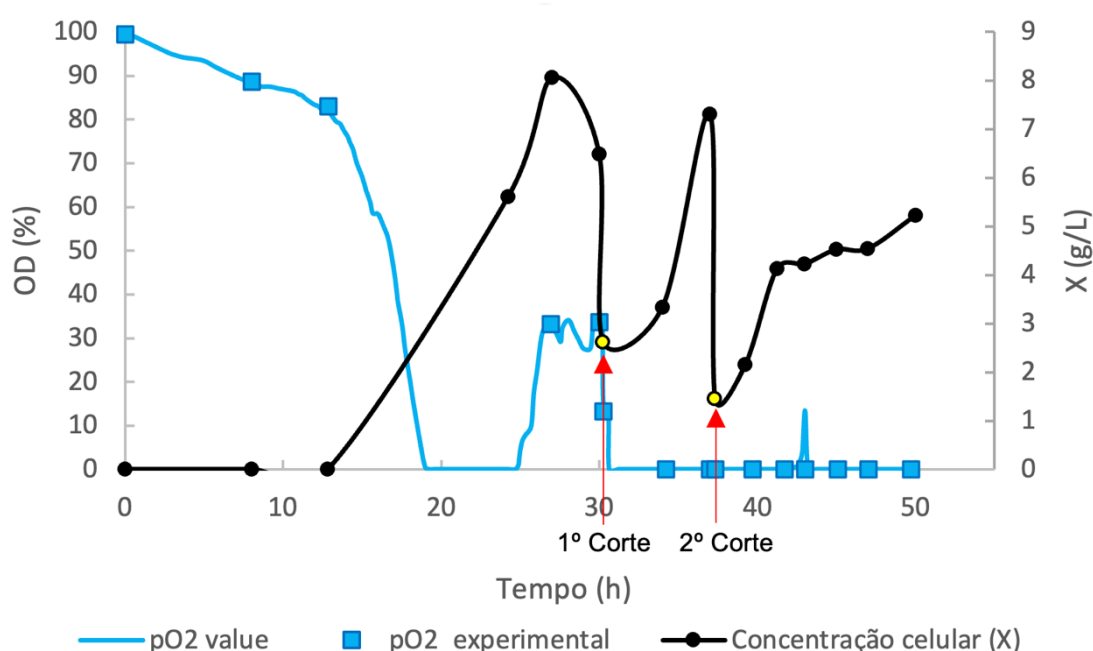
Portanto, nas condições avaliadas, o processo em batelada mostrou-se mais vantajoso por proporcionar maior estabilidade metabólica, favorecendo simultaneamente o crescimento celular e a produção enzimática, além de possibilitar a obtenção da $AT_{micelial\ máx}$ em menor tempo de cultivo.

5.5. BATELADA ALIMENTADA COM CORTE DE 80% EM REATOR DE 15 L (EB06)

O ensaio em batelada alimentada com estratégia de corte de 80% foi conduzido em biorreator de 15 L (Biorreator II), com o objetivo de avaliar a resposta enzimática e celular em bateladas sucessivas a partir de uma fração ativa de 20% de biomassa. Foram realizados dois cortes, o primeiro corte foi realizado no momento de máxima atividade da FTase em 30 h e o segundo corte foi realizado quando a concentração de sacarose estava inferior a 20 g/L. Essa estratégia visa reduzir o tempo global do processo, maximizar a produtividade enzimática e enviar para o *downstream* a maior quantidade de caldo fermentado para recuperação de enzima em menor tempo.

O biorreator foi operado por meio de um sistema multifuncional de controle (MFCS, Multi-Function Control System), responsável pelo monitoramento e controle em tempo real das variáveis de processo, incluindo temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD), agitação e aeração. O sistema permitiu aquisição contínua de dados durante o tempo de fermentação. Dessa forma, a Figura 41 apresenta os perfis de oxigênio dissolvido e crescimento celular ao longo do processo.

Figura 41 - Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 50 h de cultivo do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada alimentada com corte de 80% em reator de 15 L. A linha contínua do OD foi traçada com os valores obtidos no MFCS e os pontos representam os valores amostrados durante o ensaio.



Fonte: Autora, 2026.

Nas primeiras 20 h, a queda acentuada do oxigênio dissolvido (OD) até valores próximos a zero indica elevada velocidade respiratória, característica da transição para a fase exponencial, comportamento observado nesse processo em outros experimentos.

Houve algumas intercorrências significativas ao longo desse ensaio que influenciaram diretamente nos resultados obtidos. O aumento progressivo da temperatura, de maneira não controlada, de 30 a 45 °C entre 21 h e 23,5 h, introduziu uma perturbação significativa no sistema observada até 27,5 h. Esse desvio da temperatura provavelmente afetou tanto a cinética de crescimento quanto a atividade metabólica, promovendo um estresse fisiológico. Como consequência, observa-se um

aumento do OD para aproximadamente 30%, não por melhoria na transferência de oxigênio, mas pela redução da atividade respiratória celular. Esse fenômeno é confirmado pela queda de aproximadamente 19,5% na biomassa, de 8,1 para 6,5 g/L nesse intervalo.

Após o primeiro corte, realizado em 30,3 h, a reinicialização do cultivo com 20% do volume celular deveria teoricamente promover rápida retomada do crescimento devido à ausência de fase lag. No entanto, a interrupção da aeração por 1,5 h introduziu novamente uma limitação severa de oxigênio, evidenciada pela queda abrupta do OD a zero. Esse evento comprometeu a capacidade metabólica do sistema, resultando em crescimento subótimo, $X_{\text{máx}(1)} = 7,3 \text{ g/L}$ em 37 h.

Além disso, a diferença entre a concentração celular calculada estimada após o corte, seria de 1,28 g/L e o valor experimental obtido foi de 2,6 g/L sugerindo influência da heterogeneidade do processo fermentativo. Esse comportamento pode estar associado à característica filamentosa do microrganismo, cuja biomassa tende a aderir às paredes internas do reator, sondas e regiões de menor cisalhamento hidrodinâmico e durante a adição do novo meio, parte dessa biomassa aderida pode ter sido despreendida e adicionada ao caldo fermentativo, resultando em superestimação momentânea da concentração celular medida experimentalmente.

O segundo corte, efetuado em 37,3 h, observa-se maior consistência entre valores teóricos e experimentais, sendo ambos 1,4 g/L. Dessa forma, verificou-se um aumento moderado, de 1,4 g/L para o valor máximo médio de $4,6 \pm 0,4 \text{ g/L}$ em 43h. Diferentemente do primeiro corte, a biomassa pareceu não se recuperar ao tempo que ficou sem OD.

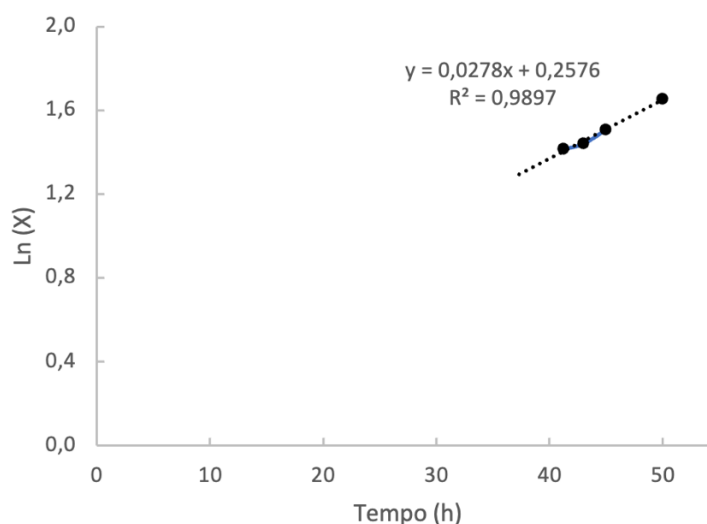
Do ponto de vista cinético, as produtividades volumétricas de biomassa $P_{X_{\text{máx}(1)}} = 1,08 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ e $P_{X_{\text{máx}(2)}} = 0,82 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ refletem essa degradação progressiva do sistema. Embora a estratégia de cortes sucessivos tenha potencial teórico para intensificação de processo, sua eficácia depende criticamente da estabilidade operacional. Neste caso, limitações de transferência de oxigênio, controle térmico inadequado e interrupções na aeração atuaram como fatores limitantes dominantes, sobrepondo-se aos benefícios esperados da estratégia.

Além disso, não foi possível determinar a velocidade específica de crescimento no início do cultivo (antes do primeiro corte), devido a oscilação causada no sistema e após o primeiro corte em razão do número insuficiente de pontos experimentais na

região correspondente à fase exponencial, o que inviabilizou a determinação de estimativas confiáveis de $\mu_{\text{máx}}$ nesses intervalos.

Entretanto, para o segundo corte, observa-se $\mu_{\text{máx}(2)} = 0,028 \text{ h}^{-1}$, embora com bom coeficiente de correlação ($R^2 = 0,98$), indicando comportamento cinético significativamente mais lento (Figura 42). Essa diminuição de $\mu_{\text{máx}}$ pode ser atribuída ao acúmulo de estresses fisiológicos ao longo do processo, incluindo episódios prévios de limitação de oxigênio e estresse térmico, que podem ter comprometido a viabilidade celular e a integridade metabólica.

Figura 42 - Velocidade específica máxima de crescimento celular no segundo corte ($\mu_{\text{máx}(2)}$) do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada alimentada em corte 80% em reator de 15 L.



Fonte: Autora, 2026.

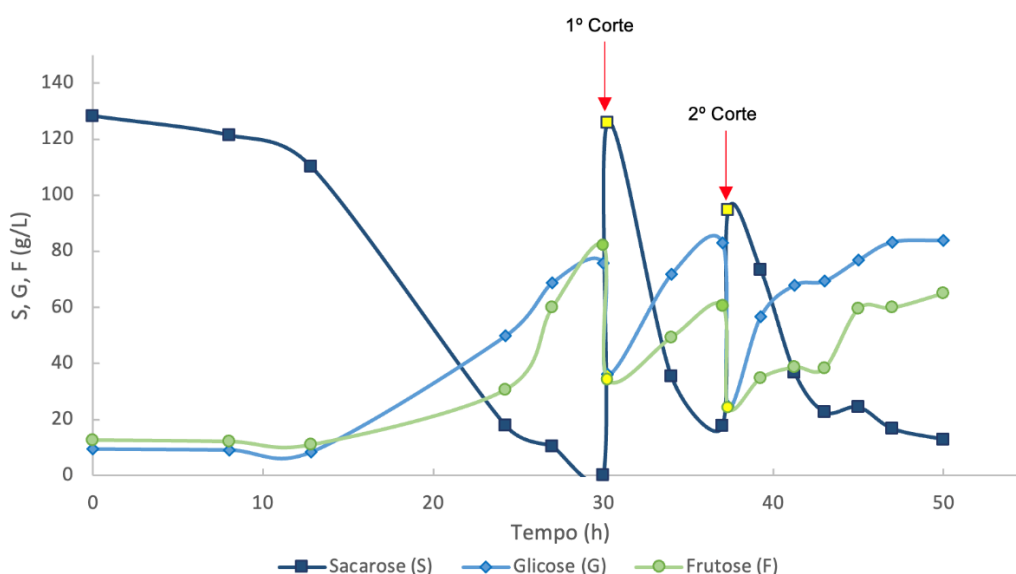
Essa redução progressiva de $\mu_{\text{máx}}$ está alinhada ao conceito de aumento da demanda de energia de manutenção celular. À medida que o cultivo é submetido a condições de estresse, uma fração crescente do substrato consumido é direcionada à manutenção celular, em detrimento do crescimento, resultando em menor velocidade específica (Salinas e Perotti, 2009).

O perfil de açúcares ao longo do cultivo com estratégia de cortes (Figura 43) evidencia a hidrólise acentuada de sacarose nas primeiras 24 h, com uma velocidade inicial de hidrólise de $4,6 \text{ g/L} \cdot \text{h}$, refletindo a intensificação da atividade enzimática nesse período (Figura 44). A rápida liberação de glicose e frutose, em velocidades superiores à capacidade de consumo celular, pode levar ao acúmulo desses

monossacarídeos no meio, refletindo possíveis limitações da biomassa, como estresse acumulado conforme discutido anteriormente.

A realização do primeiro corte foi feita quando a sacarose já havia esgotado. A reposição do meio restabelece elevadas concentrações de substrato, favorecendo a rápida atuação das enzimas já presentes e previamente induzidas. Como resultado, a hidrólise da sacarose ocorre de forma mais intensa do que na batelada inicial, evidenciada pela elevada velocidade de hidrólise observada (141,8 g/L·h 15 minutos após o corte), elevando as concentrações de glicose e frutose. Esse comportamento sugere que, diferentemente do início do cultivo, em que há um período de adaptação e indução enzimática, a biomassa remanescente encontra-se metabolicamente ativa e com o aparato enzimático previamente estabelecido, reduzindo limitações cinéticas iniciais, apesar das intercorrências ocorridas.

Figura 43 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 50 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 80%.



Fonte: Autora, 2026.

Enquanto após o segundo corte, observa-se uma velocidade de hidrólise mais elevada, de 222,6 g/L·h, após 20 minutos, sugere possível intensificação da atividade enzimática (Figura 44). A liberação de glicose e frutose ocorre rapidamente, em velocidades superiores à capacidade de consumo celular, o que possivelmente causou o acúmulo no meio (atingindo 83,9 g/L de Glicose e 65,0 g/L de Frutose), refletindo possíveis limitações da biomassa, como estresse acumulado conforme discutido anteriormente.

A Figura 44 apresentada demonstra a dinâmica das atividades miceliais de transfrutoseilação (AT) e hidrolítica (AH) ao longo do cultivo submetido à estratégia de cortes sucessivos, permitindo avaliar como a renovação parcial do meio influencia o metabolismo enzimático do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301.

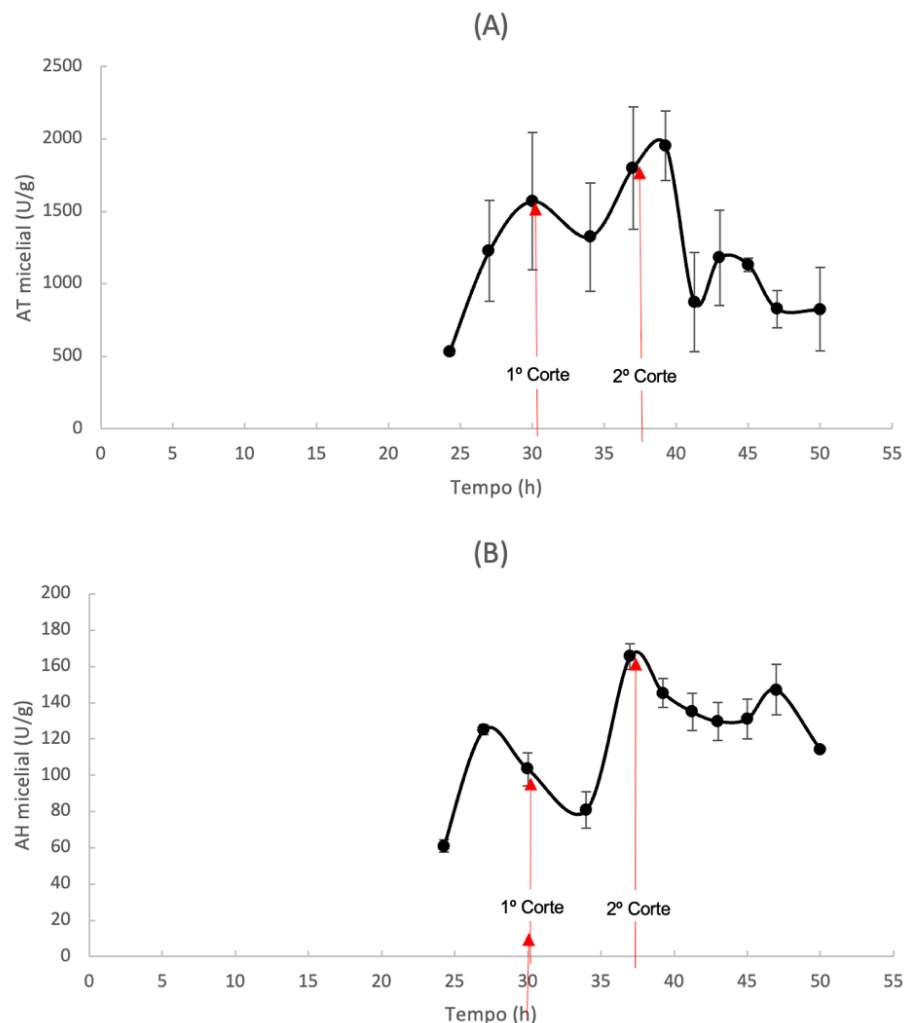
Verifica-se que antes do primeiro corte, a AT (Figura 44A) apresenta um aumento progressivo, atingindo um máximo de $1570 \pm 473,2$ U/g em 30 h, o que indica que durante a fase inicial do cultivo, a elevada disponibilidade de sacarose favoreceu a indução da FTase. Entretanto, após o primeiro corte observa-se uma queda na atividade enzimática provavelmente influenciada pela ausência de oxigênio no meio e aumento da temperatura. O microrganismo leva um tempo maior para se recuperar e atinge um valor máximo nessa batelada de $AT_{micelial\ máx(1)} = 1798,4 \pm 422,7$ U/g em 37h e produtividade da enzima micelial, $P_{micelial\ (1)} = 266,43$ U/g·h e atividade micelial total de $AT_{Total(1)} = 13.151$ U/L.

Em seguida, observa-se um incremento até atingir $AT_{micelial\ máx(2)} = 1954,4 \pm 238,6$ U/g em 39,3 h, imediatamente após o segundo corte quando a produtividade da enzima micelial alcançou $P_{micelial\ (2)} = 1019,7$ U/g·h e $AT_{Total(2)} = 4213,6$ U/L. Embora os cortes promovam recuperação da atividade de transfrutoseilação, o perfil posterior evidencia redução progressiva da enzima, com queda acentuada após 40 h e estabilização em níveis inferiores de 800 à 1200 U/g.

Esse comportamento sugere que a estratégia poderia ser mais eficiente em restabelecer disponibilidade de substrato sem necessidade do preparo de inóculo para cada batelada, diferentemente do observado em cultivos convencionais em batelada, nos quais a FTase tende a atingir um pico seguido de declínio gradual devido ao esgotamento de sacarose e acúmulo de metabólitos inibitórios, os cortes parecem reativar parcialmente o metabolismo enzimático ao submeter as células a um novo ambiente rico em carbono.

A evolução da atividade hidrolítica (Figura 44B) complementa essa interpretação. Antes do primeiro corte, a AH apresentava valores moderados acima de 100 U/g. Após o primeiro corte, observa-se queda temporária da atividade hidrolítica, seguido por um aumento expressivo até $165,5 \pm 7,3$ U/g antes do segundo corte e manteve-se relativamente estável após.

Figura 44 - Perfil das Atividades Transfrutossilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 50 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 80%.

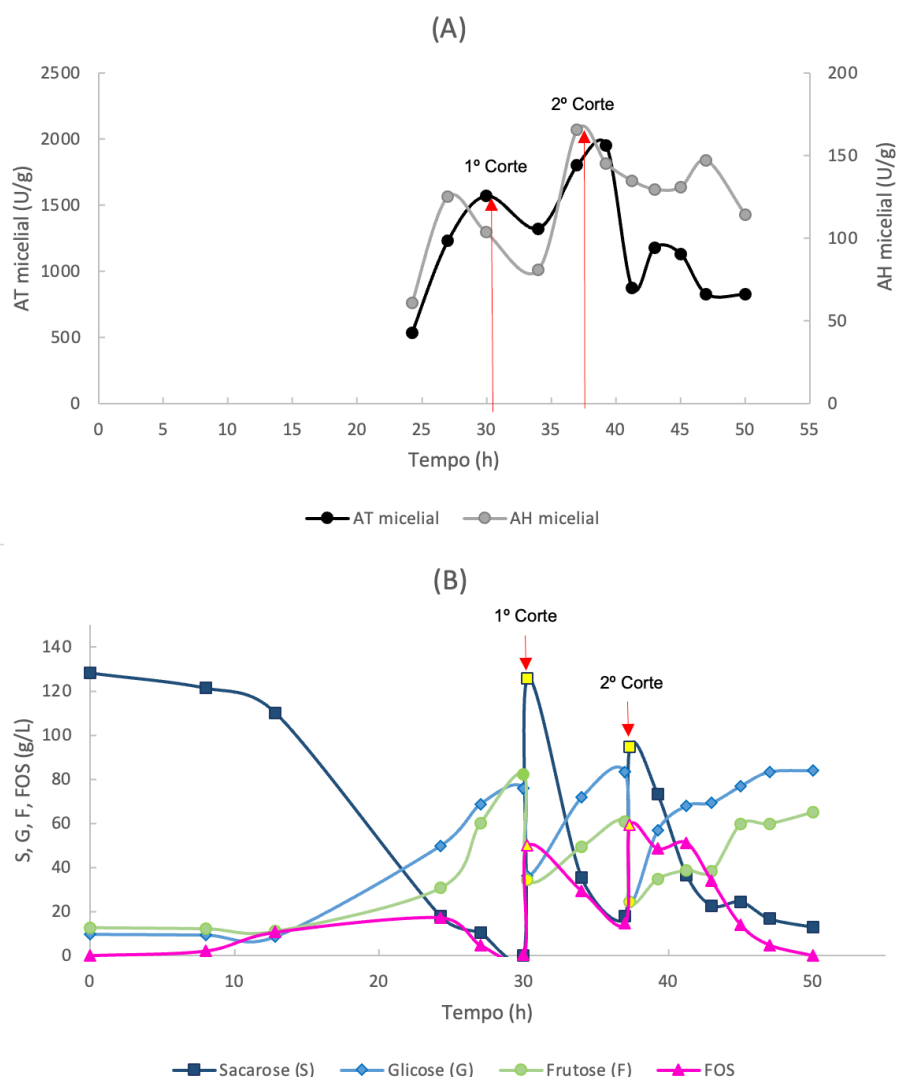


Fonte: Autora, 2026.

A Figura 45 integra os perfis de atividades enzimáticas (AT e AH micelial) e de açúcares (sacarose, glicose, frutose e FOS) ao longo do cultivo. A análise integrada desses perfis mostra uma dependência entre disponibilidade de substrato em conversão de FOS.

Na batelada inicial, a formação de FOS ocorre de maneira progressiva, atingindo 17,2 g/L em 24,3 h, com a elevada disponibilidade de sacarose e razão $AT/AH = 15,2$, favorável à transferência de unidades frutossil. Esse comportamento está de acordo com descrito na literatura, no qual altas concentrações de substrato deslocam o equilíbrio reacional para transfrutossilação, favorecendo a síntese de FOS.

Figura 45 - Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 50 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 80%.



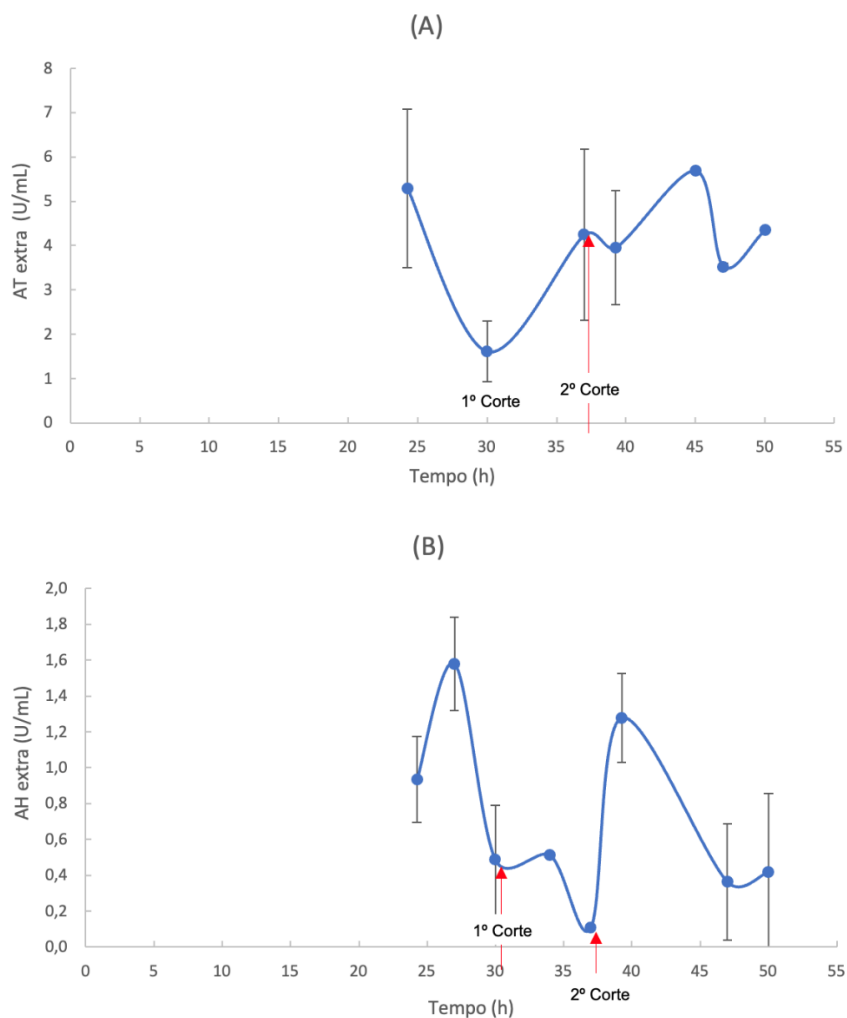
Fonte: Autora, 2026.

Com a realização do primeiro corte, há um aumento acentuado na concentração de FOS, quando atinge um novo máximo de 49,8 g/L em 30,3 h. Esse incremento pode ser associado ao corte, reestabelecendo altas concentrações de sacarose, a presença de 20% da biomassa metabolicamente ativa e previamente induzida, e a razão AT/AH favorável à transfrutossilação. Assim, diferentemente da batelada inicial, a síntese de FOS ocorre de forma mais imediata e intensificada, refletindo a ausência de limitações associadas à fase de adaptação enzimática.

Após o segundo corte, embora se observe novo aumento expressivo da AT (1954,4 U/g), o perfil de FOS torna-se mais oscilatório, com máximo de 59,2 g/L em 37,3 h e mantendo-se em 51,3 g/L em 41,3 h, seguido de queda.

A evolução das atividades enzimáticas extracelulares (Figura 46) foi marcada pela interferência causada por uma instabilidade térmica iniciada em 21 h de cultivo.

Figura 46 - Perfil das Atividades Transfrutoseilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 50 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15,0 L em modo batelada alimentada em corte 80%.



Fonte: Autora, 2026.

Após o primeiro corte, foi possível observar uma recuperação parcial da AT, atingindo 4,24 U/mL em 37 h. Esse aumento pode ser atribuído à renovação do meio e, principalmente, à retomada da secreção enzimática por uma biomassa metabolicamente ativa, embora possivelmente impactada pelo estresse térmico prévio, somado à ausência de oxigênio durante 1,5 h.

Após o segundo corte, a AT atinge um valor máximo de 5,68 U/mL em 45 h, indicando uma readaptação do sistema à introdução de substrato. Ainda assim, os níveis alcançados permanecem inferiores aos esperados em condições estáveis de

cultivo, reforçando que o histórico de estresse térmico exerce efeito cumulativo sobre o desempenho do processo.

Adicionalmente, a interpretação quantitativa das atividades enzimáticas foi dificultada pela elevada variabilidade experimental ao longo do ensaio. As oscilações observadas nos perfis de AT e AH, particularmente após a perturbação térmica e durante os períodos subsequentes aos cortes, podem gerar respostas enzimáticas instáveis.

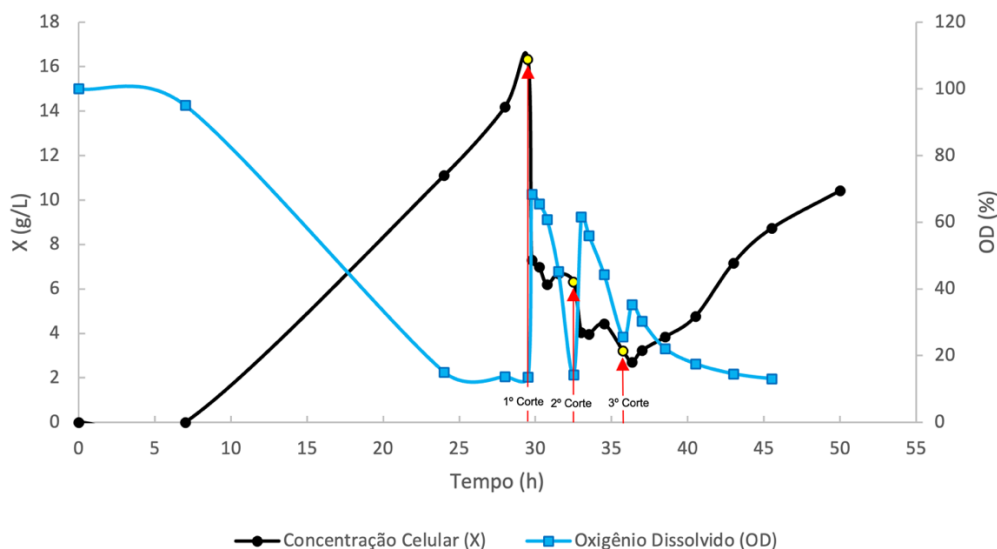
5.6. BATELADA ALIMENTADA COM CORTE DE 50% EM REATOR DE 15 L (EB07)

O ensaio em batelada alimentada com estratégia de corte de 50% foi conduzido em biorreator de 15 L (Biorreator II), com o objetivo de avaliar a resposta enzimática e celular a realização de bateladas sucessivas a partir de uma fração ativa de 50% de biomassa. Foram realizados três cortes, o primeiro corte foi realizado no momento de máxima atividade da FTase em 30 h e os demais cortes foram realizados quando a concentração de sacarose estava inferior a 20 g/L. Essa estratégia visa reduzir o tempo global do processo, maximizar a produtividade enzimática e enviar para o *downstream* a maior quantidade de caldo fermentado para recuperação de enzima em menor tempo.

A Figura 47 apresenta os perfis de oxigênio dissolvido e crescimento celular ao longo das sucessivas bateladas. Nas primeiras 20 h, a queda acentuada do oxigênio dissolvido (OD) até valores inferiores a 20% indica elevada velocidade respiratória, caracterizada pela fase de transição para a fase exponencial.

Após o primeiro corte, realizado em 29,5 h, coincide com o máximo de biomassa ($X_{\text{máx}} = 16,3 \text{ g/L}$) e atividade enzimática (Figura 50), houve uma redução significativa da concentração celular em função da retirada de 50% do volume. Imediatamente após o corte, observa-se um aumento transitório do OD, seguido por nova queda, refletindo a reativação metabólica da fração celular remanescente em contato com meio renovado.

Figura 47 - Concentração Celular (X) e Oxigênio Dissolvido (OD) em 50 h de cultivo do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada alimentada com corte de 50% em reator de 15 L.



Fonte: Autora, 2026.

Entretanto, diferentemente de sistemas convencionais, a recuperação do crescimento após o primeiro corte não atinge os níveis observados na batelada inicial, indicando perda parcial de eficiência metabólica. Esse efeito torna-se mais evidente após o segundo e o terceiro cortes em 32,5 h e 35,8 h respectivamente, nos quais a biomassa apresenta redução progressiva e menor capacidade de recuperação. Simultaneamente, o perfil de OD exibe oscilações a cada corte e início de nova batelada, sugerindo instabilidade no balanço entre transferência e consumo de oxigênio.

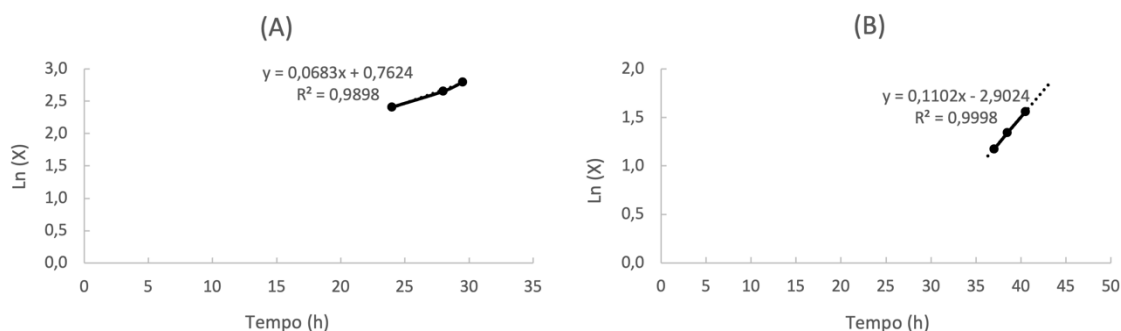
Esse comportamento pode ser interpretado por alguns fatores. Primeiramente, cortes sucessivos aumentam a frequência de perturbações no sistema, impedindo o estabelecimento de um estado metabólico estável. Além disso, a biomassa remanescente é progressivamente submetida a estresse fisiológico acumulado em um curto intervalo de tempo, incluindo limitações energéticas e aumento da demanda de manutenção celular, conforme descrito por Hiss (2001). Nessa condição, uma fração crescente do substrato consumido é utilizada para manutenção, ao invés do crescimento.

Após o terceiro corte em 35,8 h, observa-se uma recuperação gradual da biomassa alcançando 10,4 g/L em 50 h (ainda inferior quando comparado ao máximo inicial), seguido por uma tendência de estabilização do OD em níveis superiores a 10%.

A Figura 48 apresenta a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para a batelada inicial e após o terceiro corte. Ressalta-se que não foi possível calcular $\mu_{\text{máx}}$ após o primeiro e segundo corte, pois as amostras foram retiradas em um curto intervalo de tempo, impossibilitando a identificação da fase exponencial nessas bateladas.

Para a batelada inicial, foi obtido $\mu_{\text{máx}} = 0,068 \text{ h}^{-1}$, enquanto após o terceiro corte observou-se $\mu_{\text{máx}(3)} = 0,110 \text{ h}^{-1}$, ambos com elevados coeficientes de correlação ($R^2 = 0,98$ e $R^2 = 0,99$, respectivamente), indicando bom ajuste linear dos dados experimentais aos trechos exponenciais selecionados. Esse comportamento indica que a biomassa restante pode ter mantido elevada viabilidade metabólica mesmo após sucessivas operações de corte. As células previamente ativas e adaptadas ao meio podem apresentar resposta mais rápida à reintrodução de substrato, reduzindo o tempo de adaptação metabólica quando comparado à batelada inicial devido a ausência da fase lag. Esse fenômeno pode explicar o maior valor de $\mu_{\text{máx}}$ observado no terceiro corte.

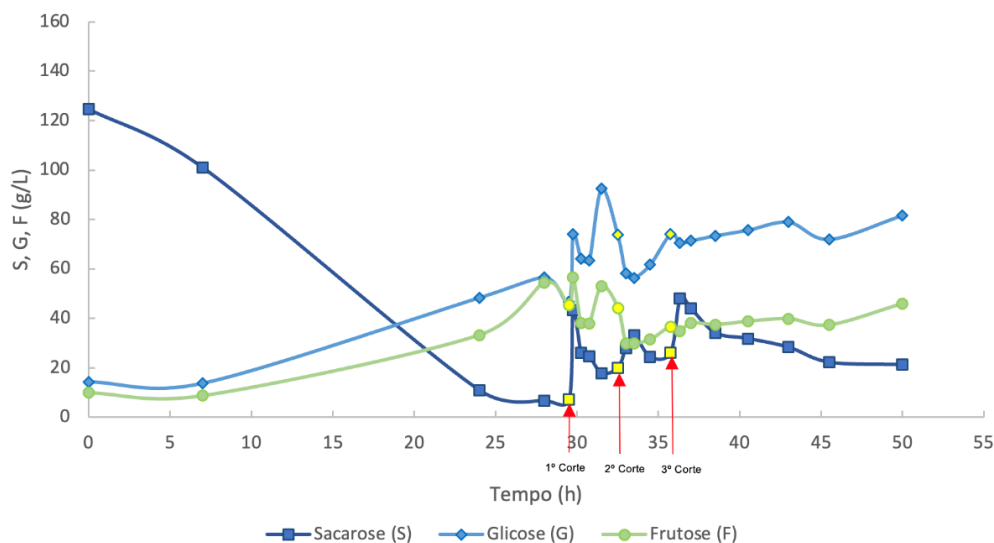
Figura 48 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) na batelada inicial (A) e após o terceiro corte (B) do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada alimentada em corte 50% em reator de 15 L.



Fonte: Autora, 2026.

A Figura 49 apresenta o perfil de açúcares ao longo do cultivo conduzido com estratégia de cortes sucessivos de 50%. Na batelada inicial, a sacarose foi progressivamente hidrolisada até próximo ao esgotamento em 28 h, com velocidade de hidrólise de $4,7 \text{ g/L} \cdot \text{h}$, refletindo a intensificação da atividade enzimática nesse período (Figura 50).

Figura 49 - Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose e Frutose) em 50 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 50%.



Fonte: Autora, 2026.

Após o primeiro corte, a adição de um novo meio contendo elevada concentração de sacarose promoveu uma intensificação na hidrólise, atingindo velocidade de 405,9 g/L·h, 15 minutos após a adição do meio. Esse aumento expressivo, aproximadamente 86 vezes superior ao observado na batelada inicial, demonstra que a biomassa possivelmente estava ativa e previamente induzida, permitindo resposta imediata à nova disponibilidade de substrato. Diferentemente da batelada inicial, na qual existe um período de adaptação associado à germinação dos esporos (fase lag), após o corte a cultura já se encontrava em estado metabólico avançado.

No segundo corte, a velocidade de hidrólise aumentou ainda mais, alcançando 457,3 g/L·h, 30 minutos após o corte, representando a maior velocidade observada ao longo do processo. Esse comportamento sugere que o sistema ainda mantinha elevada capacidade catalítica e rápida assimilação de substrato, possivelmente favorecida pela elevada concentração residual de enzimas ativas no meio e pela manutenção de biomassa viável após as sucessivas renovações parciais.

Após o terceiro corte, embora a velocidade de hidrólise permaneça elevada em 414,3 g/L·h, 40 minutos após o corte, observa-se redução relativa em comparação ao segundo corte, acompanhada por menor variação no perfil de sacarose e tendência de estabilização das concentrações de glicose e frutose. Esse comportamento sugere que, embora o sistema ainda apresentasse elevada atividade hidrolítica, a eficiência

metabólica global da cultura começava a declinar. Tal resultado está alinhado às discussões anteriores sobre aumento da demanda de manutenção celular e acúmulo de estresses ao longo das sucessivas bateladas.

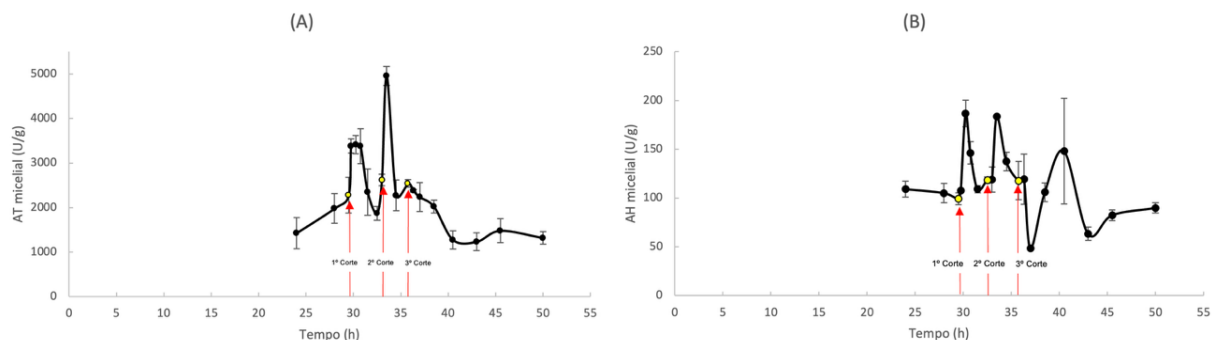
A Figura 50 apresenta os perfis das atividades miceliais de transfrutossilação (AT) e hidrolítica (AH) ao longo do cultivo submetido à estratégia de cortes sucessivos de 50%, o que permitiu avaliar como a renovação parcial do meio pode influenciar o metabolismo enzimático do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301. De maneira geral, os resultados evidenciam que as sucessivas bateladas promoveram forte reativação do sistema enzimático, porém acompanhada por instabilidade metabólica.

Inicialmente, observa-se aumento progressivo da AT (Figura 50A) atingindo um máximo de 2276 ± 400 U/g no momento do primeiro corte, refletindo a indução do sistema FTase pela elevada disponibilidade de sacarose durante a batelada inicial. Após o primeiro corte, a AT continua aumentando progressivamente e atinge um máximo médio de $AT_{\text{micelial máx}(1)} = 3390,9$ U/g, indicando que a biomassa manteve elevada atividade enzimática e rápida resposta à adição do substrato. Esse desempenho pode significar que ao iniciar outra batelada com células previamente adaptadas e metabolicamente ativas ajuda a reduzir o tempo para atingir valores máximos de AT quando comparado à batelada convencional iniciada a partir de inóculo com esporos.

Entretanto, após o segundo corte, observa-se o máximo global de atividade micelial, atingindo $4956,9 \pm 216,9$ U/g em 33,5 h, seguido por uma queda abrupta nos valores de AT e não se recuperando mais após o terceiro corte. Embora a renovação parcial do meio tenha promovido a indução enzimática, os sucessivos cortes provavelmente aumentaram o nível de estresse celular associado às mudanças constantes de composição do meio e variações na pressão osmótica.

A evolução da atividade hidrolítica (Figura 50B) apresentou um perfil semelhante, porém com amplitude relativa menor. Observa-se que os máximos de AH ocorrem próximos aos máximos de AT, entretanto, as oscilações nos valores de AT são mais intensas quando comparado a AH que tende a permanecer na maior parte do ensaio entre 80 e 180 U/g.

Figura 50 - Perfil das Atividades Transfrutossilação micelial (A) e Hidrolítica micelial (B) em 50 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 50%.



Fonte: Autora, 2026.

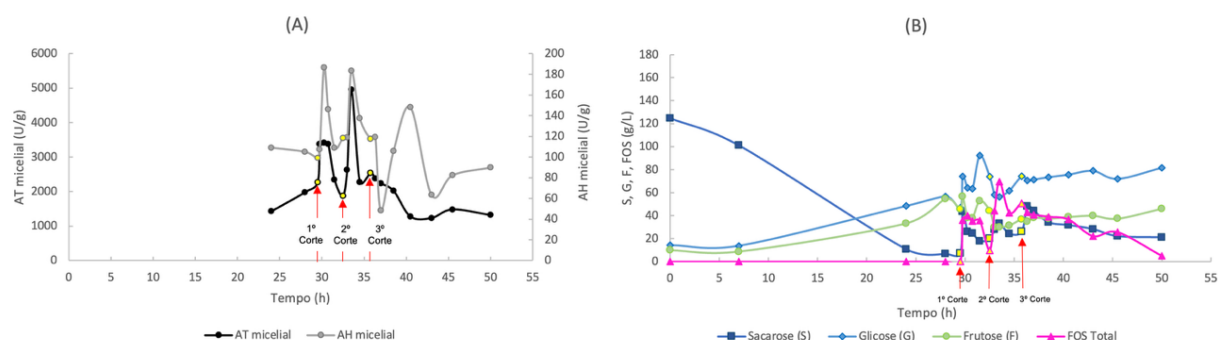
A Figura 51 integra os perfis das atividades miceliais de transfrutossilação (AT) e hidrolítica (AH) com a dinâmica de açúcares e formação de frutooligossacarídeos (FOS) ao longo do cultivo conduzido com estratégia de cortes sucessivos de 50%. A análise desses parâmetros evidencia forte interdependência entre disponibilidade de sacarose, equilíbrio entre AT/AH e estabilidade metabólica do sistema ao longo das sucessivas bateladas.

Durante a batelada inicial, observa-se consumo progressivo da sacarose acompanhado pelo aumento progressivo da AT e formação gradual de FOS, posterior ao primeiro corte realizado quando atinge 39,8 g/L em 30,3 h. Nesse intervalo, adição de novo meio faz com que a elevada disponibilidade de substrato favoreça atividade de transfrutossilação e a síntese de FOS e razão entre AT/AH = 18,3.

Após o segundo corte, há um aumento significativo na concentração de FOS, quando atinge um novo máximo de 69,4 g/L em 33,5 h. Esse incremento pode ser associado ao corte, reestabelecendo a concentração de sacarose, a presença de 50% de biomassa metabolicamente ativa e previamente induzida, e a razão de AT/AH = 27,0 favorável à transfrutossilação.

Após o terceiro corte, verifica-se redução de FOS indicando a possível hidrólise secundária de FOS previamente formados, evidenciada pelo acúmulo de glicose e frutose no meio.

Figura 51 - Atividades Transfrutossilação e Hidrolítica micelial (A) e o Perfil de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e FOS) em 50 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 50%.



Fonte: Autora, 2026.

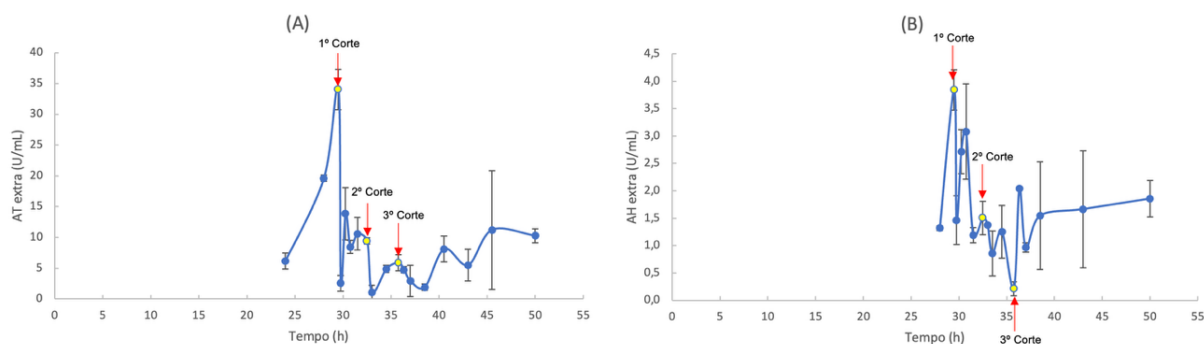
A Figura 52 apresenta os perfis das atividades extracelulares de transfrutossilação (AT_{extra}) e hidrolítica (AH_{extra}) ao longo do cultivo. De maneira geral, os resultados evidenciam que a fração extracelular respondeu de forma altamente sensível às perturbações operacionais impostas pelos cortes, apresentando oscilações.

Inicialmente, observa-se aumento progressivo da AT_{extra} até o primeiro corte, atingindo valor máximo de $34,0 \pm 3,3$ U/mL em 29,5 h (Figura 51A). Esse comportamento sugere que, durante a fase final da primeira batelada, ocorreu uma possível intensificação da secreção de FTase para o meio extracelular.

Entretanto, imediatamente após o primeiro corte, observa-se a diminuição acentuada tanto da AT_{extra} quanto da AH_{extra} . Esse comportamento está possivelmente relacionado à remoção de 50% do caldo fermentado, que promove não apenas redução da biomassa, mas também diluição significativa das enzimas previamente acumuladas no sobrenadante. Diferentemente das enzimas miceliais, que permanecem parcialmente associadas à biomassa residual, as enzimas extracelulares são diretamente impactadas pela retirada física do meio.

Após os cortes, os perfis de AT_{extra} e AH_{extra} tornam-se bastante oscilatórios, sem recuperação consistente dos máximos observados na primeira batelada. Esse comportamento sugere que as sucessivas renovações parciais comprometeram a estabilidade do processo secretório da cultura.

Figura 52 - Perfil das Atividades Transfrutoseilação extracelular (A) e Hidrolítica extracelular (B) em 50 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de 15 L em modo batelada alimentada em corte 50%.



Fonte: Autora, 2026.

Portanto, os resultados indicam que, a estratégia de cortes sucessivos pode ter comprometido a estabilidade da produção e acúmulo das enzimas extracelulares ao longo das bateladas, devido a retirada do meio fermentado. Diferentemente da atividade micelial, que apresentou uma recuperação parcial nas primeiras bateladas, a enzima extracelular mostrou-se mais sensível às perturbações operacionais ocasionadas pelos cortes.

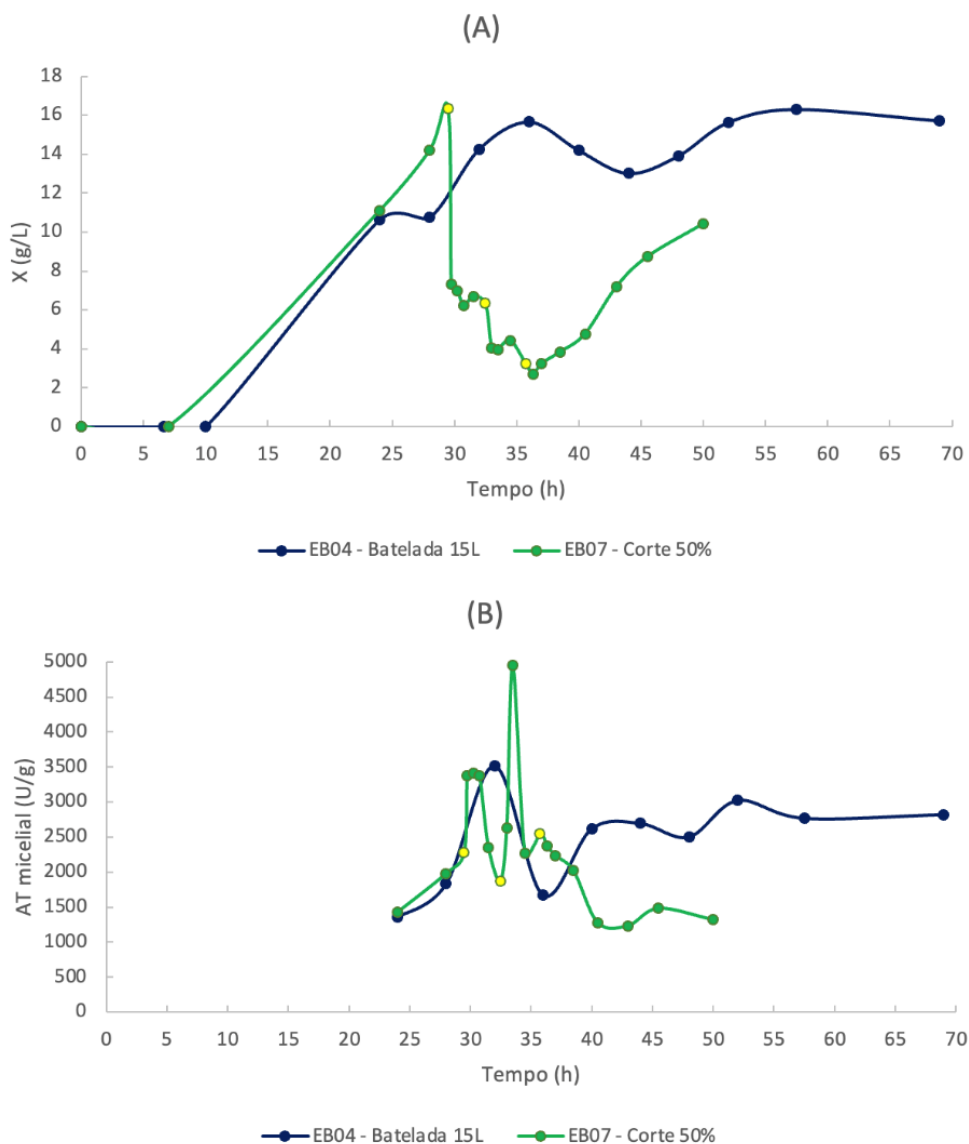
5.6.1. Batelada x batelada alimentada com corte 50% em reator de 15L (EB04 x EB07)

Os ensaios foram conduzidos em um biorreator de 15 L (Biorreator II), operado em modo batelada e batelada alimentada com estratégia de cortes sucessivos de 50% ao longo de 72 h e 50h, respectivamente. A Figura 53 apresenta a comparação entre os perfis de crescimento celular e atividade micelial de transfrutoseilação ($AT_{micelial}$) obtidos nos diferentes modos operacionais. A análise comparativa evidencia diferenças entre a estabilidade celular e na dinâmica de produção enzimática entre as estratégias.

No cultivo em batelada, observou-se crescimento celular progressivo e metabolicamente mais estável e contínuo, atingindo $X_{m\acute{a}x(EB04)} = 15,7$ g/L em 36h, seguido por uma estabilização da biomassa ao longo do tempo do cultivo (Figura 53A). Esse comportamento pode indicar maior equilíbrio metabólico e adaptação do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 às condições do processo. Consequentemente, a $AT_{micelial}$ também apresentou perfil mais constante, mantendo-

se predominantemente entre 2500 e 3000 U/g após o máximo inicial de $3514,2 \pm 119,6$ U/g, sugerindo maior estabilidade (Figura 53B).

Figura 53 - (A) Concentração Celular (X) e (B) Perfil da Atividade Transfrutossilção (AT) micelial ao longo do cultivo do microrganismo *Aspergillus oryzae* IPT-301 em modo batelada e batelada alimentada em corte 50% em reator de 15 L. Os pontos destacados representam o momento que foi feito os sucessivos cortes.



Fonte: Autora, 2026.

Enquanto, o cultivo conduzido com estratégia de cortes sucessivos de 50% apresentou comportamento relativamente mais oscilatório. Nesse ensaio, foi alcançado a $X_{\text{máx}}(\text{EB07}) = 16,3 \text{ g/L}$ em 29,5 h, seguido da primeira retirada de 50% o que causou uma grande redução da biomassa presente no meio. As oscilações observadas refletem o possível impacto da remoção recorrente de meio fermentado sobre a estabilidade celular.

Além disso, a estratégia de cortes sucessivos promoveu a intensificação transitória da atividade enzimática. Após os cortes, especialmente após o segundo corte em 32,5 h, a $AT_{micelial}$ atingiu um valor máximo de $4956,9 \pm 216,9$ U/g, representando um aumento de 41% quando comparado a batelada convencional. Esse comportamento demonstra que a renovação parcial do meio e a adição de sacarose possivelmente atuaram como forte estímulo metabólico para indução da FTase. A biomassa que restou no reator estava previamente adaptada e ativa respondendo rapidamente à adição de substrato, reduzindo o tempo necessário para ativação do sistema enzimático.

Entretanto, apesar dos elevados máximos quase que instantâneos de AT, o processo com cortes apresentou menor estabilidade global. Após os máximos observados, ocorreu queda acentuada da atividade enzimática, acompanhada por redução significativa da biomassa. Diferentemente da batelada, em que a AT permaneceu relativamente estável ao longo do tempo, inclusive em valores superiores aos reportados por Maiorano et al. (2020), em EB07 as sucessivas perturbações operacionais comprometeram a manutenção prolongada da atividade enzimática.

Esse comportamento sugere que a estratégia de cortes pode ter levado a um alto estresse celular, decorrente de mudanças repentinas na composição do meio, alterações na pressão osmótica e adição de sacarose em altas.

A análise comparativa dos parâmetros cinéticos e enzimáticos (Tabela 5) evidencia diferenças importantes entre o cultivo em batelada e a estratégia de cortes aplicada no EB07, demonstrando que a intensificação operacional alterou significativamente o balanço entre crescimento celular, indução enzimática e estabilidade metabólica do sistema FTase.

No cultivo em batelada convencional, a máxima atividade de transfrutossilação foi de $3514,2 \pm 205,5$ U/g em 32 h, acompanhada por baixa atividade hidrolítica ($AH = 119,6$ U/g) e elevada razão $AT/AH = 29,4$. Esse perfil indica um sistema altamente direcionado para transfrutossilação, favorecendo maior seletividade catalítica para síntese de FOS. Além disso, apresentou elevada atividade total de 50.123 U/L associada à produtividade de 109,8 U/g·h.

Tabela 5 - Parâmetros de produção enzimática de FTase em batelada (EB04) e batelada alimentada em corte 50% (EB07) em reator de 15 L, incluindo concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$), tempo para atingir a concentração celular máxima ($t_{X_{\text{máx}}}$), atividade máxima de transfrutossilação micelial ($AT_{\text{micelial máx}}$), tempo para atingir a atividade máxima de transfrutossilação micelial ($t_{AT_{\text{micelial máx}}}$), atividade hidrolítica micelial (AH_{micelial}), a razão entre as atividades de transfrutossilação e hidrolítica (AT/AH), produtividade da enzima micelial (P_{micelial}) e Atividade Total micelial (AT_{TOTAL}).

Ensaio	$X_{\text{máx}}$ (g/L)	$t_{X_{\text{máx}}}$ (h)	$AT_{\text{micelial máx}}$ (U/g)	$t_{AT_{\text{micelial máx}}}$ (h)	AH_{micelial} (U/g)	AT/AH	P_{micelial} (U/g.h)	AT_{TOTAL} (U/L)
Batelada 15L (EB04)	15,7	36	$3514,2 \pm 205,5$	32	119,6	29,4	109,8	50123
Batelada Inicial (EB07)	16,3	29,5	$2276,0 \pm 400,0$	29,5	99,3	22,9	77,2	37172
1º Corte (EB07)	6,7	31,5	$3413,2 \pm 207,5$	30,25	186,6	18,3	4550,9	23169
2º Corte (EB07)	4,4	34,5	$4956,9 \pm 216,9$	33,5	183,5	27,0	4956,9	19659
3º Corte (EB07)	10,4	50	$2377,2 \pm 32,7$	36,33	119,2	25,6	4075,3	6854

Fonte: Autora, 2026.

Na batelada inicial do EB07, no momento do corte, observa-se $AT_{\text{micelial máx}} = 2276,0 \pm 400,0$ U/g e a razão AT/AH para 22,9. Após o primeiro corte, ocorre um aumento expressivo em $AT_{\text{micelial máx}} (1) = 3413,2 \pm 207,5$ U/g no intervalo de 0,8 h após a renovação parcial do meio, esse curto período proporcionou uma produtividade extremamente elevada $P_{\text{micelial}} = 4550,9$ U/g.h). Esse comportamento evidencia forte resposta fisiológica da biomassa residual à adição de sacarose, indicando que as células remanescentes permaneceram metabolicamente ativas e previamente induzidas. A redução significativa do tempo necessário para atingir elevadas atividades demonstra possível intensificação cinética do processo.

Entretanto, esse aumento da atividade enzimática ocorreu acompanhado de elevação da AH o que ocasionou a redução da razão AT/AH para 18,3. Esse resultado pode indicar condição de estresse metabólico decorrente da renovação do meio e da elevada disponibilidade de sacarose após o corte.

No segundo corte, observa-se o maior valor absoluto de atividade enzimática do estudo, atingindo $AT_{\text{micelial máx}} (1) = 4956,9 \pm 216,9$ U/g em 33,5 h (1h após o segundo corte). Esse aumento pode reforçar o forte estímulo metabólico para indução da FTase. Além disso, a razão AT/AH aumenta para 27, indicando síntese de FOS. Entretanto, nesse momento a atividade total volumétrica continua reduzindo progressivamente, $AT_{\text{TOTAL}} = 19659$ U/L, evidenciando que o ganho específico não foi acompanhado pela manutenção da biomassa global no sistema. Esse resultado

demonstra que embora haja intensificação metabólica instantânea, ocorre a redução do total de enzima disponível no reator devido à retirada recorrente de caldo fermentado.

Após o terceiro corte, observa-se redução acentuada da $AT_{\text{micelial máx (3)}} = 2377,2 \pm 32,7$ U/g, assim como a diminuição da atividade total para apenas 6854 U/L. Embora a razão AT/AH permaneça relativamente elevada (25,6), o sistema demonstra clara perda de capacidade biossintética global. Esse comportamento sugere que os cortes passaram a comprometer a estabilidade, possivelmente devido ao acúmulo de estresse celular e aumento da demanda de manutenção metabólica.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de frutossiltransferase (FTase) por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em diferentes estratégias operacionais conduzidas em biorreator, incluindo cultivos em batelada, batelada alimentada em pulsos e batelada alimentada com cortes sucessivos. A análise integrada dos parâmetros cinéticos, fisiológicos e enzimáticos permitiu compreender de forma mais aprofundada a influência das condições operacionais sobre o crescimento celular, consumo de substrato, produção enzimática e formação de FOS, evidenciando a forte relação entre disponibilidade de sacarose, metabolismo celular e Atividades de Transfrutossilação e Hidrólise.

Os ensaios em batelada apresentaram maior estabilidade metabólica ao longo do cultivo, favorecendo o crescimento celular e a manutenção mais prolongada da atividade enzimática e elevadas razões AT/AH. Nessas condições, foram obtidos valores elevados de Atividade Total micelial, associados a crescimento contínuo e comportamento cinético mais previsível e estável. Além disso, os resultados obtidos foram superiores aos reportados previamente na literatura em condições semelhantes.

A estratégia de batelada alimentada em pulsos promoveu intensificação metabolismo celular, favorecendo a retomada da atividade celular e aumento significativo da síntese de FTase e intensificação na formação de FOS após as alimentações. A elevada disponibilidade de sacarose atuou como estímulo metabólico para indução do sistema enzimático, direcionando o metabolismo para Atividade de Transfrutossilação. Entretanto, os resultados também mostraram que o aumento da atividade enzimática e biomassa após os pulsos não foram superiores ao resultado obtido na batelada. Além disso, o acúmulo de glicose e frutose após os pulsos, associado às elevadas velocidades de hidrólise observadas, indica que parte significativa do substrato foi direcionada para manutenção celular e respostas adaptativas ao estresse osmótico, comportamento compatível com condições de elevada demanda energética metabólica.

Os ensaios realizados em cortes sucessivos demonstraram elevado potencial de intensificação cinética do processo fermentativo. A reutilização parcial da biomassa permitiu uma rápida reativação metabólica celular após renovação do meio, reduzindo o tempo de fase lag e favorecendo elevadas Atividade de Transfrutossilação

instantâneas, especialmente após o segundo corte da estratégia de 50%, no qual foi obtido o maior valor de $AT_{micelial}$ obtido no estudo, representando cerca de 41% superior ao máximo obtido na batelada. Entretanto, apesar da elevada produtividade, observou-se redução da estabilidade celular ao longo dos cortes, acompanhada por oscilações na biomassa, atividade enzimática, oxigênio dissolvido e acúmulo de metabólitos inibitórios. Esses resultados podem indicar que sucessivas perturbações do sistema podem comprometer a manutenção prolongada da capacidade biossintética da cultura.

Portanto, os resultados demonstram que a escolha da estratégia operacional depende do objetivo industrial. A batelada mostrou-se mais adequada para processos que demandam maior estabilidade metabólica, previsibilidade operacional e estabilidade da atividade enzimática ao longo do tempo. Em contrapartida, as estratégias de alimentação e cortes sucessivos apresentaram potencial para intensificação do processo, favorecendo a indução metabólica e elevada produtividade. Além disso, a remoção periódica do caldo fermentado favorece maior dinamismo operacional e potencial integração entre as etapas de *upstream* e *downstream*. Contudo, as oscilações observadas podem dificultar a padronização das etapas subsequentes de recuperação e purificação da enzima.

REFERÊNCIAS

- ANTOSOVÁ, M.; ILLEOVÁ, V.; VANDÁKOVÁ, M.; DRUZKOVSKÁ, A; POLAKOVIC, M. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, 135, 58 (2008).
- BELMONTE-IZQUIERDO, Y.; SALOMÉ-ABARCA, L. F.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J.C.; LÓPEZ, M. G. Fructooligosaccharides (FOS) Production by Microorganisms with Fructosyltransferase Activity. **Fermentation**, 9, 968, 2023.
- CAVINI, A. P. S. 2024. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas.
- CHEN, S.C.; SHEU, D.C.; DUAN, K.J. Production of fructooligosaccharides using β -fructofuranosidase immobilized onto chitosan-coated magnetic nanoparticles. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 45, 1105 (2014).
- CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 18, 153 (1996).
- CHIEN, C.S.; LEE, W.C.; LIN, T.J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, 29, 252 (2001).
- CHOUKADE, R.; KANGO, N. Production, properties, and applications of fructosyltransferase: a current appraisal. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2021. DOI: 10.1080/07388551.2021.1922352.
- CUERVO, R.; OTTONI, C. A.; SILVA, E. S.; MATSUBARA, R. M. M.; CARTER, J. M.; MAGOSS, L. R.; WADA, M. A. A.; RODRIGUES, M. F. A.; GUILARTE, B.; MAIORANO, A. E. Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 75, 87 (2007).
- CUNHA, J.S., OTTONI, C.A., MORALES, S.A.V., SILVA, E.S., MAIORANO, A.E., PERNA, R.F. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Braz J Chem Eng.** v. 36, p. 657-658, 2019.
- De la ROSA, O.; FLORES-GALLEGOS, A. C.; MUÑÍZ-MÁRQUEZ, D.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; TEIXEIRA, J. A.; NOBRE, C.; AGUILAR, C. N. Successive Fermentation of Aguamiel and Molasses by *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* to Obtain High Purity Fructooligosaccharides. **Foods** 2022, 11, 1786.
- DIAS, G. S.; VIEIRA, A. C.; BAIONI e SILVA, G.; SIMÕES, N.F.; MILESSI, T.S.; SARAIVA, L. S.; XAVIER, M. d. C. A.; LONGATI, A. A.; RODRIGUES, M. F. A.; FERNANDES, S.; *et al.* Fructooligosaccharides: A Comprehensive Review on Their Microbial Source, Functional Benefits, Production Technology, and Market

Prospects. **Processes** 2025, 13, 1252.

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

GANAI, M.A.; GUPTA, U.S. Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, 110, 253 (2014).

GONÇALVES, M.C.P., MORALES, S.A.V., SILVA, E.S., MAIORANO, A.E., PERNA, R.F., KIECKBUSCH, T.G. Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2020.

GRAND VIEW RESEARCH. **Prebiotics market size, share & growth report, 2026–2033**. 2026. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/prebiotics-market>. Acesso em: 19 jun. 2026.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. (coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 2. ed. v. 2. p. 93–122. São Paulo: Blucher, 2001.

MAIORANO, A. E. **Produção de pectinase por fermentação em estado sólido**. 1990. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

MAIORANO, A. E.; OTTONI, C. A.; FERNANDEZ, R. C.; SILVA, E. S.; PERNA, R. F.; PICCOLI, R. A. M.; MARESMA, B. G.; RODRIGUES, M. F. de A. Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor. **Springer Nature B.V.**, 2020.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. **Bioquímica básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

MORDOR INTELLIGENCE. **Tamanho e participação do mercado de frutooligossacarídeos - tendências de crescimento e previsão (2026 - 2031)** 2026. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/fructooligosaccharides-fos-market>. Acesso em: 19 jun. 2026.

MUSSATTO, S.I.; TEIXEIRA, J.A. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. **Biochemical Engineering Journal**, 53, 154 (2010).

OTTONI, C.A.; CUERVO, R.; PICCOLI, R.M.; MOREIRA, R.; MARESMA, B.G.; SILVA, E.S.; RODRIGUES, M.F.A.; MAIORANO, A.E. Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical**

Engineering, 29, 49 (2012).

PRADO, J.P.Z.; CUNHA, J.S.; BASSO, R.C.; SILVA, E.S.; MAIORANO, A.E.; PERNA, R.F. Obtenção da curva de crescimento do *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a produção de frutossiltransferase e monitoramento do pH do caldo de fermentação. In: SIMPÓSIO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 5, 2016, São José do Rio Preto. **Anais...** São José do Rio Preto: XI Brazilian meeting on chemistry of food and beverages, 2016. p. 1010-1016.

PRADO, J. P. Z., VIEIRA, A. C., MAIORANO, A. E., FERNANDES, S., BASSO, R. C., MAESTRELLI, S. C., OTTONI, C. A., XAVIER, M. C. A., MORALES, S. A. V., PERNA, R. F. 2026. **ACS Omega**. (1). 1.

ROMANO, N.; SANTOS, M.; MOBILI, P.; VEGA, R.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-oligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. **Food Chemistry**, 202, 467-475, 2016.

SALINAS, M. A.; PEROTTI, N. I. Production of fructosyltransferase by *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 in batch and two-step batch cultures. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 39–43, 2009. DOI: 10.1007/s10295-008-0470-2.

SÁNCHEZ, O.; GUIO, F.; GARCIA, D.; SILVA, E.; CAICEDO, L. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. *Food and Bioproducts Processing*, 86, 109 (2008).

ŠEDO VÁ M.; ILLEOVÁ V.; ANTOŠOVÁ M.; ANNUS J.; POLAKOVIČ M.; Produção de frutossiltransferase em biorreatores com agitação mecânica e air-lift. **Chem. Pap.** 68(12): p. 1639–1648, 2014.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, 19, 107 (1996).