IMOBILIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE MICROBIANA EM BAGAÇO DE CANA E SABUGO DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Rovilson J. Rocha[1], Richard S. Pereira[1], José P. Z. Prado[1], Sergio A. V. Morales[1,2], Rafael F. Perna[1], Melina S. Lopes[1]

[1] Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas - MG, Brasil (rovilson.rocha@sou.unifal-mg.edu.br)
[2] Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, Palmas – TO, Brasil

Frutosiltransferase foi imobilizada em resíduos agroindustriais visando obter um biocatalisador heterogêneo com atividade enzimática para a produção de FOS. A enzima foi produzida por cultivo submerso (30ºC, 200 rpm e 64 h) e sua imobilização (30ºC, 175 rpm, pH 5,5, 8 h) ocorreu em bagaço de cana e sabugo de milho, com rendimentos de 39 e 57 % e atividades recuperadas de 7,81 e 0,87 %, respectivamente. Portanto, os suportes devem ser funcionalizados para melhoria dos parâmetros de imobilização.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*; Frutosiltransferase; Imobilização; Bagaço de cana-de-açúcar; Sabugo de milho

INTRODUÇÃO

Frutosiltransferases (FTase, E.C. 2.4.1.9) são enzimas que apresentam altas atividades de transfrutosilação (Faria et al., 2021; Maiorano et al., 2020; Cunha et al., 2019). O fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 se destaca como fonte potencialmente produtora desse biocatalisador dentre diferentes cepas microbianas avaliadas (Cuervo Fernandez et al., 2007; Cuervo Fernandez et al., 2004).

A reação de transfrutosilação ocorre quando a FTase se conecta na posição β (2→1) da molécula de sacarose, clivando-a e separando o grupo frutosil do grupo glicosil. Por sua vez, o grupo frutosil se conecta a uma molécula aceptora, que pode ser a sacarose ou outra molécula de frutooligossacarídeo (FOS), produzindo um oligômero de frutose e liberando glicose no meio reacional (Maiorano et al. 2020; Flores-Maltos et al., 2018; Singh et al., 2017; Maiorano et al. 2008).

As moléculas de FOS são compostas por um grupo glicosil (G) e n grupos frutosil (F), com n podendo variar entre 1 e 4 (GF_1, GF_2, GF_3 e GF_4) (Flores-Maltos et al., 2018; Maiorano et al., 2008). Estes oligômeros de frutose têm se destacado nas indústrias farmacêutica e alimentícia, por se tratarem de açúcares prebióticos que proporcionam uma série de benefícios à saúde e nutrição humana, tais como aumento da flora bacteriana intestinal, redução dos níveis de colesterol e triglicérides, fortalecimento do sistema imunológico, redução de microrganismos patogênicos, auxílio no aumento da absorção de minerais, além de possuírem baixo valor calórico e serem não cariogênicos (Cunha et al., 201; Maiorano et al., 2008). Os FOS podem ser encontrados, em baixas concentrações, em alguns vegetais como trigo, banana, tomate, cebola, entre outros. Todavia, para a utilização comercial, sua produção ocorre mediante reação de transfrutosilação enzimática da sacarose (Maiorano et al., 2020; Singh et al., 2017).

A abundância de matéria-prima (sacarose), o alto valor agregado ao produto de interesse (FOS) e, principalmente, o potencial de mercado mundial de FOS, estimado em U$$ 3,88 bilhões com perspectiva de crescimento de 10,4 % entre os anos de 2021 a 2027, tornam a produção industrial atrativa para esse açúcar (Reports and Data, 2020). No entanto, os custos relacionados à produção enzimática e ao rendimento reacional continuam desafiadores frente ao escalonamento do processo. O uso de enzimas requer a recuperação e a reutilização destas para tornar o processo economicamente viável (Souza et al. 2017). A produção de FOS com FTase solúvel pode gerar altos custos de síntese e purificação da enzima, instabilidade da sua estrutura tridimensional quando isolada do seu ambiente natural e possível perda de atividade devido às condições do processo ou inibição pelo substrato ou produto. Além disso, as enzimas solúveis contaminam o produto desejado e não podem

ser recuperadas do meio reacional de forma ativa (Krajewska, 2004).

Portanto, a aplicação de FTases imobilizadas pode se tornar uma alternativa promissora frente às problemáticas levantadas. A imobilização consiste em confinar, física ou quimicamente, a enzima em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso ou solvente orgânico, obtendo-se um biocatalisador heterogêneo com elevada atividade, especificidade, seletividade e estabilidade (Dwevedi, 2016). Desta forma, a imobilização tem sido considerada a técnica mais promissora para tornar competitiva a aplicação de enzimas no setor industrial (Souza et al., 2017).

A aplicação de enzimas imobilizadas permite a obtenção de biocatalisadores heterogêneos mais robustos e resistentes às mudanças do ambiente reacional (aumento da estabilidade enzimática), sua reutilização e facilidade de separação do produto, além da possibilidade de implementar e conduzir processos contínuos (Souza et al., 2017; Sheldon, 2007).

Quanto aos possíveis materiais que podem atuar como suporte na imobilização enzimática, tem-se o sabugo de milho e o bagaço de cana-de-açúcar. Ambos são materiais orgânicos e com características hidrofóbicas (Queiroz et al., 2018). Por serem resíduos da indústria agrícola apresentam baixo custo e fácil acesso (Rocha et al., 2017).

No ano de 2020 cerca de 640 mil toneladas de cana-de-açúcar foram processadas no território nacional, com geração de um volume considerável de bagaço. Cada tonelada de cana-de-açúcar que entra na indústria sucroalcooleira gera cerca de 320 kg de bagaço (UNICA, 2020). O sabugo de milho também é um resíduo abundante da indústria agrícola nacional, representando 180 kg por tonelada de milho produzida (Rocha et al., 2017) tendo a colheita de milho atingido a marca de 100 mil toneladas no ano de 2020 (CONAB, 2020).

Ressalta-se ainda que o alto custo de suportes comerciais disponíveis motiva a busca por outros potenciais substitutos, dentre eles os suportes de resíduos agroindustriais lignocelulósicos, como serragem, palha, casca e palha de arroz, celulignina e resíduos fibrosos (fibra de coco ou mesmo o bagaço de cana-de-açúcar) (Brígida et al., 2008), assim como o sabugo de milho.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi imobilizar, por adsorção física, FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 nos suportes bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho para se obter um biocatalisador heterogêneo com atividade de transfrutosilação para a produção de FOS.

MATERIAL E MÉTODOS

PREPARO DOS SUPORTES

O bagaço de cana-de-açúcar foi doado pela Usina Monte Alegre – Adecoagro (Monte Belo, MG). O material foi submetido a peneiramento e a fração com granulometria entre 425-600 µm foi separada para os ensaios de imobilização. O sabugo de milho foi adquirido do Sítio Posses da Serra (Monte Belo, MG). O material foi triturado e a fração com granulometria entre 150-200 µm foi utilizada nos ensaios de imobilização. Ambos os suportes foram submetidos à secagem prévia em estufa a 60 °C por 24 h.

MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Cepas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP). A cepa foi cultivada em meio sólido contendo ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0 % ($m.v^{-1}$), glicerina (Isofar®) 2,5 % ($m.v^{-1}$), extrato de levedura (Synth®) 0,5 % ($m.v^{-1}$) e glicose (Dinâmica®) 2,5 % ($m.v^{-1}$) à 30 ºC por 7 dias em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371). Os esporos produzidos foram coletados por meio de raspagem utilizando alça de Drigalski e solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95 % (m/v) e Tween 80 - (Dinâmica®) 0,1 % (v/v). A suspensão de esporos obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isofar®) 20 % ($m.v^{-1}$) e sua concentração ajustada para $1x10^7$ esporos.mL^{-1}, seguido de armazenamento sob refrigeração a -12 °C (Cunha et al., 2019).

PRODUÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR

A FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 foi produzida por cultivo celular submerso em meio de cultura sintético, pH 5,5, constituído por: sacarose refinada comercial (União®) 15,0% ($m.v^{-1}$), extrato de levedura (Synth®) 0,5 % ($m.v^{-1}$), nitrato de sódio ($NaNO_3$) (Dinâmica®) 0,5 % ($m.v^{-1}$), fosfato monopotássico (KH_2PO_4) (Synth®) 0,2 % ($m.v^{-1}$), sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$) (Dinâmica®) 0,05 % ($m.v^{-1}$), cloreto de manganês tetra-hidratado ($MnCl_2.4H_2O$) (Synth®) 0,03 % ($m.v^{-1}$) e sulfato de ferro hepta-hidratado ($FeSO_4.7H_2O$) (Synth®) 0,001 % ($m.v^{-1}$). Foram distribuídos 50 mL do meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, vedados com algodão e esterilizados em autoclave à 120°C e 1,0 atm, por 15 min. Foram inoculados 0,5 mL da suspensão de esporos (1×10^7 esporos mL^{-1}) no meio de cultura e o cultivo foi conduzido em agitador orbital do tipo Shaker (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm por 64 horas (Faria et al. 2021; Cunha et al. 2019). Posteriormente, o conteúdo total dos frascos Erlenmeyer foi filtrado à vácuo (filtro membrana em éster de celulose, 0,45 µm) e o permeado, contendo a

enzima FTase extracelular, foi utilizado para os ensaios de imobilização.

ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO

Para os ensaios de imobilização, adicionou-se 20 mL de caldo fermentado (permeado) em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 0,5 g dos suportes bagaço-de-cana ou sabugo de milho. A imobilização foi conduzida em Banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) por um período de 8 h a 175 rpm, pH 5,5 e à 30 ºC. Para o monitoramento da atividade enzimática, foram extraídas alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante de cada frasco Erlenmeyer para os tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 h do processo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Ao término da imobilização, as amostras foram filtradas a vácuo e o derivado obtido (biocatalisador heterogêneo) foi submetido a ensaio de atividade enzimática para se avaliar os parâmetros de imobilização.

ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As atividades enzimáticas de transfrutosilação (A_t) foram obtidas conforme procedimento descrito por Faria et al. (2021) e Cunha et al. (2019).

Especificamente, 0,1 mL de enzima solúvel (caldo fermentado) ou 0,50 g da enzima imobilizada (biocatalisador heterogêneo) foi incubado com 3,7 mL de solução de sacarose 63,6 % (m.v^{-1}) e 1,2 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol L^{-1}, pH 5,5. A reação foi conduzida em banho Dubnoff (marca Bunker®, modelo NI 1232) a 50 ºC, 190 rpm por 1 h e interrompida pela imersão do meio reacional em água em ebulição por 10 min, seguido por resfriamento em banho com água e gelo por 5 min para inativação enzimática. Posteriormente, o meio reacional foi filtrado à vácuo e as concentrações de açúcares redutores (AR) e glicose (G) foram determinadas. A atividade A_t das enzimas solúvel e imobilizada foram calculadas pelas Equação (1) e (2), respectivamente.

$$A_t = \frac{[F_T].V_R}{V_{enzima}.t_R} \quad (1)$$

$$A_t = \frac{[F_T].V_R}{m_s.t_R} \quad (2)$$

em que $[F_T]$ é a concentração molar de frutose transfrutosilada (em µmol L^{-1}), V_R é o volume do meio reacional (em L), V_{enzima} é o volume de caldo fermentado (em mL), m_s é a massa seca de suporte (em g) e t_R é o tempo de reação (em min).

Uma unidade (1U) de atividade de transfrutosilação foi definida como a quantidade de enzima que transfere um micromol (1 µmol) de frutose (F_T) por minuto, sob as condições experimentais estabelecidas (Faria et al. 2021; Gonçalves et al. 2020; Cunha et al. 2019; Garcia et al. 2018).

QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES

A concentração dos açúcares redutores [AR], presentes no meio reacional, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), adaptado de Miller (1959), conforme descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013). A quantificação dos AR foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 0,5 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 0,5 mL da solução DNS, previamente preparada. A reação foi conduzida em banho termostatizado a 100 ºC por15 min e interrompida por resfriamento em banho com água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 4,0 mL de água destilada. Posteriormente, triplicatas de alíquotas do meio reacional foram analisadas em espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) a 540 nm para leitura de absorbância e determinação das concentrações de [AR].

A concentração de glicose [G], presente no meio reacional, foi determinada pelo método GOD-PAP®. A quantificação de glicose foi realizada pela adição, em um tubo de ensaio, de 10 µL de amostra, obtida da reação enzimática, em 1,0 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (marca Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min. Posteriormente, triplicatas de alíquotas do meio reacional foram analisadas em espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) a 505 nm para leitura de absorbância e determinação das concentrações de [G].

As concentrações de frutose liberada [F] e frutose transferida (transfrutosilada) [F_T] no meio reacional foram calculadas pelas Equações (3) e (4), respectivamente (Faria et al. 2021; Gonçalves et al. 2020; Cunha et al., 2019; Chen e Liu, 1996).

$$[F] = [AR] - [G] \quad (3)$$

$$[F_T] = [G] - [F] \quad (4)$$

PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO

O rendimento de imobilização (R_I) e a atividade recuperada (A_R) foram calculados pelas Equações (5) e (6), respectivamente (Faria et al., 2021; Morales et al. 2020; Ramos et al. 2015).

$$R_I\ (\%) = \frac{A_{ti} - A_{tf}}{A_{ti}}\ x\ 100 \quad (5)$$

$$A_R\ (\%) = \frac{A_{tD}}{A_{ti} - A_{tf}}\ x\ 100 \quad (6)$$

em que A_{ti} e A_{tf} são as atividades de transfrutosilação do sobrenadante (em U) antes e após a imobilização; e A_{tD} é a atividade de transfrutosilação do derivado (complexo enzima-suporte) (em U).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imobilização da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho foi avaliada por meio da obtenção dos perfis cinéticos de adsorção da enzima à 30 ºC, 175 rpm e pH 5,5. Os resultados estão dispostos na Figura 1.

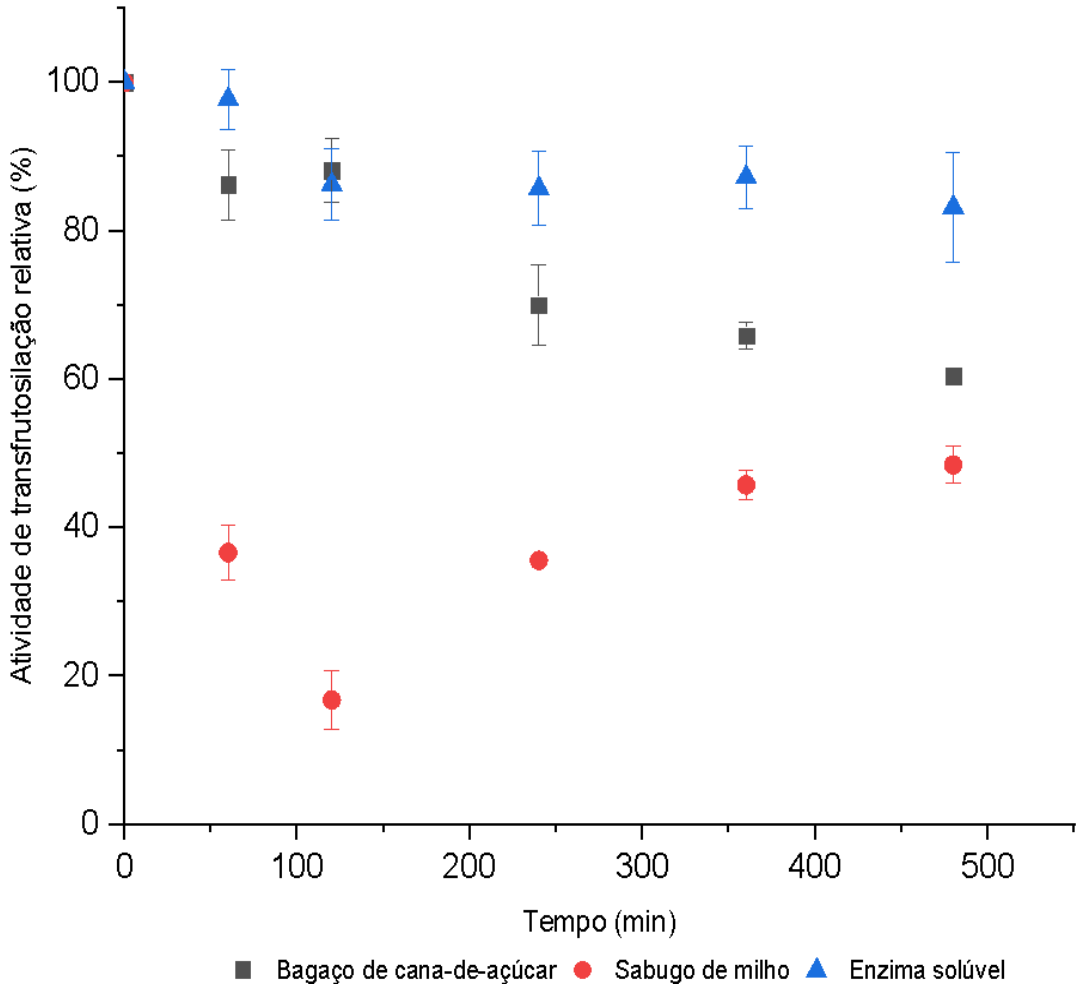


Figura 1. Perfis cinéticos de adsorção em função da atividade de transfrutosilação (A_T) para as enzimas FTase extracelular *de A.* oryzae IPT-301 imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho. Ensaios conduzidos a 30°C, 175 rpm e pH de 5,5. A máxima atividade enzimática (16,81 ± 0,46 U.mL^{-1}) foi definida como 100 % da atividade relativa.

Os perfis cinéticos de adsorção (Figura 1), descrevem o comportamento da atividade de transfrutosilação (A_t) da enzima solúvel presente no sobrenadante. Pela análise destes perfis, foi possível observar uma redução da A_t relativa ao decorrer dos ensaios de imobilização.

Sabe-se que a FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresenta, naturalmente, decaimento A_t com o passar do tempo (Cunha et al. 2019). Portanto, assim como previsto, o valor de A_t da FTase solúvel, ao final de 8 h de imobilização, foi menor que a observada no início do processo (16,81 ± 0,46 U.mL^{-1}). Este decaimento foi relativamente baixo, tendo a atividade de transfrutosilação estabilizado em torno de 83 %, correspondente a 13,99 ± 0,41 U mL^{-1}. Faria et al. (2021) e Cunha et al. (2019) reportaram a termoestabilidade da enzima solúvel à 30 ºC, o que corrobora com a baixa queda de atividade de transfrutosilação observada. A perda da atividade enzimática pode ocorrer pelo fato de a enzima solúvel estar exposta diretamente às condições do ambiente reacional por um longo período de tempo, sem a devido proteção (Faria et al. 2021).

Notou-se, contudo, maiores decaimentos nos valores de A_t da FTase extracelular oriunda das alíquotas de sobrenadante que estavam em contato com os respectivos suportes, apontando que houve a adsorção da enzima no bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho avaliados.

Os maiores decaimentos da atividade de transfrutosilação foram observados para o sabugo de milho, indicando uma maior afinidade da enzima com este suporte, quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar. Outro ponto condizente com a questão da afinidade enzimática é a alta taxa de decaimento da atividade de transfrutosilação em 2h de imobilização, para o sabugo de milho. Esta alta taxa de decaimento na atividade enzimática em um curto intervalo de tempo pode estar relacionada a uma alta afinidade da enzima por este suporte (Souza et al. 2017).

Quanto à taxa de imobilização enzimática, o decaimento da A_t relativa proveniente da curva de adsorção da FTase no bagaço de cana-de-açúcar foi menor, mais lento e gradual. Notou-se que, para este suporte, o processo de imobilização ocorreu ao decorrer de 8 h de ensaio.

Os dados obtidos dos ensaios de imobilização permitiram calcular os valores para os parâmetros: a) rendimentos de imobilização (R_I) e b) atividade recuperada (A_R). Os resultados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de imobilização da FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 em diferentes suportes orgânicos.

Suporte	Rendimento de imobilização (R_I) (%)	Atividade recuperada (A_R) (%)
Bagaço de cana	39,57 ± 1,27	7,81 ± 0,41
Sabugo de milho	51,53 ± 5,61	0,87 ± 0,27

O R_I expressa o percentual de enzima adsorvida na superfície do suporte relacionando as atividades enzimáticas no início e no final do ensaio de imobilização., ao passo que A_R define a relação entre as atividades de transfrutosilação aparente do derivado (biocatalisador heterogêneo) e a desaparecida no decorrer do ensaio de imobilização. Ambos os parâmetros são essenciais para a análise da eficiência dos suportes para a imobilização da enzima (Souza et al. 2017).

A imobilização utilizando o sabugo de milho como suporte foi mais eficiente, com R_I de 51,53 ± 5,61 %, estando de acordo com o que foi observado nos perfis cinéticos de imobilização (maior decaimento de A_t relativa ao final do ensaio de imobilização). No bagaço de cana-de-açúcar, o valor de R_I foi de 39,57 ± 1,27 %, comprovando que, para a imobilização da FTase, este suporte tona-se menos eficiente que o sabugo de milho.

Ao mesmo tempo que o sabugo de milho apresentou um maior rendimento de imobilização, a sua atividade recuperada foi menor que a obtida utilizando bagaço de cana-de-açúcar como suporte (0,87 ± 0,27 %). Independente dos valores absolutos, ambas as atividades recuperadas apresentaram valores relativamente baixos.

Os resultados de A_R obtidos podem estar relacionados ao fato de os suportes *in natura* não terem sido previamente funcionalizados para a ativação de suas superfícies. A imobilização por adsorção física costuma ser mais simples, menos dispendiosa e proporcionar pouca alteração na estrutura tridimensional da enzima, haja vista que a enzima é imobilizada em uma orientação preferencial e energeticamente favorável, quando comparada à imobilização por ligação covalente (Souza et al. 2017). No entanto, a imobilização por ligação covalente, que consiste na ligação da enzima ao suporte por ligações covalentes, propicia o surgimento de ligações mais intensas entre a superfície do suporte e a enzima do que as resultantes de um processo de imobilização por adsorção física. Por envolver vários pontos de contato entre a enzima e a superfície suporte ocorre um aumento na rigidez de sua estrutura (Souza et al. 2017); Canilha; Carvalho, 2006). Por consequência da intensidade da energia de ligação, pode ter ocorrido a dessorção da enzima, ocasionando perda na atividade de transfrutosilação do biocatalisador imobilizado e, consequentemente, menor atividade recuperada.
A imobilização enzimática pode produzir diferentes efeitos na atividade e na seletividade do biocatalisador. Se houver interações múltiplas entre a enzima e o suporte, pode ocorrer distorção na estrutura conformacional da proteína e até mesmo bloqueio dos sítios ativos. Outros pontos a serem levantados com relação aos resultados obtidos para os parâmetros de imobilização envolvem: o impedimento estérico; a saturação dos suportes *in natura*, devido à sua natureza; as limitações difusionais, pois o diâmetro dos poros do material do suporte pode afetar negativamente a transferência de massa, tanto do substrato quanto do produto. Todos estes fatores podem ser determinantes na atividade enzimática do biocatalisador produzido, podendo ocasionar a perda da atividade catalítica durante o processo de imobilização (Souza et al. 2017).

Apesar de ter sido observado maior rendimento de imobilização no sabugo de milho e de se esperar que o biocatalisador produzido a partir deste suporte apresentasse uma atividade recuperada maior, alguns dos efeitos anteriormente citados podem ter sido mais predominantes neste biocatalisador heterogêneo, ocasionando uma maior perda na atividade catalítica, quando comparada aos resultados obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a enzima FTase extracelular de *A. oryzae* IPT-301 foi adsorvida nos suportes sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram rendimentos de imobilização iguais a 39 e 57 % e atividades recuperadas de 7,81 e 0,87 %, para a imobilização em bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho, respectivamente. Os resultados sugerem a necessidade de se funcionalizar a superfície dos suportes para se buscar maiores valores de parâmetros de imobilização e se obter, portanto, biocatalisadores heterogêneos com elevada atividade de transfrutosilação.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 421540/2018-4) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP) pelo fornecimento da cepa microbiana.

REFERÊNCIAS

BRÍGIDA, Ana et al. Immobilization of Candida antarctica lipase B by adsorption to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. L.], v. 146, n. 1–3, p. 173–187, 2008. DOI: 10.1007/s12010-007-8072-4.

CANILHA, Larissa; CARVALHO, Walter de. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, [S. L.], v. 9, n. 36, p. 48–57, 2006.

CHEN, Wen Chang; LIU, Chi Hsien. Production of β-fructofuranosidase by Aspergillus japonicus. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. L.], v. 18, n. 2, p. 153–160, 1996. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00099-2.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira - CAFÉ**. 3. ed. Brasília: Observatório Agrícola, 2020. v. 8

CUERVO FERNANDEZ, Rubén et al. Screening of β-fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. L.], v. 75, n. 1, p. 87–93, 2007. DOI: 10.1007/s00253-006-0803-x.

CUERVO FERNANDEZ, Rubén et al. Production of fructooligosaccharides by β-fructofuranosidase from Aspergillus sp 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. L.], v. 79, n. 3, p. 268–272, 2004. DOI: 10.1002/jctb.967.

CUNHA, Josivan S. et al. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from A*spergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [S. L.], v. 36, n. 02, p. 657–668, 2019. DOI: 10.1590/0104-6632.20190362s20180572. Disponível em: www.abeq.org.br/bjche.

DE LA ROSA, Orlando et al. Fructooligosaccharides production from agro-wastes as alternative low-cost source. **Trends in Food Science and Technology**, [S. L.], v. 91, p. 139–146, 2019. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.06.013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.013.

DWEVEDI, Alka. **Enzyme immobilization: Advances in industry, agriculture, medicine, and the environment**. 1. ed. New Delhi: Springer, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-41418-8.

FARIA, Larissa Lemos et al. Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, [S. L.], v. 43, n. 1, p. 43–59, 2021. DOI: 10.1007/s10529-020-03016-7.

FLORES-MALTOS, Solange et al. *In*: **Green Bio-processes**. Singapore: Springer, 2019. p. 345–355. DOI: 10.1007/978-981-13-3263-0. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3263-0.

GONÇALVES, Maria Carolina et al. Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from Aspergillus oryzae IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. L.], v. 95, n. 9, p. 2473–2482, 2020. DOI: 10.1002/jctb.6429.

KRAJEWSKA, Barbara. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. L.], v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.

MAIORANO, Alfredo Eduardo et al. Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of Aspergillus oryzae IPT-301 in stirred tank bioreactor. **Biotechnology Letters**, [S. L.], v. 42, n. 12, p. 2619–2629, 2020. DOI: 10.1007/s10529-020-03006-9.

MAIORANO, Alfredo Eduardo et al. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**, [S. L.], v. 30, n. 11, p. 1867–1877, 2008. DOI: 10.1007/s10529-008-9793-3.

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [S. L.], v. 31, n. 3, p. 426–428,

1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MORALES, Sergio Andres Villalba et al. Ciências Biológicas Realidades e Virtualidades. *In*: OLIVEIRA, Antonella Carvalho de (org.). **Ciências biológicas: realidades e virtualidades**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020. v. 3, p. 56–67. DOI: DOI 10.22533/at.ed.5182005116

QUEIROZ, Monna Lisa et al. Immobilization of horseradish peroxidase on sugarcane bagasse. **Quimica Nova**, [S. L.], v. 41, n. 9, p. 1019–1024, 2018. DOI: 10.21577/0100-4042.20170279. Disponível em: http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170279.

RAMOS, Elisa Z. et al. Production and immobilization of Geotrichum candidum lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. L.], v. 118, p. 43–51, 2015. DOI: 10.1016/j.molcatb.2015.05.009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.009.

REPORTS AND DATA. **Fructooligosaccharides (FOS) Market Analysis, 2019-2027**. 2020. Disponível em: https://www.reportsanddata.com/report-detail/fructo-oligosaccharides-fos-market. Acesso em: 3 abr. 2021.

ROCHA, Martha Suzana Rodrigues dos Santos; ALMEIDA, Renata Maria Rosas Garcia; DA CRUZ, Antonio José Gonçalves. Avaliação Do Potencial Energético De Resíduos Agroindustriais Provenientes De Diferentes Regiões Brasileiras. **Engevista**, [S. L.], v. 19, n. 1, p. 217, 2017. DOI: 10.22409/engevista.v19i1.821.

SHELDON, Roger A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, [S. L.], v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007. DOI: 10.1002/adsc.200700082.

SOUZA, Lívia Tereza de Andrade et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Blücher Editora, 2017. Vol. 4, capítulo 15, p. 529-568.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-Açúcar**. 2020. Disponível em: https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/acucar/. Acesso em: 26 dez. 2020.

VASCONCELOS, Natália Moura de; PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra; ARAGÃO, Fernando Antônio de Souza. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. **Embrapa**, [S. L.], v. 88, p. 1679–6543, 2013.