Anais do I WENDEQ - Trabalho Completo
I Web Encontro Nacional de Engenharia Química
Evento Online - 05 a 09 de julho de 2021

INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 NA ATIVIDADE DE FRUTOSILTRANSFERASE

Beatriz M. Ribeiro[1], Rovilson J. Rocha[1], Melina S. Lopes[1], Alfredo E. Maiorano[2], Sergio A. V. Morales[1,3], Rafael F. Perna[1]

[1] Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas - MG, Brasil (beamenossi@hotmail.com)
[2]Laboratório de Biotecnologia Industrial, Centro de Bionanomanufatura, Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/SP), São Paulo – SP, Brasil
[3]Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, Palmas – TO, Brasil

Um delineamento de *Plackett & Burman* foi aplicado para se avaliar a influência das variáveis de imobilização, por reticulação, na atividade de frutosiltransferase (A_T) de células íntegras de *A. oryzae* IPT-301. Como variáveis significativas, foram selecionadas a velocidade de agitação e a concentração de glutaraldeído, com maior A_T alcançado (447 U/g) a 150 rpm e 1,6 % (v/v) de agente reticulante. Os resultados indicaram as variáveis que devem ser otimizadas para estudos futuros de reticulação.

Palavras-chave: Frutosiltransferase; *Aspergillus*; Células íntegras*;* Imobilização; Plackett & Burman.

INTRODUÇÃO

Frutosiltransferases (FTase, EC 2.4.1.9) são enzimas que catalisam reações de transfrutosilação em moléculas de sacarose para a produção de oligômeros de frutose, denominados frutooligossacarídeos (FOS) (Antosová e Pokovic, 2001; Antosová et al. 2008; Ganaie et al., 2014). As FTases atuam na ligação β (2→1) das moléculas do substrato formando, principalmente, 1-kestose (GF_2), 1-nistose (GF_3) e 1-β-frutofuranosil nistose (GF4) (Yun, 1996). As células íntegras microbianas, contendo FTase, possuem atividade de transfrutosilação (Nobre et al. 2018; Sheu et al. 2013). Estudos realizados por Cuervo-Fernandez et al. (2007) mostraram que a FTase presente nas células microbianas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresentou maior atividade de transfrutosilação e, portanto, um maior potencial para a produção de FOS, entre as dezessete cepas de fungos filamentosos investigadas.

Apesar da alta atividade de transfrutosilação, o uso de células íntegras *in natura* com atividade de FTase apresenta algumas desvantagens no que diz respeito a suas estabilidades (Ganaie et al., 2014). No entanto, estudos envolvendo a imobilização dessas células microbianas, por reticulação, têm permitido um aumento expressivo em suas estabilidades térmica e operacional (Ganaie et al., 2014; Huang et al., 2016), tornando-se uma importante ferramenta no processo biocatalítico envolvendo a transfrutosilação da sacarose (Garcia et al., 2018).

A imobilização é considerada uma das técnicas mais promissoras para alterar a especificidade, seletividade, atividade e estabilidade enzimática e, geralmente, pode ser aplicada para viabilizar a reutilização do biocatalisador por vários ciclos reacionais (Guisan, 2013). Dentre as diferentes técnicas de imobilização reportadas na literatura, a reticulação tem a vantagem de utilizar a própria estrutura celular como suporte, eliminando a etapa de extração da enzima e evitando o uso de materiais externos que podem ocasionar restrições difusionais (Krasňan et al., 2016).

A reticulação de células íntegras consiste na formação de um aglomerado celular, de forma natural ou induzida por agentes químicos que promovam ligações cruzadas entre as células, conhecidos como agentes de reticulação ou *cross-linking*. Entre os agentes químicos utilizados, o glutaraldeído se destaca por ser bifuncional e apresentar baixo custo (Mendes et al., 2011; Souza et al., 2017). Especificamente, a reticulação permite obter células microbianas catalíticas mais resistentes e estáveis perante agentes desnaturantes (calor, solventes orgânicos e pH extremos), além de minimizar o fenômeno de dessorção da enzima aderida à célula e possibilitar o seu uso em diferentes configurações de reatores (Souza et al., 2017).

A imobilização utilizando glutaraldeído pode ser aplicada para diversas enzimas, em uma larga faixa de condições de processo (López-Gallego et al., 2005). Garcia (2018) ao estudar a reticulação com glutaraldeído de células íntegras de *A. oryzae* IPT-301, obteve tanto o aumento das estabilidades térmica e operacional quanto a preservação da atividade de transfrutosilação por até 12 ciclos consecutivos de reação, reportando o uso potencial do biocatalisador produzido para a obtenção de FOS para processos em diferentes configurações de reatores enzimáticos.

Diversos fatores devem ser investigados para garantir que a reticulação seja bem sucedida, tais como as concentrações de células íntegras catalíticas e de glutaraldeído, além do pH, temperatura e a velocidade de agitação envolvidos no processo de imobilização (Garcia et al., 2018). Portanto, um dos métodos mais indicados para se investigar, de maneira sinérgica e simultânea, a influência das variáveis envolvidas em um determinado processo refere-se a estudos de planejamento experimental (Montgomery et al, 2013; (Rodrigues e Iemma, 2014).

Há disponível uma grande variedade de estratégias que podem ser adotadas para a execução de um planejamento experimental, cada qual com a sua especificidade (Camorim et al., 2014). Os projetos que envolvem o delineamento de *Plackett & Burman* requerem um número reduzido de ensaios e geralmente proporcionam melhores resultados do que um planejamento fracionado (Rodrigues e Iemma, 2014). Trata-se de um método que foi desenvolvido para evitar o planejamento fatorial completo em situações nas quais o número de fatores é tão grande que o procedimento padrão é impraticável (Plackett e Burman, 1946).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi aplicar um delineamento de *Plackett & Burman* para se avaliar a influência das variáveis de imobilização (pH, temperatura, velocidade de agitação e concentração de glutaraldeído) na atividade de frutosiltransferase (transfrutosilação) de células íntegras reticuladas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para a produção de FOS.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Sacarose P.A., extrato de levedura, KH_2PO_4, $MnCl_2.4H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$ foram adquiridos da Labsynth® (Diadema, Brasil). Borohidreto de sódio foi obtido da Neon (Suzano, Brasil). Glicerina foi adquirida da Isofar® (Duque de Caxias, Brasil). Solução de Glutaraldeído 25 % em água, Glicose, $NaNO_3$, $MgSO_4.7H_2O$, NaCl e Tween-80 foram obtidos da Dinâmica® (Diadema, Brasil). Ágar batata dextrose foi adquirido da Kasvi® (São José dos Pinhais, Brasil) e o kit enzimático GOD-PAP, para determinação de glicose, foi fornecido pela Laborlab® (Campinas, Brasil).

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 2,0 % ($m.v^{-1}$), glicerina 2,5 % ($m.v^{-1}$), extrato de levedura 0,5 % ($m.v^{1}$) e glicose 2,5 % ($m.v^{1}$) a 30 ºC por 7 dias. A suspensão de esporos obtida foi homogeneizada com solução de glicerina 20 % ($m.v^{-1}$) e sua concentração ajustada para 1 x 10^7 esporos.mL^{-1}, seguido de armazenamento sob refrigeração a -12 °C (Cunha et al., 2019).

PRODUÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS

Células íntegras microbianas, com atividade de frutosiltransferase (transfrutosilação), foram produzidas por cultivo submerso em agitador orbital do tipo *shaker* a 30 ºC e 200 rpm durante 64 h de processo. Foram inoculados 500 µL de suspensão de esporos (1 x 10^7 esporos. mL^{-1}) de *A. oryzae* IPT-301 em 50 mL de meio de cultura sintético, pH 5,5, constituído por (em %, $m.v^{-1}$): sacarose P.A. 15,0, extrato de levedura 0,5, $NaNO_3$ 0,5, KH_2PO_4 0,2, $MgSO_4.7H_2O$ 0,05, $MnCl_2.4H_2O$ 0,03 e $FeSO_4.7H_2O$ 0,001. Ao término do cultivo, o meio de cultura foi filtrado à vácuo e as células íntegras produzidas (torta retida no papel) foram armazenadas sob refrigeração a 4 ºC para posterior ensaios de planejamento experimental.

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Um planejamento experimental do tipo Delineamento *Plackett & Burman* foi aplicado para a seleção das variáveis significativas no processo de imobilização das células íntegras microbianas por reticulação, cuja matriz de experimentos foi elaborada com o auxílio do software Protimiza Experimental Design®. Foram realizados 16 ensaios (Tabela 1) com 4 repetições no ponto central para o estudo de quatro fatores (pH, temperatura, velocidade de agitação e concentração de glutaraldeído), cada um constituído por três níveis. Os níveis foram definidos de acordo com resultados obtidos por Gonçalves et al. (2020); Cunha et al. (2019) e Garcia et al. (2018). Como variável resposta, avaliou-se a atividade de frutosiltransferase (transfrutosilação) das células íntegras reticuladas (em U/g).

Tabela 1. Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais para as variáveis de imobilização

Ensaio	pH	Temperatura (ºC)	Velocidade de agitação (rpm)	Concentração de glutaraldeído (%, v.v^{-1})
	X_1	X_2	X_3	X_4
1	8,5 (1)	15 (-1)	250 (1)	1,6 (-1)
2	8,5 (1)	35 (1)	150 (-1)	2,6 (1)
3	6,5 (-1)	35 (1)	250 (1)	1,6 (-1)
4	8,5 (1)	15 (-1)	250 (1)	2,6 (1)
5	8,5 (1)	35 (1)	150 (-1)	2,6 (1)
6	8,5 (1)	35 (1)	250 (1)	1,6 (-1)
7	6,5 (-1)	35 (1)	250 (1)	2,6 (1)
8	6,5 (-1)	15 (-1)	250 (1)	2,6 (1)
9	6,5 (-1)	15 (-1)	150 (-1)	2,6 (1)
10	8,5 (1)	15 (-1)	150 (-1)	1,6 (-1)
11	6,5 (-1)	35 (1)	150 (-1)	1,6 (-1)
12	6,5 (-1)	15 (-1)	150 (-1)	1,6 (-1)
13	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)
14	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)
15	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)
16	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)

ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS COM GLUTARALDEÍDO

Os ensaios de imobilização das células íntegras foram realizados de acordo com a adaptação dos métodos descritos por Gonçalves et al. (2020) Garcia (2018), Vescovi et al. (2016) e Sun et al. (2010). Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 1,5 g de células íntegras (biomassa úmida) filtrada à vácuo, oriunda do cultivo celular. Posteriormente, adicionou-se solução aquosa de glutaraldeído 25 % (v.v^{-1}), previamente dissolvida em solução tampão tris-acetato 0,2 mol L^{-1}, totalizando um volume reacional de 150 mL. A reação de imobilização foi conduzida por 60 minutos em agitador orbital do tipo *shaker* (Tecnal®, modelo TE-4200) e cessada, por mais 30 minutos, pela adição de 1,5 mL de borohidreto de sódio ($NaBH_4$) 100 g.L^{-1}, previamente dissolvido em solução 1 x 10^{-3} mol L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH). As variáveis de imobilização envolvidas na reação (pH, temperatura, velocidade de agitação e concentração de glutaraldeído), foram definidas de acordo com a matriz de experimentos (Tabela 1) gerada a partir do delineamento de *Plackett & Burman*.

Ao término da reação de imobilização, a suspensão resultante foi filtrada à vácuo e as células íntegras reticuladas (Figura 1) foram lavadas abundantemente com água destilada e preservadas sob refrigeração a 4 ºC em tampão tris-acetato 0,2 mol L^{-1} pH 5,5 para a realização dos ensaios de atividade enzimática.

ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As atividades enzimáticas de transfrutosilação (A_T) foram obtidas conforme procedimento descrito por Gonçalves et al. (2020), Cunha et al. (2019) e Garcia et al. (2018).

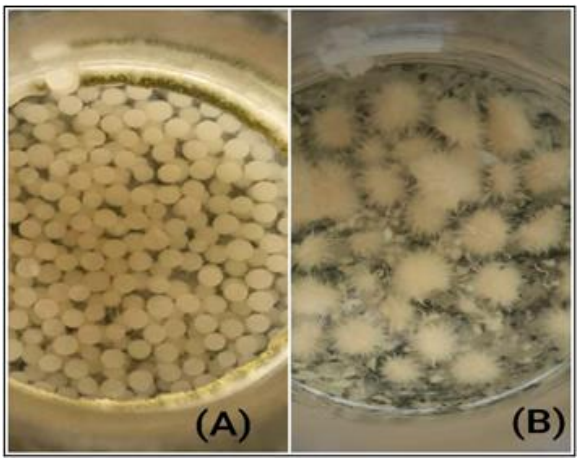


Figura 1. Células íntegras de *A. oryzae* IPT-301: (A) *in natura* (antes da reticulação) e (B) reticuladas com solução de glutaraldeído 25 % (v v^{-1}) em água.

Especificamente, 0,05 g de célula íntegra imobilizada (reticulada) foi incubada 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 (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 de transfrutosilação (A_T) das células íntegras reticuladas foi calculada pela Equação (1).

$$A_T = \frac{[F_T].V_R}{m_s.t_R} \quad (1)$$

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), m_s é a massa microbiana seca (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).

OBTENÇÃO DE MASSA SECA

As células íntegras reticuladas úmidas, ao término dos ensaios de atividade enzimática, foram lavadas abundantemente com água destilada para remoção de sacarose residual e, imediatamente, filtradas à vácuo. As células íntegras retidas no papel (torta) foram acondicionadas em estufa de secagem à 60 ºC até a obtenção de massa seca constante. O valor da massa seca foi aplicado na Equação (1) para a determinação da atividade enzimática.

QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES

A concentração dos açúcares redutores [AR], presentes no meio reacional, foi determinada utilizando o 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 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 por 10 min e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 4,0 mL de água destilada. Posteriormente, 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 de 35 µL de amostra, obtida da reação enzimática, em 3,5 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (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 (2) e (3), respectivamente (Chen e Liu, 1996, Cunha et al., 2019; Gonçalves et al. 2020, Faria et al. 2021).

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matriz do planejamento experimental (fatores e níveis) com suas respectivas respostas para a atividade enzimática de transfrutosilação (A_T) está disposta na Tabela 2. Foi observado que a 15 ºC, obteve-se o maior valor de A_T (447,09 U.g^{-1}) ao se reticular células íntegras a 150 rpm, pH 6,5, utilizando concentração de glutaraldeído de 1,6 % (v.v^{-1}). Para a mesma temperatura, também se obteve o menor valor de atividade (18,45 U.g^{-1}) para o processo de imobilização conduzido a 250 rpm, pH 8,5 e com 2,6 % (v.v^{-1}) do agente reticulante. Com relação aos ensaios realizados no ponto central, verificou-se que os valores de A_T alcançados apresentaram baixa variação, indicando, portanto, uma boa reprodutibilidade do processo. Para essa condição experimental, a atividade enzimática média foi de 267,05 ± 26,43 U.g^{-1}. De acordo com Rodrigues e Iemma (2014), pontos centrais que apresentam altas variações não estão devidamente controlados, o que influencia diretamente na qualidade dos resultados obtidos com o planejamento experimental. Garcia et al. (2018) alcançaram os maiores valores de A_T ao se reticular células íntegras de *A. oryzae* IPT-301, à 25 ºC e 200 rpm, para faixas de pH e concentração de glutaraldeído compreendidas entre 7,5-8,3 e 1,65-2,30 % (v.v^{-1}), respectivamente.

Ao se aplicar o planejamento experimental do tipo delineamento de *Plackett & Burman* (Tabela 2), buscou-se selecionar as variáveis de imobilização significativas para o processo de reticulação das células íntegras microbianas. Foram considerados estatisticamente significativos os fatores ao nível de significância de 10 % (p-valor < 0,1). Bioprocessos que envolvem enzimas e microrganismos apresentam grande variabilidade e, portanto, recomenda-se aplicar

níveis de significância mais altos (Rodrigues e Iemma, 2014).

Tabela 2. Matriz do Delineamento *Plackett & Burman* de 16 ensaios para a resposta atividade de transfrutosilação com seus valores reais e codificados

Ensaio	X_1	X_2 (ºC)	X_3 (rpm)	X_4 (% v/v)	Y1 (U. g^{-1})
1	8,5 (1)	15 (-1)	250 (1)	1,6 (-1)	287,06
2	8,5 (1)	35 (1)	150 (-1)	2,6 (1)	217,78
3	6,5 (-1)	35 (1)	250 (1)	1,6 (-1)	179,46
4	8,5 (1)	15 (-1)	250 (1)	2,6 (1)	18,45
5	8,5 (1)	35 (1)	150 (-1)	2,6 (1)	89,45
6	8,5 (1)	35 (1)	250 (1)	1,6 (-1)	58,64
7	6,5 (-1)	35 (1)	250 (1)	2,6 (1)	214,99
8	6,5 (-1)	15 (-1)	250 (1)	2,6 (1)	123,64
9	6,5 (-1)	15 (-1)	150 (-1)	2,6 (1)	110,67
10	8,5 (1)	15 (-1)	150 (-1)	1,6 (-1)	305,27
11	6,5 (-1)	35 (1)	150 (-1)	1,6 (-1)	259,59
12	6,5 (-1)	15 (-1)	150 (-1)	1,6 (-1)	447,09
13	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)	255,22
14	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)	239,53
15	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)	301,29
16	7,5 (0)	25 (0)	200 (0)	2,1 (0)	272,17

Nota: X1- pH; X2 - temperatura (em ºC); X3 - velocidade de agitação (em rpm); X4 - concentração de glutaraldeído (em %, v v^{-1}); Y1 - atividade enzimática de transfrutosilação (em U g^{-1}).

Os efeitos do diagrama de Pareto (Figura 2) são reflexos dos impactos das variáveis de imobilização na atividade enzimática A_T (variável resposta), representados por p-valor < α (nível de significância, α = 0,10), ao se considerar alta significância e uma distribuição normal dos dados obtidos. O planejamento experimental de *Plackett & Burman* é válido para conjuntos amostrais representados por uma distribuição normal (Rodrigues e Iemma, 2014). O teste de *Shapiro-Wilk* (utilizado para verificar a normalidade do conjunto amostral) indicou que a amostra experimental pode ser representada por uma distribuição normal, validando, portanto, a técnica de delineamento utilizada neste estudo.

De acordo com a Figura 2, foi possível identificar duas variáveis de imobilização que influenciaram, significativamente, a magnitude da resposta A_T (Y_1), sendo elas: a velocidade de agitação (X_3) e a concentração de glutaraldeído (X_4).

Observou-se ainda que o pH de reticulação (X_1) e a temperatura reacional (X_2) não foram estatisticamente significativos no processo de reticulação, o que significa que estas variáveis não apresentaram influência significativa na variável resposta (Y1), ao nível de significância de 10 % (α = 0,10). Os intervalos para variáveis temperatura e pH foram definidos de acordo com Garcia et al. (2018) e Gonçalves et al. (2020), que obtiveram as melhores atividades de transfrutosilação reticulando as células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 a 25 ºC, pH 7,9 e com a adição de 2,1 % (v.v^1) de glutaraldeído.

A temperatura é capaz de influenciar a atividade enzimática em termos de velocidade de reação. Ao se elevar a temperatura do meio reacional, a agitação das moléculas aumenta e, em função disso, a probabilidade de colisões intermoleculares aumenta também, ou seja, a maioria das reações enzimáticas ocorrem em uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Esta tendência é válida até um determinado ponto. Enzimas possuem temperaturas ou faixas de temperaturas com atividade ótima, porém, o aumento da temperatura de forma contínua pode ocasionar a desnaturação da enzima, por romper ligações que estabilizam a estrutura espacial da proteína, devido à acentuada agitação das moléculas (Dal Maso, 2019). Nos estudos de planejamento experimental aplicado, variou-se apenas a temperatura do processo de reticulação de células íntegras catalíticas. Os resultados apontaram que, na faixa de

temperatura investigada (15 a 35 ºC), não houve desnaturação do biocatalisador, não tendo, portando, havido influência direta na variável resposta (A_T). Esta hipótese é condizente com os estudos de Cunha et al. (2019) que concluíram que células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 com atividade de frutosiltransferase são termoestáveis para a mesma faixa de temperatura.

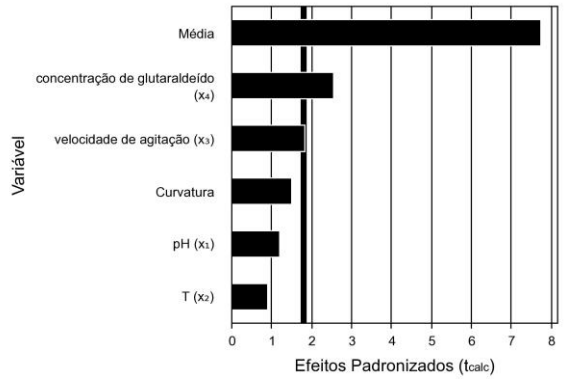


Figura 2. Diagrama de Pareto para atividade de frutosiltransferase (transfrutosilação). Fatores do planejamento experimental: X_1 - pH de reticulação; X_2 - temperatura; X_3 - velocidade de agitação; X_4 - concentração de glutaraldeído.

A influência do pH no meio reacional é uma das razões da preservação da estrutura protéica e da atividade enzimática (Dwevedi, 2016; Dal Maso, 2019). Enzimas possuem grupos iônicos em seus sítios ativos que devem estar em uma forma adequada (ácida ou básica) para serem funcionais. As variações de pH resultam em mudanças na forma iônica do sítio ativo e, consequentemente, na atividade da enzima, podendo alterar a forma tridimensional do biocatalisador. Portanto, enzimas são ativas apenas em uma determinada faixa de pH (Shuler; Kargi, 2002). Para a faixa de pH investigada no processo de reticulação, conforme delineamento proposto (pH 6,5-8,5), foi observado que a essa variável de imobilização não afetou significativamente a atividade de frutosiltransferase (transfrutosilação) das células íntegras microbianas.

Por outro lado, o aumento da velocidade de agitação pode acarretar o aumento da A_T, por favorecer o processo de reticulação. No entanto, a influência dessa variável torna-se indesejável quando resistências à transferência de massa associadas a formação de vórtex dificultam a distribuição homogênea de glutaraldeído no meio reacional, reduzindo o tempo de contato do agente reticulante com as células íntegras. Além disso, velocidades de agitação relativamente elevadas podem carretar no aumento da tensão de cisalhamento e afetar a estrutura das células íntegras (Dwevedi, 2016). Os resultados obtidos demonstraram que, na faixa de velocidade de agitação investigada (150 - 250 rpm) os efeitos mostraram-se significativos na atividade de frutosiltransferase.

A reticulação é uma técnica que propicia ganhos significativos no que diz respeito à estabilidade enzimática. Garcia et al. (2018) reportaram um ganho de 14 % na atividade de transfrutosilação das células íntegras reticuladas de *A. oryzae* IPT-301, assim como aumento das estabilidades térmica e operacional do biocatalisador. A condição de reuso é essencial para a implementação de processos industriais, por aumentar a efetividade e reduzir custos do biocatalisador na produção de FOS (Ganaie et al., 2014).

CONCLUSÃO

Por meio dos estudos de planejamento experimental, por delineamento de *Plackett & Burman*, foi possível avaliar a influência das variáveis de imobilização das células íntegras de *A. oryzae* IPT-301 na atividade de frutosiltransferase (atividade de transfrutosilação). A velocidade de agitação e a concentração de glutaraldeído no processo de imobilização, por reticulação, foram estatisticamente significativas. A maior atividade (447 U g^{-1}) foi obtida a 150 rpm utilizando 1,6 % (v v^{-1}) de agente reticulante. Os resultados indicaram que as variáveis selecionadas devem ser otimizadas por outros métodos de planejamento experimental para estudos futuros de reticulação de células íntegras microbianas visando obter um biocatalisador ativo para a síntese de frutooligossacarídeos.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

ANTOSOVÁ, M; POLAKOVIC, M. Fructosyltransferase: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides**. Chemical Papers**, p.351-353, 2001.

ANTOŠOVÁ M; ILLEOVÁ, V; VANDÁKOVÁ, M: DRUZKOVSKÁ A; POLAKOVIC M. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from Aureobasidium pullulans. **Journal of Biotechnology**, v. 135, n.1, p. 58-63, 2008.

CAMORIM, J. E.; MORABITO, R.; RODRIGUES, M. I. Estudo comparativo de aproximações para redes de filas de manufatura utilizando planejamento de

experimentos. **Revista Eletrônica Pesquisa Operacional**, Rio de Janeiro, v.6, n.1, p.11-12, 2014.

CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of β-fructofuranosidase by Aspergillus japonicus. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.153-160, 1996.

CUERVO-FERNANDEZ. R; OTTONI C.A; SILVA E.S; MATSUBARA R.M.S; CARTER, J.M; MAGOSSI, L.R; WADA, M.A.A; RODRIGUES, M.F.A; MARESMA, B.G; MAIORANO, A.E. Screening of β-fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 75, p. 87-93, 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. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n.2, p. 657-668, 2019.

DAL MASSO, S. S. S. **Produção de Frutosiltransferase e β - Frutofuranosidase por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em Cultivo Submerso**. 2019. 48 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI - Erechim, 2019.

Dwevedi, A. **Enzyme Immobilization:** Advances in industry, agriculture, medice, and the environment. Switzerland, 2016. E-book. 132p.

FARIA, L. L; MORALES, S.A.V; PRADO, J.P.Z; DIAS, G.S; ALMEIDA, A.F; XAVIER, M.C.A; SILVA, E.S; MAIORANO, A.E; PERNA, R.F. Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, v. 43, p. 43-59, 2021.

GANAIE, M. A.; RAWAT, H. K.; WANI, O. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 840-844, 2014.

GARCIA, R. L; ROSSI, G. D; MORALES, S. V; SILVA, E. S; MAIORANO, A. E; PERNA, R. F. Imobilização da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, caracterização e aplicação na produção de frutooligossacarídeos, p. 3530-3533. In: São Paulo: **Blucher**, 2018.

GUISAN, J. M. New Opportunities for Immobilization of Enzymes. In: GUISAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition**. v. 1051, p. 1–14, 2013.

GONÇALVES, M. C. P.; MORALES, S. A. V.; 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**, v. 95, p. 1-10, 2020.

HUANG, M. P; WU, M; XU, Q-S; MO, D-J; FENG, J-X. Highly Efficient Synthesis of Fructooligosaccharides by Extracellular Fructooligosaccharide-Producing Enzymes and Immobilized Cells of *Aspergillus aculeatus* M105 and Purification and Biochemical Characterization of a Fructosyltransferase from the Fungus**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 33, p. 6425–6432, 2016.

KRASŇAN, V.; STLOUKAL, R.; ROSENBERG, M. e REBROŠ, M. 2016. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, n.6, p. 2535– 2553, 2016.

LÓPEZ-GALLEGO, F; BETANCOR, L; HIDALGO, A; ALONO-MORALES, N; FERNÁNDEZ-LORENTE, G; GUISAN, J.M. Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on sepabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, n.7, p.750–756, 2005.

MENDES, A. A; OLIVEIRA, P.C; CASTRO, H.F; GIORDANO, R.L.C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. New York: John Wiley & Sons, 3° Ed, 2013, 757p.

NOBRE C; FILHO, E.G.A; FERNANDES, F.A.N; BRITO, E.S; RODRIGUES, S; TEXEIRA, J.A; RODRIGUES, L. R. Production of fructo-oligosaccharides by *Aspergillus ibericus* and their chemical characterization. LWT – Food Scienci and Technology. [*s.l*], v. 89, p. 58-64,2018.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v.33, n. 4, p. 305–325, 1946.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de processos**. Ed.

Cárita, 3ª. Edição: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

SHEU, D-C; CHANG, J-Y; CHEN, Y-J; LEE, C-W. Production of high-purity neofructooligosaccharides by culture of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Tecnhology**, v. 132, p. 432-435, 2013.

SHULER, M. L; KARGI, F**. Bioprocess engineering: Basic concepts**. 2nd ed. USA: Prentice Hall PTR, 2002, 574p.

SOUZA, L.T.A; VERÍSSIMO, L.A.A; JOÃO, B.C.P; SANTORO, M.M; RESENDE, R.R; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *In*: SOUZA, L.T.A; VERÍSSIMO, L.A.A; JOÃO, B.C.P; SANTORO, M.M; RESENDE, R.R; MENDES, A. A. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria. São Paulo: Blücher Editora, 2017. Vol. 4, cap. 15, p. 529-568.**

SUN, T.; DU, W.; LIU, D.; DAI, L. Exploring the effects of oil inducer on whole cell-mediated methanolysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 514–518, 2010.

VASCONCELOS, N. M. DE; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. DE S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico". **Boletim de Pesquisa Número 9** - Embrapa, p. 1–59, 2013.

VESCOVI, V.; KOPP, W.; GUISÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; MENDES, A. A.; TARDIOLI, P. W. Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino- glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, v. 51, n.12, p. 2055–2066, 2016.

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