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

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM DIVERSOS SUPORTES

Isabella M. Araújo[1], José P. Z. Prado[1], Leandro D. R. S. Júnior[1], Michelle C. A. Xavier[2], Sergio A. V. Morales[1,3], Rafael F. Perna[1]

[1]Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, Brasil (isabellamedeirosaraujo@hotmail.com)
[2]Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFT, Gurupi-TO, Brasil
[3]Curso de Engenharia de Alimentos, UFT, Palmas-TO, Brasil

A enzima frutosiltransferase (FTase) é aplicada na produção de frutooligossacarídeos. Este trabalho visou determinar o rendimento de imobilização (R_I) e atividade recuperada (A_R) da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizada por adsorção em sílica gel, farelo de soja e polihidroxibutirato (PHB). O R_I da FTase adsorvida em sílica, PHB e farelo foi de 85 %, 41 % e 36 %, respectivamente. A A_R da FTase adsorvida em sílica, PHB e farelo foi de 13 %, 14 % e 68 %, respectivamente.

Palavras-chave: **Frutosiltransferase; Imobilização; Sílica gel, Farelo de soja; Polihidroxibutirato**

INTRODUÇÃO

As enzimas frutosiltransferases (FTase, E.C.2.4.1.9) catalisam a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (FOS), através de reações de transfrutosilação. Os FOS são açúcares pouco calóricos, prebióticos, não são cariogênicos, e auxiliam no tratamento de múltiplas doenças como: diabetes, anemia, hipertensão arterial, insuficiência renal e câncer de cólon (Jitonnom et al., 2018; Zhang et al., 2017; Passos et al., 2003).

As FTases são sintetizadas, principalmente, por fungos dos gêneros *Aureobasidium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (Castro et al., 2017; Antosová et al., 2008). Especificamente, o *Aspergillus oryzae* IPT-301 foi reportado como fonte potencialmente produtora de FTase extracelular (enzima excretada para o meio de cultura) com elevada atividade de transfrutosilação, dentre dezessete linhagens de fungos filamentosos (Cuervo-Fernandez et al., 2007). Ottoni et al. (2012) reportaram a otimização da composição do meio para a produção de enzimas pelo fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301. Essa composição ótima do meio foi utilizada por Cunha et al. (2019) para produzir e caracterizar a FTase extracelular e micelial de *Aspergillus oryzae* IPT-301.

A imobilização da FTase tem fornecido numerosas vantagens a esta enzima, tais como maior estabilidade térmica e operacional, fácil separação do meio reacional, e possibilidade de reutilização em reatores em batelada e contínuos (Gonçalves et al., 2020; Gabrielczyk et al., 2018; Ali et al., 2016; Zambelli et al., 2016; Kamimura et al., 2009; Onderková et al., 2007). Dentre os métodos de imobilização de enzimas, a adsorção física oferece maior facilidade de aplicação, menor custo e possibilidade de reuso, pois permite a regeneração da matriz (suporte) utilizada. Além disso, a adsorção provoca pouca alteração na estrutura conformacional da enzima e em seu sítio ativo, uma vez que não há ligação química entre esta e o suporte (Dalla-Vecchia et al., 2004). Entretanto, essa técnica fornece ligações de baixa energia (interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio) entre a enzima e o suporte, o que facilita a dessorção da enzima por arraste em etapas de lavagem ou por cisalhamento (Kalantari et al., 2017; Carvalho et al., 2015; Kharrat et al., 2011).

Existem poucos estudos sobre a imobilização da FTase extracelular em suportes orgânicos e inorgânicos. Yun et al. (1996) imobilizaram a FTase de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10542 em uma resina altamente porosa Diaion HPA 25®. A enzima imobilizada apresentou maior resistência às variações de pH do que a enzima solúvel e apresentou alta atividade enzimática por 30 dias a 50 °C. Ghazi et al. (2005) estudaram a imobilização por ligações covalentes de frutosiltransferases comerciais em um polímero a base de polimetacrilato e relataram altas atividades enzimáticas. Oliveira (2007) imobilizou a FTase extracelular em suporte sólido ácido inorgânico

composto por nióbio e grafite, apresentando elevadas atividades e satisfatórias estabilidades térmicas e frente ao pH de incubação da enzima.

Dentre os suportes inorgânicos aplicados na imobilização de enzimas por adsorção destaca-se a sílica gel, a qual apresenta baixo custo, alta resistência mecânica, estabilidade térmica e química, caráter altamente hidrofílico, e, principalmente, elevada área superficial específica (Canilha et al., 2006). A superfície da sílica apresenta grupos hidroxila (-OH), os quais atuam como pontos de ligação com a enzima a ser imobilizada e agem como centros de adsorção molecular, formando ligações do tipo (Si-O-X) (Carvalho et al., 2015).

O polihidroxibutirato (PHB) é um material orgânico hidrofóbico produzido como reserva de carbono e energia por microorganismos (Mendes et al., 2012). Este biopolímero possui características que tornam sua aplicação atraente para a imobilização de enzimas por adsorção, tais como: baixo custo, alta cristalinidade, alta resistência mecânica, capacidade de regeneração, biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de ser atóxico e inerte (Mendes et al., 2011).

Destaca-se ainda, o farelo de soja como potencial suporte orgânico, de origem natural, para a imobilização de enzimas. O farelo é um subproduto do processamento da soja e apresenta alta disponibilidade. O Brasil ocupa a quarta posição mundial na produção de farelo de soja, com um volume de 33,9 milhões de toneladas (Embrapa, 2021; Zeferino, 2020; De Freitas, 2011). Este material também é biodegradável e atóxico, características cruciais na seleção de um material de suporte utilizável na produção de produtos alimentícios (Embrapa, 2021; Gondin, 2019). Ressalta-se que, até a realização deste trabalho, não foram encontrados relatos na literatura sobre o uso de farelo de soja em processos de imobilização enzimática.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros e velocidade de imobilização da enzima FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 nos suportes sílica gel, farelo de soja e PHB, visando a síntese de biocatalisadores ativos e estáveis, com potencial de aplicação para a produção de FOS.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAIS

A sílica gel (área superficial de 500 $m^2\ g^{-1}$ e tamanhos de poro e de partícula iguais a 60 Å e 63-200 µm, respectivamente) foi adquirida da Sigma-Aldrich®. O polihidroxibutirato (PHB) foi fornecido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do estado de São Paulo (IPT-SP) (São Paulo, Brasil). O farelo de soja foi fornecido pela empresa Fazendão (Gurupi-TO). Extrato de levedura, sacarose, KH_2PO_4, $MnCl_2.4H_2O$, e $FeSO_4.7H_2O$ foram adquiridos da Labsynth® (Diadema, Brasil). A glicerina foi obtida na Isofar® (Duque de Caxias, Brasil). Glicose, $NaNO_3$, $MgSO_4.7H_2O$, NaCl e Tween-80 foram adquiridos da Dinâmica® (Diadema, Brasil). Ágar batata dextrose foi adquirido da Kasvi® (São José dos Pinhais, Brasil) e o kit enzimático GOD-PAP para determinação da glicose foi fornecido pela Laborlab® (Campinas, Brasil).

PRÉ-TRATAMENTO DOS SUPORTES

Previamente aos ensaios de imobilização, o farelo de soja, foi peneirado para classificação granulométrica entre 0,850 e 0,300 μm. A sílica e o farelo foram secos em estufa a 60 °C por 24 horas.

O polímero polihidroxibutirato (PHB), foi submetido ao pré-tratamento descrito por Mendes (2009). Inicialmente, o suporte foi lavado com etanol P.A 95 % (v v^{-1}) na proporção de 1:10 (g de suporte: ml de caldo fermentado) sob agitação magnética a 25 °C por 6 horas. Ao término da lavagem, a solução foi filtrada a vácuo e o polímero (torta) armazenado em dessecador por 24 horas.

MICRORGANIMO 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}) à 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 $1x10^7$ esporos mL^{-1}, seguido de armazenamento sob refrigeração a -12 °C (Cunha et al., 2019).

PRODUÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR

A enzima FTase extracelular foi produzida por fermentação submersa a partir da cepa de *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP). A fermentação foi realizada em agitador orbital do tipo *shaker*, por 64 horas, a 200 rpm de velocidade de agitação e 30 ºC, utilizando-se meio de cultura sintético, pH 5,5, constituído por: sacarose (150 g L^{-1}), extrato de levedura (5,0 g L^{-1}), $NaNO_3$ (5,0 g L^{-1}), KH_2PO_4 (2,0 g L^{-1}), $Mg_2SO_4.7H_2O$ (0,5 g L^{-1}), $MnCl_2.4H_2O$ (0,3 g L^{-1}) e $FeSO_4.7H_2O$ (0,01 g L^{-1}). Em seguida, foi realizada uma filtração a vácuo e o permeado (caldo filtrado), rico em FTase extracelular, foi imediatamente utilizado para os ensaios de imobilização.

ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO

Os ensaios de imobilização por adsorção foram realizados com base no protocolo de Faria et al. (2021). Inicialmente, o caldo de fermentação (contendo a enzima) foi adicionado a cada suporte em um erlenmeyer, na proporção de 1:10 (g do suporte: ml de caldo fermentado). A imobilização foi conduzida em Banho Dubnoff a 35 °C e 175 rpm, durante 6 horas para a sílica gel e o farelo de soja e 8 horas para o PHB. Ao término da imobilização, coletou-se 0,1 mL do sobrenadante para monitoramento das atividades de transfrutosilação do caldo fermentado. Posteriormente, as amostras foram filtradas a vácuo e a torta retida (enzima imobilizada no suporte) foi submetida a ensaios de atividade enzimática para a determinação dos parâmetros de imobilização (rendimento e atividade recuperada).

PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO

Os parâmetros rendimento de imobilização (R_I) e atividade recuperada (A_R), foram calculados conforme as equações (1) e (2), respectivamente:

$$R_I\ (\%) = \frac{U_f - U_o}{U_o}\ \text{X}\ 100 \qquad (1)$$

$$A_R(\%) = \frac{U_{imobilizado}}{U_o - U_f}\ \text{X}\ 100 \qquad (2)$$

onde U_f é a atividade no sobrenadante no final da imobilização (U mg^{-1} da proteína) e U_o a atividade oferecida no início da imobilização (U mg^{-1} da proteína) e $U_{imobilizado}$ a atividade aparente do derivado imobilizado (U g^{-1} do suporte).

ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade de transfrutosilação (A_t) foi determinada conforme o procedimento descrito por Cuervo-Fernandez et al. (2007), Ottoni et al. (2012) e Cunha et al. (2019). Para isso, 1 g de enzima imobilizada (complexo enzima-suporte) ou 0,1 mL de enzima solúvel (presente no caldo fermentado) 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 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 de água e gelo por 5 min para inativação enzimática. Posteriormente, o meio reacional foi filtrado à vácuo e a concentração de açúcares redutores e glicose foram quantificadas através dos métodos de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) e GOD-PAP® (kit enzimático glicose-oxidase), respectivamente.

As atividades de transfrutosilação (A_t) das enzimas solúveis ($A_t^{solúvel}$) e imobilizadas ($A_t^{imobilizada}$) foram calculadas pelas equações (3) e (4), respectivamente:

$$A_t^{solúvel} = \frac{[F_t]V_R}{t_R V_{enzimático}} \qquad (3)$$

$$A_t^{imobilizado} = \frac{[F_t]V_R}{t_R m} \qquad (4)$$

onde $[F_t]$ é a concentração molar de frutose transfrutosilada (µmol L^{-1}), V_R é o volume do meio reacional (L), $V_{enzimático}$ é o volume de solução enzimática (caldo fermentado) (mL), m é massa do complexo enzima-suporte (g) e t_R é o tempo de reação (min).

De acordo com Cunha et al. (2019), Gonçalves et al. (2020) e Faria et al. (2021), uma unidade (1U) de atividade de transfrutosilação é definida como a quantidade de enzima que transfere um micromol (1 µmol) de frutose transfrutosilada (F_t) por minuto, sob condições experimentais estabelecidas.

QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES

Para a quantificação dos açúcares redutores (AR) utilizou-se o método DNS, conforme metodologia disponibilizada por meio de um boletim técnico da Embrapa por Vasconcelos et al. (2013). Para a análise, adicionou-se 0,5 mL de DNS em 0,5 mL de amostra proveniente da atividade enzimática. Após a homogeneização, a amostra foi mantida em banho com água em ebulição por 10 min, seguido por banho em gelo. Acrescentou-se 4 mL de água destilada e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Para quantificar a concentração de glicose (G), utilizou-se o método GOD-PAP®. Para tal, adicionou-se 1 mL de solução GOD-PAP® em 10 µL de amostra. Após a homogeneização, a amostra foi conduzida ao banho de aquecimento à 37 ºC por 5 min. Por fim, a absorvância da amostra foi lida em espectrofotômetro a 505 nm (Morales et al., 2020).

A partir das concentrações de (AR) e (G), foram obtidas as concentrações de frutose transfrutosilada (F_t) e frutose (F) utilizando as equações (5), (6) e (7) (Morales et al., 2020):

$$[AR] = [F] + [G] \qquad (5)$$

$$[F] = [AR] - [G] \qquad (6)$$

$$[F_t] = [G] - [F] = 2[G] - [AR] \qquad (7)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento do processo de imobilização por adsorção da FTase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel, farelo de soja e PHB é apresentado na Figura 1.

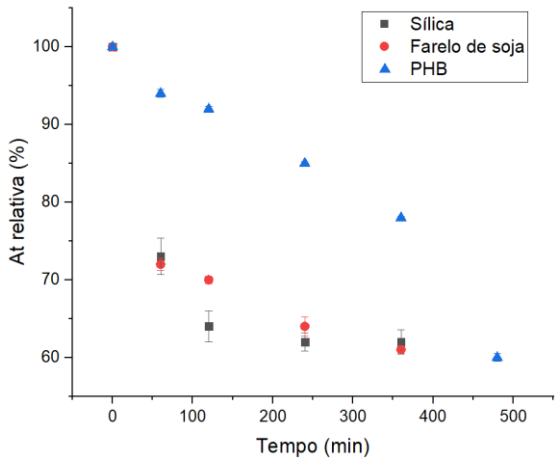


Figura 1. Curvas de adsorção para a FTase extracelular imobilizada em sílica gel, farelo de soja e PHB: monitoramento da atividade de transfrutosilação no sobrenadante. Condições experimentais: (pH: 5,5, temperatura: 35 ºC, velocidade de agitação: 175 rpm, 1:10 g de suporte/ml de caldo fermentado).

Nessa figura, é possível observar que para todos os suportes investigados, a atividade de transfrutosilação (A_t), monitorada para o sobrenadante, diminuiu com o aumento do tempo de imobilização, indicando que a enzima foi satisfatoriamente adsorvida nos suportes. No entanto, as maiores velocidades de imobilização da FTase foram obtidas com a sílica gel e o farelo de soja. Para estes suportes, a queda da atividade de transfrutosilação relativa para 60% ocorreu em um tempo de aproximadamente 6 horas de imobilização, enquanto para o PHB foram necessárias 8 horas de imobilização para atingir a mesma queda de atividade no sobrenadante. Estes resultados sugerem uma maior afinidade da FTase com a sílica gel e com o farelo de soja, e, uma menor afinidade com o PHB. Estas diferenças de velocidade de imobilização podem ser atribuídas a características superficiais e morfológicas dos materiais de suporte (Canilha et al., 2006).

A sílica gel é um suporte inorgânico, altamente utilizado como material de suporte para a imobilização de enzimas como Lipases, já que apresenta uma superfície composta por regiões de ligações siloxano interrompidas por sítios expondo grupos silanol, responsáveis pela sua hidrofílicidade, uma vez que podem interagir com grupos polares ou moléculas através de ligações de hidrogênio (Ricardi, 2016). Além disso, a sílica é um material poroso, com elevada área superficial, o qual permite uma maior disponibilidade de sítios de adsorção, e favorece a interação entre as enzimas e o suporte, através de ligações de Van der Waals (Faria et al., 2021). Essas características podem justificar a alta velocidade de adsorção da FTase em sílica gel. É importante destacar que a velocidade de adsorção da FTase extracelular em farelo de soja aproxima-se da velocidade de imobilização em sílica, sendo o primeiro material um resíduo orgânico, de baixo custo e renovável.

Os ensaios realizados também possibilitaram a determinação dos parâmetros de imobilização enzimática: (i) rendimento de imobilização (R_I) e (ii) atividade recuperada (A_R) para todos os suportes. Para os cálculos de R_I foram consideradas a atividade de transfrutosilação inicial e final do caldo fermentado, e, para a obtenção de A_R, utilizou-se além destas, a atividade de transfrutosilação presente no derivado (complexo enzima-suporte). Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de imobilização para a sílica, farelo de soja e PHB.

	Atividade recuperada (A_R) (%)	Rendimento de imobilização (R_I) (%)
Sílica gel	13 ± 0,94	85 ± 6
Farelo de soja	68 ± 0,04	36 ± 2,87
PHB	14 ± 0,5	41 ± 0,9

O rendimento de imobilização da FTase adsorvida em sílica gel foi de 85%, o qual foi maior que os valores obtidos para a FTase adsorvida em PHB e farelo de soja (41% e 36%, respectivamente).

A divergência apresentada pelos parâmetros de imobilização da FTase nos suportes avaliados pode ser atribuída a alguns efeitos relacionados ao método de imobilização utilizado, capazes de alterar a atividade catalítica e seletividade da enzima. Dentre eles estão a distorção da enzima, caso ocorram interações múltiplas entre a enzima e o suporte, o bloqueio do sítio ativo e problemas difusionais (Garcia-Galan et al., 2011). A imobilização por adsorção física, técnica utilizada neste trabalho, possibilita a adsorção espontânea da enzima no suporte, em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável (Zhou, et al., 2012).

Mendes (2009) reportou a imobilização de lipases em PHB, por adsorção física, para a síntese de biodiesel. Nesse estudo, o autor testou cinco tipos de lipases de origem microbiana, imobilizadas com variação do PHB (pó e granular), e foram obtidos rendimentos de imobilização de 100 % para três dessas enzimas, e em torno de 60 % para duas delas na forma granular, revelando a influência da geometria do suporte nos parâmetros de imobilização. Para as atividades recuperadas (A_R), considerando o polímero em grânulo, foram encontrados valores similares (entre 8 % e 11 %) ao da imobilização da FTase em PHB (14 %).

Oliveira (2007) obteve resultados expressivos ao imobilizar a FTase extracelular de *Rhodotorula sp*., por adsorção, em suporte sólido ácido inorgânico composto por nióbio e grafite, atingindo eficiência de imobilização de 97,76 %. Nesse estudo também foram testados outros suportes, sendo um deles a sílica enxertada com zircônio, apresentando rendimento de 80% ao se utilizar o método de adsorção.

CONCLUSÃO

Os parâmetros de imobilização da FTase adsorvida nos suportes foram determinados. A enzima suportada em sílica forneceu um maior rendimento de imobilização (85%), seguido pelo PHB (41%) e pelo farelo de soja (36%). O maior R_I encontrado para a sílica pode ser explicado por suas propriedades tais como hidrofilicidade, alta porosidade e área superficial. A maior atividade recuperada foi apresentada pela FTase imobilizada em farelo de soja (68%), enquanto a imobilização em PHB e sílica proporcionou atividades recuperadas similares, de 14% e 13%, respectivamente. Estes resultados sugerem um potencial de aplicação da técnica de imobilização por adsorção para a síntese de biocatalisadores de FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 aplicáveis na produção de FOS.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 421540/2018-4), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) 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

ALI, Z.; TIAN, L.; ZHAO, P.; ZHANG, B.; ALI, N.; KHAN, M.; ZHANG, Q. Immobilization of lipase on mesoporous silica nanoparticles with hierarchical fibrous pore. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.L.], v.134, p.129–135, 2016.

ANTOSOVÁ, M.; ILLEOVÁ, V.; VANDÁKOVÁ, M.; DRUZKOVSKÁ, A.; POLAKOVIC, M. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, [S.L.], v.135, p. 58-63, 2008.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biotacalisadores imobilizados. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, [S.L.], v. 36, n. 36, p.47-57, 2006.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.

CASTRO, C. C.; NOBRE, C.; DUPREZ, M. E.; DE WEIRELD, G.; HANTSON, A. L. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 118, p. 82-90, 2017.

CUERVO-FERNANDEZ. R.; OTTONI, C. A.; DA SILVA, E. S.; MATSUBARA, R. M. S.; CARTER, J. M.; MAGOSSI, L. R.; WADA, M. A. A.; RODRIGUES, M. F. D 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**, [S.L.], 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**, [S.L.], v. 36, n.2, p. 657-668, 2019.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 4, p.623-630, 2004.

DE FREITAS, M. D. M. A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, [S.L.], v.7, N.12; 2011.

EMBRAPA. **Soja em números (Safra 2019/20)**. 2021. Brasília: EMBRAPA. Disponível em: https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos. Acesso em: 06 abr. 2021.

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**, [S.L.], v. 43, p. 43-59, 2021.

GABRIELCZYK, J.; DUENSING, T.; BUCHHOLZ, S.; SCHWINGES, A.; JORDENING, H. J. A comparative study on immobilization offructosyltransferase in biodegradable polymers by electrospinning. **Appl Biochem Biotechnol**, [S.L.], v. 185, p.847–862, 2018.

GARCIA-GALAN C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Adv Synth Catal**, [S.L.], v. 353, p. 2885-2904, 2011.

GHAZI, I.; SEGURA, A. G.; FERNANDEZ-ARROJO L.; ALCALDE, M.; YATES, M.; ROJAS-CERVANTES, M. L.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the syn-thesis of fructo-oligosaccharides. **J Mol Catal B Enzym,** [S.L.], v.35, p. 19–27, 2005.

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**, [S.L.], v. 95, p. 1-10, 2020.

GONDIN, Pedro Henrique Rodrigues. **Industrialização da soja no Brasil**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- MG, 2019.

JITONNOM, J.; KETUDAT-CAIRNS, J. R.; HANNONGBUA, S. QM/MM modeling of the hydrolysis and transfructosylation reactions of fructosyltransferase from *Aspergillus japonicas*, an enzyme that produces prebiotic fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, [S.L.], v. 79, p. 175-184, 2018.

KALANTARI, M.; YU M.; YANG, Y.; STROUNINA, E.; GU, Z.; HUANG, X.; ZHANG, J.; SONG, H.; YU, C. Tailoring mesoporous-silica nanoparticles for robust immobilization of lipase and biocatalysis. **Nano Res**, [S.L.], v.10, p.605–617, 2017.

KAMIMURA, E. S.; SILVA, G. S.; COVRE, L. M.; CARVALHO, R, A.; SANTOS, A. M. P. Immobilization of fructosyltransferase from *Pichia pastoris* in blend of alginate and gelatin. **New Biotechnology**, [S.L.], v. 25, n. September, p. S149, 2009.

KHARRAT, N.; BEN ALI, Y.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y. T.; KARRA-CHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: comparison with the free enzyme. **Process Biochem**, [S.L.], v.46, p.1083–1089, 2011.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MENDES, A. A.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, [S.L.], v. 34, p. 831-840, 2011.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. D. L. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 503–511, 2012.

MORALES, S. A. V.; FARIA, L. L.; XAVIER, M. D. C. A. X.; PRADO, J. P. Z.; JUNIOR, L. D. R. S.; DIAS, G. D. S.; DA SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Imobilização de Frutosiltransferase em Sílica Gel e Bucha Vegetal para a Síntese de Frutooligossacarídeos. In: SILVA, C. D. D. **Ciências Biológicas: Realidades e Virtualidades.** [S.L.]: Atena, 2020. Cap. 6, p. 56-67.

OLIVEIRA, Elizama Aguiar de. **Imobilização da enzima frutosiltransferase extracelular de rhodotorula sp. e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 2007.

ONDERKOVÁ, Z.; BRYJAK, J.; POLAKOVIC, M. Properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* immobilized on an acrylic carrier. **Chemical Papers**, [S.L.], v. 61, n. 5, p.359-363, 2007.

OTTONI, C.A.; CUERVO-FERNANDEZ, R.; PICCOLI, R. M.; MOREIRA, R.; MARESMA, B. G.; DA SILVA, E. S.; RODRIGUES, M. F. A.; MAIORANO, A. E. Media optimization for β-fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineeing**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 49-59, 2012.

PASSOS, L. M. N.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, [S.L.], v.33, n.2, p.385-390, 2003.

RICARDI, N. C. **Desenvolvimento de suportes porosos de sílica e suportes híbridos de sílica/quitosana para aplicação em catálise enzimática**. 2016. 85 f. Dissertação (Mestrado em

Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

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.

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

YUN, J. W.; SONG, S. K. Continuous production of fructooligosaccharides using fructosyltransferase immobilizedon ion exchange resin. **Biotechnol Bioprocess**, [S.L.], v. 1, p.18–21, 1996.

ZAMBELLI, P. TAMBORINI, L.; CAZZAMALLI, S.; PINTO, A.; ARIOLLI, S.; BALZARETTI, S.; PLOU, F. J.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; MOLINARI, F.; CONTI, P.; ROMANO, D. An efficient continuous flowprocess for the synthesis of a non-conventional mixture of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, [S.L.], v.190, p. 607–613, 2016.

ZHANG, J.; LIU, C.; XIE, Y.; LI, N.; NING, Z.; DU, N.; HUANG, X.; ZHONG, Y. Enhancing fructooligosaccharides production by genetic improvement of the industrial fungus *Aspergillus niger* ATCC 2061. **Journal of Biotechnology**, [S.L.], v. 249, p. 25-33, 2017.

ZHOU, Z.; INAYAT, A.; SCHWIEGER, W.; HARTMANN, M. Improvedactivity and stability of lipase immobilized in cage-likelarge pore mesoporous organosilicas. **Microporous Meso-porous Mater**, [S.L.], v. 154, p.133–141, 2012.

ZEFERINO, M. Soja: conjuntura e tendências 2019/20. Secretaria de agricultura e abastecimento - Instituto de Economia Agrícola (IEA), 2020. Disponível em: http://www.iea.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=14763. Acesso em: 06 abr. 2021.