



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE INULINASE PRODUZIDA POR *Aspergillus terreus* URM4658
EM PARTÍCULAS DE ALGINATO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE INULINA**

WALLACE RIBEIRO DA SILVA

Recife, PE

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

WALLACE RIBEIRO DA SILVA

**IMOBILIZAÇÃO DE INULINASE PRODUZIDA POR *Aspergillus terreus* URM4658
EM PARTÍCULAS DE ALGINATO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE INULINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. TATIANA SOUZA PORTO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO LIRA DE OLIVEIRA

Recife, PE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586i

Ribeiro da Silva, Wallace

IMOBILIZAÇÃO DE INULINASE PRODUZIDA POR *Aspergillus terreus* URM4658 EM PARTÍCULAS DE ALGINATO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE INULINA / Wallace Ribeiro da Silva. - 2023.
75 f. : il.

Orientadora: Tatiana Souza Porto.
Coorientador: Rodrigo Lira de Oliveira.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife, 2023.

1. *Aspergillus terreus*. 2. cinética. 3. fermentação em estado sólido. 4. imobilização. 5. inulinase. I. Porto, Tatiana Souza, orient. II. Oliveira, Rodrigo Lira de, coorient. III. Título

CDD 664

WALLACE RIBEIRO DA SILVA

**IMOBILIZAÇÃO DE INULINASE PRODUZIDA POR *Aspergillus terreus* URM4658
EM PARTÍCULAS DE ALGINATO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE INULINA**

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 28/02/2023 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em sua forma final.

Profa Dra Tatiana Souza Porto – Presidente/Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profa Dra Suzana Pedroza da Silva – Membro interno
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco – UFAPE

Profa Dra Camila Souza Porto – Membro externo
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Dedico este trabalho a minha mãe, que sempre acreditou em mim e me apoiou em todas as circunstâncias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele, nada de minha trajetória havia se concretizado. Ele sempre esteve comigo, em momentos de falhas e acertos, me guiando sobre quais decisões eu tomaria em minha vida.

Aos meus pais, José Rivaldo da Silva e Luciene Ribeiro da Silva, que sempre acreditaram em mim, muitas vezes mais do que eu. Diante de todas as dificuldades que tínhamos, eles sempre se esforçaram e depositaram confiança em mim de que tudo daria certo.

Em especial, a minha mãe, que sempre foi minha referência de dedicação, perseverança e força. Você sempre esteve presente comigo em todas as minhas decisões. Lembro como hoje, eu ligando para a senhora para ir levar o restante dos documentos para me matricular na universidade, sob fortes chuvas. A mulher que comprou o meu anel de formatura no terceiro período de curso, sem antes mesmo saber se eu finalizaria ou não. Ela que quando finalizava uma cliente, me cedia o dinheiro de seu trabalho para passagens e alimentação na universidade. Sem você, nada disso seria possível. Agradeço muito ao ser humano que você é e aos seus ensinamentos, você sempre será o meu maior exemplo. Obrigado por tudo, mãe!

Agradeço também aos meus amigos, Camila, Iasmin, Paulo, Rebeca e Thatianna, que de alguma forma, vibraram pelas minhas conquistas e me aconselharam sobre como conduzir em diversas situações. Em especial Paulo de Tarso, meu melhor amigo, confidente e irmão. Você me ajudou muito em todo esse processo. Obrigado!

À minha orientadora, Tatiana Souza Porto. Uma orientação que caiu de paraquedas sobre minha vida. Você é um exemplo de mulher, mãe e profissional. Você sempre se preocupou com o desenvolvimento da pesquisa de seus orientandos, fornecendo toda a ajuda necessária. Obrigado não apenas pela sua orientação, mas pelo exemplo de profissional que você é.

Ao meu coorientador, Rodrigo Lira de Oliveira. Você foi fundamental para o desenvolvimento de toda a minha pesquisa. Você é brilhante e se tornou um grande pesquisador. Que Deus te abençoe grandemente pelos seus ensinamentos.

A todos que fizeram parte da minha pesquisa no laboratório NUBIOTEC, direta e indiretamente, em especial Camila, Lígia e Lorena, sem vocês, as manhãs, tardes e algumas noites no laboratório não seriam as mesmas.

À UFRPE por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PGCTA). Este programa de Mestrado abriu as portas para minha carreira acadêmica.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos.

Por fim, agradeço a mim mesmo. Por toda minha dedicação e comprometimento, que diante de todas as dificuldades, não escolhi desistir.

A todos e todas, meu muito obrigado!

RESUMO

Inulinases são enzimas envolvidas na hidrólise de inulina, sendo divididas em endo e exoinulinases. A imobilização enzimática é uma alternativa viável, uma vez que é possível a sua recuperação e reuso por ciclos sucessivos. Diante disso, este trabalho objetivou desenvolver um processo de hidrólise de inulina a partir da inulinase de *Aspergillus terreus* URM4658 imobilizada em alginato de cálcio. As inulinases foram produzidas por FES utilizando farelo de trigo como substrato. As enzimas foram imobilizadas em partículas de alginato de cálcio, utilizando uma mistura de solução enzimática e alginato de sódio que foram gotejadas em solução de cloreto de cálcio, sob constante agitação, para formação das partículas. Para tanto, foi realizado um planejamento fatorial completo (2^3), variando as concentrações de cloreto de cálcio, alginato e tempo de cura, na finalidade de se obter a melhor condição para o maior rendimento de imobilização. O maior rendimento foi visualizado nas condições de maior concentração de cloreto de cálcio (0,35M), menor percentagem de alginato de sódio (1,25%) e maior tempo de cura (90min), apresentando um rendimento de 92,72% de atividade. A enzima foi caracterizada bioquimicamente e avaliada em relação aos seus parâmetros cinéticos. A inulinase imobilizada em alginato de cálcio na melhor condição de rendimento, apresentou uma temperatura ótima de 60°C e um pH ótimo de 7,0. Em relação aos parâmetros cinéticos, a enzima exibiu um K_m de 10,70 mM, V_{max} de 10,24 mM min⁻¹ e k_{cat} de 1,47 min⁻¹. Foram avaliadas as condições do biocatalisador imobilizado em 10 ciclos de reuso, apresentando uma atividade superior de 70% em todos os ciclos. Também foi determinada a estabilidade da enzima imobilizada ao longo do armazenamento de 30 dias, que preservou valores acima de 80% ao longo de todo o armazenamento. Portanto, a inulinase imobilizada apresentou características interessantes a nível industrial, podendo ser utilizada para a formação de fruto-oligossacarídeos e frutose.

Palavras-chave: *Aspergillus terreus*, cinética, fermentação em estado sólido, imobilização, inulinase.

ABSTRACT

Inulinases are enzymes involved in inulin hydrolysis, and are divided into endo- and exoinulinases. Enzymatic immobilization is a viable alternative, since it is possible to recover and reuse by successive cycles. Therefore, this work aimed to develop an inulin hydrolysis process from *Aspergillus terreus* URM4658 inulinase immobilized in calcium alginate. The inulinases were produced by FES using wheat bran as substrate. The enzymes were immobilized on calcium alginate particles, using a mixture of enzymatic solution and sodium alginate that were dropped in calcium chloride solution, under constant agitation, for particle formation. A complete factorial design was performed (2^3), varying the concentrations of calcium chloride, alginate and curing time, in order to obtain the best condition for the highest immobilization yield. The highest yield was seen under conditions of higher concentration of calcium chloride (0.35M), lower percentage of sodium alginate (1.25%) and longer curing time (90min), presenting a yield of 92.72% activity. The enzyme was characterized biochemically and evaluated in relation to its kinetic parameters. The inulinase immobilized in calcium alginate in the best yield condition, presented an optimal temperature of 60°C and an optimal pH of 7.0. Regarding the kinetic parameters, the enzyme exhibited a K_m of 10.70 mM, V_{max} of 10.24 mM min⁻¹ and k_{cat} of 1.47 min⁻¹. The conditions of the immobilized biocatalyst were evaluated in 10 reuse cycles, showing an activity higher than 70% in all cycles. The stability of immobilized enzyme over 30-day storage period was also determined, which preserved values above 80% throughout the entire storage period. Therefore, the immobilized inulinase presented interesting characteristics at the industrial level, and can be used for the formation of fructo-oligosaccharides and fructose.

Keywords: *Aspergillus terreus*, kinetics, solid state fermentation, immobilization, inulinase.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Projeção de Haworth da molécula de inulina. Fonte: Adaptado de ZOU et al. (2022).....20
- Figura 2.** Hidrólise de inulina a partir de inulinases. A: inulotriose; B: inulotetraose; C: inulopentaose; D: 1-kestose; E: nistose; F: frutofuranosil nistose. Fonte: O autor.....21
- Figura 3.** Projeção de Haworth dos principais frutooligossacarídeos (FOS). Fonte: Adaptado de BALI et al. (2015).....23
- Figura 4.** Fotomicrografia de *Aspergillus terreus* URM4658. Conidióforo (1); Vesícula (2); Fiálide (3); Conídios (4). Aumentado 40X. Fonte: O autor.....25
- Figura 5.** Diferentes métodos para a imobilização de enzimas. Fonte: O autor.....29
- Figura 6.** Estrutura molecular do alginato de sódio. M: Ácido manurônico; G: Ácido gulurônico. Fonte: Adaptado de MA et al. (2018).....36

ARTIGO

- Figura 1.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais das variáveis independentes (concentração de cloreto de cálcio – CaCl_2 , concentração de alginato e tempo de cura), e suas interações que influenciaram no rendimento de imobilização das inulinases em esferas de alginato por aprisionamento.....61
- Figura 2.** Diagrama de interpretação geométrica dos efeitos na interação entre Concentração de cloreto de cálcio (CaCl_2) e tempo de cura sobre o rendimento de imobilização de inulinases por aprisionamento.....62
- Figura 3.** Gráfico cúbico das interações entre a concentração de cloreto de cálcio – CaCl_2 , a concentração de alginato e o tempo de cura sobre o rendimento de imobilização das inulinases em alginato por aprisionamento.....63

- Figura 4.** Efeito da temperatura (A) e do pH (B) na atividade da inulinase imobilizada em alginato de cálcio de *Aspergillus terreus* URM4658 produzida por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.....64
- Figura 5.** Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da reação de hidrólise de inulina pela inulinase imobilizada em alginato de cálcio de *Aspergillus terreus* URM4658 produzida por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.....67
- Figura 6.** Efeitos dos ciclos de reuso (A) e da estabilidade operacional ao longo do armazenamento (B) da inulinase produzida por *A. terreus* em FES e imobilizada em alginato de cálcio.....68

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* produtores de inulinase. Fonte: O autor.....26

Tabela 2. Diferentes métodos e suportes utilizados para imobilização de inulinases. Fonte: O autor.....35

ARTIGO

Tabela 1. Planejamento fatorial completo 2^3 tendo como variáveis independentes cloreto de cálcio, alginato e tempo de cura e variável resposta o rendimento de imobilização.....60

LISTA DE ABREVIATURAS

CLEAs - Ligação por agregados enzimáticos reticulados (Cross-linked aggregates)

CLECs - Ligação cruzada por enzimas cristalizadas (Cross-linked enzyme crystals)

E_o - Concentração total da enzima, (kJ mol^{-1})

EC - Comissão Internacional de Enzimas

FES - Fermentação em Estado Sólido

FOS - Frutooligossacarídeos

F_{Sm} - Fermentação Submersa

F₃ - Inulotriose

F₄ - Inulotetraose

F₅ - Inulopentaose

GF₂ - 1-kestose

GF₃ - Nistose

GF₄ - Frutofuranosil nistose

IOS - Inulooligossacarídeos

k_{cat} - Constante catalítica (min^{-1})

K_m - Constante de Michaelis-Menten (mM)

V_{max} - Velocidade máxima, (mM min^{-1})

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1. Enzimas.....	18
3.1.1. Inulinases	19
3.1.1.2. Frutooligossacarídeos	22
3.2. <i>Aspergillus terreus</i>	24
3.3. Imobilização de enzimas.....	27
3.3.1. Adsorção	29
3.3.2. Ligação covalente	30
3.3.3. Aprisionamento.....	31
3.3.4. Ligação cruzada	32
3.4. Tipos de suporte.....	34
3.4.1. Alginato	35
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 1	52
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
2.1. Micro-organismo	56
2.2. Produção de inulinase e meio de fermentação.....	57
2.3. Determinações analíticas da inulinase imobilizada	57
2.4. Imobilização de inulinase em alginato.....	57
2.5. Caracterização bioquímica da inulinase imobilizada.....	58
2.6. Determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise de inulina.....	58
2.7. Capacidade de reutilização e estabilidade ao armazenamento da inulinase imobilizada	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1 Imobilização de inulinase em esferas de alginato.....	59
3.2 Caracterização bioquímica da inulinase imobilizada.....	63
3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise de inulina.....	66

3.4 Capacidade de reutilização e estabilidade ao armazenamento da inulinase imobilizada	67
4. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

Inulinases são uma classe de enzimas envolvidas na hidrólise de inulina, um polissacarídeo que possui polifrutano em sua composição e apresenta uma reconhecida matéria-prima para produção de xarope de frutose. As inulinases hidrolisam a ligação glicosídica β -2,1 resultando em frutose, frutooligossacarídeos (FOS), inulooligossacarídeos (IOS) e glicose. Estas enzimas podem ser agrupadas com base em seu mecanismo de ação em exo e endoinulinases. A exoinulinase (EC 3.2.1.80) libera sequencialmente unidades de frutose a partir da extremidade terminal da inulina, enquanto a endoinulinase (EC 3.2.1.7) age indiscriminadamente nas ligações internas da inulina para liberar FOS de comprimento variado da cadeia (SINGH et al., 2018; DAS; BHAT; SELVARAJ, 2019; SAIKIA et al., 2020).

Uma das principais aplicações da inulinase é a produção de frutose e consequentemente o xarope de alto teor de frutose. Sua obtenção a partir da hidrólise da inulina é considerado um método promissor, uma vez que é mais simples do que o método multienzimático convencional a partir de amido, por ser um método enzimático de etapa única, atingindo mais de 90% de rendimento de frutose sem necessidade de uma etapa adicional (DAS; BHAT; SELVARAJ, 2019; SAIKIA et al., 2020; SINGH et al., 2020). Outra aplicação bastante relevante dessas enzimas consiste na obtenção de FOS, um importante prebiótico para a indústria de alimentos, que quando presentes na dieta, são capazes de melhorar a saúde humana e prevenir o surgimento de várias doenças (KAUR et al., 2021; SINGH; SINGH, 2022b). Além disso, estas enzimas são também amplamente empregadas na produção de diferentes outros produtos de interesse industrial, tais como etanol, ácido lático e ácido cítrico (TEMKOV et al., 2019).

Com relação à obtenção, as inulinases já foram reportadas de diferentes origens, em animais, partes de plantas ricas em inulina e micro-organismos. No entanto, fontes de origem animal e vegetal não são a melhor opção para a produção de inulinase (SINGH et al., 2018). Neste sentido, as inulinases produzidas por micro-organismos apresentam-se mais promissoras, devido ao alto rendimento de produção, multiplicação rápida e facilidade de cultivo microbiano (SALEH et al., 2020). A produção de inulinases por micro-organismos é realizada a partir de processos fermentativos, podendo ocorrer em cultivo submerso (FSm) ou em estado sólido (FES). A FSm possui uma recuperação simples das enzimas extracelulares,

enquanto a FES apresenta um meio de cultivo mais barato e os produtos de sua diluição são mais estáveis quando comparados aos da FSm (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Processos enzimáticos industriais, como os reportados acima envolvendo inulinasas, geralmente apresentam alguns inconvenientes envolvendo o biocatalisador, principalmente relacionados a reutilização e estabilidade das enzimas frente às condições reacionais, como pH e temperatura. Para minimizar estes efeitos, os processos de imobilização enzimática apresentam-se como alternativas viáveis, uma vez que a enzima é ligada ou retida em um suporte sólido que é insolúvel na mistura reacional, possibilitando sua recuperação e reutilização por ciclos sucessivos. Além disso, as interações envolvidas com o suporte atuam melhorando a estabilidade da enzima frente às condições da reação como temperatura e pH (ZDARTA et al., 2018; SINGH et al., 2020).

A escolha do material do suporte a ser utilizado é uma etapa muito importante e um requisito essencial para imobilização enzimática é que este carreador ofereça um ambiente biocompatível e inerte (MIKANI; TORABIZADEH; RAHMANIAN, 2018). Entre os diversos materiais envolvidos, os biopolímeros apresentam várias vantagens como biodegradabilidade a produtos inofensivos, biocompatibilidade, não toxicidade e afinidade notável por proteínas, o que favorece a interação com enzimas. O alginato é um polissacarídeo natural derivado de algas marinhas, destaca-se pela sua capacidade de formar hidrogéis estáveis e biocompatíveis na presença de cátions bivalentes, apresentando um processo de imobilização bastante simples por encapsulação ou aprisionamento. Além disso, este suporte é seguro, simples, barato e oferece boa resistência mecânica e alta porosidade para difusão de substratos e produtos (DE OLIVEIRA et al., 2018; ZDARTA et al., 2018).

Diante do exposto, a presente dissertação teve como objetivo desenvolver a produção de inulinasas por fungo filamentososo do gênero *Aspergillus* da espécie *terreus* do tipo URM4658, por fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato. Após isso, as enzimas produzidas foram extraídas e congeladas para posteriores análises. No item 5. de resultados do artigo da dissertação, realizou-se um planejamento fatorial completo de imobilização da inulinase em alginato de cálcio, na finalidade de determinar qual a melhor condição de sua atividade. Além disso, estão presentes a caracterização bioquímica para determinação do pH e temperatura ótima da imobilização da enzima, bem como a análise cinética da inulinase imobilizada em alginato de cálcio e sua estabilidade ao longo do armazenamento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um processo de hidrólise de inulina a partir da inulinase de *Aspergillus terreus* URM4658 produzida por FES e imobilizá-la em alginato de cálcio, avaliando a sua capacidade de reuso e estabilidade ao armazenamento.

2.2. Objetivos Específicos

- Produzir inulinasas por Fermentação em Estado Sólido utilizando farelo de trigo;
- Imobilizar inulinasas por aprisionamento em partículas de alginato de cálcio;
- Avaliar por meio de planejamentos experimentais as variáveis que influenciam o processo de imobilização;
- Caracterizar bioquimicamente pelos parâmetros da influência de pH, temperatura na atividade e estabilidade da inulinase imobilizada;
- Determinar os parâmetros cinéticos relacionados à reação de hidrólise de inulina;
- Determinar os parâmetros cinéticos de inativação térmica da inulinase imobilizada;
- Avaliar a capacidade de reutilização e a estabilidade ao armazenamento da inulinase imobilizada;
- Avaliar a hidrólise de inulina por processo descontínuo utilizando a inulinase imobilizada;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Enzimas

As enzimas são macromoléculas biológicas, que possuem função catalítica e atividade intra ou extracelular, consideradas vitais no progresso da vida. São constituídas essencialmente de proteínas, com exceção de algumas ribozimas (MARZZOCO; TORRES, 2017; ZHANG et al., 2021). Esses biocatalisadores possuem inúmeras vantagens, como alta especificidade de reconhecimento de substrato, seletividade, eficiência na atividade catalítica e elevado rendimento de seus produtos (WANG et al., 2020; FENG et al., 2022).

Nesse sentido, as enzimas são consideradas catalisadores verdes naturais por serem biodegradáveis, biocompatíveis e obtidas de fontes acessíveis e renováveis, gerando menos resíduos que os catalisadores metálicos (BILAL et al., 2018; THANGARAJ; SOLOMON, 2019). Elas são capazes de acelerar as reações bioquímicas que ocorrem no meio intracelular, sem provocar alterações no seu equilíbrio, exigindo menos energia de ativação no processo (DU et al., 2021). Por esse motivo, a catálise envolvendo enzimas tem sido utilizada com frequência nas indústrias de alimentos, cosméticos, químicas e farmacêuticas (ERKAN et al., 2021; FOURNIÈRE et al., 2021; ZUCCARELLO et al., 2021; LI et al., 2021).

A grande maioria desses catalisadores são definidos como proteínas globulares formadas pela união de aminoácidos, constituindo a ligação peptídica. São moléculas que participam de maneira efetiva da reação, causando alterações em sua estrutura química durante esse processo. Porém, invariavelmente, retornam à sua forma original ao término dessas reações químicas. Nestas mesmas reações, os reagentes são chamados de substratos, que irão se ligar em uma pequena região bem definida da enzima, chamada de sítio ativo (MARZZOCO; TORRES, 2017).

As enzimas podem ser produzidas por diversas fontes diferentes, incluindo plantas, animais e micro-organismos. Contudo, a produção por plantas e animais possuem desvantagens significativas do ponto de vista econômico, pois a extração enzimática necessita de métodos caros de tecnologias baseadas em enzimas. Ao contrário destas fontes, enzimas microbianas apresentam extrações enzimáticas mais simples, com alta atividade catalítica e são produzidas em concentrações mais baixas de substrato (SINGH; SINGH, 2019; PAUL; KUMAR, 2020; SINGH; SINGH; KENNEDY, 2020; GERMEC; TURHAN, 2021).

A produção enzimática por micro-organismos pode ser realizada, basicamente, por dois processos de fermentação, sendo eles a FSm e a FES. Dentro dessas duas metodologias, a mais utilizada é a FSm, isso porque os micro-organismos, de forma geral, possuem uma

facilidade de crescimento em situações de controle de temperatura e pH, além da maioria das bactérias crescerem em ambiente com alta atividade de água, tornando mais fácil o processo da recuperação. Além disso, este tipo de fermentação é utilizado industrialmente para uma ampla produção de enzimas, utilizando grandes biorreatores para o processo (NAMNUCH; THAMMASITTIRONG; THAMMASITTIRONG, 2021; NAHER et al., 2021; SAVINO et al., 2021; GARRIDO-GALAND et al., 2021). Entretanto, a fermentação em estado sólido acaba apresentando uma série de vantagens quando comparada à fermentação submersa, principalmente relacionadas aos altos rendimentos obtidos, somados a um aumento da atividade metabólica, baixa necessidade de energia, extração mais simples de enzimas, facilidade de recuperação dos produtos, além de possuir uma baixa contaminação por outros micro-organismos (SADH; DUHAN; DUHAN, 2018; LEITE et al., 2019; LÓPEZ-GÓMEZ; VENUS, 2021; ZAIER et al., 2021).

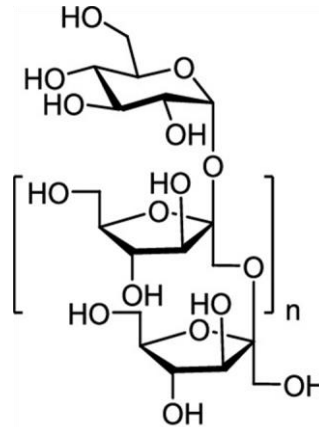
Nesse sentido, uma peculiaridade da FES é a baixa atividade de água do meio, o que acaba limitando o crescimento de alguns micro-organismos, especialmente as bactérias. Baseado nessa teoria, somente fungos e leveduras seriam adequados para esse tipo de fermentação. Porém, alguns estudos relataram a possibilidade de bactérias serem utilizadas nesse processo, isso quando a manipulação e o controle são realizados de forma efetiva (WANG et al., 2021b; SINGH et al., 2021). Além disso, a FES apresenta um meio de cultivo mais barato, devido a utilização de resíduos agroindustriais que muitas vezes são descartados pelas indústrias de processamento agrícola (DE OLIVEIRA et al., 2020). A principal classe de micro-organismos envolvidos na produção de inulinase usando FES são fungos filamentosos e leveduras, destacando-se os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Kluyveromyces*, respectivamente (DAS; BHAT; SELVARAJ, 2019; GUERRERO-URRUTIA et al., 2021).

3.1.1. Inulinases

A inulina é um polissacarídeo que está frequentemente presente em bulbos de plantas, raízes tuberosas e tubérculos, sendo uma matéria-prima indispensável para o desenvolvimento de probióticos em alimentos, como exemplo do leite em pó e iogurte (SINGH; SINGH; KENNEDY, 2020; HUANG et al., 2021). A nível estrutural, ela é uma cadeia linear composta de 2 a 60 monômeros de unidades frutose e uma unidade de glicose presente na extremidade terminal, que estão interagindo entre si por meio de ligações glicosídicas β -D (2 \rightarrow 1), como mostrado na Figura 1 (SINGH; SINGH; KENNEDY, 2020. WANG et al., 2021a; GERMEC; TURHAN, 2021). Atualmente, os pesquisadores vêm investindo, em proporções mundiais,

estudos que envolvem a obtenção de frutooligossacarídeos e xarope de frutose através da hidrólise de inulina (SINGH; SINGH; KENNEDY, 2020).

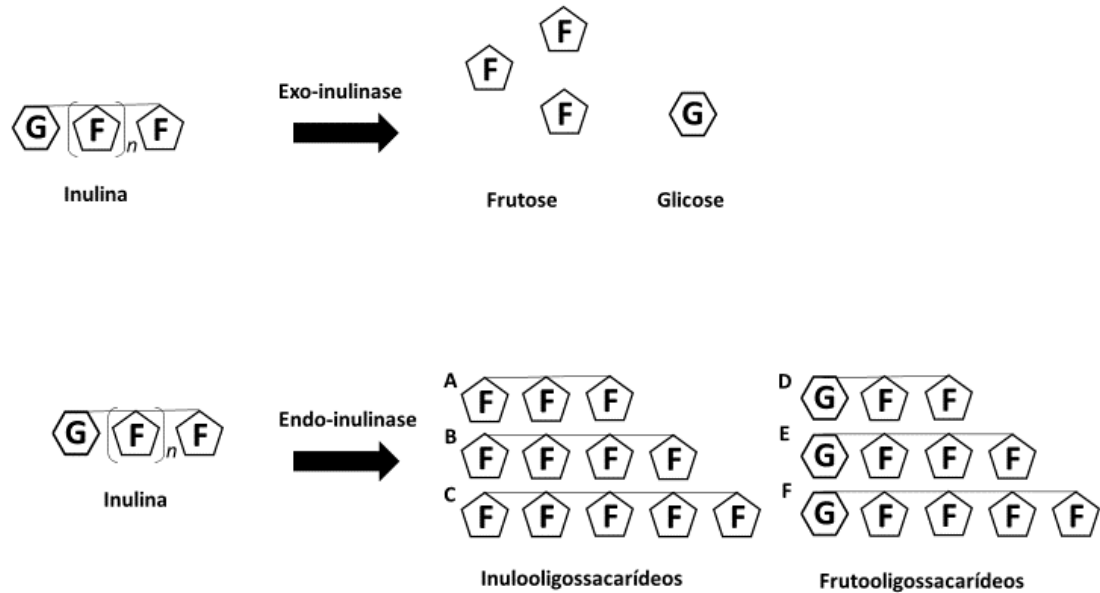
Figura 1. Projeção de Haworth da molécula de inulina. Fonte: Adaptado de ZOU et al. (2022).



As inulinases são enzimas que catalisam a hidrólise da molécula de inulina, obtendo como principais produtos FOS, inulooligossacarídeos (IOS) e frutose (GERMEC; TURHAN, 2021). Essas enzimas podem ser obtidas de diferentes fontes, sendo elas plantas, raízes e tubérculos ricos em inulina, animais, bactérias, fungos e leveduras. Entretanto, inulinases são preferencialmente produzidas por micro-organismos, a saber, bactérias, fungos e leveduras, sendo estes últimos os maiores produtores das inulinases (RIBEIRO; FERNANDES; ASSIS, 2018; CORRADO et al., 2021).

Esses biocatalisadores obtidos por micro-organismos sofrem classificação conforme o seu modo de ação, sendo classificados em exoinulinases (2,1- β -D-frutano-frutohidrolase; EC 3.2.1.80) ou endoinulinases (β -D-frutano-frutano-hidrolase; EC 3.2.1.7), como pode ser visualizado na Figura 2. Exoinulinases agem nas ligações glicosídicas mais externas da cadeia de inulina, liberando principalmente produtos de frutose, que podem ser utilizados para a produção de oligossacarídeos. Essa classe de enzimas pode hidrolisar totalmente a inulina por uma única etapa enzimática, apresentando 95% de pureza para o concentrado de frutose obtido (GUERRERO-URRUTIA et al., 2021).

Figura 2. Hidrólise de inulina a partir de inulinases. A: inulotriose; B: inulotetraose; C: inulopentaose; D: 1-kestose; E: nistose; F: frutofuranosil nistose. Fonte: O autor.



As endoinulinases, por sua vez, catalisam as ligações mais internas da cadeia de inulina, sem apresentar atividade de invertase, tendo como principais produtos os FOS, sendo eles 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄); também podem produzir IOS, sendo os mais comuns inulotriose (F₃), inulotetraose (F₄) e inulopentaose (F₅) (CORRADO et al., 2021). Essas classes de enzimas são utilizadas de forma ampla na produção de frutooligossacarídeos, que são ingredientes alimentares com propriedades nutracêuticas, podendo ser aplicados em produtos hipocalóricos. Além desses efeitos, os FOS apresentam baixa cariogenicidade e um poder de doçura de 0,4-0,6 vezes maior quando comparado à sacarose (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2020). Por essa razão, eles são geralmente aplicados como substitutos do açúcar em produtos de panificação (KRUPA-KOZAK et al., 2020) e em suco de frutas (SHARMA et al., 2020).

Nos últimos anos, a indústria açucareira enfrentou grandes desafios em relação à concorrência intensa do xarope de alto teor de frutose, produto este utilizado como um alternativo adoçante de custo relativamente baixo. Diante dessa crescente necessidade, a inulinase oferece perspectivas favoráveis em relação a produção desses xaropes ricos em frutose puros, além dessa enzima apresentar uma alternativa de produção de xaropes de ultra-alta-frutose-glicose a partir do substrato de inulina e não do amido (HOLYAVKA et al., 2019).

Sendo assim, a produção de xarope de frutose a partir da inulina é a aplicação principal das inulinases, visto que a conversão do amido em frutose necessita de etapas multienzimáticas e apresenta uma conversão aproximada de 45% de frutose obtida. Já a conversão a partir da inulina, além de necessitar de uma única etapa enzimática, utilizando a própria inulinase, ela hidrolisa a inulina em frutose de forma praticamente pura, além de facilmente alcançar uma produção de 95% de frutose (HOLYAVKA et al., 2019; WANG et al., 2021a).

Nesse sentido, as inulinases tornam-se biocatalisadores necessários em processos industriais, pois são amplamente utilizadas na produção de açúcares, produzindo xaropes de alto teor de frutose, através da hidrólise enzimática, além de serem aplicadas para produzir fruto-oligossacarídeos, que são ingredientes com propriedades funcionais. Além disso, essas enzimas podem ser utilizadas na fabricação de outros produtos, a exemplo do ácido cítrico, bioetanol, álcoois e ácido lático, porém, em menor proporção (TEMKOV et al., 2019; GERMEC; TURHAN, 2021).

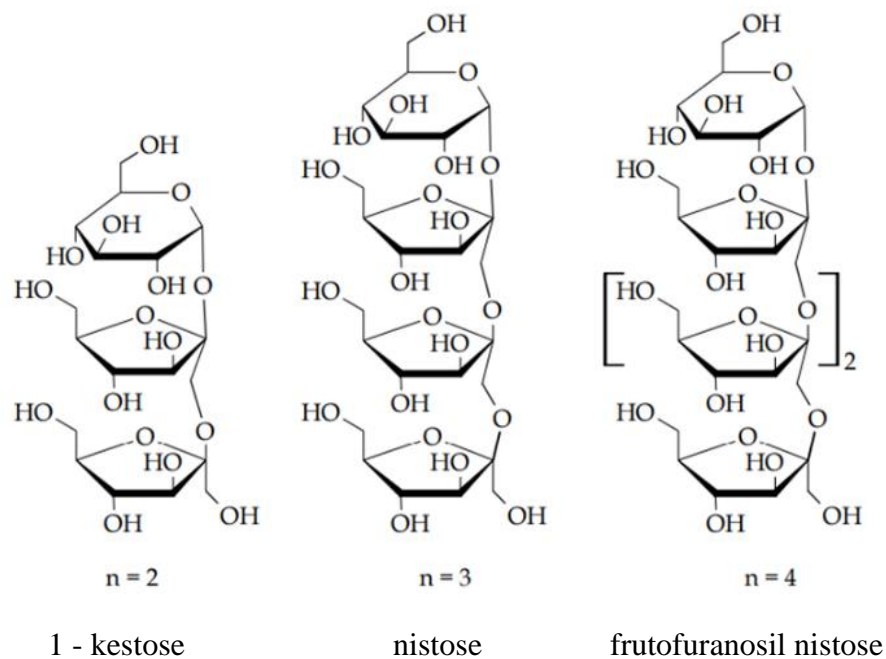
3.1.1.2. Frutooligossacarídeos

Oligossacarídeos são glicosídeos que possuem em sua composição uma variação de 2 a 9 unidades de monossacarídeos, as quais estão unidas por ligações glicosídicas (SINGH et al., 2021; SINGH; SINGH, 2022a). Nos últimos anos, a sua demanda vem crescendo de forma contínua em indústrias de alimentos por apresentarem baixa caloria, não oferecerem cariogenicidade e aumentarem o crescimento de micro-organismos benéficos. Os oligossacarídeos englobam principalmente os frutooligossacarídeos, maltooligossacarídeos, isomaltooligossacarídeos e galactooligossacarídeos. Dentre eles, os frutooligossacarídeos se destacam devido a sua aplicação em grande escala, pois são ingredientes funcionais de produtos alimentícios que possuem características prebióticas, podendo ser utilizados como substitutos de sacarose e gorduras (CATENZA; DONKOR, 2021; CHAROENWONGPAIBOON; WANGPAIBOON; PICHYANGKURA, 2021). Além disso, mascaram o sabor amargo dos edulcorantes acessulfame e aspartame, elevam a vida útil de alimentos processados e podem ser aplicados em alimentos industrializados na finalidade de reduzir calorias (KRUSCHITZ; NIDETZKY, 2020).

Os FOS são também conhecidos como açúcares não convencionais, pois não são digeríveis, chegando intactos ao cólon. Por essa razão, promovem benefício à saúde do hospedeiro, estimulando de forma seletiva a atividade e o crescimento de bactérias colônicas

(SINGH; SINGH, 2022a; GU et al., 2022). Nesse sentido, esses componentes são classificados como fibras dietéticas e estão presentes nos alimentos como ingredientes alimentares e não aditivos (MACEDO; VIMERCATI; ARAÚJO, 2020). Do ponto de vista bioquímico, os FOS são oligômeros de frutose, compostos de GF2, GF3 e GF4 (Figura 3), constituídos por ligações glicosídicas β -(2 \rightarrow 1), de 3 a 10 unidades de frutose, com a frutose terminal ligada a uma molécula de glicose, formando uma extremidade não redutora de sacarose (MACEDO; VIMERCATI; ARAÚJO, 2020; SEPÚLVEDA-QUIROZ et al., 2021; HAJAR-AZHARI et al., 2021).

Figura 3. Projeção de Haworth dos principais frutooligossacarídeos (FOS). Fonte: Adaptado de BALI et al. (2015).



Geralmente, a purificação de FOS envolvendo matérias-primas ricas em inulina é um bioprocesso de elevado custo. Para sanar essa limitação, os FOS são sintetizados a partir da sacarose, com a utilização das enzimas β -frutofuranosidases, ou até mesmo através da hidrólise de inulina, pelo uso das endoinulinases. Normalmente, esses são os métodos utilizados para a produção de FOS em grande escala (SINGH; SINGH, 2022a). Os FOS obtidos a partir da hidrólise controlada da inulina são estruturalmente semelhantes aos produzidos por enzimas que atuam sobre a molécula de sacarose, como a β -frutossiltransferase

e a β -frutofuranosidase, e ambos têm propriedades funcionais e fisiológicas semelhantes. Contudo, a formação de FOS através de endoinulinases é preferível, pois a presença do grupo frutossil pode diminuir a concentração do produto final, além de possuir um elevado custo das enzimas para transfrutossilagem (RIBEIRO et al., 2021b).

Dentro dos possíveis efeitos benéficos que os FOS são capazes de oferecer, já está bem elucidada a sua estimulação do crescimento de bifidobactérias no trato digestivo (HAJAR-AZHARI et al., 2021; GU et al., 2022; ZHANG et al., 2022). Além disso, eles possuem características bioativas consideráveis em alimentos, apresentando diminuição de glicose sanguínea, colesterol, triglicerídeos e fosfolípidios, melhora cognitiva, são capazes de suprimir bactérias patogênicas intestinais e, conseqüentemente, reduzir o desenvolvimento de câncer de cólon (RAHIM et al., 2021; BRAGA et al., 2022; JANGID et al., 2022). Embora sejam notórios os benefícios dos FOS, sua ingestão excessiva pode estar associada a ocorrência de flatulências, estando mais presentes em indivíduos que possuem intolerância à lactose. Estudos científicos apontam que doses entre 20-30g de FOS por dia são capazes de desencadear desconforto gastrointestinal severo em indivíduos. Portanto, o controle da sua quantidade consumida é o melhor caminho para evitar esses desconfortos, sendo 10g por dia por pessoa a dose de consumo ideal recomendada (MACEDO; VIMERCATI; ARAÚJO, 2020).

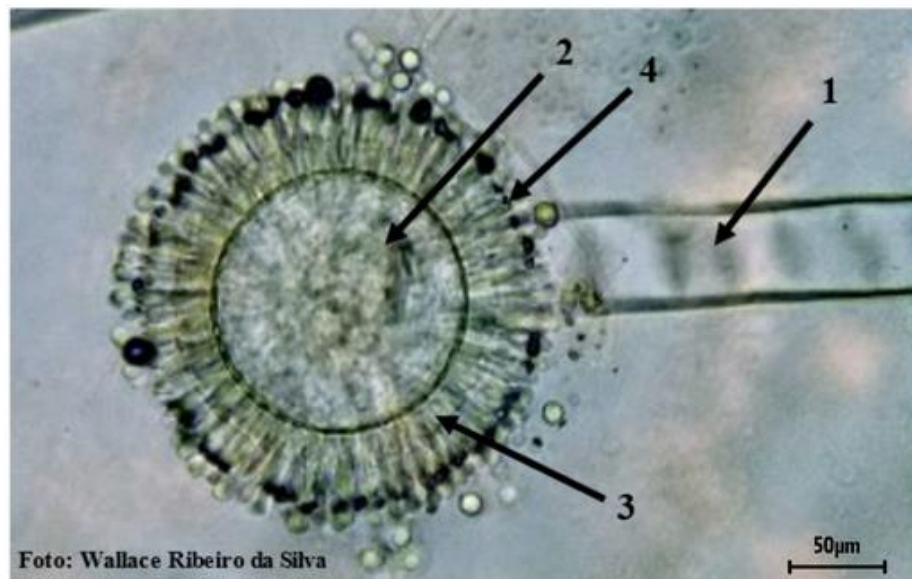
3.2. *Aspergillus terreus*

Geralmente, os micro-organismos são a fonte de preferência para a produção de biocatalisadores. Dentre eles, fungos filamentosos de gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* produzem enzimas consideradas seguras de acordo com a *Food and Drug Administration* (VIDYA et al., 2020). Contudo, o *Aspergillus* se destaca por apresentar cada vez mais estudos científicos que comprovam a produção de enzimas com alta capacidade catalítica e estabilidade enzimática (ALMEIDA et al., 2018; AZZAZ et al., 2020; VIDYA et al., 2020; VAZ et al., 2021).

O gênero *Aspergillus* engloba uma quantidade superior a 300 espécies reconhecidas, com diferentes espécies de relevância, que podem ser aplicadas nas áreas de produção de alimentos e na biotecnologia (CORRÊA et al., 2020). *Aspergillus terreus* (Figura 4) é um fungo do tipo filamentoso saprófita, pertencente da família *Aspergillaceae*, que já foi isolado em diversas amostras, incluindo milho, amendoim, cevada, pastagens e solo (JAIN; KATYAL, 2018; DADHEECH et al., 2019; CHEIN et al., 2019; ASHTEKAR et al., 2021).

Sua reprodução ocorre de forma assexuada, envolvendo dois tipos de conídios, sendo eles conídios que se produzem na ponta dos conidióforos e conídios acessórios que crescem lateralmente por meio das hifas, também chamados de aleurioconídios (SATO et al., 2022).

Figura 4. Fotomicrografia de *Aspergillus terreus* URM4658. Conidióforo (1); Vesícula (2); Fiálide (3); Conídios (4). Aumentado 40X. Fonte: O autor.



Em condições de temperatura e atividade de água adequadas, os conídios fúngicos, que são esporos assexuados, são capazes de germinar, formando as hifas. A formação dessas hifas acontece devido a capacidade do fungo absorver água através das paredes dos esporos, que ativa o citoplasma e estimula a divisão celular. Além disso, eles obtêm nutrientes por meio da secreção de enzimas extracelulares no substrato utilizado para o crescimento. Sendo assim, os componentes presentes no substrato são absorvidos pelas paredes das hifas do fungo, promovendo a sua nutrição (SOBOLEV et al., 2019).

A. terreus possui um potencial biotecnológico relevante, visto que ele é capaz de produzir diferentes tipos de enzimas, incluindo celulase, xilanase (CORRÊA et al., 2020), tanase (AZZAZ et al., 2020), invertase (ALMEIDA et al., 2018) e inulinase (MAGADUM; YADAV, 2018; DE OLIVEIRA et al., 2022). As inulinases podem ser obtidas de animais, plantas e diversos grupos de micro-organismos. No entanto, fungos filamentosos são os preferíveis para produzirem essas enzimas a partir de diferentes grupos microbianos, isso porque eles toleram elevadas temperaturas, apresentam baixa estabilidade de pH, exigem substrato de baixo custo para fermentação ideal e apresentam sinergia entre endo e

exoinulinase na obtenção do produto (SINGH; CHAUHAN, 2018). Dentre esses fungos utilizados, atualmente, a produção de inulinases utilizando o gênero de *Aspergillus* sp. vem aumentando de forma contínua, pois as inulinases produzidas por esse grupo fúngico além de apresentarem características únicas, também possuem atividades biocatalíticas eficientes (SINGH et al., 2020b). Na Tabela 1 pode-se visualizar os fungos filamentosos mais utilizados do gênero *Aspergillus* produtores de inulinases, bem como o seu tipo de fermentação, substrato utilizado e valores de atividade máxima enzimática obtidos.

Tabela 1. Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* produtores de inulinase. Fonte: O autor.

Micro-organismo	Tipo de fermentação	Substrato utilizado	Valores de atividade máxima	Referência
<i>A. niger</i>	FES	Extrato de alfarroba	1560.17 U mL ⁻¹	ILGIN; GERMEC; TURHAN, 2020.
<i>A. terreus</i>	FES	Farelo de trigo	15.08 U mL ⁻¹	DE OLIVEIRA et al., 2022;
<i>A. brasiliensis</i>	FES	Sacarose	5.88 ± 0.78 U mL ⁻¹	GUERRERO-URRUTIA et al., 2021.
<i>A. wewitschiae</i>	FSm	Folhas de alcachofra	7.08 U mL ⁻¹	SALEH et al., 2020.
<i>A. flavus</i>	FSm	Sal mineral de sacarose	12 ± 0.03 U mL ⁻¹	SIKANDER; KHALID, 2020.
<i>A. oryzae</i>	FSm	Sal mineral de sacarose	17 ± 0.04 U mL ⁻¹	SIKANDER; KHALID, 2020.
<i>A. versicolor</i>	FES	Cascas de laranja	1.917 ± 0.016 U/gds*	DAS; BHAT; SELVARAJ, 2019.
<i>A. parasiticus</i>	FES	Bagaço de cana-de-açúcar	1.773 ± 0.627 U/gds*	DAS; BHAT; SELVARAJ, 2019.
<i>A. tamaritii</i>	FES	Farelo de trigo	218.3 ± 1.4 U/gds*	GARUBA; ONILUDE, 2020;

* Unidade por grama de substrato seco

3.3. Imobilização de enzimas

Enzimas em sua forma solúvel geralmente apresentam alguns inconvenientes, como exemplo do comprometimento de sua estabilidade em condições de temperaturas elevadas e alterações de pH, levando a uma perda enzimática durante a reação catalítica (NADAR et al., 2018; ZHOU et al., 2021). Nesse sentido, grande parte das enzimas apresentam uma sensibilidade às condições reacionais devido à instabilidade termodinâmica de sua estrutura terciária em situações artificiais, onde estresses térmicos ou a utilização de solventes orgânicos são capazes de alterar ou inibir sua capacidade de catálise (LIANG et al., 2021).

Na finalidade de superar essas limitações impostas através do uso de enzimas no âmbito industrial, existem algumas alternativas que podem estabilizar as enzimas, como modificação química (GLUSAC; FISHMAN, 2021), engenharia genética (GIESSEL et al., 2022) e imobilização (ZHOU et al., 2021). Dentre essas opções, a técnica de imobilização enzimática se destaca por apresentar um aumento da seletividade para substratos não naturais, melhorar a estabilidade das enzimas e propriedades funcionais, além de ser capaz de reduzir a inibição do produto de reação. Além disso, a enzima imobilizada é separada facilmente do meio e reutilizada, caracterizando um processo econômico e viável (GAN et al., 2021; LIU et al., 2021; CALIFANO; COSTANTINI, 2021; ATIROĞLU; ATIROĞLU; ÖZACAR, 2021).

A imobilização enzimática é desenvolvida através da interação entre a enzima e o material de suporte utilizado na imobilização. Para imobilizar uma enzima de forma eficiente, é de fundamental importância conhecer as características funcionais e estruturais das matrizes de suporte e das superfícies enzimáticas. Além disso, outros fatores importantes que estão envolvidos na eficiência de imobilização enzimática são ponto isoelétrico, flexibilidade conformacional da enzima, grupos funcionais de superfície, estabilidade durante a imobilização, presença de aditivos, glicosilação e regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (LIU et al., 2021).

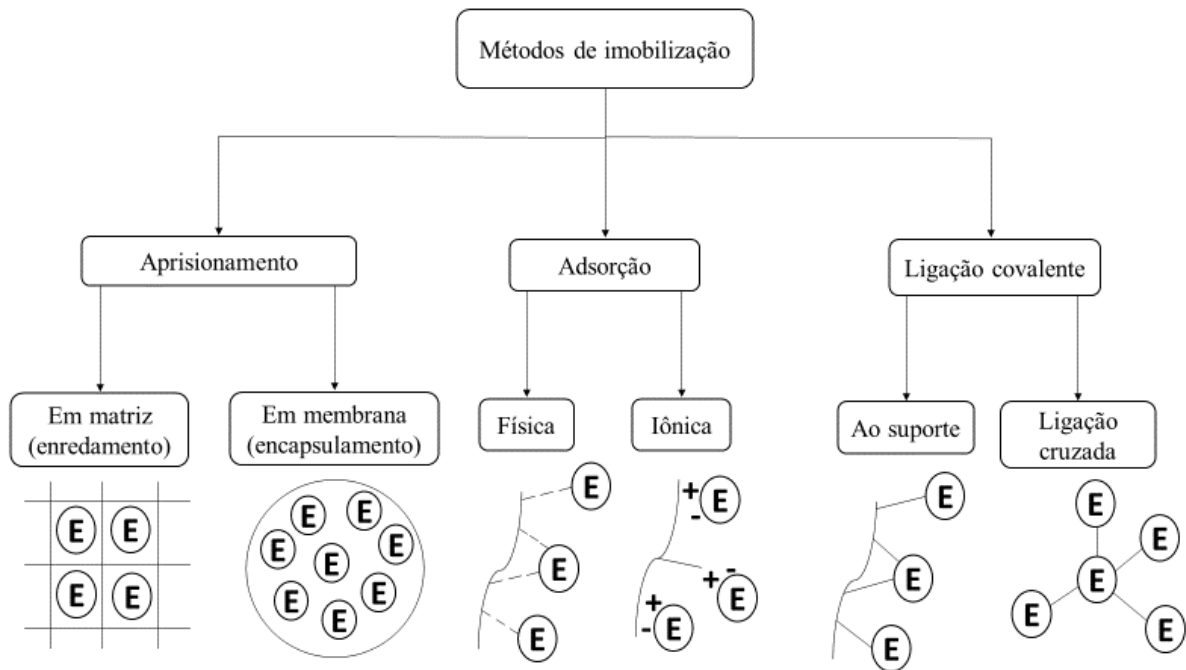
Embora a imobilização enzimática apresente benefícios expressivos do ponto de vista biotecnológico, biocatalisadores imobilizados podem apresentar atividade enzimática diminuída em comparação com as enzimas livres, isso porque no processo de interação entre a enzima e o suporte, parte do sítio ativo enzimático pode estar participando da ligação, o que acaba contribuindo para a diminuição da capacidade catalítica da enzima (FILHO; VITOLO, 2017; LIU et al., 2021). No entanto, a técnica de imobilização também pode apresentar um aumento de sua atividade enzimática, pois em determinados casos a estabilização de catalisadores produz uma enzima mais ativa sob situações adversas (DAL MAGRO et al.,

2019; DAL MAGRO et al., 2020). Outra vantagem seria a redução dos requisitos de processos de *downstream*, devido aos produtos serem facilmente liberados das enzimas imobilizadas (ARANA-PEÑA et al., 2021). Sendo assim, biocatalisadores imobilizados são mais estáveis e possuem maior desempenho catalítico comparados aos livres (FENG et al., 2022).

Devido às diferentes características físico-químicas encontradas nos diversos biocatalisadores existentes, não existe um método único de imobilização enzimática aplicável a todas as enzimas. A escolha do método é baseada em parâmetros como o custo de imobilização, atividade geral do biocatalisador, condições de regeneração e inativação, toxicidade dos reagentes utilizados para imobilização e características desejadas da enzima imobilizada (TEMKOV et al., 2019; ZHAO et al., 2021; WELTER et al., 2022). Tais parâmetros têm a finalidade de se obter condições de maior estabilidade e retenção do poder catalítico da enzima, além de apresentar uma boa durabilidade (FEDERSEL; MOODY; TAYLOR, 2021). Sendo assim, a técnica de imobilização utilizada deve ser escolhida com cautela, devendo-se levar em consideração o tipo de interação entre a enzima e o suporte, se mais forte ou mais fraca, número de ciclos de reuso enzimático, além das intenções em manter, modificar ou potencializar as propriedades do biocatalisador (RIBEIRO et al., 2021a).

Nesse sentido, as enzimas imobilizadas apresentam resultados promissores a nível de estabilidade térmica, ao pH e ao armazenamento. Além disso, são facilmente separadas do produto, possíveis de serem reutilizadas, catalisam substratos não naturais e possibilitam reações novas (BILAL et al., 2018; BILAL; IQBAL, 2019; ZHAO et al., 2021). Através da imobilização, outras propriedades enzimáticas podem ser melhoradas, a exemplo da pureza, seletividade, atividade ou especificidade enzimática, além de poderem apresentar resistência a inibidores (BILAL et al., 2019a; MORTAZAVI; AGHAEI, 2020; ARANA-PEÑA et al., 2021). Baseado nisso, diferentes estudos apontaram que, nas últimas décadas, os principais métodos utilizados para imobilização enzimática, como pode ser visualizado no diagrama da figura 5, foram por adsorção, ligação covalente, aprisionamento e ligação cruzada (*cross-linking*), cada um com suas vantagens e desvantagens, tornando-os difíceis de serem comparados (REIS et al., 2019; MORTAZAVI; AGHAEI, 2020; LIU; MA; SHI, 2020; ASHKAN et al., 2021).

Figura 5. Diferentes métodos para a imobilização de enzimas. Fonte: O autor.



3.3.1. Adsorção

A imobilização de enzimas por adsorção consiste na interação entre a enzima e o suporte por meio de ligações fracas, sendo elas as ligações iônicas, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Ela é dividida em adsorção por troca iônica e adsorção física. A adsorção por troca iônica interage com o suporte por meio da ligação iônica, já a adsorção física é marcada pelas ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Dentre as técnicas disponíveis, essa não induz alteração química da enzima, causando mínimo distúrbio em sua estrutura nativa (VILAR; IKUMA, 2021; ASHKAN et al., 2021; REN et al., 2021; YAO et al., 2022; CAVALCANTI et al., 2022). Entretanto, sua interação física é reversível, devido a facilidade de a ligação ser desfeita entre a enzima e o suporte utilizado (YAO et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022). Além disso, a atividade dos biocatalisadores que se encontram adsorvidos é fortemente induzida pela fixação e rearranjo das superfícies sólidas. Sendo assim, a configuração dessa imobilização é influenciada por fatores como pH, superfície química, temperatura e força iônica (VILAR; IKUMA, 2021).

A técnica de imobilização enzimática por adsorção frequentemente preserva a capacidade de hidrólise da enzima, no entanto, é bem comum neste tipo de método acontecer perda da enzima imobilizada ao longo do armazenamento, isso porque a interação entre a enzima e o suporte é relativamente fraca (ZHAO et al., 2021; ASHKAN et al., 2021;

ZANKER et al., 2021). Outrossim, nesse método, a não especificidade das interações entre a enzima e o suporte pode originar vazamento enzimático de forma inesperada, induzido pelas variações de temperatura, força iônica e pH (ASHKAN et al., 2021). Contudo, com a utilização de técnicas combinadas de imobilização, como exemplo da adsorção seguida de aprisionamento, é possível minimizar algumas dessas limitações impostas, devido ao aumento de sua estabilidade e termoestabilidade ao longo do armazenamento (TIZCHANG et al., 2021).

A imobilização por adsorção é considerada uma técnica simples, e uma das principais vantagens desse método está associada ao baixo custo, que se destaca pelo fato de existir a possibilidade de reutilização do suporte e de não haver a necessidade de ativação do mesmo. Além disso, a adsorção provoca pouca mudança na estrutura enzimática, visto que a imobilização da enzima no suporte é de caráter espontâneo, seguindo uma orientação de forma preferencial e energeticamente favorável (XU et al., 2021; ASHKAN et al., 2021; TIZCHANG et al., 2021). Os principais suportes utilizados neste tipo de imobilização incluem polissacarídeos, tais como quitina, celulose, carboximetilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose, proteína e álcool polivinílico (SHAHID et al., 2020; DE CASTRO et al., 2022).

3.3.2. Ligação covalente

A ligação covalente envolve um método de meio químico, sendo baseada na formação de interações mais fortes entre a enzima e o suporte utilizado (ASHKAN et al., 2021; ZDARTA et al., 2022). Essa ligação proporciona uma força elevada que frequentemente envolve diversos resíduos enzimáticos, configurando uma rígida estrutura, capaz de proporcionar a enzima maiores tolerâncias perante variações de calor, pH extremos e presença de solventes orgânicos, podendo manter a estrutura enzimática inalterada (OLIVEIRA et al., 2022). Desse modo, dentre as técnicas disponíveis para imobilização de enzimas, as ligações por adsorção e por ligação covalente são as mais aplicadas. Geralmente, a adsorção aumenta a atividade da enzima e possui uma baixa estabilidade, enquanto a ligação covalente apresenta uma menor atividade e uma maior estabilidade (AGHAEI et al., 2022). Entretanto, isso não é regra, pois em outros trabalhos envolvendo a imobilização de enzimas foram vistas uma boa atividade e estabilidade para ligações covalentes e por adsorção (HOSSEINI et al., 2018; SEL et al., 2021).

Um fator que determina essa estabilidade é a direção da ligação entre a enzima e o suporte. Estudos apontaram que o nível de atividade enzimática é mais elevado quando os aminoácidos centrais ativos não estão participando da ligação com o suporte utilizado, caso contrário, as enzimas podem ser parcialmente ou totalmente inativadas (REN et al., 2021). Geralmente, as matrizes mais utilizadas nesse tipo de imobilização incluem celulose, agarose, vidro poroso e resina de troca iônica (MORELLON-STERLING et al., 2021; SHOMAL et al., 2021; KURIBAYASHI et al., 2021; BRISOLA et al., 2022).

Frequentemente, a técnica de ligação covalente se inicia com a alteração da superfície do suporte na presença de reagentes ativadores; tal ato tem a finalidade de modificar os grupos funcionais de sua matriz, produzindo intermediários reativos (ZDARTA et al., 2022). Dos reagentes mais utilizados para atingir essa ativação, o glutaraldeído é o mais empregado, pelo fato de promover condições enzimáticas ativas e estáveis (GIRELLI; SCUTO, 2021). Entretanto, comparado aos outros métodos de imobilização, a seleção das condições da técnica por ligação covalente é mais difícil (REN et al., 2021). Seus principais inconvenientes estão relacionados à diminuição da atividade catalítica da enzima ou sua parcial inativação, pois a ligação covalente promove uma alteração da conformação nativa enzimática, devido principalmente à interação entre a enzima e os grupos reativos do suporte (REN et al., 2021; ZANKER et al., 2021).

3.3.3. Aprisionamento

A imobilização por aprisionamento consiste na retenção física da enzima dentro de uma matriz polimérica, que pode ser por ligações covalentes ou não, estando esses biocatalisadores retidos dentro de géis ou fibras (RIBEIRO et al., 2021a; NÁJERA-MARTÍNEZ et al., 2022). É definido como um método irreversível de imobilização enzimática, onde a enzima fica restrita em um espaço ou rede confinada (SHARMA et al., 2021; KABERNICK; GOSTICK; WARD, 2022). Nesse processo, a desnaturação é geralmente evitada, pois a enzima não interage quimicamente com o suporte utilizado. Sendo assim, a imobilização por aprisionamento pode melhorar a estabilidade mecânica (SHOMAL et al., 2021; OGUNBADEJO; AL-ZUHAIR, 2021; RIBEIRO et al., 2021a).

Nesse método, o material de encapsulamento pode ser modificado. Além disso, essa técnica permite criar um ambiente ideal a nível de polaridade, pH e afinidade, podendo isso ser alcançado através de diferentes materiais, como polímeros, géis e outros elementos

inorgânicos (SHARMA et al., 2021). Diferentes polímeros podem ser utilizados como matriz na imobilização por aprisionamento, como o alginato, quitosana, poliacrilamida, carragenina, colágeno, borracha de silicone, gelatina, álcool polivinílico com grupo estirilpirídio e poliuretano (SHARMA et al., 2021; TERCAN; SÜRMELE; ŞANLI-MOHAMED, 2021; ZHU et al., 2022). Dentre eles, o alginato é o mais aplicado, devido às suas propriedades não tóxicas, de baixo custo, por possuírem biocompatibilidade favorável e capacidade de gelificação suave (TERCAN; SÜRMELE; ŞANLI-MOHAMED, 2021).

A técnica de imobilização por aprisionamento, ou também chamada de encapsulamento, é uma das mais simples, podendo ser utilizada para imobilizar um ou vários tipos de proteínas. A grande vantagem desse método consiste na proteção da enzima em relação ao contato direto com o meio reacional, o que acaba minimizando a inativação enzimática na utilização de solventes orgânicos. Além disso, facilita a separação da enzima imobilizada da mistura de reação e aumenta a estabilidade em diferentes temperaturas e pH (LYU et al., 2021; SHARMA et al., 2021; ALI et al., 2021).

Entretanto, uma das limitações encontradas nesse processo está relacionada à transferência de massa do substrato ou analito para o sítio ativo enzimático. Além disso, quando os poros da matriz utilizada são extensos, acabam facilitando a possibilidade de vazamento das enzimas; conseqüentemente, ocasionam ineficiência na imobilização, baixa capacidade de carga e desgaste do suporte durante o uso (ZHAO et al., 2021; TERCAN; SÜRMELE; ŞANLI-MOHAMED, 2021; RIBEIRO et al., 2021a). Desse modo, na técnica por aprisionamento, é importante controlar o tamanho do poro do material utilizado, na finalidade de se obter uma boa imobilização (URREA et al., 2021).

3.3.4. Ligação cruzada

A técnica de imobilização por ligação cruzada, também conhecida como reticulação, envolve a união de duas ou mais moléculas através de ligação covalente, enquanto os reagentes de reticulação são substâncias capazes de ligar quimicamente diferentes grupos funcionais. Trata-se de um método irreversível, que não necessita do uso de suportes (NARAYANAN; HAN, 2022). Nessa ligação, as moléculas enzimáticas ou proteínas inativas formam agregados entre si mesmas, por meio de ligações covalentes e agentes de reticulação funcionais (ASHKAN et al., 2021).

Enzimas reticuladas podem ser realizadas por ligações entre enzimas ou entre suportes consolidados, com possibilidade de ligação multiponto, o que torna a interação mais forte e

reduz as etapas de lavagens (NÁJERA-MARTÍNEZ et al., 2022). Contudo, embora o método de reticulação seja capaz de aumentar a eficiência da ligação enzimática bem como a sua estabilidade, ele é geralmente demorado, apresenta diminuição de atividade enzimática e possui um alto custo, devido a utilização de reagentes químicos caros (ASHKAN et al., 2021; SHARMA et al., 2021).

Diferentes agentes de reticulação podem ser aplicados para obter a ligação cruzada. Dentre os reagentes de reticulação mais utilizados, o glutaraldeído se destaca, pois além dele ser facilmente obtido em quantidades elevadas, é também econômico e pode interagir com quase todas as enzimas (NÁJERA-MARTÍNEZ et al., 2022). Contudo, estudos apontam que a utilização de agentes de reticulação biológicos naturais como genipina e polissacarídeos à base de aldeídos vem aumentando gradativamente, devido a sua boa biocompatibilidade enzimática bem como suas práticas ambientalmente sustentáveis (GUO et al., 2021).

A imobilização enzimática por ligação cruzada pode ser obtida por diferentes métodos, porém, as principais técnicas de reticulação utilizadas são a ligação cruzada utilizando enzimas cristalizadas (CLECs) e a ligação por agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) (SHOMAL et al., 2021; OGUNBADEJO; AL-ZUHAIR, 2021). Uma característica em comum entre as duas metodologias é que elas não necessitam de suporte. Conseqüentemente, enzimas reticuladas normalmente apresentam uma boa estabilidade mecânica, capacidade de suportar elevadas temperaturas e uma maior tolerância de tensão de cisalhamento comparada às outras técnicas de imobilização (OGUNBADEJO; AL-ZUHAIR, 2021).

CLECs são preparados através da precipitação enzimática em microcristais, seguida de reticulação com reagentes bifuncionais para criar ligações covalentes entre os aminoácidos livres da enzima. O método necessita de enzimas altamente purificadas, por isso, torna-se um processo caro (ROUF; GREISH; AL-ZUHAIR, 2021; PEKGENC et al., 2022). Já o CLEA é uma forma modificada do CLEC, pois não necessita da formação de cristais. Ele é formado na presença de solventes orgânicos, sais, polímeros não iônicos ou ácidos que são utilizados para acúmulo e precipitação de enzimas, seguida de reticulação. Comparado ao CLEC é mais barato e possibilita a formação de CLEA com mais de uma enzima, podendo ser aplicada em catálise multienzimática. Contudo, seus agregados formados são geralmente pequenos, o que acaba dificultando o contato do substrato com o sítio ativo enzimático (ROUF; GREISH; AL-ZUHAIR, 2021; PEKGENC et al., 2022; WEI et al., 2022).

3.4. Tipos de suporte

A escolha do suporte selecionado para a imobilização enzimática é relativa, pois não existe um suporte universal para a imobilização de enzimas, devendo, portanto, ser escolhido caso a caso. Sendo assim, devem ser levadas em consideração as propriedades da enzima imobilizada, visto que elas são influenciadas pelas características do biocatalisador e do suporte. A interação visualizada nestes dois componentes é capaz de atribuir à enzima imobilizada condições bioquímicas, químicas, cinéticas e mecânicas específicas, pois o desempenho da enzima imobilizada está fortemente interligado às características do suporte (ZHAO et al., 2021; CALIFANO; COSTANTINI, 2021).

As propriedades da superfície dos suportes interferem diretamente no processo de imobilização enzimática, pois o suporte pode ser modificado conforme as propriedades visualizadas nas superfícies enzimáticas, tornando-o quimicamente compatível com a enzima (BILAL et al., 2019b; MORSI et al., 2021). Além desses fatores, também deve ser dada atenção aos parâmetros da matriz do suporte, que incluem a área superficial, estabilidade química e mecânica, tamanho da partícula, carga superficial, natureza orgânica ou inorgânica, funcionalização da superfície, hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, além da porosidade do material de suporte (LIU et al., 2021).

Um requisito necessário para essa imobilização acontecer de forma eficiente, é a presença de um suporte biocompatível e inerte, que não interfira na estrutura nativa da enzima, preservando sua atividade biológica (MIKANI; TORABIZADEH; RAHMANIAN, 2018; GAN et al., 2021). Além disso, é ideal que os materiais utilizados para a elaboração dos suportes sejam econômicos, estáveis e possuam a capacidade de aumentar a atividade enzimática. Entretanto, a maioria das matrizes utilizadas para a imobilização apresenta apenas algumas dessas propriedades, devendo selecionar a matriz de suporte com base nas características das matrizes e suas limitações (HOLYAVKA et al., 2019; TEMKOV et al., 2019; GAN et al., 2021).

Nesse sentido, existem diversas matrizes poliméricas que podem ser utilizadas na finalidade de imobilizar catalisadores, incluindo alginato, quitosana, gelatina, goma arábica e goma xantana (FRAKOLAKI et al., 2021). Na Tabela 2 é possível verificar alguns suportes utilizados para a imobilização de inulinas. Essas pesquisas envolvendo a imobilização de inulinas nos diferentes suportes têm a finalidade comum de manter a estabilidade e produtividade das enzimas por um tempo maior, quando comparado à enzima livre.

Tabela 2. Diferentes métodos e suportes utilizados para imobilização de inulinases. Fonte: O autor.

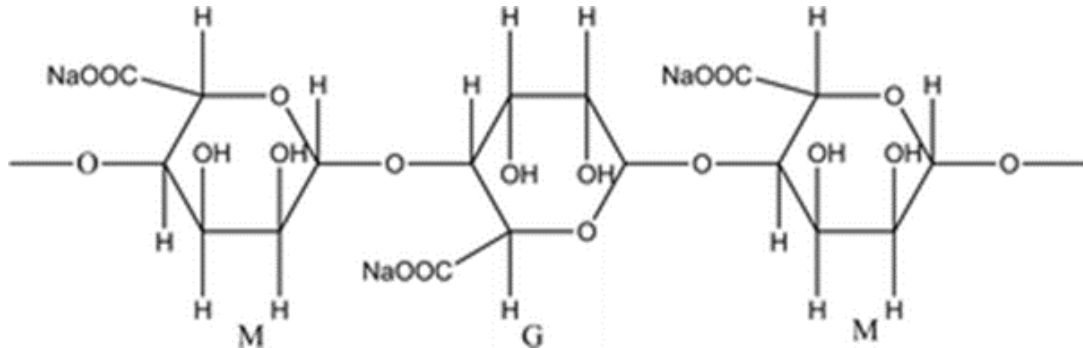
Enzima	Suporte	Técnica de imobilização	Referência
Inulinase	Casca de ovo de galinha	Adsorção e ligação cruzada	RIBEIRO et al., 2021b.
Inulinase	Duolite XAD*	Ligação cruzada	SINGH et al., 2020a.
Inulinase	Microesferas de sílica mesoporosa	Ligação cruzada	SAIKIA et al., 2021.
Endoinulinase	Nanoargila de haloisita heteromodificada	Ligação cruzada	SINGH; SINGH, 2022a.
Inulinase	Poliacrilamida/polietilenoglicol	Aprisionamento	TEMKOV et al., 2022.
Inulinase	Nanofibras de carbono heterofuncionalizadas	Ligação cruzada	SINGH; CHAUHAN; KENNEDY, 2019.
Inulinase	Nanopartículas magnéticas	Ligação covalente	TORABIZADEH; MAHMOUDI, 2018.
Exo-inulinase	Argila de caulim	Ligação covalente	GARUBA; ONILUDE, 2018.
Exo-inulinase	Alginato	Aprisionamento	RAWAT et al., 2021.

*Resina adsorvente

3.4.1. Alginato

O alginato de sódio, também conhecido como gel de alginato, é um polissacarídeo extraído de algas marinhas marrons que está envolvido por ligações 1,4 glicosídicas em ácido β - D -manurônico e ácido α - L -gulurônico (POPOVIĆ et al., 2021; HU et al., 2022), como visualizado na Figura 6. E, através da troca do Na^+ por cátions divalentes como Cu^{2+} , Ba^{2+} e Ca^{2+} , o alginato de sódio é capaz de formar biopolímeros estáveis, de estrutura tridimensional exclusiva (MA et al., 2018b). Dentro da grande variedade dos suportes utilizados para a imobilização das enzimas, o alginato se destaca em relação a outras matrizes por apresentar inúmeros benefícios, incluindo biodisponibilidade, biodegradabilidade e capacidade hidrofílica. Além disso, é um material não tóxico, biocompatível e aplicado com abundância nas indústrias de alimentos e farmacêutica, principalmente na finalidade de imobilização de substâncias (POPOVIĆ et al., 2021).

Figura 6. Estrutura molecular do alginato de sódio. M: Ácido manurônico; G: Ácido gulurônico. Fonte: Adaptado de MA et al. (2018a).



Tradicionalmente, o encapsulamento de enzimas utilizando partículas de alginato como suporte tem sido realizado através de duas abordagens principais, sendo elas a abordagem geral e a abordagem inversa. A primeira envolve o gotejamento de uma mistura de alginato e enzimas em uma solução de reticulação, produzindo esferas macroscópicas; enquanto a segunda está relacionada com o adição gota a gota de uma mistura viscosa, a qual contém o agente de reticulação e os biocatalisadores em uma solução de alginato, formando microcápsulas de núcleo viscoso com invólucro de alginato (KURAYAMA et al., 2020).

No entanto, devido a grande presença de poros na matriz do gel de alginato, geralmente ocorre o extravasamento indesejável de enzimas do interior das esferas para fora delas, causando assim uma limitação em suas aplicações. Além disso, esse polímero apresenta instabilidade química na presença de quelantes de cálcio, a exemplo do citrato, lactato e fosfato (FILHO; VITOLO, 2017; KURAYAMA et al., 2020). Para sanar essas limitações, algumas abordagens são relatadas na literatura, incluindo a imobilização covalente entre enzimas e alginato (ALI et al., 2021), nanopartículas imobilizadas por enzimas (WELTER et al., 2022) e moduladores dos poros da matriz de alginato (RODRIGUEZ et al., 2018). Além desses, existem métodos mais simples de melhorar a estabilidade e o grau de vazamento enzimático, como a utilização de diferentes concentrações de alginato, cloreto de cálcio e tempo de contato com a solução (URREA et al., 2021).

REFERÊNCIAS

- AGHAEI, H. et al. Efficient hydrolysis of starch by α -amylase immobilized on cloisite 30B and modified forms of cloisite 30B by adsorption and covalent methods. **Food Chemistry**, v. 373, p. 131425, 2022.
- ALI, A. O. et al. Grafted carrageenan: alginate gel beads for catalase enzyme covalent immobilization. **3 Biotech**, v. 11, n. 7, p. 1-7, 2021.
- ALMEIDA, M. N. et al. Purification and characterization of an invertase and a transfructosylase from *Aspergillus terreus*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. e12551, 2018.
- ARANA-PEÑA, S. et al. Enzyme co-immobilization: Always the biocatalyst designers' choice... or not?. **Biotechnology Advances**, v. 51, p. 107584, 2021.
- ASHKAN, Z. et al. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 708-721, 2021.
- ASHTEKAR, N. et al. *Aspergillus terreus*: taxonomy, biology, and bioactive secondary metabolites with potential applications. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, p. 215-223, 2021.
- ATIROĞLU, V.; ATIROĞLU, A.; ÖZACAR, M. Immobilization of α -amylase enzyme on a protein@ metal-organic framework nanocomposite: A new strategy to develop the reusability and stability of the enzyme. **Food Chemistry**, v. 349, p. 129127, 2021.
- AZZAZ, H. H. et al. A newly developed tannase enzyme from *Aspergillus terreus* versus commercial tannase in the diet of lactating Damascus goats fed diet containing pomegranate peel. **Livestock Science**, v. 241, p. 104228, 2020.
- BALI, V. et al. Fructo-oligosaccharides: production, purification and potential applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1475-1490, 2015.
- BILAL, M. et al. Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: A review from immobilization strategies viewpoint. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 3, p. 159-182, 2019a.

- BILAL, M. et al. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical reviews in biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 202-219, 2019b.
- BILAL, M. et al. State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: A review from immobilization to implementation view point. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 893-901, 2018.
- BILAL, M; IQBAL, H. M.N. Lignin peroxidase immobilization on Ca-alginate beads and its dye degradation performance in a packed bed reactor system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101205, 2019.
- BRAGA, A. et al. One-step production of a novel prebiotic mixture using *Zymomonas mobilis* ZM4. **Biochemical Engineering Journal**, p. 108443, 2022.
- BRISOLA, J. et al. Covalent Immobilization of Lipase on Bacterial Cellulose Membrane and Nanocellulose. **Materials Research**, v. 25, 2022.
- CALIFANO, V.; COSTANTINI, A. Enzyme immobilization and biocatalysis. **Catalysts**, v. 11, n. 7, p. 823, 2021.
- CATENZA, K. F.; DONKOR, K. K. Recent approaches for the quantitative analysis of functional oligosaccharides used in the food industry: A review. **Food Chemistry**, v. 355, p. 129416, 2021.
- CAVALCANTI, M. H. S. et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase via ionic adsorption on superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Facile synthesis and improved catalytic performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 431, p. 134128, 2022.
- CHAROENWONGPAIBOON, T.; WANGPAIBOON, K.; PICHYANGKURA, R. Cross-linked levansucrase aggregates for fructooligosaccharide synthesis in fruit juices. **LWT**, v. 150, p. 112080, 2021.
- CHEIN, S. H. et al. Prevalence and identification of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from peanut kernels in central Myanmar. **Journal of Food Safety**, v. 39, n. 6, p. e12686, 2019.

CORRADO, I. et al. Optimization of inulin hydrolysis by *Penicillium lanosocoeruleum* inulinases and efficient conversion into polyhydroxyalkanoates. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 9, p. 108, 2021.

CORRÊA, C. L. et al. Transcriptome profiling-based analysis of carbohydrate-active enzymes in *Aspergillus terreus* involved in plant biomass degradation. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, p. 1179, 2020.

DADHEECH, T. et al. Draft genome analysis of lignocellulolytic enzymes producing *Aspergillus terreus* with structural insight of β -glucosidases through molecular docking approach. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 181-190, 2019.

DAL MAGRO, L. et al. Optimized immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* following different protocols: Improved stability and activity under drastic conditions. **International journal of biological macromolecules**, v. 138, p. 234-243, 2019.

DAL MAGRO, L. et al. Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 132, p. 109397, 2020.

DAS, D.; BHAT M, R.; SELVARAJ, R. Review of inulinase production using solid-state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 201–209, 2019.

DE CASTRO, M. C. et al. Lipase immobilization on biodegradable film with sericin. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 660-667, 2022.

DE OLIVEIRA, B. H.; CORADI, G.V.; OLIVA-NETO, P.; NASCIMENTO, V. M. G. Biocatalytic benefits of immobilized *Fusarium* sp. (GFC) lipase from solid state fermentation on free lipase from submerged fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 112235, 2020.

DE OLIVEIRA, R. L. et al. Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 9–18, 2018.

DE OLIVEIRA, R. L. et al. Production, Biochemical Characterization, and Kinetic/Thermodynamic Study of Inulinase from *Aspergillus terreus* URM4658. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6418, 2022.

DU, P. et al. Bioinspired Self-Assembling Materials for Modulating Enzyme Functions. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 38, p. 2104819, 2021.

ERKAN, S. B. et al. Mannooligosaccharide production by β -mannanase enzyme application from coffee extract. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 8, p. e14668, 2021.

FEDERSEL, H. J.; MOODY, T. S.; TAYLOR, S. J. C. Recent trends in enzyme immobilization—concepts for expanding the biocatalysis toolbox. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2822, 2021.

FENG, Y. et al. Recent advances in enzyme immobilization based on novel porous framework materials and its applications in biosensing. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 459, p. 214414, 2022.

FILHO, J. A. R.; VITOLLO, M. Guia para aulas práticas de biotecnologia de enzimas e fermentação. 1. Ed. Dig. São Paulo: Blucher, 2017.

FOURNIÈRE, M. et al. Poly-and oligosaccharide *ulva* sp. Fractions from enzyme-assisted extraction modulate the metabolism of extracellular matrix in human skin fibroblasts: Potential in anti-aging dermo-cosmetic applications. **Marine drugs**, v. 19, n. 3, p. 156, 2021.

FRAKOLAKI, G. et al. Effect of various encapsulating agents on the beads' morphology and the viability of cells during BB-12 encapsulation through extrusion. **Journal of Food Engineering**, v. 294, p. 110423, 2021.

GAN, J. S. et al. Covalent organic frameworks as emerging host platforms for enzyme immobilization and robust biocatalysis—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 502-515, 2021.

GARRIDO-GALAND, S. et al. The potential of fermentation on nutritional and technological improvement of cereal and legume flours: A review. **Food Research International**, v. 145, p. 110398, 2021.

GARUBA, E. O.; ONILUDE, A. A. Exo-Inulinase Production by a catabolite repression-resistant mutant Thermophilic *Aspergillus tamarii*-U4 in solid state fermentation. **Biotechnol. J. Inter**, v. 24, p. 21-31, 2020.

GARUBA, E. O.; ONILUDE, A. A. Immobilization of thermostable exo-inulinase from mutant thermophilic *Aspergillus tamarii*-U4 using kaolin clay and its application in inulin hydrolysis. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 341-346, 2018.

GERMEC, M.; TURHAN, I. Kinetic modeling and sensitivity analysis of inulinase production in large-scale stirred tank bioreactor with sugar beet molasses-based medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 176, p. 108201, 2021.

GIESSEL, A. et al. Therapeutic enzyme engineering using a generative neural network. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2022.

GIRELLI, A. M.; SCUTO, F. R. Eggshell membrane as feedstock in enzyme immobilization. **Journal of Biotechnology**, v. 325, p. 241-249, 2021.

GLUSAC, J.; FISHMAN, A. Enzymatic and chemical modification of zein for food application. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 507-517, 2021.

GUERRERO-URRUTIA, C. et al. Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. **Process Biochemistry**, v. 108, p. 169-175, 2021.

GU, J. et al. Bifidobacteria exhibited stronger ability to utilize fructooligosaccharides, compared with other bacteria in the mouse intestine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 6, p. 2413-2423, 2022.

GUO, H. et al. Immobilization of lipase by dialdehyde cellulose crosslinked magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 287-296, 2021.

HAJAR-AZHARI, S. et al. Enzymatically synthesised fructooligosaccharides from sugarcane syrup modulate the composition and short-chain fatty acid production of the human intestinal microbiota. **Food Research International**, v. 149, p. 110677, 2021.

HOLYAVKA, M. G. et al. Immobilization of inulinase on KU-2 ion-exchange resin matrix. **International journal of biological macromolecules**, v. 138, p. 681-692, 2019.

HOSSEINI, S. H. et al. Covalent immobilization of cellulase using magnetic poly (ionic liquid) support: improvement of the enzyme activity and stability. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 4, p. 789-798, 2018.

HUANG, Y. et al. Fusion and secretory expression of an exo-inulinase and ad-allulose 3-epimerase to produce d-allulose syrup from inulin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 2, p. 693-702, 2021.

HU, X. et al. Direct processing of alginate-immobilized microalgae into polyhydroxybutyrate using marine bacterium of *Saccharophagus degradans*. **Bioresource Technology**, v. 351, p. 126898, 2022.

ILGIN, M.; GERMEC, M.; TURHAN, I. Statistical and kinetic modeling of *Aspergillus niger* inulinase fermentation from carob extract and its partial concentration. **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112866, 2020.

JAIN, D.; KATYAL, P. Optimization of gluco-amylase production from *Aspergillus* spp. for its use in saccharification of liquefied corn starch. **3 Biotech**, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2018.

JANGID, A. et al. Impact of dietary fructooligosaccharides (FOS) on murine gut microbiota and intestinal IgA secretion. **3 Biotech**, v. 12, n. 2, p. 1-13, 2022.

KABERNICK, D. C.; GOSTICK, J. T.; WARD, V. C. A. Kinetic characterization and modeling of sequentially entrapped enzymes in 3D-printed PMMA microfluidic reactors for the synthesis of amorphadiene via the isopentenol utilization pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 119, n. 5, p. 1239-1251, 2022.

KAUR, A. P. et al. Plant Prebiotics and Their Role in the Amelioration of Diseases. **Biomolecules**, v. 11, n. 3, p. 440, 2021.

KRUPA-KOZAK, U. et al. High-Quality Gluten-Free Sponge Cakes without Sucrose: Inulin-Type Fructans as Sugar Alternatives. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1735, 2020.

KRUSCHITZ, A.; NIDETZKY, B. Downstream processing technologies in the biocatalytic production of oligosaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 43, p. 107568, 2020.

KURAYAMA, F. et al. Facile preparation of aminosilane-alginate hybrid beads for enzyme immobilization: kinetics and equilibrium studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1203-1212, 2020.

KURIBAYASHI, L. M. et al. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* for application in the dairy industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 9, p. 3601-3610, 2021.

LEITE, P. et al. Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Industrial crops and products**, v. 137, p. 315-322, 2019.

LIANG, W. et al. Metal-organic framework-based enzyme biocomposites. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 3, p. 1077-1129, 2021.

LI, P. et al. Dopamine-polyethyleneimine co-deposition of a capillary for α -glucosidase immobilization and its application in enzyme inhibitor screening. **Electrophoresis**, v. 42, n. 20, p. 2081-2086, 2021.

LIU, J.; MA, R. T.; SHI, Y. P. "Recent advances on support materials for lipase immobilization and applicability as biocatalysts in inhibitors screening methods"-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1101, p. 9-22, 2020.

LIU, S. et al. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices-A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, p. 396-408, 2021.

LÓPEZ-GÓMEZ, J. P.; VENUS, J. Potential role of sequential solid-state and submerged-liquid fermentations in a circular bioeconomy. **Fermentation**, v. 7, n. 2, p. 76, 2021.

LYU, X. et al. Immobilization of Enzymes by Polymeric Materials. **Catalysts**, v. 11, n. 10, p. 1211, 2021.

MACEDO, L. L.; VIMERCATI, W. C.; ARAÚJO, C. S. Fruto-oligossacarídeos: aspectos nutricionais, tecnológicos e sensoriais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.

MAGADUM, D. B.; YADAV, G. D. Fermentative production, purification of inulinase from *Aspergillus terreus* MTCC 6324 and its application for hydrolysis of sucrose. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 14, p. 293-299, 2018.

MA, J. et al. Influence of sodium silicate/sodium alginate additives on discharge performance of Mg–Air battery based on AZ61 alloy. **Journal of Materials Engineering and Performance**, v. 27, p. 2247-2254, 2018a.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MA, Y. et al. Ag₂O/sodium alginate-reduced graphene oxide aerogel beads for efficient visible light driven photocatalysis. **Applied Surface Science**, v. 430, p. 155-164, 2018b.

MIKANI, M.; TORABIZADEH, H.; RAHMANIAN, R. Magnetic soy protein isolate–bovine serum albumin nanoparticles preparation as a carrier for inulinase immobilisation. **IET nanobiotechnology**, v. 12, n. 5, p. 633-639, 2018.

MORELLON-STERLING, R. et al. Effect of amine length in the interference of the multipoint covalent immobilization of enzymes on glyoxyl agarose beads. **Journal of Biotechnology**, v. 329, p. 128-142, 2021.

MORSI, R. et al. Immobilized soybean peroxidase hybrid biocatalysts for efficient degradation of various emerging pollutants. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 904, 2021.

MORTAZAVI, S.; AGHAEI, H. Make proper surfaces for immobilization of enzymes: immobilization of lipase and α -amylase on modified Na-sepiolite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1-12, 2020.

NADAR, S. S. et al. Recent progress in nanostructured magnetic framework composites (MFCs): Synthesis and applications. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 91, p. 653-677, 2018.

NAHER, L. et al. Cellulase Enzyme Production from Filamentous Fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in Submerged Fermentation with Rice Straw. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 868, 2021.

NÁJERA-MARTÍNEZ, E. F. et al. Lignocellulosic residues as supports for enzyme immobilization, and biocatalysts with potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, p. 748-759, 2022.

NAMNUCH, N.; THAMMASITTIRONG, A.; THAMMASITTIRONG, S. N. R. Lignocellulose hydrolytic enzymes production by *Aspergillus flavus* KUB2 using submerged fermentation of sugarcane bagasse waste. **Mycology**, v. 12, n. 2, p. 119-127, 2021.

NARAYANAN, K. B.; HAN, S. S. Peptide ligases: a novel and potential enzyme toolbox for catalytic cross-linking of protein/peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 155, p. 109990, 2022.

OGUNBADEJO, B.; AL-ZUHAIR, S. MOFs as potential matrices in cyclodextrin glycosyltransferase immobilization. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 680, 2021.

OLIVEIRA, J. P. B. et al. Immobilization and characterization of latex cysteine peptidases on different supports and application for cow's milk protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 117, p. 180-190, 2022.

PAUL, I.; KUMAR, C. G. Fungal biofactories as potential inulinase sources for production of fructooligosaccharides. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2020. p. 183-210.

PEKGENC, E. et al. Biocatalytic membranes in anti-fouling and emerging pollutant degradation applications: Current state and perspectives. **Separation and Purification Technology**, v. 282, p. 120098, 2022.

POPOVIĆ, N. et al. Immobilization of yeast cell walls with surface displayed laccase from *Streptomyces cyaneus* within dopamine-alginate beads for dye decolorization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 1072-1080, 2021.

RAHIM, M. A. et al. Functional and nutraceutical properties of fructo-oligosaccharides derivatives: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 24, n. 1, p. 1588-1602, 2021.

RAWAT, H. K. et al. Exo-inulinase production from *Aspergillus fumigatus* NFCCI 2426: purification, characterization, and immobilization for continuous fructose production. **Journal of food science**, v. 86, n. 5, p. 1778-1790, 2021.

REIS, C. L. B. et al. Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. **Química Nova**, v. 42, p. 768-783, 2019.

REN, S. et al. Enzymatic characteristics of immobilized carbonic anhydrase and its applications in CO₂ conversion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, p. 111779, 2021.

RIBEIRO, E. S. et al. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1959-1970, 2021a.

RIBEIRO, G. C. A.; FERNANDES, P.; SILVA, D. A. A. BRANDÃO, H. N.; ASSIS, S. A. Inulinase from *Rhodotorula mucilaginosa*: Immobilization and application in the production of fructooligosaccharides. **Food Science and Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 959-969, 2021b.

RIBEIRO, G. C. A.; FERNANDES, P.; ASSIS, S. A. Production, characterization, and immobilization of inulinase produced by *Pseudozyma* sp. (CCMB 306). **Chemical Engineering Communications**, v. 205, n. 8, p. 1060-1068, 2018.

RODRIGUEZ, Y. E. et al. Exogenous enzymes in aquaculture: Alginate and alginate-bentonite microcapsules for the intestinal delivery of shrimp proteases to Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 490, p. 35-43, 2018.

ROUF, S.; GREISH, Y. E.; AL-ZUHAIR, S. Immobilization of formate dehydrogenase in metal organic frameworks for enhanced conversion of carbon dioxide to formate. **Chemosphere**, v. 267, p. 128921, 2021.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2018.

SAIKIA, K. et al. Development of a sustainable route for the production of high-fructose syrup from the polyfructan inulin. **IET nanobiotechnology**, v. 15, n. 2, p. 149-156, 2021.

SAIKIA, K. et al. Magnetically assisted commercially attractive chemo-enzymatic route for the production of 5-hydroxymethylfurfural from inulin. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-11, 2020.

SALEH, S. A. A. et al. Physicochemical, kinetic and thermodynamic studies on *Aspergillus wewitschiae* MN056175 inulinase with extraction of prebiotic and antioxidant *Cynara scolymus* leaves fructo-oligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1026-1036, 2020.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M, J. et al. Manufacturing of short-chain fructooligosaccharides: from laboratory to industrial scale. **Food Engineering Reviews**, v. 12, n. 2, p. 149-172, 2020.

SATO, T. et al. Bovine abortion and necrotic placentitis by *Aspergillus terreus*. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 21-0599, 2022.

SAVINO, S. et al. Agro-Industrial Wastes: A Substrate for Multi-Enzymes Production by *Cryphonectria parasitica*. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 279, 2021.

SEL, E. et al. Comparative study of catalase immobilization via adsorption on P (MMA-co-PEG500MA) structures as an effective polymer support. **Polymer Bulletin**, v. 78, p. 2663-2684, 2021.

SEPÚLVEDA-QUIROZ, C. A. et al. Fructooligosaccharide supplementation in diets for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile: Effects on morphophysiology and intestinal barrier function. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 1, p. 37-50, 2021.

SHAHID, F. et al. A Comparative Study Among Different Protocols of Immobilization of Dextranase Using Chitin as a Matrix. **Catalysis Letters**, v. 150, p. 613-622, 2020.

SHARMA, R. et al. Optimization of fructooligosaccharide fortified low calorie apple-whey based RTS beverage and its quality evaluation during storage. **Current Journal of Applied Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 17-28, 2020.

SHARMA, A. et al. Employment of polysaccharides in enzyme immobilization. **Reactive and Functional Polymers**, v. 167, p. 105005, 2021.

SHOMAL, R. et al. Advances in Enzyme and Ionic Liquid Immobilization for Enhanced in MOFs for Biodiesel Production. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3512, 2021.

SIKANDER, A.; KHALID, S. W. Kinetic and Parametric Optimization for the Enhanced Production of a Novel Fungal Exo-inulinase under Liquid Culture. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 52, n. 5, p. 1657, 2020.

SINGH, B. et al. Enhanced Phytase Production by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* in Solid State Fermentation and its Utility in Improving Food Nutrition. **Protein and Peptide Letters**, v. 28, n. 10, p. 1083-1089, 2021.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K. Production, purification, characterization and applications of fungal inulinases. **Current Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 242-260, 2018.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; KAUR, N.; KUMAR, N. Inulinase immobilization onto glutaraldehyde activated duolite XAD for the production of fructose from inulin. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, p. 101699, 2020a.

SINGH, R. S. et al. Biocatalytic strategies for the production of high fructose syrup from inulin. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 395–403, 2018.

SINGH, R. S. et al. Updates on inulinases: Structural aspects and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 193-210, 2020b.

SINGH, R. S.; SINGH, T. Glutaraldehyde functionalization of halloysite nanoclay enhances immobilization efficacy of endoinulinase for fructooligosaccharides production from inulin. **Food Chemistry**, v. 381, p. 132253, 2022a.

SINGH, R. S.; SINGH, T. Hetero-modification of halloysite nanoclay to immobilize endoinulinase for the preparation of fructooligosaccharides. **Food Research International**, v. 159, p. 111591, 2022b.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; KENNEDY, J. F. Purification, thermodynamics and kinetic characterization of fungal endoinulinase for the production of fructooligosaccharides from inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3535-3545, 2020.

SINGH, R. S.; SINGH, T. Microbial inulinases and pullulanases in the food industry. In: *Microbial Enzymes and Additives for the Food Industry*. **Nova Science Publishers Inc USA**, p. 23-52, 2019.

SOBOLEV, V. et al. Inhibition of Aflatoxin Formation in *Aspergillus* Species by Peanut (*Arachis hypogaea*) Seed Stilbenoids in the Course of Peanut–Fungus Interaction. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 22, p. 6212-6221, 2019.

TEMKOV, M. et al. Inulinase immobilisation in PAA/PEG composite for efficient fructooligosaccharides production. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 40, n. 1, p. 50-63, 2022.

TEMKOV, M. et al. Inulinase immobilization on polyethylene glycol/polypyrrole multiwall carbon nanotubes producing a catalyst with enhanced thermal and operational stability. **Engineering in Life Sciences**, v. 19, n. 9, p. 617-630, 2019.

TERCAN, Ç.; SÜRMELE, Y.; ŞANLI-MOHAMED, G. Thermoalkalophilic recombinant esterase entrapment in chitosan/calcium/alginate-blended beads and its characterization. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, n. 8, p. 2257-2264, 2021.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. Immobilization of lipases—A review. Part I: Enzyme immobilization. **ChemBioEng Reviews**, v. 6, n. 5, p. 157-166, 2019.

TIZCHANG, S. et al. Immobilization of β -galactosidase by halloysite-adsorption and entrapment in a cellulose nanocrystals matrix. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1865, n. 6, p. 129896, 2021.

TORABIZADEH, H.; MAHMOUDI, A. Inulin hydrolysis by inulinase immobilized covalently on magnetic nanoparticles prepared with wheat gluten hydrolysates. **Biotechnology reports**, v. 17, p. 97-103, 2018.

URREA, D. A. M. et al. Immobilization of horseradish peroxidase in Ca-alginate beads: Evaluation of the enzyme leakage on the overall removal of an azo-dye and mathematical modeling. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 156, p. 134-143, 2021.

VAZ, R. P. et al. Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 197-208, 2021.

VIDYA, B. et al. Purification and characterization of β -galactosidase from newly isolated *Aspergillus terreus* (KUBCF1306) and evaluating its efficacy on breast cancer cell line (MCF-7). **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p. 103442, 2020.

VILAR, R. P.; IKUMA, K. Adsorption of urease as part of a complex protein mixture onto soil and its implications for enzymatic activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 171, p. 108026, 2021.

WANG, C. H. et al. Engineering better catalytic activity and acidic adaptation into *Kluyveromyces marxianus* exoinulinase using site-directed mutagenesis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 6, p. 2472-2482, 2021a.

WANG, J. et al. Bimetallic metal–organic framework for enzyme immobilization by biomimetic mineralization: Constructing a mimic enzyme and simultaneously immobilizing natural enzymes. **Analytica Chimica Acta**, v. 1098, p. 148-154, 2020.

WANG, J. et al. Production of extracellular enzymes by a termite-nest-related *Bacillus siamensis* YC-9 in solid-state fermentation on agricultural by-products. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 4, p. 1087-1094, 2021b.

WEI, B. et al. Enhancing stability and by-product tolerance of β -glucuronidase based on magnetic cross-linked enzyme aggregates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 210, p. 112241, 2022.

WELTER, R. A. et al. Droplet microfluidics for double lipase immobilisation using TiO₂ and alginate microbeads. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 110, p. 576-586, 2022.

XU, J. et al. Nickel-Carnosine complex: A new carrier for enzymes immobilization by affinity adsorption. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 38, p. 237-246, 2021.

YAO, L. W. et al. Insight into immobilization efficiency of Lipase enzyme as a biocatalyst on the graphene oxide for adsorption of Azo dyes from industrial wastewater effluent. **Journal of Molecular Liquids**, v. 354, p. 118849, 2022.

ZAIER, H. et al. Filamentous fungi isolated from Tunisian olive mill wastes: use of solid-state fermentation for enzyme production. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 49, n. 1, p. 12125-12125, 2021.

ZANKER, A. A. et al. Selective ene-reductase immobilization to magnetic nanoparticles through a novel affinity tag. **Biotechnology Journal**, v. 16, n. 4, p. 2000366, 2021.

ZDARTA, J. et al. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, 2018.

ZDARTA, J. et al. Bioremoval of estrogens by laccase immobilized onto polyacrylonitrile/polyethersulfone material: Effect of inhibitors and mediators, process characterization and catalytic pathways determination. **Journal of Hazardous Materials**, v. 432, p. 128688, 2022.

ZHANG, H. et al. Progress and perspective of enzyme immobilization on zeolite crystal materials. **Biochemical Engineering Journal**, v. 172, p. 108033, 2021.

ZHANG, Q. et al. *In vitro* study of *Bifidobacterium lactis* BL-99 with fructooligosaccharide synbiotics effected on the intestinal microbiota. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 798, 2022.

ZHAO, C. P. et al. Evaluation of Enzyme Inhibitory Activity of Flavonoids by Polydopamine-Modified Hollow Fiber-Immobilized Xanthine Oxidase. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3931, 2021.

ZHOU, W. et al. Improved enzymatic activity by oriented immobilization on graphene oxide with tunable surface heterogeneity. **Composites Part B: Engineering**, v. 216, p. 108788, 2021.

ZHU, C. Y. et al. Recent Strategies for the Immobilization of Therapeutic Enzymes. **Polymers**, v. 14, n. 7, p. 1409, 2022.

ZOU, L. J. et al. Iterative Synthesis of Inulin-Type Fructooligosaccharides Enabled by Stereoselective β -d-Fructofuranosylation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 87, n. 22, p. 15273-15288, 2022.

ZUCCARELLO, L. et al. Electrocatalysis by heme enzymes—Applications in biosensing. **Catalysts**, v. 11, n. 2, p. 218, 2021.

CAPÍTULO 1

ARTIGO: IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE *Aspergillus terreus* URM4658 PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTUDO CINÉTICO

Wallace Ribeiro da Silva¹, Camila Fernanda de Aquino Luna², Rodrigo Lira de Oliveira³, Tatiana Souza Porto⁴.

Este artigo será submetido à revista:

3 Biotech



ISSN:

Qualis Capes: A2 Impact Factor: 2.893

IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE *Aspergillus terreus* URM4658 PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTUDO CINÉTICO

Wallace Ribeiro da Silva¹, Camila Fernanda de Aquino Luna², Rodrigo Lira de Oliveira³, Tatiana Souza Porto⁴.

¹Department of Consumer Sciences, Federal Rural University of Pernambuco/UFRPE, Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Recife 52171-900, Brazil

²Department of Rural Technology, Federal Rural University of Pernambuco/UFRPE, Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Recife 52171-900, Brazil

³School of Food Engineering, Federal University of Agreste of Pernambuco/UFPE, Av. Bom Pastor, Boa Vista, s/n, Garanhuns 55296-901, Brazil

⁴Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco/UFRPE, Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Recife 52171-900, Brazil

RESUMO

A inulinase foi produzida por *Aspergillus terreus* URM4658 e imobilizada em esferas de alginato de cálcio. A enzima foi produzida por fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato. O processo de imobilização foi avaliado por meio de um planejamento fatorial completo (2³), tendo como variáveis as concentrações de alginato e cloreto de cálcio, bem como o tempo de cura. O maior rendimento de imobilização (92,72%) foi obtido no ensaio 6, sob uma maior concentração de cloreto de cálcio (0,35M), menor porcentagem de alginato (1,25%) e maior tempo de cura (90min). A enzima imobilizada foi caracterizada bioquimicamente, apresentando uma temperatura ótima de 60°C e um pH ótimo de 7,0. Em relação aos parâmetros cinéticos, o biocatalisador imobilizado apresentou um K_m de 10,70 mM, V_{max} de 10,24 mM min⁻¹ e k_{cat} de 1,47 min⁻¹. A inulinase aprisionada em alginato de cálcio apresentou uma atividade acima de 70% no seu décimo reuso e valores acima de 80% de atividade inicial para a estabilidade ao armazenamento em 30 dias, mostrando uma aplicabilidade promissora a nível industrial.

Palavras-chave: *Apergillus terreus*; Cinética; Imobilização de enzimas; Planejamento fatorial completo.

IMMOBILIZATION OF INULINASE FROM *Aspergillus terreus* URM4658 PRODUCED BY SOLID STATE FERMENTATION: BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND KINETIC STUDY

Wallace Ribeiro da Silva¹, Camila Fernanda de Aquino Luna², Rodrigo Lira de Oliveira³, Tatiana Souza Porto⁴.

¹Department of Consumer Sciences, Federal Rural University of Pernambuco/UFRPE, Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Recife 52171-900, Brazil

²Department of Rural Technology, Federal Rural University of Pernambuco/UFRPE, Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Recife 52171-900, Brazil

³School of Food Engineering, Federal University of Agreste of Pernambuco/UFAPE, Av. Bom Pastor, Boa Vista, s/n, Garanhuns 55296-901, Brazil

⁴Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco/UFRPE, Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Recife 52171-900, Brazil

ABSTRACT

Inulinase was produced by *Aspergillus terreus* URM4658 and immobilized on calcium alginate beads. The enzyme was produced by solid state fermentation using wheat bran as substrate. The immobilization process was evaluated by a full factorial design (2³) using alginate and calcium chloride concentrations, as well as curing time. The highest immobilization yield (92.72%) was seen in assay 6, under higher calcium chloride concentration (0.35M), lower percentage of alginate (1.25%) and longer curing time (90min). The immobilized enzyme was characterized biochemically, presenting an optimum temperature of 60°C and an optimum pH of 7.0. Regarding the kinetic parameters, the immobilized biocatalyst showed a K_m of 10.70 mM, V_{max} of 10.24 mM min⁻¹ and k_{cat} of 1.47 min⁻¹. The inulinase entrapped in calcium alginate showed an activity above 70% in its tenth reuse and values above 80% of initial activity for storage stability in 30 days, showing a promising applicability at industrial level.

Keywords: *Apergillus terreus*; Kinetics; Enzyme immobilization; full factorial design.

Corresponding author.

E-mail address: tatiana.porto@ufrpe.br (T.S. Porto).

1. INTRODUÇÃO

Depois do amido, a inulina é o segundo polissacarídeo mais abundante, presente nos tubérculos, bulbos de plantas e raízes tuberosas (GERMEC; TURHAN, 2020; SINGH; SINGH; KENNEDY, 2020). A inulina é um polissacarídeo natural formado por moléculas de frutose e uma unidade de glicose presente na extremidade terminal de sua cadeia, que estão unidas por ligações glicosídicas β -(2 \rightarrow 1), sendo as inulinases consideradas a classe de enzimas responsáveis pelas reações catalíticas de inulina. Atualmente, as pesquisas estão mais focadas em obter a produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) e xarope de frutose pela hidrólise de inulina (SINGH; SINGH; KENNEDY, 2020).

De acordo com o princípio catalítico das inulinases sobre a inulina, as inulinases são classificadas em exo-inulinases (EC 3.2.1.8) e endo-inulinases (3.2.1.7) (SINGH; SINGH; KENNEDY, 2020; GUERRERO-URRUTIA *et al.*, 2021). Enquanto exo-inulinases hidrolisam a inulina na extremidade terminal não redutora e libera unidades de frutose, as endo-inulinases promovem a hidrólise de inulina de forma aleatória, liberando fruto-oligossacarídeos como produto (GERMEC; TURHAN, 2020). Além desses produtos, as inulinases também têm sido empregadas para a produção de ácidos orgânicos, biocombustível, sorbitol, manitol, óleo e proteínas de célula única (SINGH; SINGH, 2019; SINGH; SINGH; LARROCHE, 2019; SINGH *et al.*, 2020b).

As inulinases podem ser produzidas através de plantas, animais e micro-organismos (SINGH *et al.*, 2018). Contudo, inulinases de origem microbiana possuem grandes vantagens, a exemplo da fácil manipulação, rápida multiplicação, elevada produtividade e cultivo em condições controladas em relação às fontes vegetais e animais (SINGH; CHAUHAN, 2018; SALEH *et al.*, 2020). Nesse sentido, as inulinases fúngicas se destacam em relação às demais fontes microbianas, pois sua produção necessita de baixas concentrações de substrato, além de apresentarem maior estabilidade às variações de temperatura (SALEH *et al.*, 2020). Dentre as diversas linhagens fúngicas utilizadas, a produção de inulinases pelo gênero *Aspergillus* sp. vem aumentando de forma contínua, pois os biocatalisadores produzidos por este grupo fúngico apresentam características únicas e atividades biocatalíticas eficientes (SINGH *et al.*, 2020b), se destacando, recentemente, as inulinases produzidas pelo *A. terreus* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Aplicações enzimáticas industriais, como a hidrólise de inulina, utilizando enzimas livres ou solúveis, apresentam algumas limitações, tais como a dificuldade de recuperação, instabilidade enzimática e armazenamento diminuído, que aumentam o custo do bioprocessamento (SINGH; CHAUHAN; KENNEDY, 2019a; SINGH; CHAUHAN; KENNEDY, 2019b). Dessa forma, a fim de superar essas desvantagens, a imobilização enzimática em um suporte adequado surge como uma alternativa para utilizar um biocatalisador de maneira mais econômica (WAHBA *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2022). Várias vantagens são visualizadas em biocatalisadores imobilizados, como uso enzimático repetido, fácil separação, maior estabilidade e custo reduzido (SINGH; SINGH, 2022a).

A escolha de um suporte para imobilização é uma medida fundamental, pois sua matriz deve possuir boa resistência mecânica, fácil disponibilidade e baixo custo (DHIMAN *et al.*, 2020). Dentre os suportes disponíveis, o alginato de sódio se destaca por ser um polissacarídeo natural, biodegradável, extraído e processado de algas marinhas marrons, capaz de formar hidrogéis na presença de cátions bivalentes (DHIMAN *et al.*, 2020; KURAYAMA *et al.*, 2020). Essas propriedades são essenciais para a uma boa imobilização enzimática, sendo investido uma variedade de estudos ao encapsulamento de enzimas em esferas macroscópicas e microscópicas à base de alginato (KURAYAMA *et al.*, 2020). Sua aplicação tem sido amplamente empregada no campo farmacêutico, alimentício, biotecnológico e engenharia biomédica (KURAYAMA *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020).

No presente trabalho, a inulinase foi produzida por *Aspergillus terreus* URM4658 através de fermentação em estado sólido e imobilizada em esferas de alginato de cálcio. Propriedades da enzima imobilizada foram vistas por meio de um planejamento fatorial completo, realizando a caracterização da melhor condição enzimática obtida pelo rendimento de imobilização. Foram avaliadas as condições operacionais e de armazenamento da inulinase imobilizada, bem como os parâmetros cinéticos relacionados à hidrólise de inulina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

Para a produção de inulinase foi utilizada a linhagem *Aspergillus terreus* URM4658 gentilmente cedida pela micoteca URM pertencente ao Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As linhagens fúngicas foram preservadas mantidas em meio

Czapek Dox Agar e óleo mineral. Posteriormente, estas foram reativadas em caldo glicosado e sequencialmente transferidas para meio Czapek Dox Agar, cultivadas em 7 dias a 30°C em estufa bacteriológica visando a esporulação.

2.2. Produção de inulinase e meio de fermentação

A produção de inulinases por *Aspergillus terreus* URM4658 através de fermentação em estado sólido ocorreu em frascos Erlenmeyer (125mL) contendo 3g de substrato (farelo de trigo), previamente seco (65°C) e padronizado em peneiras tipo Tyler com granulometria entre 0,5 e 2,0 mm. Os frascos com o substrato foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Após o resfriamento, os frascos foram inoculados com solução de esporos contendo (10^7 esporos/mL) de cultura de *A. terreus* URM4658 com 7 dias de esporulação, adicionados de solução nutritiva (7,5% de inulina e 0,5% de extrato de levedura), correspondente a um teor de umidade de 55% por 72 h a 30°C. O extrato bruto de inulinase contendo 7,5 mL de tampão acetato 0,1M (pH 5,0) por cada 1g de substrato, com subsequente homogeneização em agitador orbital por 90 minutos a 130 rpm. Posteriormente, a mistura de material fermentado e o tampão foram macerados e filtrados e o extrato bruto foi armazenado a -22°C para posterior análise.

2.3. Determinações analíticas da inulinase imobilizada

A atividade de inulinase foi realizada de acordo com Singh, Chauhan e Jindal (2018), com adaptações como se segue: 0,1 g de partículas de alginato de cálcio contendo a enzima imobilizada foi incubado com 0,9 mL de solução de inulina (1% em tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 5,0) a 55°C por 10 min. Em seguida, a reação foi interrompida pela desnaturação da enzima na mistura reacional em um banho a 100°C. Os açúcares redutores no hidrolisado foram analisados pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (MILLER, 1959). Uma unidade de inulinase foi definida como a quantidade de enzima que produziu um μmol de frutose por minuto, sob as condições padrão de ensaio. O teor de proteínas totais foi determinado Vm utilizando albumina sérica bovina como padrão, utilizando curva de calibração.

2.4. Imobilização de inulinase em alginato

O processo de imobilização foi realizado de acordo com Bickerstaff (1997) com adaptações. Foi realizada uma mistura na proporção 1:4 da solução enzimática e alginato de sódio. Após suave agitação, a mistura foi gotejada em solução de cloreto de cálcio, levando a formação de partículas de alginato de cálcio. As enzimas imobilizadas foram mantidas na solução de CaCl_2 e posteriormente foram lavadas com tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) para remoção de enzimas não imobilizadas. As esferas contendo enzima-alginato de cálcio foram armazenadas no mesmo tampão a 4°C para posterior análise. Para definição da melhor condição de imobilização, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 tendo como variáveis independentes envolvidas no processo as concentrações de alginato (1,25, 1,50 e 1,75%), cloreto de cálcio (0,05, 0,20 e 0,35M) e tempo de cura (30, 60 e 90min), e como variável resposta o rendimento de imobilização, calculado pela razão entre a atividade da enzima imobilizada e livre, expresso em percentagem (%), seguindo a Eq. (1). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software Statistica 7.0 (Statsoft Inc, 2007).

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \frac{\text{Atividade da enzima imobilizada}}{\text{Atividade da enzima livre}} \times 100 \quad (1)$$

2.5. Caracterização bioquímica da inulinase imobilizada

O efeito do pH na atividade da inulinase imobilizada em alginato foi avaliado pela reação da atividade enzimática entre as enzimas imobilizadas com o substrato específico, preparados em soluções tampões com diferentes valores de pH: citrato de sódio (pH 3,0-4,0), citrato-fosfato (pH 4,0-6,0), fosfato (pH 6,0-7,0) e Tris-HCl (pH 7,0-9,0). O efeito da temperatura na atividade da inulinase imobilizada foi avaliado pela reação da atividade enzimática utilizando-se uma mistura de reação contendo o substrato específico e as enzimas imobilizadas, incubadas em diferentes temperaturas (30-80°C).

2.6. Determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise de inulina

Os parâmetros cinéticos envolvidos na reação de hidrólise da inulina (K_m e V_{max}) foram determinados pela realização da atividade enzimática, variando a concentração de substrato e mantendo as demais condições constantes, sendo estimadas através do método gráfico de Lineweaver Burk. A constante catalítica (k_{cat}) foi calculada pela razão de V_{max} e a

concentração total da enzima (E_o), definido através da metodologia proposta por Bradford (1976).

2.7. Capacidade de reutilização e estabilidade ao armazenamento da inulinase imobilizada

A capacidade de reutilização da inulinase imobilizada foi determinada pela realização de 10 ciclos repetidos de reação de hidrólise de inulina de acordo com a Seção 2.3. As esferas da enzima-alginato de cálcio foram removidas da reação, filtradas e lavadas em tampão acetato (pH 5,0; 0,1 M), na finalidade de remover quaisquer impurezas adsorvidas. As pérolas contendo a enzima imobilizada foram secas e utilizadas para os próximos ensaios. A estabilidade ao armazenamento da inulinase imobilizada foi determinada pela atividade de inulinase ao longo de vários dias, os biocatalisadores imobilizados foram armazenados imersos completamente em tampão acetato (pH 5,0; 0,1 M) por 30 dias. Os resultados da capacidade de reutilização e a estabilidade ao armazenamento foram expressos em termos de atividade residual.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Imobilização de inulinase em esferas de alginato

A técnica utilizada no presente trabalho envolveu um processo de aprisionamento da inulinase, onde a enzima se liga de forma físico-química com o suporte, formando as esferas de alginato de cálcio. Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 1), variando a concentração de cloreto de cálcio (0,05-0,35M), a porcentagem de alginato (1,25-1,75%) e o tempo de cura (30-90min), na finalidade de obter o melhor rendimento de imobilização. O maior rendimento de imobilização (92,72%) foi obtido nas condições do ensaio 6, como podem ser visualizados na tabela 1, sob uma maior concentração de cloreto de cálcio (0,35M), menor porcentagem de alginato (1,25%) e maior tempo de cura (90min). Contudo, no ensaio 1 sob as condições de cloreto de cálcio (0,05M), alginato (1,25%) e tempo de cura (30min), também foi possível observar um excelente rendimento de imobilização, visto que preservou uma atividade enzimática de 89,35%. Diante destes resultados, pode-se afirmar que a metodologia empregada apresentou uma boa eficiência de aprisionamento, pois manteve uma alta atividade. Em trabalhos semelhantes envolvendo a imobilização de inulinases, os maiores

rendimentos de imobilização alcançados foram de 46,27% em inulinase imobilizada por adsorção e reticulação na casca de ovo de galinha (DE ARAUJO RIBEIRO *et al.*, 2021), 70,87% em inulinase imobilizada por reticulação em nanofibras de carbono heterofuncionalizadas (SINGH; CHAUHAN; KENNEDY, 2019b), 76,3% em inulinase imobilizada por reticulação em duolite XAD (SINGH *et al.*, 2020a) e 80% em inulinase imobilizada por aprisionamento em alginato (RAWAT *et al.*, 2021), indicando, portanto, que o rendimento de imobilização do presente estudo foi significativamente maior.

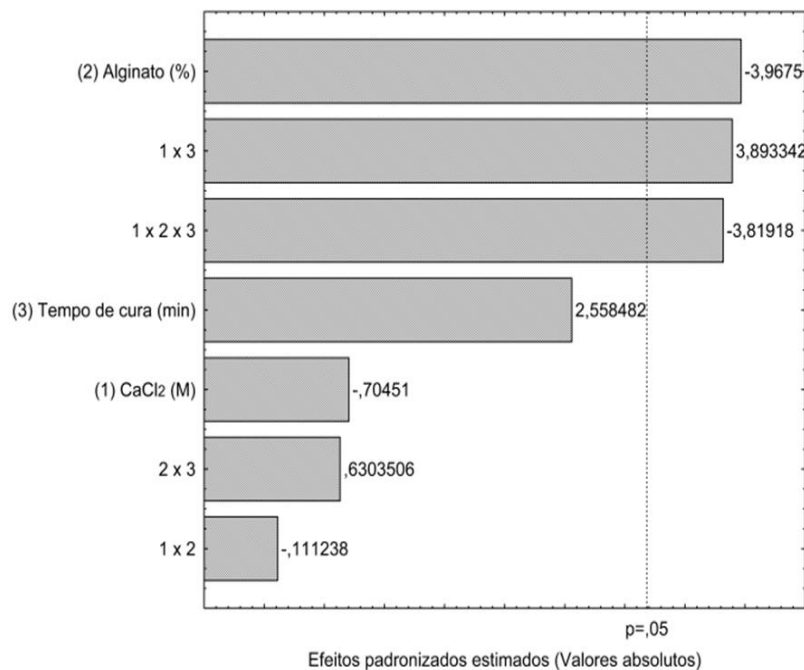
Tabela 1. Planejamento fatorial completo 2^3 da inulinase imobilizada em alginato de cálcio tendo como variáveis independentes cloreto de cálcio, alginato e tempo de cura e variável resposta o rendimento de imobilização.

Ensaio	Cloreto de cálcio (M)	Alginato (%)	Tempo de cura (min)	Rendimento (%)
1	0,05	1,25	30	89,35
2	0,35	1,25	30	68,39
3	0,05	1,75	30	68,39
4	0,35	1,75	30	66,14
5	0,05	1,25	90	74,75
6	0,35	1,25	90	92,72
7	0,05	1,75	90	76,25
8	0,35	1,75	90	74,38
9 (C)	0,2	1,5	60	61,28
10 (C)	0,2	1,5	60	58,28
11 (C)	0,2	1,5	60	65,39
12 (C)	0,2	1,5	60	65,77

Avaliando a Figura 1 pode-se observar que a única variável que apresentou efeito significativo foi a concentração de alginato, sendo este efeito negativo, ou seja, aumentando a concentração de alginato diminuiu o valor do rendimento de imobilização. Este fenômeno é observado por vários autores em seus estudos, pois o aumento da concentração de alginato

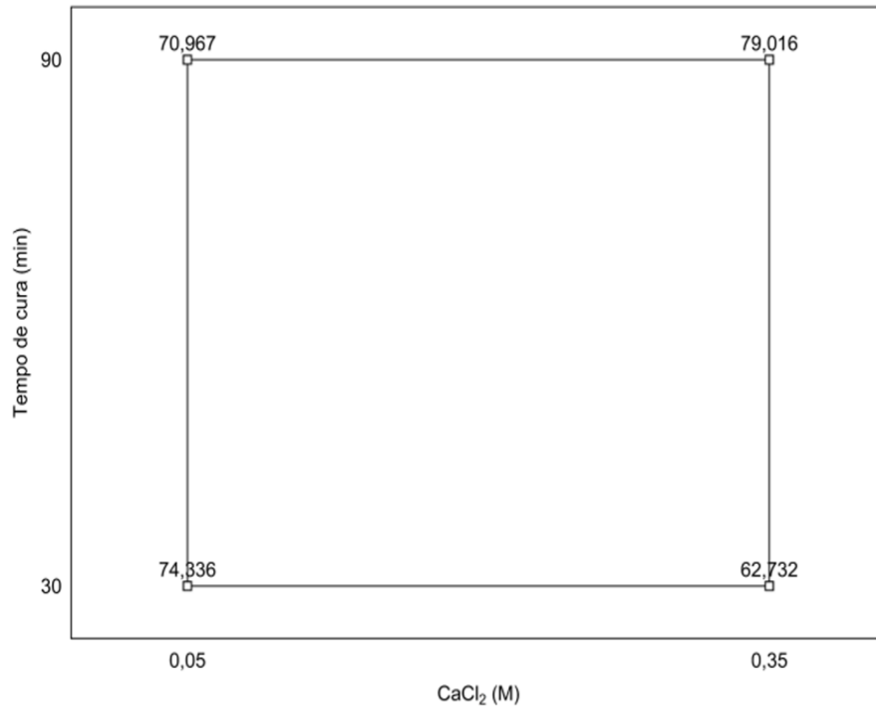
diminui o tamanho dos poros da pérola de imobilização, ocasionando um efeito negativo na difusão dos substratos para interagirem com a enzima (GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2018; AINIWAER *et al.*, 2022).

Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos principais das variáveis independentes (concentração de cloreto de cálcio - CaCl₂, concentração de alginato e tempo de cura), e suas interações que influenciaram no rendimento de imobilização das inulinasas em esferas de alginato por aprisionamento.



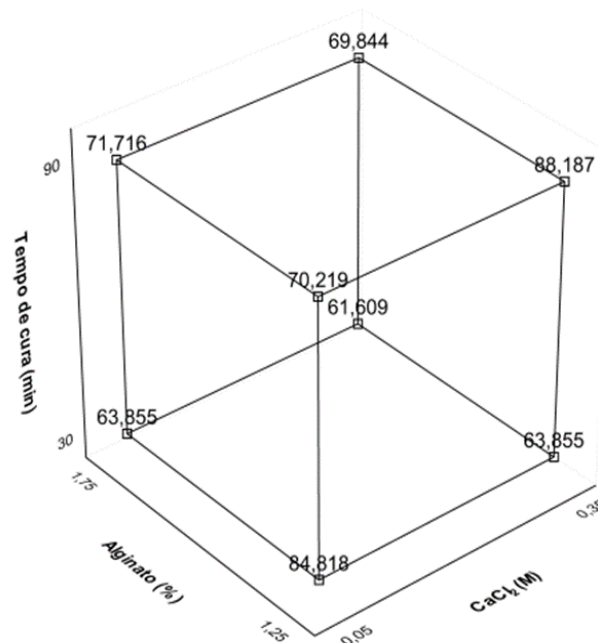
Em relação às interações ou efeitos de segunda ordem, pode-se verificar que a interação entre a concentração do cloreto de cálcio e o tempo de cura (1x3) apresentou efeito significativo e positivo, isto indica que o aumento destas duas variáveis favoreceu o rendimento de imobilização. Este comportamento pode ser confirmado na Figura 2. Na Figura 2 pode ser observado que a maior concentração de cloreto de cálcio (0,35M) e o maior tempo de cura (90min) favoreceu maiores valores de efeito. Isto significa que a maioria dos ensaios com estas condições apresentou valores maiores de rendimento, culminando com o melhor ensaio nestas condições (ensaio 6).

Figura 2. Diagrama de interpretação geométrica dos efeitos na interação entre Concentração de cloreto de cálcio (CaCl_2) e tempo de cura sobre o rendimento de imobilização de inulinas por aprisionamento.



Além da interação entre duas variáveis, na Figura 1 também se verificou o efeito significativo entre as três variáveis analisadas. Este efeito foi negativo devido a divergência entre os efeitos envolvidos na interação, ou seja, duas variáveis influenciaram positivamente e uma negativamente. Esta interação está representada na Figura 3, onde seus vértices apresentam diferentes valores de efeito, sendo o melhor ensaio correspondendo às condições de maior concentração de cloreto de cálcio, maior tempo de cura e menor concentração de alginato. Esta condição de maior efeito é apresentada na Tabela 1, como sendo o ensaio 6 com o valor de rendimento de imobilização de 92,72% .

Figura 3. Gráfico cúbico das interações entre a concentração de cloreto de cálcio – CaCl_2 , a concentração de alginato e o tempo de cura sobre o rendimento de imobilização das inulinas em alginato por aprisionamento.



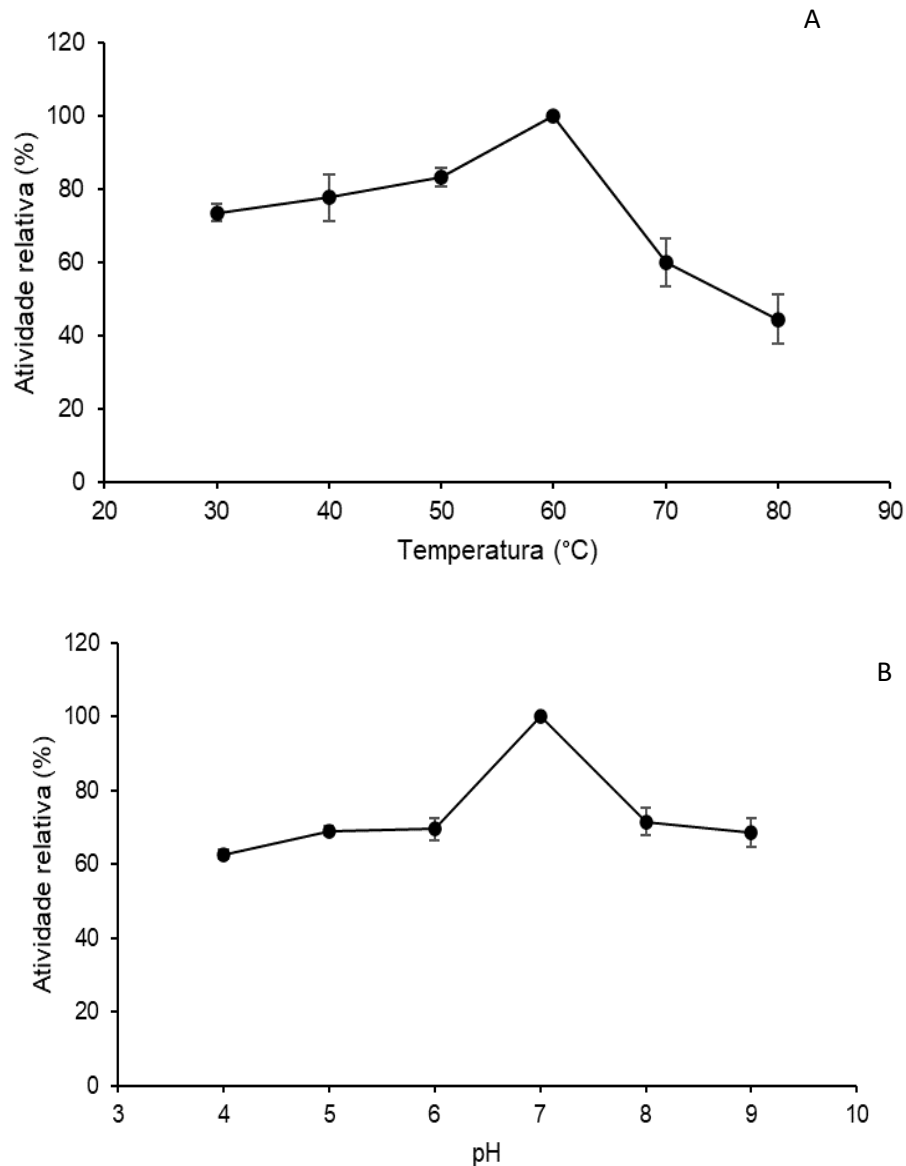
Avaliando a Figura 3 foi possível visualizar de forma gráfica a interação entre as três variáveis sobre o rendimento de imobilização das inulinas. Este gráfico representa a influência das variáveis umas sobre as outras. Apesar de que o melhor rendimento ter sido visto nas maiores concentrações de CaCl_2 e maior tempo de cura, essas variáveis não influenciaram de forma significativa, uma vez que nas menores concentrações de alginato, CaCl_2 e menor tempo de cura, observou-se um rendimento de 84,81, confirmando, portanto, a influência maior do alginato sobre as demais variáveis.

3.2 Caracterização bioquímica da inulinase imobilizada

A caracterização das enzimas imobilizadas é importante para avaliar se o processo de imobilização afetou a atividade e a estabilidade enzimática quando comparada à enzima livre. A imobilização, em sua grande maioria, melhora os parâmetros de estabilidade e pode alterar os demais parâmetros cinéticos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; ALI *et al.*, 2021). Na figura 4,

pode-se visualizar a influência da temperatura e do pH na atividade da inulinase imobilizada em alginato de cálcio.

Figura 4. Efeito da temperatura (A) e do pH (B) na atividade da inulinase imobilizada em alginato de cálcio de *Aspergillus terreus* URM4658 produzida por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.



A atividade relativa da inulinase de *A. terreus* URM4658 imobilizada em alginato de cálcio apresentou valor máximo em temperatura de 60°C (Fig. 4A) e pH 7,0 (Fig. 4B). Comparando a influência dos mesmos parâmetros em sua enzima na forma livre utilizando as mesmas condições de produção enzimática, foi observada a mesma temperatura ótima de

60°C, diferenciando apenas no valor de pH ótimo de 4,0 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022). Pode-se perceber que a imobilização da enzima manteve a sua atividade máxima na mesma temperatura que a sua forma livre. Isso também foi visualizado em estudos semelhantes de imobilização de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus aculeatus* em esferas de quitosana, que apresentou antes e após a imobilização, uma temperatura ótima de 60°C de atividade hidrolítica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Em outro estudo avaliando a imobilização de inulinase de *Aspergillus tamarii* - U4, visualizou-se uma temperatura ótima de 65°C, antes e após a sua imobilização (GARUBA; ONILUDE, 2018). A imobilização de inulinase produzida por *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 em duolite XAD apresentou uma temperatura ótima de 55°C antes e após a imobilização (SINGH *et al.*, 2020a), indicando, portanto, um valor semelhante ao encontrado no presente estudo.

Contudo, a influência da atividade da inulinase em diferentes pHs aumentou após a imobilização, mostrando uma melhor atividade no pH 7,0. Sendo assim, o pH exibido pelo biocatalisador imobilizado é neutro. Esses resultados podem ser explicados devido a possibilidade de a enzima livre sofrer agregação de proteínas, principalmente próximo ao seu ponto isoelétrico, causando interações enzimáticas indesejadas e estabilizando estruturas enzimáticas incorretas (MOSTAFA *et al.*, 2019). De Araujo Ribeiro *et al.* (2021) corroboram com o nosso resultado, pois a inulinase fúngica estudada pelos autores exibiu um pH ótimo de 8,0 após sua imobilização, um pH considerado básico, mas próximo a neutralidade. Em estudo semelhante avaliando a imobilização de inulinase produzida por *A. terreus* em alginato de cálcio, foi verificado um pH ótimo 5,5 (MAGADUM; YADAV, 2018). A xilanase de *A. flavus* imobilizada em esferas de alginato apresentou um comportamento semelhante, tendo em vista que o seu pH ótimo modificou de 5,0 na enzima livre para 5,5 na enzima imobilizada (MOSTAFA *et al.*, 2019).

Em contrapartida, apresentando um fenômeno inverso ao presente estudo, foi visto em alguns trabalhos uma diminuição do pH ótimo das enzimas após a imobilização. A tanase de *A. ficuum* imobilizada em alginato de cálcio demonstrou uma redução de pH ótimo, alterando um pH ótimo de 6,0 para 5,0 nas formas livre e imobilizada, respectivamente (DE LIMA *et al.*, 2018). Além disso, após a imobilização enzimática, foi vista uma mudança de pH ótimo das inulinases de pH 6,0 para o 5,7 (TORABIZADEH; MAHMOUDI, 2018) e pH 6,0 para 5,5 (TORABIZADEH; MIKANI; RAHMANIAN, 2018), confirmando, portanto, o efeito oposto.

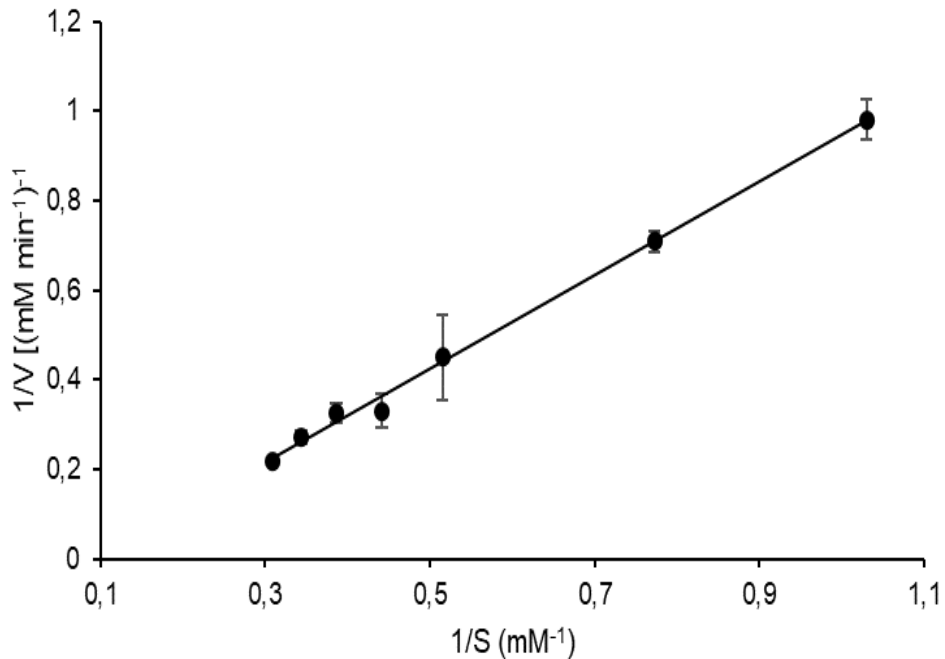
A imobilização da inulinase de *A. terreus* URM4658 em alginato de cálcio proporcionou atividade em uma ampla faixa de pH (4,0-9,0), apresentando uma atividade relativa maior do que 60% em todas as faixas estudadas. Esses resultados mostraram-se promissores, uma vez que em contraposição ao descrito na literatura que utilizaram diferentes materiais como suporte para imobilização de inulinases, como nanoargila de haloisita (SINGH; SINGH, 2022b) e nanopartículas magnéticas de ouro (MOHAMMADI *et al.*, 2019), apresentaram atividades relativas superiores a 40% na faixa de pH entre 4,0 a 7,5 e 3,0 a 7,0, respectivamente.

3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise de inulina

Parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , da enzima imobilizada foram calculados a partir do gráfico de Lineweaver-Burk, como visualizado na figura 5, enquanto a constante catalítica (k_{cat}) foi calculada como a razão entre V_{max} e a concentração total da enzima (E_o). Diversas concentrações de substrato (inulina) 6-20 mg/mL foram usadas para medir a velocidade inicial da reação. A cinética de Michaelis-Menten foi observada. Para a enzima livre de *Aspergillus terreus* URM4658, o K_m foi determinado com o valor de 2,02 mM, V_{max} de 35,09 mM/min e k_{cat} de 6,68 min⁻¹ (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022), enquanto na forma imobilizada apresentou o K_m de 10,70 mM, V_{max} de 10,24 mM/min e k_{cat} de 1,47 min⁻¹. Como mostrado, a inulinase produzida por *A. terreus* após a imobilização em alginato de cálcio apresentou um aumento do K_m e diminuição do V_{max} e k_{cat} .

Geralmente, valores baixos de K_m indicam uma alta afinidade da enzima pelo substrato (TEMKOV *et al.*, 2019). Nesse sentido, com o processo de imobilização, foi evidenciado que a enzima imobilizada diminuiu a sua afinidade pelo substrato, uma vez que o valor do K_m aumentou em comparação a sua forma livre (OLIVEIRA *et al.*, 2022), a qual foi utilizado os mesmos processos de cultivo e extração enzimática. Tal fenômeno acontece devido a possibilidade dos sítios ativos enzimáticos estarem pouco disponíveis para interagirem com o substrato, o que acaba diminuindo a afinidade pela inulina e, conseqüentemente, aumentando a constante K_m . Quando isso ocorre, também provoca uma redução da velocidade de reação (TEMKOV *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019). Isso foi visualizado no estudo envolvendo a imobilização de β -galactosidase em alginato, que apresentou um aumento do K_m após a imobilização, alterando de 1,5 em sua forma livre, para 2,05 em sua forma imobilizada e reduziu o k_{cat} de 2,31 para 2,21 min⁻¹ (SOUZA *et al.*, 2019).

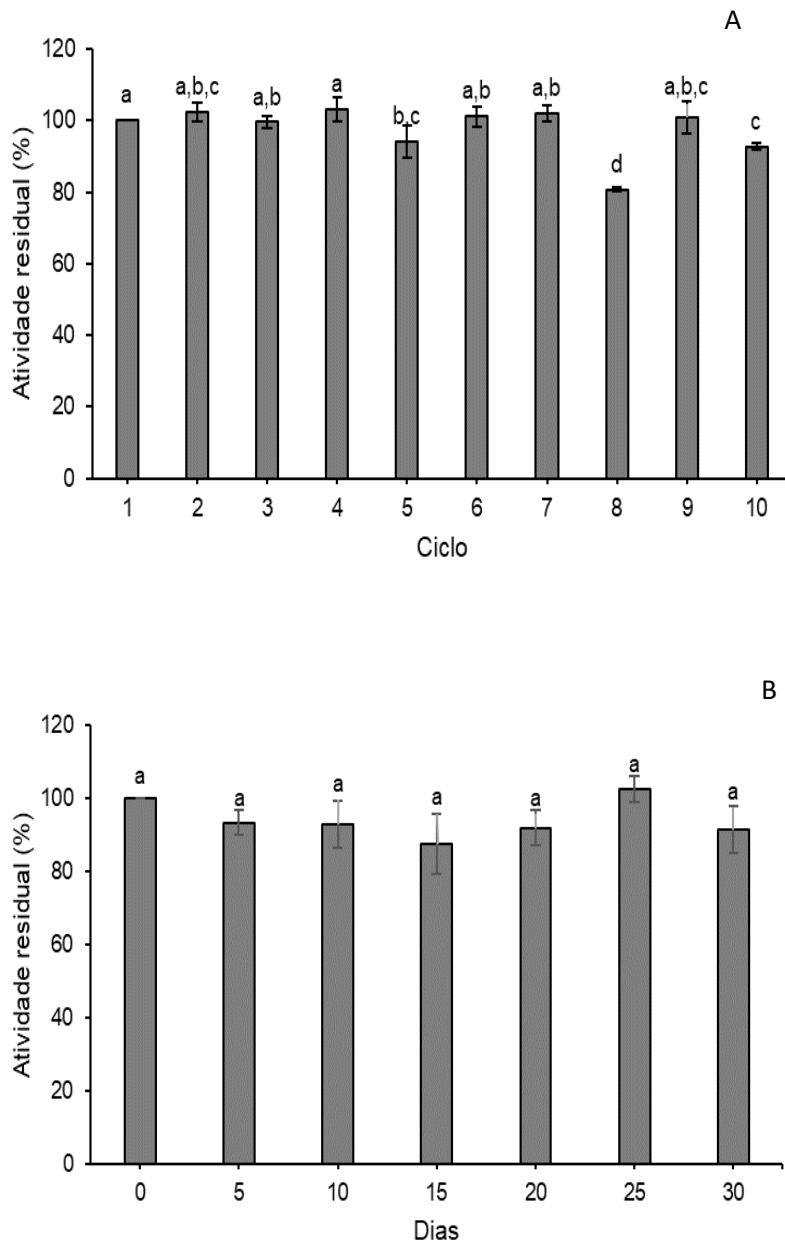
Figura 5. Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da reação de hidrólise de inulina pela inulinase imobilizada em alginato de cálcio de *Aspergillus terreus* URM4658 produzida por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.



3.4 Capacidade de reutilização e estabilidade ao armazenamento da inulinase imobilizada

Na finalidade de serem economicamente viáveis do ponto de vista industrial, as enzimas comerciais devem reter uma alta atividade catalítica após múltiplos ciclos de reuso. Este objetivo pode ser alcançado através da imobilização enzimática em suportes sólidos, pois estas enzimas podem ser recuperadas do meio de reação e reutilizadas durante vários ciclos. Os resultados dos ciclos de reuso da inulinase produzida por *A. terreus* URM4658 estão apresentados na Figura 6A, enquanto os da estabilidade operacional ao longo do armazenamento na Figura 6B. Para o reuso, a inulinase imobilizada foi estudada até dez ciclos, utilizando o mesmo biocatalisador imobilizado.

Figura 6. Efeitos dos ciclos de reuso (A) e da estabilidade operacional ao longo do armazenamento (B) da inulinase produzida por *A. terreus* em FES e imobilizada em alginato de cálcio.



Na Figura 6A pode-se observar que, ao longo dos 10 experimentos, a enzima manteve mais de 70% de sua atividade inicial. No oitavo ciclo, percebeu-se que sua atividade diferiu significativamente das demais, atingindo 77,36% de atividade residual, ao passo que nos experimentos 9 e 10 a enzima aumentou de atividade, alcançando um valor superior a 88%.

Provavelmente, no oitavo ciclo ocorreu um problema na homogeneização das pérolas, o que acabou diferindo a atividade dos demais ciclos. A partir desses resultados, pode-se inferir que a enzima possui uma alta capacidade catalítica ao longo de vários ciclos de reuso. Os resultados obtidos neste estudo foram compatíveis com os dados publicados na literatura.

A pectinase imobilizada efetivamente em grânulos de alginato de cálcio por meio de aprisionamento apresentou no seu sexto ciclo de reação 40% de atividade residual (MARTÍN *et al.*, 2019), ao passo que Andrade *et al.* (2021) identificaram a manutenção de atividade acima de 50% da tanase imobilizada em alginato de cálcio no seu sexto ciclo de reuso. Corroborando com estes resultados, Temkov *et al.* (2019) estudaram a imobilização da inulinase em nanotubos de carbono que, no décimo ciclo, reteve uma atividade superior a 65%. Torabizadeh, Mikani e Rahmanian (2018) conseguiram reutilizar a inulinase imobilizada durante 12 ciclos, mantendo também 80% de sua atividade inicial no seu décimo ciclo. Enquanto Singh, Chauhan e Kennedy (2019a) utilizando inulinase fúngica imobilizada em nanotubos de carbono, constataram uma preservação de apenas 28% da atividade residual após o décimo ciclo consecutivo de reuso. Portanto, a inulinase de *A. terreus* URM4658 imobilizada em alginato de cálcio pode ser reutilizada por mais vezes, sendo capaz de reter a atividade enzimática quando comparada com sua forma livre, o que promove economia de custos, tempo e utilização de mais enzimas.

Em relação a estabilidade ao longo do armazenamento da inulinase de *A. terreus* URM4568 imobilizada em alginato de cálcio (Fig. 6B), foi realizado um estudo de atividade residual durante um período de 30 dias de armazenamento, sob temperatura de refrigeração (5°C) com as enzimas imobilizadas imersas em tampão acetato (pH 5,0; 0,1M). Geralmente as enzimas permanecem ativas quando mantidas em baixas condições de temperatura, isso porque provavelmente elas tendem a bloquear a sua conformação biocatalítica original (DE LIMA *et al.*, 2018).

A cada 5 dias de armazenamento, foram realizadas análises em triplicata de atividade residual da enzima imobilizada. Ao longo dos experimentos, observou-se que a enzima manteve uma atividade superior a 80% durante os 30 dias de armazenamento, sem diferença significativa entre um experimento e outro, preservando uma atividade superior a 91% de sua atividade inicial no trigésimo dia. Em estudo semelhante envolvendo a imobilização de tanase em partículas de alginato de cálcio, observou-se também uma preservação acima de 80% de sua atividade residual no trigésimo dia de armazenamento em refrigeração (DE LIMA *et al.*, 2018). Mohammadi *et al.* (2019) observaram que, em 30 dias, a inulinase imobilizada em

nanopartículas magnéticas apresentou atividade acima de 75% de sua atividade inicial. Tais resultados mostram-se promissores, uma vez que estudos envolvendo a imobilização de inulinase produzida por *A. tamaritii*-U4, apresentou uma atividade em seu trigésimo dia de armazenamento, de 20% de sua atividade inicial (GARUBA; ONILUDE, 2018), indicando um valor inferior ao encontrado no presente estudo. A partir disso, pode-se constatar que a inulinase de *Aspergillus terreus* URM4658 imobilizada em alginato de cálcio possui uma ótima estabilidade ao longo de vários dias, com a manutenção de aproximadamente 90% de sua atividade inicial em 30 dias de armazenamento, sendo possível e recomendada a sua utilização em grande escala no setor industrial.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a imobilização da inulinase de *Aspergillus terreus* URM4658 em partículas de alginato de cálcio sob as condições de maiores concentrações de cloreto de cálcio (0,35M), maior tempo de cura (90min) e menor porcentagem de alginato (1,25%) proporcionou o maior rendimento de imobilização (92,72%). A atividade máxima da inulinase imobilizada foi observada na temperatura de 60°C e pH 7,0. Em relação aos parâmetros cinéticos, após a imobilização, o biocatalisador apresentou um K_m de 10,70 mM, V_{max} de 10,24 mM min⁻¹ e k_{cat} de 1,47 min⁻¹. A inulinase de *A. terreus* URM4658 imobilizada sob a melhor condição de imobilização, provou ser um biocatalisador promissor a nível industrial, tendo em vista que a enzima preservou uma boa atividade, acima de 70% de sua atividade inicial, em 10 ciclos de reuso. Além disso, a inulinase imobilizada em alginato de cálcio apresentou uma excelente estabilidade ao longo de 30 dias de armazenamento, preservando valores acima de 80% de atividade. Sendo assim, a inulinase imobilizada em alginato de cálcio provou ser um biocatalisador promissor e eficiente, podendo ser utilizada em larga escala no setor industrial para a possível produção de frutose e frutooligossacarídeos.

REFERÊNCIAS

AINIWAER, A. et al. Site-Specific Covalent Immobilization of *Methylobacterium extorquens* Non-Blue Laccase Melac13220 on Fe₃O₄ Nanoparticles by Aldehyde Tag. **Catalysts**, v. 12, n. 11, p. 1379, 2022.

ALI, A. O. et al. Grafted carrageenan: alginate gel beads for catalase enzyme covalent immobilization. **3 Biotech**, v. 11, n. 7, p. 341, 2021.

ANDRADE, P. M. L. et al. Immobilization and characterization of tannase from *Penicillium rolsii* CCMB 714 and its efficiency in apple juice clarification. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, p. 1005-1013, 2021.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of enzymes and cells. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.

CHEN, X. et al. Efficient production of inulo-oligosaccharides from inulin by exo-and endo-inulinase co-immobilized onto a self-assembling protein scaffold. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 210, p. 588-599, 2022.

DE ARAUJO RIBEIRO, G. C. et al. Inulinase from *Rhodotorula mucilaginosa*: Immobilization and application in the production of fructooligosaccharides. **Food Science and Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 959-969, 2021.

DE LIMA, J. S. et al. Immobilization of *Aspergillus ficuum* tannase in calcium alginate beads and its application in the treatment of boldo (*Peumus boldus*) tea. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 1989-1994, 2018.

DE OLIVEIRA, R. L.; SILVA, M. F.; SILVA, S. P.; CAVALCANTI, J. V. F. L.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Immobilization of a commercial *Aspergillus aculeatus* enzyme preparation with fructosyltransferase activity in chitosan beads: A kinetic/thermodynamic study and fructo-oligosaccharides continuous production in enzymatic reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 122, p. 169-182, 2020.

DE OLIVEIRA, R. L. et al. Production, Biochemical Characterization, and Kinetic/Thermodynamic Study of Inulinase from *Aspergillus terreus* URM4658. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6418, 2022.

DHIMAN, S. et al. Immobilization of mannanase on sodium alginate-grafted- β -cyclodextrin: An easy and cost effective approach for the improvement of enzyme properties. **International journal of biological macromolecules**, v. 156, p. 1347-1358, 2020.

GARUBA, E. O.; ONILUDE, A.A. Immobilization of thermostable exo-inulinase from mutant thermophilic *Aspergillus tamaris*-U4 using kaolin clay and its application in inulin hydrolysis. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 341-346, 2018.

GERMEC, M.; TURHAN, I. Partial purification and characterization of *Aspergillus niger* inulinase produced from sugar-beet molasses in the shaking incubator and stirred-tank bioreactors. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3789-3799, 2020.

GUERRERO-URRUTIA, C. et al. Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. **Process Biochemistry**, v. 108, p. 169-175, 2021.

GÜR, S. D.; İDİL, N.; AKSÖZ, N. Optimization of enzyme co-immobilization with sodium alginate and glutaraldehyde-activated chitosan beads. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 184, p. 538-552, 2018.

KURAYAMA, F. et al. Facile preparation of aminosilane-alginate hybrid beads for enzyme immobilization: kinetics and equilibrium studies. **International journal of biological macromolecules**, v. 150, p. 1203-1212, 2020.

LI, Q. et al. Elucidation of degradation pattern and immobilization of a novel alginate lyase for preparation of alginate oligosaccharides. **International journal of biological macromolecules**, v. 146, p. 579-587, 2020.

MAGADUM, D. B.; YADAV, G. D. Fermentative production, purification of inulinase from *Aspergillus terreus* MTCC 6324 and its application for hydrolysis of sucrose. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 14, p. 293-299, 2018.

MARTÍN, M. C. et al. Immobilization of enological pectinase in calcium alginate hydrogels: A potential biocatalyst for winemaking. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 18, p. 101091, 2019.

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426–428, 1959.

MOHAMMADI, M.; MOKARRAM, R. R.; GHORBANI, M.; HAMISHEHKAR, H. Inulinase immobilized gold-magnetic nanoparticles as a magnetically recyclable biocatalyst

for facial and efficient inulin biotransformation to high fructose syrup. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 846-855, 2019.

MOSTAFA, F. A. et al. Immobilization of xylanase on modified grafted alginate polyethyleneimine bead based on impact of sodium cation effect. **International journal of biological macromolecules**, v. 140, p. 1284-1295, 2019.

RAWAT, H. K. et al. Exo-inulinase production from *Aspergillus fumigatus* NFCCI 2426: purification, characterization, and immobilization for continuous fructose production. **Journal of food science**, v. 86, n. 5, p. 1778-1790, 2021.

SALEH, S. A. A et al. Physiochemical, kinetic and thermodynamic studies on *Aspergillus wewitschiae* MN056175 inulinase with extraction of prebiotic and antioxidant *Cynara scolymus* leaves fructo-oligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1026-1036, 2020.

SINGH, R. et al. Purification and characterization of two isoforms of exoinulinase from *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 for the preparation of high fructose syrup from inulin. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 1974-1983, 2018.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; JINDAL, A. Response surface optimization of solid state fermentation for inulinase production from *Penicillium oxalicum* using corn bran. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 7, p. 2533–2540, 2018.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; KENNEDY, J. F. Fructose production from inulin using fungal inulinase immobilized on 3-aminopropyl-triethoxysilane functionalized multiwalled carbon nanotubes. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 41-52, 2019a.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; KENNEDY, J. F. Immobilization of fungal inulinase on hetero-functionalized carbon nanofibers for the production of fructose from inulin. **LWT**, v. 116, p. 108569, 2019b.

SINGH, R.S.; CHAUHAN, K. Production, purification, characterization and applications of fungal inulinases. **Current Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 242-260, 2018.

SINGH, R. S. et al. Inulinase immobilization onto glutaraldehyde activated duolite XAD for the production of fructose from inulin. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, p. 101699, 2020a.

SINGH, R. S. et al. Updates on inulinases: Structural aspects and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 193-210, 2020b.

SINGH, R. S.; SINGH, T. Fructooligosaccharides Production from Inulin by Immobilized Endoinulinase on 3-Aminopropyltriethoxysilane Functionalized Halloysite Nanoclay. **Catalysis Letters**, v. 152, n. 7, p. 1927-1949, 2022a.

SINGH, R. S.; SINGH, T. Hetero-modification of halloysite nanoclay to immobilize endoinulinase for the preparation of fructooligosaccharides. **Food Research International**, v. 159, p. 111591, 2022b.

SINGH, R. S.; SINGH, T. Inulinase and pullulanase production from agro-industrial residues. In: **Industrial Biotechnology**. De Gruyter, p. 1-30, 2019.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; KENNEDY, J. F. Purification, thermodynamics and kinetic characterization of fungal endoinulinase for the production of fructooligosaccharides from inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3535-3545, 2020.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; LARROCHE, C. Biotechnological applications of inulin-rich feedstocks. **Bioresource technology**, v. 273, p. 641-653, 2019.

SOUZA, C. J. F et al. Immobilization of β -galactosidase by complexation: Effect of interaction on the properties of the enzyme. **International journal of biological macromolecules**, v. 122, p. 594-602, 2019.

TEMKOV, M. et al. Inulinase immobilization on polyethylene glycol/polypyrrole multiwall carbon nanotubes producing a catalyst with enhanced thermal and operational stability. **Engineering in Life Sciences**, v. 19, n. 9, p. 617-630, 2019.

TORABIZADEH, H.; MAHMOUDI, A. Inulin hydrolysis by inulinase immobilized covalently on magnetic nanoparticles prepared with wheat gluten hydrolysates. **Biotechnology reports**, v. 17, p. 97-103, 2018.

TORABIZADEH, H.; MIKANI, M.; RAHMANIAN, R. Inulin hydrolysis by immobilized inulinase on functionalized magnetic nanoparticles using soy protein isolate and bovine serum albumin. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 65, n. 6, p. 771-779, 2018.

WAHBA, M. I. et al. Immobilization impact of GEG-Alg-SPI as a carrier for *Aspergillus niger* MK981235 inulinase: Kinetics, thermodynamics, and application. **Bioresource Technology Reports**, p. 101099, 2022.