



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

LARISSA SANTOS SARAIVA

**IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE BACTERIANA PARA A
PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO: INFLUÊNCIA DO
MATERIAL DE SUPORTE E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA**

Palmas- TO

2024

LARISSA SANTOS SARAIVA

**IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE BACTERIANA PARA A
PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO: INFLUÊNCIA DO
MATERIAL DE SUPORTE E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia aplicada à indústria de alimentos

Orientador: Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales

Coorientador: Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

Palmas - TO

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- S243i Saraiva, Larissa Santos.
Imobilização de invertase bacteriana para a produção de açúcar invertido: influência do material de suporte e caracterização bioquímica. / Larissa Santos Saraiva. – Palmas, TO, 2024.
78 f.
Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2024.
Orientador: Sergio Andres Villalba Morales
Coorientador: Alex Fernando de Almeida
1. invertase bacteriana. 2. imobilização. 3. sílica. 4. polihidroxibutirato. I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS - TO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
LARISSA SANTOS SARAIVA

**IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE BACTERIANA PARA A
PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO: INFLUÊNCIA DO
MATERIAL DE SUPORTE E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 27 de março de 2024, pela Banca Examinadora
constituída pelos membros:

Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales
Orientador – UFT

Profª. Dra. Jamile Zeni
URI Erechim

Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta
UFT

*Dedico esse trabalho a Deus e aos meus pais,
nada disso seria possível sem todo o
ensinamento de vida que me proporcionaram.*

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, por ser minha fortaleza, meu refúgio e sempre guiar meus caminhos em todos os momentos, direcionando para as melhores decisões.

Aos meus pais, Osmar e Telma, minhas irmãs Lorena e Ludmila, meus tios Célia, Selma, Edilson e Jairo, meus primos, Eliza, Nathan, Ágatha e Bruna, ao Ryan e aos meus avós, por serem minha base, me compreenderem, me apoiarem durante todo o mestrado e vibrarem comigo diante de cada conquista. Pai e mãe tudo isso é para vocês e por vocês.

Aos Professores Sergio Andres Villalba Morales e Michelle da Cunha Abreu Xavier, por serem mais que orientadores, transmitirem todo conhecimento com total paciência, sempre presentes e me apoiando no decorrer dos experimentos.

À Catarina e Roze, que foram as melhores pessoas encontradas nessa caminhada, me ensinando e ajudando, sempre sorrindo independente do momento, tornando tudo mais leve, sendo positivas e lembrando que tudo daria certo, basta parar e tomar um café para organizar as ideias.

Ao LABIC, onde além do desenvolvimento da ciência em um ambiente agradável, aprendemos a serem gratos e em especial aos alunos de IC Natanael, Thais, Pedro e Kauã, vocês são os melhores, tornaram cada dia mais divertido e souberam fazer a diferença, auxiliando a todos e compartilhando conhecimentos.

À Gabriela Eustáquio, por ser tão solícita, auxiliar na resolução de problemas, nos experimentos e sem deixar de lado o nosso café da tarde, preocupando com cada aluno no laboratório.

Aos professores Rafaela Rocha Pinto, Rafael Firmani Perna, Raquel Marchesan e ao coorientador Alex Fernando de Almeida, por todo apoio científico.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP) e a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) pela realização de análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de recursos para o desenvolvimento do projeto PROCAD-AM 1707/2018 (Processo nº 88887.666945/2022-00).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) e a Universidade Federal do Tocantins e todos os seus servidores, pela oportunidade e estrutura disponível para o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

Os frutos amazônicos apresentam microrganismos capazes de produzir diversas enzimas, dentre as quais destaca-se a invertase, a qual catalisa a hidrólise da sacarose podendo produzir açúcar invertido e fruto-oligossacarídeos. Como a enzima em sua forma solúvel é geralmente instável, a imobilização pode aumentar a sua estabilidade, permitindo o reuso, reduzindo a contaminação e a formação de subprodutos, com criteriosa seleção de material de suporte e método para imobilização. Este trabalho propõe avaliar o processo de imobilização por adsorção física e ligação covalente da invertase produzida pela bactéria *Bacillus tequilenses*, isolada do fruto amazônico da pupunha, nos materiais de suporte sílica-gel, polihidroxibutirato (PHB) e biocarvão puro e funcionalizado com glutaraldeído, visando a obtenção de biocatalisadores estáveis para a reação de hidrólise da sacarose em açúcar invertido. Para isso, a enzima foi imobilizada durante 8 h, na temperatura de 30 °C, utilizando os métodos de adsorção e ligação covalente. Para a caracterização do biocatalizador foram realizados ensaios de estabilidade operacional, estabilidade de armazenamento, estabilidade frente ao pH (4,5 a 6,5), estabilidade térmica (30 °C a 60 °C) e da influência da concentração de substrato (5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 50 g/L, 100 g/L). Após 8 h de imobilização houve uma queda de atividade enzimática do extrato enzimático na presença dos suportes e a amostra controle manteve sua atividade próxima aos valores iniciais. As enzimas imobilizadas nos três suportes mostraram ser estáveis após 9 dias de armazenamento. Para a estabilidade operacional, a imobilização em sílica-gel funcionalizada, manteve mais de 50% da sua concentração até o terceiro ciclo. O biocatalizador se mostrou mais estável entre o pH 5,0 e 6,0 para a imobilização em PHB funcionalizado, enquanto para a imobilização em sílica-gel funcionalizada, apresentou maior atividade em pH 5,0. Durante a estabilidade térmica, os dois suportes testados funcionalizados apresentaram maior atividade em temperaturas de 30 °C a 50 °C. Para a influência do substrato, com o aumento da concentração, ocorreu elevação nos valores da atividade enzimática nas imobilizações com sílica-gel e PHB funcionalizados, sendo que esse último suporte apresentou maior afinidade da enzima com o substrato de acordo com os parâmetros cinéticos. Esses resultados indicam que a invertase bacteriana foi imobilizada nos três suportes, com alto potencial na obtenção de biocatalisadores estáveis para a produção de açúcar invertido.

Palavras-chave: invertase bacteriana, imobilização, sílica, polihidroxibutirato, biocarvão

ABSTRACT

Amazonian fruits have microorganisms capable of producing various enzymes, among which invertase stands out. Invertase catalyzes the hydrolysis of sucrose, potentially yielding inverted sugar and fructo-oligosaccharides. Given the inherent instability of soluble enzymes, immobilization can enhance stability, enabling reusability, reducing contamination, and minimizing byproduct formation, with careful selection of support material and immobilization method. This study aims to evaluate the immobilization process via physical adsorption and covalent binding of invertase produced by the bacterium *Bacillus tequilenses*, isolated from the Amazonian fruit pupunha, on support materials such as silica gel, polyhydroxybutyrate (PHB), and pure and glutaraldehyde-functionalized biochar. The objective is to obtain stable biocatalysts for sucrose hydrolysis into inverted sugar. Immobilization was conducted for 8 hours at 30°C using adsorption and covalent binding methods. Characterization of the biocatalyst involved operational stability, storage stability, pH stability (4.5 to 6.5), thermal stability (30°C to 60°C), and substrate concentration influence (5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 50 g/L, 100 g/L). After 8 hours of immobilization, a decrease in enzymatic activity was observed in the presence of supports, while the control sample maintained activity close to initial values. Enzymes immobilized on all three supports exhibited stability after 9 days of storage. For operational stability, immobilization on functionalized silica gel retained over 50% of its concentration until the third cycle. The biocatalyst was most stable between pH 5.0 and 6.0 when immobilized on functionalized PHB, whereas immobilization on functionalized silica gel showed higher activity at pH 5.0. During thermal stability, both functionalized supports exhibited higher activity at temperatures between 30°C and 50°C. With increasing substrate concentration, enzymatic activity increased in immobilizations with functionalized silica gel and PHB, with the latter demonstrating higher enzyme-substrate affinity according to kinetic parameters. These results indicate successful immobilization of bacterial invertase on all three supports, with high potential for obtaining stable biocatalysts for inverted sugar production.

Keywords: bacterial invertase, immobilization, silica, polyhydroxybutyrate, biochar.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 01 – Ação da invertase	17
Figura 02- Métodos de imobilização enzimática	26
Figura 03 - Redução do ácido dinitrossalicílico pelo açúcar redutor, formando o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico	35
Figura 04 – Micrografias eletrônicas das amostras GLU-BIO (A), GLU-SI (B) e GLU-PHB (C)	40
Figura 05- Espectro de infravermelho por transformada de Fourier das amostras GLU-BIO, GLU-SI e GLU-PHB	42
Figura 06 – Perfil cinético de imobilização em sílica gel, PHB, biocarvão	43
Figura 07 – Perfil cinético de imobilização em sílica gel, biocarvão, PHB funcionalizados com glutaraldeído	44
Figura 08 – Estabilidade de armazenamento da enzima livre e imobilizada	48
Figura 09 – Estabilidade operacional da invertase em GLU-BIO, GLU-SI e GLU-PHB	49
Figura 10 – Estabilidade de pH da imobilização em PHB	51
Figura 11 – Estabilidade térmica das enzimas imobilizadas em GLU-PHB	52
Figura 12 – Estabilidade térmica das enzimas imobilizadas em GLU-SI	53
Figura 13 – Concentração de frutose em função do tempo para a imobilização GLU-PHB	57
Figura 14 – Concentração de frutose em função do tempo para a imobilização GLU-SI	57
Figura 15 – Modelo de Michaelis-Menten para a imobilização GLU-PHB	58
Figura 16 – Modelo de Michaelis-Menten para a imobilização GLU-SI	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Diferentes métodos e suportes de imobilização da invertase	23
Tabela 02 - Caracterização das partículas obtidas pelos métodos BET e BJH	40
Tabela 03 – Parâmetros de imobilização com o rendimento e atividade recuperada	46
Tabela 04 – Parâmetros termodinâmicos para a invertase imobilizada em PHB e sílica-gel funcionalizadas em diferentes temperaturas de incubação	54
Tabela 05 – Parâmetros cinéticos obtidos para a invertase imobilizada em PHB e sílica-gel funcionalizadas	60
Tabela 06 – Perfil cinético do extrato enzimático durante a imobilização sem funcionalização	77
Tabela 07 – Perfil cinético do extrato enzimático durante a imobilização com funcionalização	77
Tabela 08 – Estabilidade de armazenamento	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- PHB – Polihidroxibutirato
- RI – Rendimento de imobilização
- AR – Atividade recuperada
- FOS – Fruto-oligossacarídeos
- DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico
- HPLC – cromatografia líquida de Alta Eficiência
- GRAS – Geralmente Reconhecidos como Seguros
- PP6 – Linhagem bacteriana *Bacillus tequilensis* isolada da pupunha
- BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio
- GLU-SI – Sílica-gel funcionalizada com glutaraldeído
- GLU-BIO – Biocarvão funcionalizado com glutaraldeído
- GLU-PHB – PHB funcionalizado com glutaraldeído
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- BET – BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938
- BJH – BARRET; JOYNER; HALLEND, 1951
- FT-IR – Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier
- K_d – Constante de desativação térmica
- $T_{1/2}$ – Tempo de meia vida
- E_d – Energia de ativação para a desnaturação térmica
- ΔH_d – Entalpia de ativação da desnaturação térmica
- ΔG_d – Energia livre de Gibbs
- ΔS_d – Entropia de ativação da desnaturação térmica
- K_m – Constante de Michaelis-Menten
- $V_{m\acute{a}x}$ – Velocidade máxima de reação
- ANOVA – Análise de variância
- SBA-15 – Santa Barbara Amorphous number 15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 AÇÚCAR INVERTIDO	16
3.2 INVERTASE	16
3.2.1 Fontes de produção	18
3.2.2 Bioprospecção	19
3.2.3 <i>Bacillus tequilenses</i>	20
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	23
3.3.1 Adsorção	26
3.3.2 Ligação covalente	27
3.4 MATERIAIS DE SUPORTE	28
3.4.1 Sílica-gel	29
3.4.2 Polihidroxibutirato (PHB)	30
3.4.3 Biocarvão	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Produção do biocatalisador	32
4.1.1 Produção da invertase	32
4.1.2 Materiais de suporte	33
4.1.2.1 Pré-tratamento dos suportes para o método de adsorção	33
4.1.2.2 Funcionalização dos suportes	33
4.1.3 Imobilização da invertase	33
4.2 Determinação dos parâmetros de imobilização	34
4.3 Método para determinação da atividade enzimática	34
4.4 Caracterização física e química dos biocatalisadores	35
4.5 Caracterização bioquímica da invertase imobilizada	36
4.5.1 Estabilidade ao armazenamento	36
4.5.2 Ensaios de estabilidade operacional das enzimas imobilizadas	36
4.5.3 Ensaios de estabilidade frente ao pH	36
4.5.4 Ensaios de estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos	37

4.5.5	Influência da concentração de substrato e determinação da cinética de reação	38
4.6	Análise estatística dos dados	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Caracterização físico-química dos biocatalisadores	39
5.2	Imobilização por adsorção física e ligação covalente	43
5.3	Parâmetros de imobilização	46
5.4	Estabilidade de armazenamento	48
5.5	Estabilidade operacional das enzimas imobilizadas	49
5.6	Estabilidade frente ao pH	50
5.7	Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos	52
5.8	Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e determinação da cinética de reação	56
6	CONCLUSÕES	61
7	TRABALHOS FUTUROS	62
8	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICE	77

1. INTRODUÇÃO

A invertase, ou β -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26), é uma enzima que catalisa a hidrólise da sacarose para produção de glicose e frutose, formando assim o açúcar invertido, o qual é considerado mais doce e atraente para indústria, visto que a frutose resultante possui maior grau de doçura e não cristaliza durante o processamento (KOTWAL e SHANKAR, 2009; MANOOCHEHRI *et al.*, 2020). O açúcar invertido produzido mediante ação da invertase é considerado um produto com maior qualidade, sem cores e subprodutos, sendo mais interessante para a produção de alimentos em comparação com o açúcar obtido pela hidrólise ácida (CABRERA *et al.*, 2017).

Especificamente, na indústria alimentícia, o açúcar invertido pode ser utilizado no preparo de balas, geleias, melaço para bebidas alcoólicas, mel, chocolates, coberturas líquidas e biscoitos (LINCOLN; MORE, 2017). Este açúcar também pode ser utilizado na indústria farmacêutica em formulação de xaropes, fabricação de nutracêuticos e até mesmo em formulações de ração animal (LINCOLN; MORE, 2017).

As plantas são uma das principais fontes produtoras de invertase, mas este processo não é economicamente viável em escala industrial devido a seu longo tempo, alto custo de produção e flutuações sazonais (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020). No entanto, a invertase pode ser produzida em maior quantidade utilizando leveduras, bactérias e fungos, em vários meios de crescimento, sendo que essa invertase apresenta melhores propriedades catalíticas, e permite a obtenção de produtos seguros para o consumo, podendo assim ser utilizada na indústria de alimentos (NADEEM *et al.*, 2015; ÖZTOP *et al.*, 2020; RASBOLD *et al.*, 2021).

A produção da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* é a mais comum para uso em indústria alimentícia, visto que não apresenta toxicidade e não é patogênica (ANDJELKOVIĆ; PIĆURIĆ; VUJČIĆ, 2010; LINCOLN; MORE, 2017). No entanto, o bioma amazônico fornece espécies ricas em leveduras e bactérias capazes de produzir a invertase, como reportada por Bastos (2022) que estudou a produção da invertase a partir do *Bacillus tequilenses*, onde essa bactéria foi extraída do fruto da pupunha (*Bactris gasipaes*) e produzida a enzima por fermentação (MATOS *et al.*, 2019).

Apesar das suas propriedades catalíticas, a invertase em sua forma livre apresenta baixa estabilidade térmica devido à rápida desnaturação, a qual limita a sua aplicação e aumenta os custos de produção do açúcar invertido (ÖZTOP *et al.*, 2020; ASHKAN *et al.*, 2021). No entanto, a imobilização desta enzima pode aumentar a sua estabilidade térmica e

operacional, permitindo a reutilização, redução de contaminantes e formação de subprodutos (MELLER *et al.*, 2016; ASHKAN *et al.*, 2021). Além disso, o uso de enzimas imobilizadas é favorável a nível industrial por possibilitar sua fácil separação de reagentes, produtos e uso de diferentes configurações de reatores (LABUS; WOLANIN; RADOSIŃSKI, 2020). O desempenho da enzima imobilizada dependerá principalmente do método de imobilização e do material de suporte utilizado (REMONATTO *et al.*, 2022).

Existem diversos métodos de imobilização, classificados de acordo com o modo de ligação das enzimas, podendo ser físicos como a adsorção e aprisionamento, químicos como ligação covalente e reticulação, ou físico-químicos como a microencapsulação (XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022). Os métodos físicos são mais indicados para manter a maior atividade catalítica das enzimas, já os métodos químicos são mais indicados para manter a estabilidade por longos períodos de tempo (NUNES *et al.*, 2021).

A adsorção é um método físico que requer interação hidrofóbica ou iônica entre o suporte e a enzima, sendo um método reversível, simples, e que permite reutilizar o suporte após a inativação da enzima imobilizada, resultando em menores custos (BAYRAMOĞLU *et al.*, 2009; REMONATTO *et al.*, 2022). Já a ligação covalente é um método de imobilização irreversível, de alta estabilidade, com a capacidade de induzir a formação de fortes interações entre a enzima e o suporte, reduzindo assim a dessorção da enzima, aumentando a sua estabilidade térmica e o tempo de meia vida (MOHAMAD *et al.*, 2015; NAZAROVA *et al.*, 2021; REMONATTO *et al.*, 2022).

O suporte utilizado em cada método de imobilização precisa tolerar a formação de muitas ligações, de maneira que consiga imobilizar grandes quantidades de enzimas e possa ser reutilizado (EMREGUL; SUNGAR; AKBULUT, 2007). Esses suportes podem ser orgânicos, inorgânicos ou sintéticos orgânicos, sendo que os inorgânicos possuem maior estabilidade, pois não sofrem alterações em condições de alta temperatura e pressão (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012). Dentre os materiais de suporte reportados para a imobilização da invertase destacam-se polímeros compósitos de poliacrilonitrila/polianilina, quitosana, nanopartículas de óxido de ferro e nanoargilas de beidelita (BAYRAMOĞLU *et al.*, 2009; UZUN *et al.*, 2013; ANDJELKOVIĆ *et al.*, 2015; KOLI; GAIKAR, 2016).

Recentemente, a sílica gel e o polihidroxibutirato (PHB) têm se destacado pela sua aplicabilidade na imobilização de enzimas frutossiltransferase, utilizadas para a obtenção de açúcares funcionais (ARAUJO *et al.*, 2021; FARIA *et al.*, 2021), pelo qual são considerados como materiais com alto potencial para imobilização de enzimas semelhantes, tais como a

invertase. A sílica apresenta baixo custo, estabilidade térmica e não é tóxica (NZEREOGU *et al.*, 2023). O PHB é um material biodegradável e de natureza renovável produzido a partir de bactérias, com propriedades que possuem semelhança a polímeros petroquímicos (MANIKANDAN, PAKSHIRAJAN, PUGAZHENHI; 2020). Similarmente, biocarvões representam uma interessante opção como matriz porosa para a imobilização de invertase devido a suas características texturais e origem renovável.

No entanto, os materiais citados anteriormente ainda não foram avaliados como suporte para a imobilização da enzima invertase produzida pelo *Bacillus tequilenses* isolado do fruto amazônico pupunha, sendo que na literatura são encontrados poucos estudos recentes com produção, caracterização e imobilização de invertase bacteriana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir, caracterizar e avaliar biocatalisadores estáveis para a reação de hidrólise da sacarose em açúcar invertido, mediante a imobilização de invertase bacteriana em suportes orgânicos e inorgânico, pelo método de adsorção física e ligação covalente.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a influência dos materiais de suporte sílica-gel, polihidroxibutirato (PHB) e biocarvão na imobilização da invertase, mediante a obtenção do rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR);

Analisar a influência da funcionalização dos suportes com glutaraldeído na imobilização da invertase;

Caracterizar física e quimicamente os suportes após a imobilização;

Avaliar a estabilidade de armazenamento da invertase livre e imobilizada;

Determinar a estabilidade operacional da invertase imobilizada em ciclos sequenciais de reação em batelada;

Avaliar a estabilidade frente ao pH e temperatura da invertase imobilizada;

Determinar a influência da concentração de substrato na reação de hidrólise catalisada pela invertase imobilizada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AÇÚCAR INVERTIDO

O açúcar invertido é formado a partir da hidrólise da sacarose, onde produz uma mistura equimolar de frutose e glicose (NADEEM *et al.*, 2015). O nome açúcar invertido vem do fato que após a hidrólise da sacarose, ocorre a inversão da luz polarizada da molécula, visto que comumente se apresenta do lado direito e nessa inversão altera para o lado esquerdo (RANA *et al.*, 2023).

O açúcar invertido pode ser produzido a partir da hidrólise ácida e hidrólise enzimática. A hidrólise ácida exige um alto consumo de energia e resulta em baixa eficiência da conversão de sacarose e como esse processo é submetido a alta temperatura e baixo pH, ocorre a contaminação com compostos de oxidação coloridos, tornando a hidrólise ácida um processo inviável (MACHÍN *et al.*, 2020).

Com a hidrólise enzimática é possível produzir açúcar invertido de alta qualidade, sem alteração de cor, sabor, com baixo teor de cinzas e sem a formação de hidroximetilfurfural, sendo esse um composto químico que indica alterações indesejáveis no açúcar (RODRIGUES *et al.*, 2000). Entretanto a rota enzimática apresenta elevados custos, mas isso pode ser minimizado com a imobilização da enzima (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

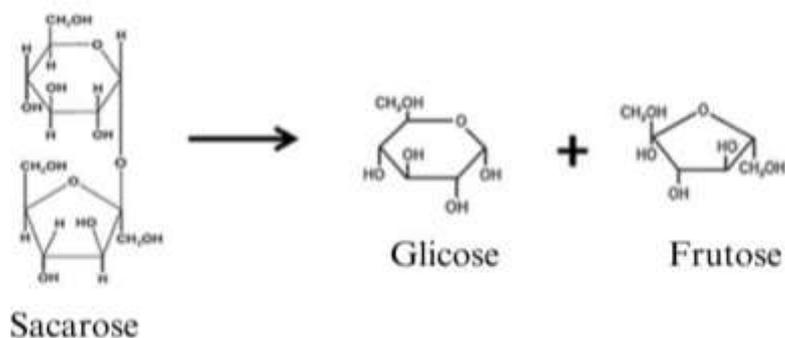
Esse açúcar invertido possui natureza higroscópica, podendo assim ser utilizado como umectante durante a produção de balas e bombons (NADEEM *et al.*, 2015). Assim como apresenta maior resistência e solubilidade, sendo aplicado também em sorvetes, pães e bolos aumentando a maciez e durabilidade, devido a capacidade de redução da atividade de água, podendo ser inserido em processos de fabricação de caramelos, geléias, bebidas carbonatadas e sucos (OZCAN *et al.*, 2019; LINCOLN; MORE, 2017).

3.2 INVERTASE

A invertase (EC 3.2.1.26) ou β -frutofuranosidase é uma enzima que está ligada a catálise da reação de hidrólise da sacarose (β -D-frutofuranosil α -D-glucopiranosídeo) resultando em D-glicose e D-frutose (Figura 01), produzindo assim o açúcar invertido (CHEN

et al., 2023). Na indústria alimentícia, a invertase pode ser utilizada no preparo de balas, geléias, melaço para bebidas alcoólicas, mel, chocolates, coberturas líquidas e biscoitos (LINCOLN e MORE, 2017).

Figura 01 – Ação da invertase



Fonte: LINCOLN e MORE (2017).

Também se utiliza a invertase na indústria farmacêutica e na produção de plastificantes para mel artificial e cosméticos (PEŞINT, YÜNGEVIŞ, DEMIRÇELIK, 2023). Essa enzima é aplicada na hidrólise da sacarose em etanol, evitando que durante o processo de fermentação tenha a formação de sorbitol, assim como na fabricação de papel, glicerol, ácido láctico e eletrodos enzimáticos para detectar sacarose (LEE e HUANG, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

A invertase pode ser classificada de acordo com o seu pH, podendo ser ácida, neutra ou alcalina, logo a invertase ácida tem pH ideal entre 4,5-5,0 e já a invertase neutra ou alcalina tem sua faixa de pH ideal entre 6,5-8,0 (AFTAB; KHAN; ALI, 2021). De acordo com Kulshrestha *et al.* (2013), a invertase em sua forma livre apresenta maior atividade em pH de 3,5-4,5, enquanto a temperatura alcança atividade enzimática em no máximo a 55 °C, já o valor de Michaelis-Menten (k_m) é de aproximadamente 30 mM.

Dependendo da concentração de substrato, a invertase terá atividade de hidrólise ou de transfutossilacção, sendo que em baixa quantidade de aproximadamente 10% de sacarose terá a função de hidrólise e em concentrações mais altas de aproximadamente 20-85% terá atividade de transfutossilacção (MELO *et al.*, 2023). Onde essa atividade de transfutossilacção provem a partir da ação na ligação β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose, transferindo frações de frutossil para um aceptor que não seja a água, formando assim fruto-oligossacarídeos (FOS) e liberando uma molécula de glicose ao meio reacional (VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2015).

Os principais métodos para determinação da atividade enzimática da invertase são DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), onde o espectrofotômetro mede a luz absorvida do resultado da mudança de cor da reação de redução entre o DNS e os açúcares redutores, o método de polarimetria que determina a concentração de frutose dependente das propriedades de rotação das substâncias e o método na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e análise de gel que isola a frutose e determina a quantidade de produção (CHEN *et al.*, 2023).

3.2.1 Fontes de produção

Espécies como *Aureobasidium spp.*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*, são leveduras que tem a capacidade de produzir a invertase comercial, sendo que a *Saccharomyces cerevisiae* é a principal fonte de produção da invertase para a indústria de alimentos, pois essa levedura não apresenta toxicidade e não é patogênica (PÉREZ DE LOS SANTOS *et al.*, 2016; MACHÍN *et al.*, 2020).

Resíduos de frutos podem ser utilizados para a extração de bactérias benéficas, visto que nesses frutos é encontrada grande quantidade de microrganismos, onde possuem conteúdos de carbono como a sacarose e assim produz enzimas extracelulares (RANA *et al.*, 2023). A invertase produzida por meio de fontes extremófilas, possuem alto interesse industrial, visto que essa enzima pode ser utilizada em condições extremas de temperatura e pH (AFTAB; KHAN; ALI, 2021).

Estudos mostram que é possível extrair a invertase após o processamento de vegetais, como Garcia *et al.* (2021) que detectaram a invertase em mamão do cultivar Formosa depois do processo de branqueamento, provando que esse fruto pode ser uma fonte para extração da invertase, diante do baixo custo da produção e caracterização da enzima.

Os fungos, como *Aspergillus niger*, podem crescer e produzir invertase em maiores quantidades a partir de variados meios de crescimento, sendo que essa invertase pode apresentar propriedades catalíticas favoráveis a processos, considerando também seus produtos como seguros e serem aplicadas a alimentos (NADEEM *et al.*, 2015).

Rana *et al.* (2023) estudaram um comparativo do *Bacillus* e *Enterobacter* para o aumento da produção de invertase, isolando bactérias de cascas de maçã e banana em decomposição, mostrando que em meio ácido todas as amostras liberaram invertase extracelular e que a temperatura ótima para síntese enzimática foram entre 25 e 45 °C,

concluindo assim que resíduos agroindustriais podem ser utilizados para extração de microrganismos e obtenção de biocatalizadores econômicos a indústria.

Rasbold *et al.* (2021b) avaliaram a produção da invertase pelo fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM para processos industriais alimentícios, concluindo que de acordo com os resultados das propriedades bioquímicas e comparando com outros trabalhos, essa invertase pode ser aplicada para fins biotecnológicos.

De acordo com Manoochehri *et al.* (2020), o processo recombinante é o mais acessível para a produção da invertase, visto que esse processo resulta em maior produtividade, baixos custos e maior quantidade de enzimas, podendo ser utilizadas leveduras, fungos filamentosos e bactérias em um mesmo sistema.

3.2.2 Bioprospecção

Ao longo de milhares de anos, os seres humanos têm inadvertidamente empregado microrganismos e enzimas na fabricação de alimentos, como cerveja, pão e queijo (CHILIVERI; LINGA, 2014). Mas na contemporaneidade, o cenário evoluiu, e as enzimas passaram a ser produzidas em escala industrial, sejam extraídas de animais e plantas ou provenientes de fontes microbianas, sendo que, essas enzimas são fundamentais tanto na produção de alimentos quanto no processamento alimentar (CHILIVERI; LINGA, 2014).

Embora diversas enzimas possuam potenciais valiosos para aplicação no processamento de alimentos, apenas algumas de origem vegetal ou animal estão comercialmente disponíveis, devido à escassez de fontes e à inconsistência entre lotes (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019). Além disso, a produção e extração de enzimas a partir de tecidos animais podem gerar desafios sanitários. A complexidade e o custo associados aos processos de purificação de enzimas provenientes de plantas ou animais também representam obstáculos significativos. Cerca de 85% das enzimas industriais são derivadas de microrganismos, enquanto o restante é obtido a partir de fontes vegetais ou animais (ZHANG *et al.*, 2019).

A elevada utilização de fontes microbianas advém de diversas vantagens, sendo que o desenvolvimento e a otimização de processos de fermentação possibilitam a produção e purificação em larga escala de enzimas bem caracterizadas, garantindo altos rendimentos (AGUILAR; SATO, 2018). Além disso, as enzimas provenientes de fontes microbianas tendem a apresentar maior atividade e estabilidade em comparação com aquelas de origem vegetal ou animal. Adicionalmente, os microrganismos são mais propícios para modificações

genéticas, ampliando ainda mais suas aplicações (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; AGUILAR; SATO, 2018; ZHANG *et al.*, 2019).

Mais da metade das enzimas industriais são sintetizados por leveduras e fungos filamentosos, enquanto aproximadamente 30% são produzidas por bactérias, a contribuição de animais é de apenas 8%, seguida por 4% provenientes de plantas. A viabilização da aplicação industrial de enzimas é creditada aos esforços pioneiros de Jokichi Takamine (1894) e de Boidin e Effront (1917), que realizaram o cultivo em larga escala de enzimas de fungos e bactérias.

As enzimas microbianas apresentam uma diversidade de funções bioquímicas, fisiológicas e reguladoras. Diversas bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se como significativos produtores de enzimas para aplicações na indústria e pesquisa (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; BI *et al.*, 2023). Os microrganismos industriais são atrativos por várias razões, entre eles, apresentarem taxas de crescimento elevadas, resultando em tempos de fermentação reduzidos, habilidade para secretar proteínas no ambiente extracelular e conformidade com as diretrizes GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros), exemplificado pelas espécies de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (AMIN *et al.*, 2019). *Bacillus licheniformis*, em particular, demonstra a capacidade de crescer utilizando diversas fontes de nutrientes, além de ser competente na produção e excreção de diversas enzimas hidrolíticas, predominantemente as proteases alcalinas e neutras (AMIN *et al.*, 2019; BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

3.2.3 *Bacillus tequilenses*

O gênero *Bacillus* é predominantemente constituído por bactérias Gram-positivas que têm a capacidade de formar endósporos, exibindo morfologia em forma de bacilo e apresentando a habilidade de serem aeróbias ou anaeróbias facultativas (ZHANG *et al.*, 2019). No entanto, algumas espécies dentro desse gênero foram identificadas com características variadas, podendo assumir formas de cocos, serem móveis ou não móveis, além de exibirem características anaeróbias, organotróficas ou litotróficas, revelando uma notável diversidade fisiológica (BI *et al.*, 2023; ZHANG *et al.*, 2019). Essas bactérias estão amplamente distribuídas em diferentes ambientes, incluindo solo e sedimentos aquáticos, desempenhando papéis cruciais nos ciclos do carbono e nitrogênio. Vale destacar que a

maioria das espécies não é patogênica, o que as torna alvos potenciais para exploração em aplicações biotecnológicas e industriais (SU *et al.*, 2023).

O *Bacillus tequilensis* (*B. tequilensis*), foi primeiramente isolada na cidade mexicana de Tequila, apresentando morfologia semelhante à do *Bacillus subtilis*, a diferenciação entre ambas demanda testes bioquímicos, tais como a análise da composição de ácidos graxos e a sequência do gene do RNA ribossomal 16S (BI *et al.*, 2023; SONDHI *et al.*, 2015). Esta espécie exibe habilidade de se desenvolver e reproduzir em amplas variações de pH e temperatura, variando entre pH 5,5 e 8,0, e temperaturas de 25 a 50 °C. Tal característica confere-lhe uma robustez singular, refletida também nas proteínas que produz, sendo que isso faz da *B. tequilensis* uma opção atraente para aplicações industriais, onde a necessidade de controle rigoroso de temperatura e pH pode ser significativamente reduzida (GATSON *et al.*, 2006).

Embora a literatura careça de dados mais aprofundados para uma definição mais precisa dessa bactéria, existem ainda trabalhos onde são documentadas diversas aplicações de *B. tequilensis* aplicadas a agentes de controle biológico em oposição aos agroquímicos sintéticos para controlar patógenos de vegetais, como citado por Gatson *et al.* (2006) onde relata como uma importante bactéria de biocontrole, tornando-se agente chave no controle de fungos fitopatogênicos devido aos seus excelentes efeitos inibitórios e de controle. Nos estudos de Wang *et al.* (2023), ao explorarem, pela primeira vez, a atividade e o mecanismo de biocontrole de um novo isolado de *Bacillus*, *B. tequilensis* A13, no antagonismo do fungo *Fusarium solani* (*F. solani*). Os autores observaram que a cepa *B. tequilensis* A13 demonstrou boa capacidade de inibir o crescimento *F. solani*, resultando na efetiva prevenção da doença de podridão radicular em *Rehmannia glutinosa* (*R. glutinosa*). Os pesquisadores também identificaram que o *B. tequilensis* A13 produziu uma variedade de compostos antifúngicos, como beta-1,3–1,4 glucanase, subtilisina e o peptídeo antimicrobiano LCI (WANG *et al.*, 2023). Todos esses componentes contribuíram para a atividade antifúngica da cepa, consolidando-a como um candidato promissor no desenvolvimento de agentes de biocontrole contra a doença de podridão radicular em *R. glutinosa*. Bi *et al.* (2023), ao verificar a atividade antifúngica de *B. tequilensis* contra *A. alternata* e o efeito de biocontrole na mancha preta da pêra, evidenciaram que o *B. tequilensis* não apenas inibiu o crescimento micelial, mas também induziu a agregação, torção e emaranhamento micelial em *A. alternata*. Além disso exerceu um controle efetivo, reduzindo a mancha preta da pêra em mais de 90%. Nos estudo de Zhou *et al.* (2021), a cepa JN-369 de *B. tequilensis*, que exibiu efeito antagônico contra

diversos fitopatógenos, foi previamente isolada e identificada a partir de plantas saudáveis de arroz xiang zaoxian. Os resultados do estudo mostraram que a cepa JN-369 pode promover a germinação das sementes e o crescimento das mudas, além de melhorar as atividades das enzimas de defesa das plantas.

Embora a maioria da aplicação do *B. tequilenses* seja em biocontrole de fungos e bactérias em vegetais, algumas dessas também são utilizadas para a produção de biosurfactantes. Segundo Su *et al.* (2023), os surfactantes de base biológica, incluindo os biosurfactantes microbianos, gerados como produtos metabólicos durante a produção fermentativa bacteriana ou fúngica, são produtos sustentáveis e ambientalmente benignos. Os mesmos autores conduziram um estudo para obter um microrganismo não patogênico e ecologicamente correto para a rápida produção de biosurfactantes, concluindo que a cepa de *B. tequilensis* SL9 forneceu evidências de que ela possui a capacidade de produzir um biosurfactante do tipo surfactina com boa atividade emulsificante e propriedade antimicrobiana (SU *et al.*, 2023). Cortéz-camargo *et al.* (2021) obteve um novo biosurfactante da *B. tequilensis* ZSB10 que foi isolada de uma lagoa de água salina localizada no vale de Tehuacan-Cuicatlan, no México, o biosurfactante bruto demonstrou possuir propriedades emulsificantes, surfactantes e antifúngicas.

O *B. tequilenses* tem sido relatado também para produção de enzimas, Sondhi *et al.* (2015) ao produzir uma lacase extracelular termo-alcálica estável de *Bacillus tequilensis* SN4, com potencial para biobranqueamento de polpa de madeira macia, Concluindo que a enzima foi capaz de reduzir significativamente o número kappa e aumentar o brilho da polpa mesmo sem o uso de mediador, tornando o processo industrialmente viável. Semelhantemente Zhang *et al.* (2019) isolou *Bacillus tequilensis* CAS-MEI-2-33 de embalagens de charuto para produzir pectinase alcalina a partir de talo de tabaco (TT). Com base nas condições otimizadas (pH 7,0, 40 g/L, 3% de inoculação e 40 h de cultivo), a maior atividade enzimática da cepa foi de 1370 U/mL. As propriedades enzimáticas foram estudadas, incluindo o pH do tampão de reação, temperatura de reação, efeitos de íons metálicos e estabilidade térmica. A pectinase alcalina foi relativamente estável a 40°C com um peso molecular de aproximadamente 45,4 kDa. Já Chiliveri *et al.* (2014), ao produzir pectato liase de *Bacillus tequilensis* SV11, após a purificação a enzima apresentou uma melhoria de 16,2 vezes na atividade específica da enzima, com rendimento de aproximadamente 40,2%. SDS-PAGE mostrou que a enzima possuía duas subunidades com massas moleculares de 135 ± 2 e 43 ± 2 kDa. A enzima foi otimamente ativa a 60 °C, pH 9. K_m e V_{max} da pectato liase

purificada foram encontrados como 1,220 mg/mL e 1773 U/mL, respectivamente. A enzima foi estudada quanto à sua aplicabilidade em biodecapagem e mostrou-se eficiente na remoção de 97,91% de pectina de tecido de algodão quando comparado com tecido tratado com álcali.

Os resultados consistentes desses estudos sugerem que *B. tequilensis* é uma cepa promissora com amplas possibilidades de contribuir para práticas agrícolas sustentáveis, biotecnologia industrial e outras aplicações benéficas. Ainda que desafios possam persistir, os avanços recentes destacam o potencial dessa bactéria como uma ferramenta versátil em diferentes contextos, promovendo inovações ecológicas e eficazes.

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Durante processos, é necessário manter a estabilidade da enzima principalmente nos parâmetros de temperatura, pH e concentração de substrato, para assim preservar a estrutura terciária das biomoléculas e não alterar o sítio ativo, pois essas alterações diminui a capacidade catalítica da enzima, sendo assim, a opção para controlar a instabilidade e diminuição do custo é a imobilização (MELO *et al.*, 2023).

A imobilização é um processo biotecnológico ao qual as enzimas são fixadas na superfície de matrizes sólidas chamadas de suporte ou confinadas no interior de uma matriz (RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020).

Um biocatalisador imobilizado para uso industrial precisa apresentar como características a alta atividade catalítica, capacidade para reuso em vários ciclos de reação, ligação com durabilidade ao suporte, resistência a fatores físico-químicos externos, não toxicidade, possibilidade de uso em modo contínuo e estabilidade aos parâmetros bioquímicos (LABUS; WOLANIN; RADOSIŃSKI, 2020).

Mas para obter êxito na imobilização é necessária a seleção do material de apoio, verificação das propriedades do suporte e também o método utilizado para essa imobilização, na Tabela 01 pode ser verificado alguns materiais usados para suporte para imobilização de invertase com o método de imobilização, pHs e temperaturas ótimas da enzima imobilizada (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

Tabela 01 – Diferentes métodos e suportes de imobilização da invertase

Material para suporte	Imobilização	pH	Temperatura	Referências
Hidrogel poli	Reticulação	3,0	60 ° C	ÖZTOP <i>et al.</i>

(acrilamida/ácido vinilsulfônico)					(2020)
Quitosana	Reticulação	3,0	60 ° C	KOLI; GAIKAR (2016)	
Poli (N vinilpirrolidona- co - butilacrilato - co - N - hidroximetilacrilamida)	Aprisionamento	5,0	70 ° C	HAKKOYMAZ; MAZI (2020)	
Silício poroso	Ligação covalente	4,5	57 ° C	AZODI; FALAMAKI; MOHSENFAR (2011)	
Polímeros compósitos poliacrilonitrila/polianilina	Adsorção	5,5	55 ° C	BAYRAMOĞLU <i>et al.</i> (2009)	
Nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana	Adsorção	5,0	60 ° C	WAIFALKAR <i>et al.</i> (2016)	
Nanoargilas de beidelita	Adsorção	5,0	65 ° C	ANDJELKOVIĆ <i>et al.</i> (2015)	
Quitosana	Ligação covalente	6,0	60 ° C	RASBOLD <i>et al.</i> (2021 ^a)	

Fonte: Autora (2023).

Os métodos de imobilização podem ser classificados de acordo com a ligação da enzima ao suporte, podendo ser físicos como adsorção e aprisionamento formando assim ligações fracas, químicas como o método de ligação covalente e reticulação formando ligações fortes ou também pela natureza do suporte, sendo poroso ou não-poroso (XIE;

ZHANG; SIMPSON, 2022; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015). Entretanto, os métodos por ligação covalente e adsorção podem imobilizar enzimas orientadas de forma aleatória na superfície do suporte, contribuindo para uma diminuição da atividade enzimática (JANG *et al.*, 2021).

A reticulação é um método químico irreversível, responsável pela formação de agregados enzimáticos por meio da ligação covalente, não sendo necessário o uso de uma matriz transportadora sólida, ou seja, não se utiliza suporte para esse método de imobilização (REMONATTO *et al.*, 2022). Existem diversas técnicas que compõem esse método, como cristais de enzimas reticuladas, enzimas dissolvidas reticuladas, enzimas secas por pulverização reticuladas e agregados de enzimas reticuladas, onde a aplicação da técnica vai depender da enzima utilizada e recursos disponíveis para a reticulação (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012).

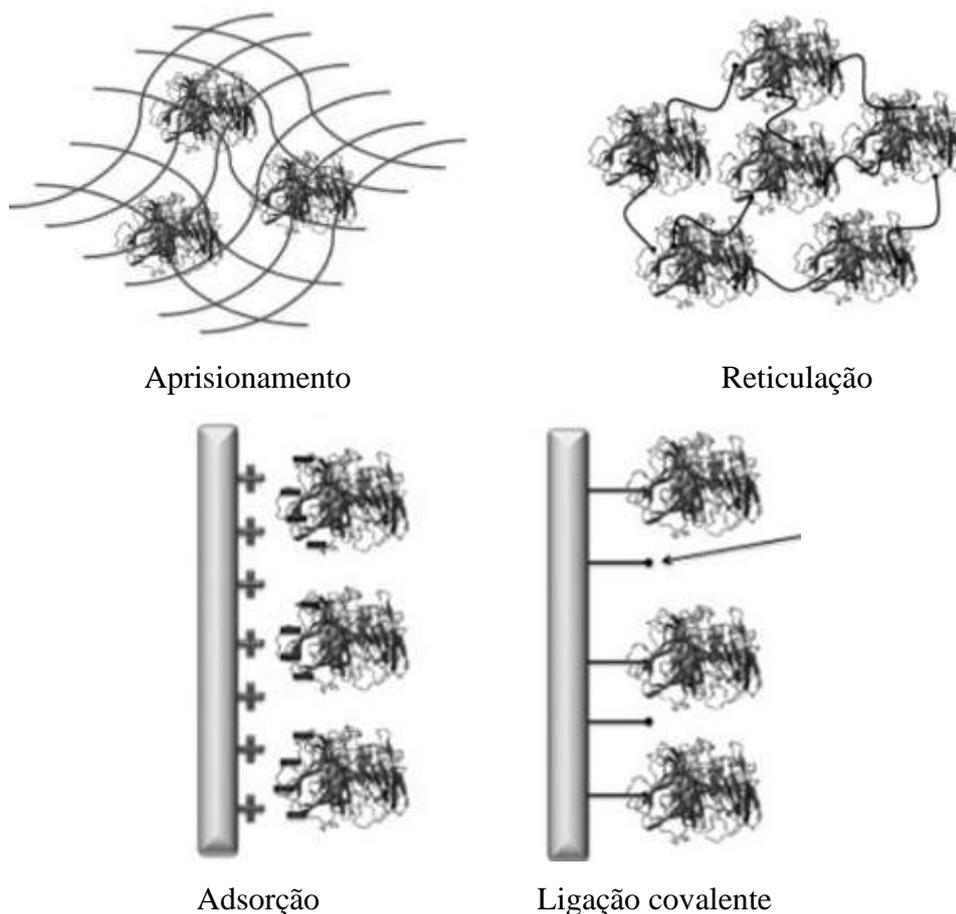
Na reticulação não tem o risco de ocorrer a lixiviação, pois os agregados enzimáticos preservam a estabilidade da enzima (LEE *et al.*, 2021). Esse método também tem maior estabilidade ao calor e solventes orgânicos, além de uma possível reutilização desses agregados (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012). As desvantagens de utilizar a reticulação para imobilização é que essa técnica apresenta maior lentidão e menor simplicidade durante o processo, podendo ocorrer perda de metade da atividade enzimática e quando aplicada a grandes quantidades de enzimas, possui baixa estabilidade e pouca reprodutibilidade (FURLANI *et al.*, 2020).

O aprisionamento consiste em um método de imobilização enzimática que aprisiona enzimas em uma rede de material ou em membranas poliméricas, sendo geralmente utilizado combinado a outros métodos para obter melhores resultados (NAZAROVA *et al.*, 2021). Nesse método, reações químicas entre o monômero e a enzima não afetam a atividade de imobilização, pois a enzima é protegida para não possuir contato direto com o meio reacional, minimizando assim a inativação da enzima por solventes orgânicos (FURLANI *et al.*, 2020).

Outra vantagem é que dentro do mesmo polímero podem ser imobilizados vários tipos de enzimas (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012). A desvantagem da utilização do aprisionamento é que pode haver dificuldade em controlar o tamanho dos poros no suporte e assim causar a lixiviação das enzimas, além da difusão do substrato e também limitações no aumento de produtos dentro do suporte, por isso faz-se necessário a utilização combinada com outro método que contribui para maior fixação da enzima ao suporte (FILHO; SILVA; GUIDINI; 2019).

As interações químicas que ocorrem nos métodos de imobilização podem ser observadas na Figura 02.

Figura 02- Métodos de imobilização enzimática.



Fonte: FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES (2013).

3.3.1 Adsorção

A adsorção física é um método de imobilização enzimática considerada simples e de baixo custo, pela diminuição de etapas no processo e com menos chance de alteração do sítio ativo, por conter ligações fracas (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015). Nesse método, as moléculas enzimáticas se aderem à superfície do suporte através da combinação de interações hidrofóbicas, interações dipolo-dipolo, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (JIANG *et al.*, 2024; EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015).

Com a aplicação desse método é possível reutilizar o suporte por vários ciclos, pois após a reação o suporte pode ser regenerado e imobilizar novamente outra enzima (DALLA-

VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Na adsorção física também não é necessário a ativação do suporte, reduzindo materiais e custos, além da minimização do risco de uma possível intoxicação do produto final (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Por serem fracamente ligadas ao material de suporte, as enzimas adsorvidas possuem baixa estabilidade de armazenamento, operacional e pouca seletividade com a adsorção de outras proteínas ou substâncias presentes (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012). Esse método também apresenta como desvantagem a possibilidade de ocorrer a dessorção em variações de pH, temperatura e força iônica (MENDES *et al.*, 2011).

Tizchang *et al.* (2021) imobilizaram a enzima β -galactosidase utilizando como suporte nanotubos de haloisita por adsorção física, encontrando melhores condições para esse método. A enzima imobilizada se manteve mais estável durante a catálise e armazenamento, concluindo que esse suporte foi adequado para a imobilização da enzima pela adsorção.

Bedzo *et al.* (2019) imobilizaram a invertase, extraída do fungo *Aspergillus japonicus*, pelo método de adsorção em resinas de troca iônica, essa imobilização foi realizada em duas temperaturas, 25 e 62 °C, sendo que para 62 °C a imobilização apresentou maiores resultados, com rendimento de 62% e atividade recuperada de 27%.

A β -frutofuranosidase foi imobilizada por Chen, Sheu e Duan (2014) em nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana, em 1 h a 25 °C. A enzima imobilizada apresentou maior atividade entre pH 3,0 e 6,5, mais estável em altas temperaturas comparada a enzima livre e resultados semelhantes para a produção de FOS da enzima livre e imobilizada, concluindo que a enzima pode ser imobilizada sem adição de outros reagentes tóxicos, recuperada através da aplicação de um campo magnético e reutilizada para a produção de FOS.

3.3.2 Ligação covalente

A ligação covalente é composta por ligações fortes, que impedem a eluição dos biocatalisadores, com maior estabilidade térmica e facilidade do contato da enzima com o substrato (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). Nessa técnica, o suporte é ativado inserindo grupos reativos que vão reagir com os grupos nucleofílicos da enzima, esses grupos ativos são inseridos com a aplicação de agentes funcionalizantes (MENDES *et al.*, 2011; ZHOU; HARTMANN, 2013).

Para a funcionalização da superfície do suporte pode ser utilizado o glutaraldeído, onde a enzima e o suporte vão reagir com as moléculas de glutaraldeído e assim por meio da reação de grupos aminos que se ligam aos grupos aldeídos do suporte funcionalizados, vai ocorrer a imobilização por ligação covalente (SOUZA *et al.*, 2017).

Com isso, ocorre a modificação da superfície do suporte e por fazer ligações fortes, o método se torna irreversível sem risco de lixiviação, a enzima também pode sofrer alterações no sitio ativo pelo tratamento químico, podendo então aumentar ou diminuir a atividade enzimática (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

Mas para a eficiência do método é necessário maior número de ligações covalentes da enzima ao suporte, dependendo da especificidade e densidade dos grupos reativos, da reatividade dos grupos funcionais e estado de protonação, podendo resultar em um biocatalisador com maior estabilidade operacional e resistência a amplas faixas de pH e temperatura (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013; MATEO *et al.*, 2007).

BAYRAMOĞLU *et al.* (2017) imobilizaram a enzima invertase pelo método de ligação covalente, utilizando como suporte nanopartículas magnéticas silanizadas, nas condições de temperatura a 22 °C por 6 h, observando uma ampla faixa de pH ideal e temperatura a 35 °C, assim como vida útil de 6 semanas e diminuição de 21% após ser reutilizada 12 vezes. Com isso, os autores concluíram a viabilidade de utilizar esse método e suporte para fins industriais.

Oliveira *et al.* (2020) imobilizaram uma preparação enzimática de marca Pectinex Ultra SP-L, em quitosana por ligação covalente, apresentando rendimento de imobilização de 95,9%, com 100% de atividades hidrolíticas até o terceiro ciclo de reuso e retenção de atividade de transfrutosilação equivalente a 80,7 % após 45 dias de armazenamento.

3.4 MATERIAIS DE SUPORTE

A escolha do material de suporte tem grande relevância durante a imobilização (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). Os suportes que possuem como característica química o fornecimento de grupos hidroxilas facilitam o processo de ativação. Mas também é de grande importância que o suporte tenha propriedades físicas que proporcionam vantagens ao processo de imobilização como maior área superficial de acordo com a porosidade, resistência a temperaturas elevadas, contaminação, produtos químicos e também resistência mecânica

(ALBERTINI *et al.*, 2012). Além disso, o suporte deve permitir fácil separação do biocatalisador com o meio inserido, mantendo maior retenção da viabilidade enzimática, sendo esse material mais indicado para aplicações industriais alimentícias e farmacêuticas (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015).

Os suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos. Os suportes orgânicos são encontrados em maior disponibilidade, biodegradáveis, com baixo custo, além de possuir estruturas que não sintetizam artificialmente com facilidade, sendo mais comum a utilização de polímeros sintéticos e biopolímeros (MISHRA *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2022).

Os suportes inorgânicos podem apresentar várias formas físicas, diferentes estruturas químicas e maior resistência, podendo adequar para a enzima que pretende imobilizar conforme as características esperadas, mas pode ser encontrado em quantidade mais limitada (MENDES *et al.*, 2011). Os materiais de suportes inorgânicos também são mais susceptíveis da reutilização, resistência a contaminação microbiana, maior rigidez e porosidade, mantendo a estrutura física e volume do material, como exemplos a sílica, nanopartículas e óxidos metálicos (ASHKAN *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2022).

Os suportes podem ser de materiais porosos e não porosos, sendo os porosos os que apresentam maior área superficial interna, mas necessita também de maior diâmetro desse suporte para a enzima imobilizar internamente, já no material não poroso a enzima se imobiliza na superfície externa, com maior interação da enzima e substrato (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

3.4.1 Sílica-gel

A sílica é um mineral encontrado comumente na natureza em abundância, com diversas aplicações industriais e tecnológicas, desde o uso em borracha, plásticos, filtros industriais e imobilização de enzimas (NZEREOGU *et al.*, 2023; KOVALENKO *et al.*, 2016). Sendo composta por átomos de silício ligados a quatro átomos de oxigênio em um ângulo tetraédrico, os poros da sílica podem variar de tamanho entre 5 a 3000 Å e área superficial entre 5-800 m²/g (NZEREOGU *et al.*, 2023; BANERJEE; LAYA MIMÓ; VERA VEGAS, 2001).

A caracterização da sílica pode ser definida como amorfa, natural ou artificial, microporosa, mesoporosa ou macroporosa, sendo consideradas suportes eficientes para a imobilização de enzimas pelas suas propriedades polares e apresentando estabilidade térmica

e química (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015). A literatura cita o uso da sílica-gel macroporosa como suporte de enzimas e no empacotamento para coluna de HPLC (WANG *et al.*, 2010).

A sílica-gel utilizada em reações químicas de catálise pode ocorrer em condições suaves de temperatura, pH e demais parâmetros, com alta seletividade e procedimentos operacionais mais simples (BANERJEE; LAYA MIMÓ; VERA VEGAS, 2001). Entretanto, a estrutura porosa do material tem a capacidade de proteger a enzima de condições extremas, apresentando um ambiente ideal para preservação da atividade enzimática (CALIFANO; COSTANTINI, 2020).

Diversos autores utilizaram a sílica para imobilização da lipase, pois essa enzima exige uma superfície hidrofóbica para maior interação enzima-suporte, sendo essas características que se encontram no material da sílica (PEDRO *et al.* 2023; KOVALENKO *et al.*, 2016; CLARSON *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2011).

Wang *et al.* (2010) imobilizaram a papaína em macroporos de sílica-gel por agregados enzimáticos reticulados, onde os resultados mostraram melhores condições de pH, temperatura e maior estabilidade térmica e de armazenamento comparado a enzima livre, concluindo que essa pode ser uma opção viável e eficiente para superar os desafios encontrados no uso da enzima livre.

Gomez *et al.* (2010) estudaram a imobilização da β -glicosidase em sílica mesoporosa por adsorção física após sete h de contato, apresentando 430 mg/g de enzima imobilizada, com carga máxima em pH 3,5 e 30 mM de concentração, mostrando excelente adsorção da enzima ao suporte.

3.4.2 Polihidroxibutirato (PHB)

O PHB é um polímero orgânico, com características físicas semelhante ao polipropileno, considerado termoplástico biodegradável, biocompatível e ecologicamente correto, sendo produzido a partir de microrganismos, sendo mais comum a bactéria, sob condições de estresses ambientais como limitações de nitrogênio, excesso de fontes de carbono e limitações de oxigênio (KAVITHA; RENGASAMY; INBAKANDAN, 2018; BINHAYEEDING *et al.*, 2020).

O PHB tem ampla aplicação industrial, devido às propriedades térmicas, mecânicas e biológicas favoráveis, alta cristalinidade (50-70%) e atoxicidade, podendo ser utilizado em

encapsulamento de alimentos, embalagens, fertilizantes, produtos farmacêuticos, materiais para interiores automotivos, dispositivos elétricos, produtos sanitários e suporte para imobilização de enzimas (SIROHI *et al.*, 2020; JEONG *et al.*, 2021; KAVITHA; RENGASAMY; INBAKANDAN, 2018; RAMOS *et al.*, 2015).

Binhayeeding *et al.* (2020) estudaram a imobilização da lipase em PHB pela combinação dos métodos de adsorção e reticulação, apresentando 92% de rendimento de imobilização, temperatura ótima em 40 °C, pH 9,0 e 80% de atividade em temperatura de 80-90 °C por duas h, mostrando melhor estabilidade em comparação a enzima livre.

Araújo *et al.*, (2022) imobilizaram a enzima frutossiltransferase em PHB, analisando a eficiência da imobilização sem glutaraldeído e com a adição de glutaraldeído, apresentando rendimentos de imobilização de 41% e 55%, retendo atividade após seis lotes de reações sequenciais em mais de 40% e concluindo que esses biocatalisadores são promissores para a produção de FOS.

3.4.3 Biocarvão

O biocarvão é um suporte obtido a partir da degradação térmica de materiais orgânicos pelo processo de pirólise, com características porosa, sólido e enriquecido com carbono, sendo considerado um material promissor por apresentar condições favoráveis à adsorção física (SUN *et al.*, 2020).

Quando o biocarvão é produzido com temperaturas de pirólise entre 400-700 °C, o produto final apresenta maior área superficial, volume dos poros e hidrofobicidade, além de que em altas temperaturas ocorre a diminuição do hidrogênio e oxigênio e aumento do carbono (GODLEWSKA *et al.*, 2017).

Diferentes de outros materiais orgânicos, o biocarvão possui maior proporção de carbono aromático, podendo apresentar duas formas, o carbono amorfo que se forma em baixas temperaturas de pirólise e o carbono turboestrático que se forma em temperaturas mais elevadas, logo, a natureza desses carbonos contribuem para maior estabilidade do biocarvão (LEHMANN *et al.*, 2011).

Para o uso do biocarvão como suporte para imobilização de enzimas são preferíveis os métodos de adsorção e ligação covalente, sendo que suas propriedades físicas tornam um material promissor para a imobilização (PANDEY; DAVEREY; ARUNACHALAM, 2020). Li *et al.* (2018) estudaram a imobilização da lacase em biocarvão de madeira de diferentes

espécies, apresentando alto rendimento de imobilização e atividade recuperada, além da melhor estabilidade térmica da enzima, concluindo que esse biocatalisador pode ser um adsorvente reutilizável, de baixo custo e ecologicamente correto, sendo promissor para a remoção de bifenil clorado de águas residuais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção do biocatalisador

4.1.1 Produção da invertase

A invertase foi produzida a partir da linhagem bacteriana *Bacillus tequilensis* (PP6) isolada dos frutos amazônicos da Pupunha, obtido por meio do projeto PROCAD-AM 1707/2018 (Processo nº 88881.200497/2018-01). Essa bactéria foi preservada em criotubos contendo 50% de glicerol 40% (m/v), e 50% do meio caldo nutriente, contendo 5 g/L de peptona de carne e 3 g/L de extrato de carne e armazenada a -80 °C até o momento da reativação. Para o repique em placas, foi utilizado o meio caldo nutriente com 20 g/L de ágar, 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de carne. O meio preparado e as placas foram esterilizados em autoclave a 121 °C, por 15 min, sendo feitas em seguida as estrias utilizando alças de inoculação descartáveis estéreis. As placas inoculadas foram incubadas em uma incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) por 24 h a 30 °C. Após o crescimento do microrganismo em placas, foi seguido com o pré-inóculo em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 20 mL do meio basal, utilizando 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de carne, sendo esterilizados a 121 °C por 15 min e inoculada a colônia do microrganismo com alças de inoculação descartáveis e estéreis. O pré-inóculo foi mantido em agitador tipo *shaker* a 150 rpm por 24 h a 30 °C. Para o cultivo submerso, foi utilizado 2 mL do pré-inóculo em 18 mL de meio mineral esterilizado, contendo 1,5 g/L de fosfato monopotássio, 3,5 g/L de fosfato dissódio, 2 g/L de sulfato de amônio, 1 g/L de extrato de levedura, 0,2 g/L de sulfato de magnésio e 20 g/L de sacarose em cada Erlenmeyer (REDDY *et al.*, 2010). Esse cultivo foi mantido em agitador tipo *shaker* em 150 rpm, por 48 h a 30 °C. Após esse tempo, as amostras foram colocadas em tubos falcons de 15 mL e centrifugadas em 3000 rpm, por 30 min a 10 °C, obtendo assim o extrato bruto enzimático para seguir com a imobilização (BASTOS, 2022).

4.1.2 Materiais de suporte

Os materiais de suporte sílica-gel e PHB foram fornecidos gratuitamente pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/SP), mediante parceria de pesquisa existente entre pesquisadores da UFT e estas instituições. O biocarvão foi produzido a partir do eucalipto, na UFT *campus* Gurupi, onde as maravalhas foram secas em temperatura ambiente, sendo em seguida peneiradas em peneiras de 40 mesh e levadas para a pirólise, com temperatura inicial de 150 °C e final de 500 °C, para taxa de aquecimento em 5 °C/min.

4.1.2.1 Pré-tratamento dos suportes para o método de adsorção

No PHB colocou-se 10 g do suporte em 50 mL de etanol anidro 99% (v/v), em frascos Erlenmeyers (125 mL), sendo levado ao *shaker* por 2 h a 25 °C em 50 rpm. Após esse período, o PHB foi filtrado e lavado três vezes com água destilada, obtendo assim o PHB puro (ARAUJO *et al.*, 2022). Esse suporte foi seco em estufa na temperatura de 80 °C por 24 h. O pré-tratamento da sílica gel e do biocarvão para imobilização por adsorção foi a secagem em estufa por 80 °C em 24 h.

4.1.2.2 Funcionalização dos suportes

Para a funcionalização desses suportes, adicionou-se 18 mL de glutaraldeído 25% (v/v) em 2 g de cada suporte utilizando frascos Erlenmeyers (125 mL). Os suportes foram colocados no *shaker* por 18 h, a 50 rpm em 25 °C. Após esse tempo, os suportes foram filtrados a vácuo e secados em dessecador por 24 h, sendo utilizados para ensaios de imobilização da enzima com o suporte puro e também funcionalizado com glutaraldeído (PRADO, 2021; ARAUJO *et al.*, 2022).

4.1.3 Imobilização da invertase

A imobilização foi realizada pelo método de adsorção física e ligação covalente, adicionando em frascos Erlenmeyers (125 mL) 1 g de suporte e 20 mL do extrato enzimático bruto, sendo essa quantidade suficiente para cobrir os suportes e retirar as alíquotas, conduzido em triplicata. Essas amostras foram colocadas em banho Dubnoff por 8 h, a 175 rpm em 30 °C, onde foi retirado uma alíquota de 1 mL do extrato enzimático a cada h até o final das 8 h. Após o término da imobilização, o suporte que estava no Erlenmeyer foi filtrado em filtro a vácuo, obtendo assim o derivado imobilizado, denominando os biocatalisadores em sílica-gel, biocarvão e PHB funcionalizados com glutaraldeído de GLU-SI, GLU-BIO, GLU-PHB, respectivamente. As amostras foram armazenadas sob refrigeração para posteriores análises de atividade enzimática e ensaios de estabilidades.

4.2 Determinação dos parâmetros de imobilização

Após a determinação da atividade enzimática em cada tempo e do derivado imobilizado foi calculado o rendimento de imobilização (RI) pela Equação 1 e atividade recuperada (AR) pela Equação 2, definindo o melhor tempo para imobilização da invertase (TARVENINI *et al.*, 2021; PRADO, 2021).

$$RI (\%) = \frac{A_{ti} - A_{tf}}{A_{ti}} \times 100 \quad (1)$$

$$AR (\%) = \frac{A_{td}}{A_{ti} - A_{tf}} \times 100 \quad (2)$$

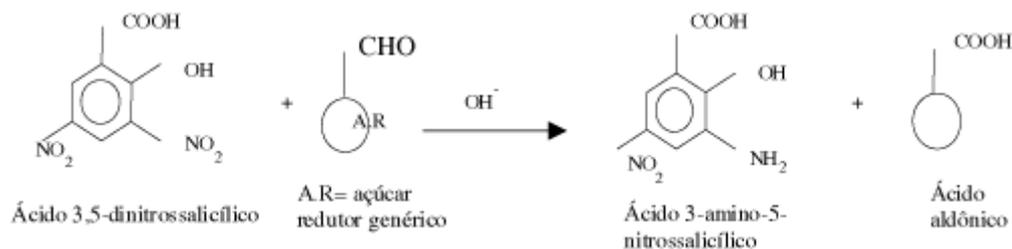
Onde, A_{td} é a atividade enzimática (U) da enzima imobilizada no suporte, A_{ti} representa a atividade enzimática do extrato enzimático antes da imobilização e A_{tf} a atividade enzimática após a imobilização.

4.3 Método para determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática (U/mL) foi realizada pelo método Miller (1959), onde o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino, a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, como mostra a Figura 03. Durante essa reação o grupo aldeído é oxidado a ácido carboxílico, resultando em uma mudança de coloração da

amostra de amarelo para vermelho marrom. Essa análise foi desenvolvida em duplicata, sendo preparado inicialmente o meio reacional com tampão McIlvaine pH 5.0 e 2% de sacarose. Foi colocado 800 µL de meio reacional em banho-maria a 50 °C por 5 min, após esse tempo foi adicionado 200 µL de amostra (ou 0,2 g do derivado imobilizado) nesse meio reacional. Depois da homogeneização foram retirados 200 µL do meio reacional com a amostra e adicionado em 200 µL de DNS, sendo considerado o tempo zero. Após 5 min, outra alíquota de 200 µL da mesma amostra com meio reacional foi adicionada a solução de DNS. Essas amostras foram levadas para o banho-maria a 100 °C por 5 min e logo em seguida colocado no banho de gelo, adicionando 2 mL de água destilada. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm, com os valores, foi calculada a atividade enzimática (U/mL) e a média das triplicatas, sendo que uma unidade de enzima (U) é a quantidade de enzima necessária para a produção de um µmol por minuto de açúcar redutor a 50 °C e pH 5,0, por grama (g) de enzima imobilizada ou mililitro (mL) de enzima solúvel (CADENA *et al.*, 2010).

Figura 03 - Redução do ácido dinitrossalicílico pelo açúcar redutor, formando o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico



Fonte: Silva *et al.* (2003).

4.4 Caracterização física e química dos biocatalisadores

As propriedades dos três suportes (GLU-SI, GLU-BIO, GLU-PHB) depois da imobilização das enzimas foram determinadas experimentalmente, observando a morfologia a partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o microscópio eletrônico (Zeiss EVO MA-10, Alemanha), com tensão de aceleração de 15 kV e distâncias de 15 mm. Essas análises foram realizadas pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT-SP. As amostras também foram preparadas em Vap Prep 61, Sample Degas System e secas a 60 °C por 2 h, assim suas áreas superficiais específicas foram determinadas por fisissorção de

nitrogênio a 77 K em analisador Micromeritics Gemini VII, usando o método BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938), já para obtenção do volume e tamanho dos poros foi utilizado o método BJH (BARRET; JOYNER; HALLEND, 1951). A caracterização das ligações químicas e estrutura do biocatalizador imobilizado foram determinadas por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) usando Espectrômetro (Agilent Cary 630, Estados Unidos) operado para uma faixa de 650 a 4000 cm^{-1} , realizando essas análises na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

4.5 Caracterização bioquímica da invertase imobilizada

4.5.1 Estabilidade ao armazenamento

Os ensaios da estabilidade de armazenamento prosseguiram durante 9 dias, sendo realizados com as enzimas imobilizadas em GLU-SI, GLU-BIO, GLU-PHB e enzima livre como controle. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C, determinando diariamente a atividade enzimática por 5 dias e esporadicamente completando os 9 dias.

4.5.2 Ensaio de estabilidade operacional das enzimas imobilizadas

A estabilidade operacional das enzimas imobilizadas nos três suportes GLU-SI, GLU-BIO, GLU-PHB foi avaliada durante seis ciclos de reação sequenciais em batelada, onde 1 g do suporte contendo a enzima imobilizada (biocatalisador) foi adicionado em 4,0 mL de meio reacional composto por tampão MCIlvaine pH 5,0 e sacarose 2%. Após cada ciclo de 1 h da reação em batelada o biocatalisador foi separado do meio reacional mediante filtração e utilizado em um novo ciclo nas mesmas condições, sendo realizado em triplicata. 200 microlitros desse meio filtrado foram adicionados a 200 microlitros de DNS e colocado no banho-maria a 100 °C por 5 min, após esse período a amostra passou pelo banho de gelo, adicionando 2,0 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e com esse resultado foi determinada a concentração de açúcares redutores (FARIA *et al.*, 2021).

4.5.3 Ensaio de estabilidade frente ao pH

Para essa análise e as outras seguintes, foram selecionados os biocatalisadores com maiores resultados e disponibilidade, sendo então seguido com as imobilizações GLU-SI e GLU-PHB. Na estabilidade frente ao pH, a enzima imobilizada em sílica-gel e PHB funcionalizados foram incubados em tampão MCIlvaine na ausência de substrato com pH ajustado para 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5 a 4 °C por 24 h, após esse período foi determinada a atividade enzimática (tópico 4.3) do biocatalizador, sendo que todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.4 Ensaios de estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos

As enzimas imobilizadas em sílica-gel e PHB funcionalizados foram incubados em tampão MCIlvaine pH 5,0 e ausência de substrato em diferentes temperaturas, sendo elas 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C. As amostras foram retiradas com 60 min, 120 min, 240 min, 360 min e 1440 min e resfriadas a banho de gelo. Em seguida foi determinada a atividade enzimática (tópico 4.3), realizando o experimento em triplicata (ARAÚJO, 2021). Para determinação dos parâmetros termodinâmicos foi encontrada a constante de desativação térmica (K_d , em min^{-1}) a partir do ajuste ao modelo linear no Excel, com os dados de atividade enzimática versus tempo de incubação (Equação 3).

$$\ln A = \ln A_0 - K_d t \quad (3)$$

Sendo: A a atividade enzimática em determinada temperatura, A_0 a atividade enzimática inicial, K_d a constante de desnaturação térmica de primeira ordem (min^{-1}) e t o tempo de incubação (min).

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$ em min) determinado pela Equação 4 é inversamente proporcional ao K_d , sendo o tempo necessário para redução da atividade da enzima a metade do seu valor inicial (FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (4)$$

Para o cálculo da energia de ativação para a desnaturação térmica (E_d) foi utilizada a linearização da equação de Arrhenius (Equação 5). Essa energia de ativação se dá de modo

irreversível, sendo que quando ocorre a desnaturação térmica da enzima, há uma transição de um estado de menor energia para um estado de maior energia (CAMPELLO, 2010).

$$\ln(K_d) = -\frac{E_d}{R} \frac{1}{T} + \ln(A) \quad (5)$$

Onde, R é a constante universal dos gases ideais (8,314 J/ mol.K) e T são os valores experimentais da temperatura (K).

A entalpia de ativação da desnaturação (ΔH_d) indica a energia necessária para desnaturar a enzima, determinada a partir da Equação 6 (FERREIRA, 2021; SAQIB et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

$$\Delta H_d = E_d - RT \quad (6)$$

A partir da equação 7 é possível determinar a energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação (ΔG_d), onde quantifica a estabilidade térmica abrangendo a entalpia e entropia para determinar a espontaneidade da perda de estabilidade da enzima (KUMAR *et al.*, 2013).

$$\Delta G_d = -RT \cdot \ln\left(\frac{K_d h}{K_b T}\right) \quad (7)$$

Sendo, h a constante de Planck ($11,04 \times 10^{-36}$ J/min) e K_b a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}$ J/K).

A entropia de ativação da desnaturação térmica da enzima (ΔS_d) está relacionada com a aleatoriedade do processo de desnaturação enzimática, determinada pela equação 8 (KUMAR *et al.*, 2013).

$$\Delta S_d = \frac{\Delta H_d - \Delta G_d}{T} \quad (8)$$

4.5.5 Influência da concentração de substrato e determinação da cinética de reação

Para análise da influência da concentração de substrato 1,0 g do biocatalisador imobilizado em sílica-gel e PHB funcionalizados, foram colocados em 4,0 mL de meio reacional contendo tampão MCIlvaine pH 5,0 e diferentes concentrações de sacarose, sendo

elas 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 50 g/L e 100 g/L, a 50 °C. Foram retiradas alíquotas desse meio reacional com 5 min, 10 min, 60 min, 240 min e 480 min, para análise da concentração de açúcares redutores, determinando a cinética de reação. Foram definidos os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m a partir de análises de regressão não linear pelos ajustes do modelo de Michaelis-Menten através da Equação 9 (PRADO, 2021).

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S]+K_m} \quad (9)$$

Onde, V é a velocidade inicial da reação, S é a concentração de substrato, K_m (constante de Michaelis-Menten) como sendo uma medida de afinidade entre a enzima e o substrato e representa a concentração de substrato quando a velocidade de reação é metade da velocidade máxima e $V_{máx}$ é a velocidade máxima de reação.

4.6 Análise estatística dos dados

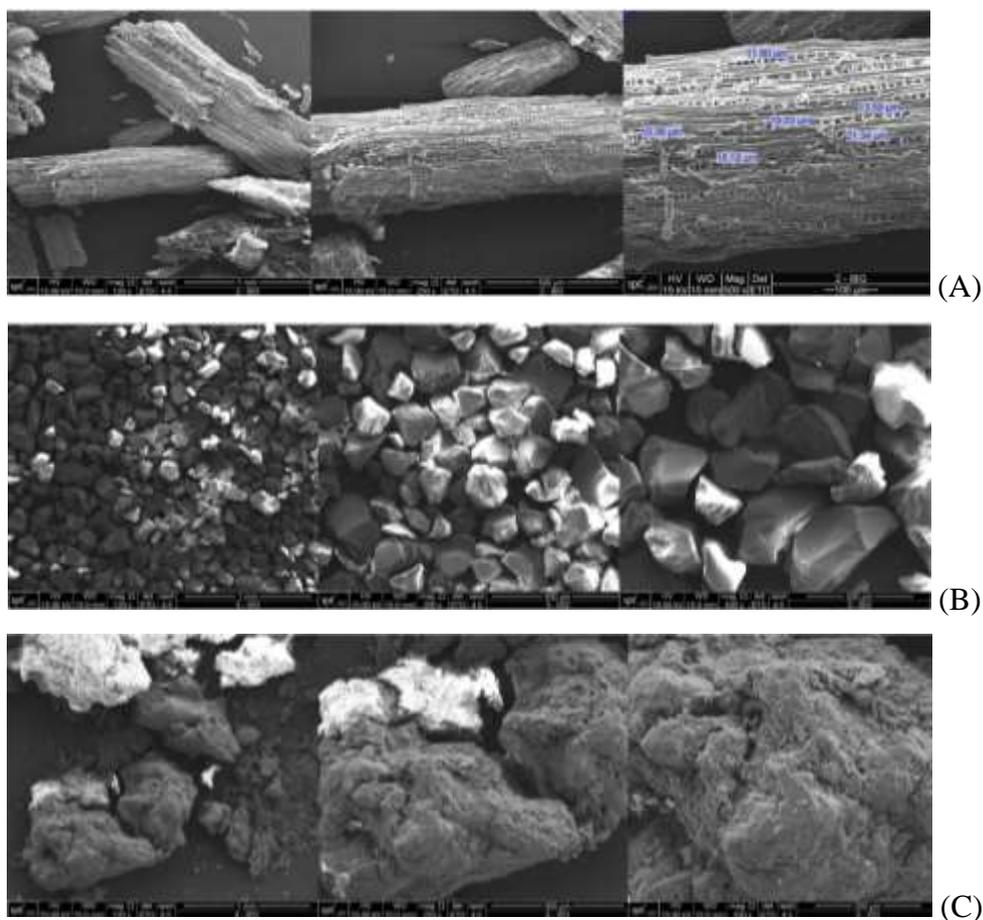
Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de média e submetidos à análise de variância (ANOVA) ao teste Tukey (5% de significância), utilizando o software Sisvar. Os gráficos foram realizados utilizando o programa Origin Pro 2017.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química dos biocatalisadores

As características físicas dos suportes foram obtidas através das análises de MEV, BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938) e BJH (BARRET; JOYNER; HALLEND, 1951), para as amostras GLU-BIO (A), GLU-SI (B) e GLU-PHB (C), obtendo valores da área superficial, tamanho dos poros e volume dos poros para essas amostras, como apresentado na Figura 04 e Tabela 02.

Figura 04 – Micrografias eletrônicas das amostras GLU-BIO (A), GLU-SI (B) e GLU-PHB (C)



Fonte: Autora (2024).

Tabela 02 - Caracterização das partículas obtidas pelos métodos BET e BJH

Suporte	Área superficial específica (m ² /g)	Tamanho dos poros (Å)	Volume dos poros (cm ³ /g)
GLU-BIO	0,37	-	1,61 × 10 ⁻⁴
GLU-SI	211,09	21,33	7,92 × 10 ⁻²
GLU-PHB	4,36	20,36	1,33 × 10 ⁻³

Fonte: Autora (2024).

Nas imagens de morfologia da amostra GLU-BIO (Figura 4a) é possível observar uma superfície porosa e irregular. Já a área superficial dessa amostra (0,37 m²/g) com menor valor, comparado as demais, indica possível dificuldade para imobilização, pois o método de ligação covalente utilizado para esse processo exige maior área superficial externa e material não poroso, já o tamanho dos poros não foi possível quantificar, pois são partículas muito pequenas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Durante o processo de

conversão térmica é liberado matéria em forma de pequenas moléculas voláteis como H₂O, CO, CO₂, CH₄, o que explica a porosidade do biocarvão (TASKIN *et al.*, 2019).

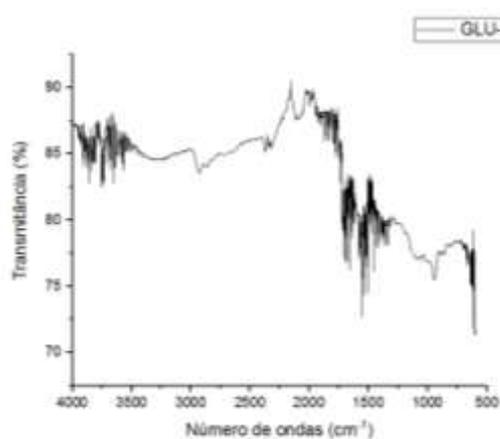
Para a amostra GLU-SI (Figura 4b), as imagens mostram partículas mais uniformes, com superfície rugosa. De acordo com Blanco *et al.* (2008), o material com superfície rugosa é favorável a adsorção, pois aumenta a área superficial para maior interação enzima – suporte. O que confirma com o resultado da análise pelo método de BET da área superficial específica, onde foi encontrado valor de 211,09 m²/g. O tamanho dos poros de 21,33 Å encontrado pelo método de BJH caracteriza a sílica- gel como material mesoporoso, onde esse tipo de material apresenta tamanho dos poros entre 20 a 500 Å (BARDESTANI; PATIENCE; KALIAGUINE, 2019). Com a adição do glutaraldeído é esperado que o tamanho dos poros diminua, pois assim as moléculas da enzima mantêm a interação para a imobilização ocorrer na superfície externa do suporte (BOLINA; MENDES, 2023).

Já para a amostra imobilizada em GLU-PHB (Figura 4c), apresenta superfície mais irregular e rugosa, o que pode favorecer o processo de imobilização. A área superficial de 4,36 m²/g, o tamanho de 20,36 Å e volume dos poros (1,33 × 10⁻³ cm³/g), determinam o desempenho do biocatalisador, durante aplicações industriais, sendo esse também considerado como suporte mesoporoso (BARDESTANI; PATIENCE; KALIAGUINE, 2019).

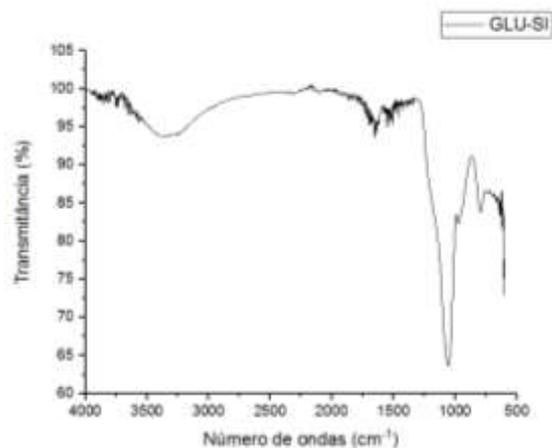
Prado (2021) encontrou para a sílica-gel pura antes da imobilização área superficial de 319,69 m²/g, tamanho dos poros de 56,92 Å e volume dos poros 7,50 × 10⁻² cm³/g, pelos mesmos métodos de análises, mostrando assim que com a imobilização esses resultados são diminuídos. Isso se deve ao fato que a funcionalização e imobilização modificam a área superficial e o tamanho dos poros do suporte, com a adição de grupos funcionais e a difusão do substrato ao sitio ativo da enzima (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015). Assim como Araújo *et al.* (2022) encontraram para o PHB puro área específica de 7,96 m²/g, tamanho dos poros de 39,61 Å e volume dos poros 2,14 × 10⁻³ cm³/g, utilizando os mesmos métodos de análises citado no trabalho.

Com a análise de FT-IR, obteve-se os espectros de infravermelho para as amostras GLU-BIO, GLU-SI e GLU-PHB, onde os resultados estão dispostos na Figura 05.

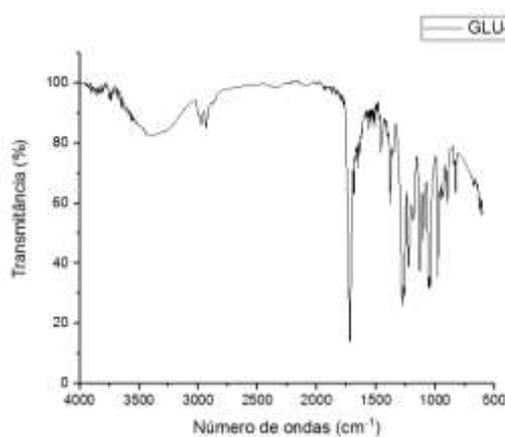
Figura 05- Espectro de infravermelho por transformada de Fourier das amostras GLU-BIO (a), GLU-SI (b) e GLU-PHB (c)



(a)



(b)



(c)

Fonte: Autora (2024).

Esses resultados representam os grupos funcionais envolvidos ao processo de imobilização. Nas três amostras é possível observar bandas comuns próximas a 3300 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} e 1068 cm^{-1} .

A banda 3300 cm^{-1} indica a presença de estiramento dos grupos N-H (aminas) que podem ser encontrados em enzimas, podendo comprovar a presença da enzima imobilizada. O alargamento dessa banda até aproximadamente 3700 cm^{-1} , pode indicar diferentes grupos OH, causada por água absorvida, indicando água na superfície das partículas (PATEL *et al.*, 2016).

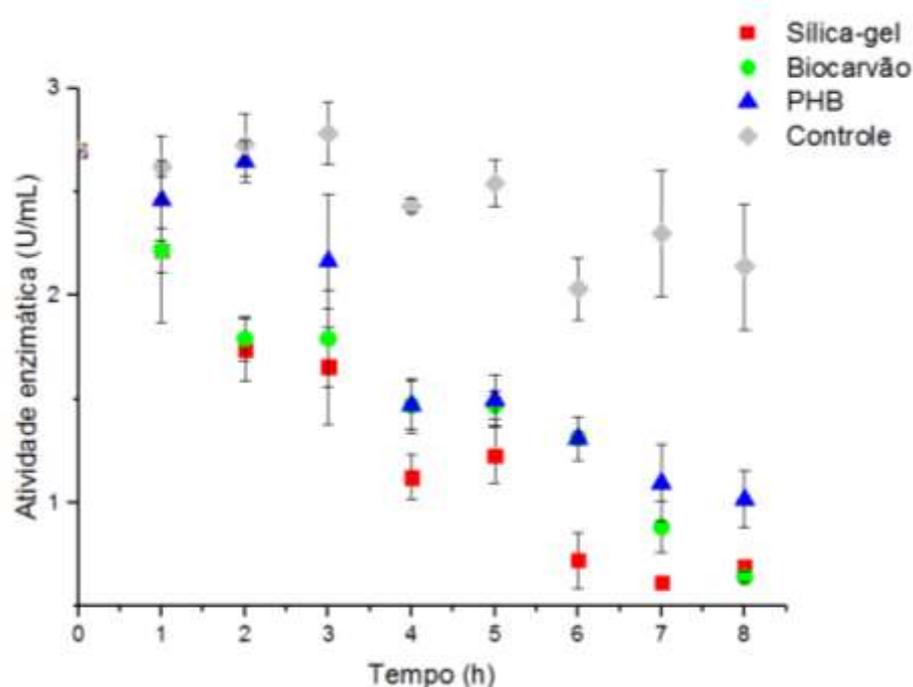
A banda em 1630 cm^{-1} corresponde à banda de amida I, produzida por vibrações C=O. Na amostra GLU-BIO é encontrada banda de amida II entre 1600 e 1500 cm^{-1} devido à deformação N-H e estiramento da vibração C-N. Bandas de amidas estão presentes em proteínas, o que também indica a enzima imobilizada ao suporte. O pico 1068 cm^{-1} corresponde a interação do grupo -CO da enzima com os materiais de suporte (XUE *et al.*, 2015; ISAK *et al.*, 2016). No pico próximo a 1620 cm^{-1} do GLU-BIO são indicadas vibrações aromáticas de estiramento C-C, podendo está relacionada a compostos aromáticos formados

durante a pirólise (TASKIN *et al.*, 2019). Nas amostras GLU-PHB uma série de picos entre 1000 e 1300 cm^{-1} indica estiramento das ligações CO em grupo éster (BINHAYEEDING *et al.*, 2020).

5.2 Imobilização por adsorção física e ligação covalente

A invertase imobilizada por adsorção física em sílica gel, biocarvão e PHB em função do tempo é apresentada na Figura 06. Durante o processo observou-se que a atividade enzimática do extrato enzimático bruto na presença dos suportes diminuiu no decorrer do tempo, em comparação com a atividade do extrato enzimático na amostra controle (sem suporte) indicando possível migração da enzima do extrato enzimático para a superfície do suporte.

Figura 06 – Perfil cinético de imobilização em sílica gel, PHB, biocarvão.



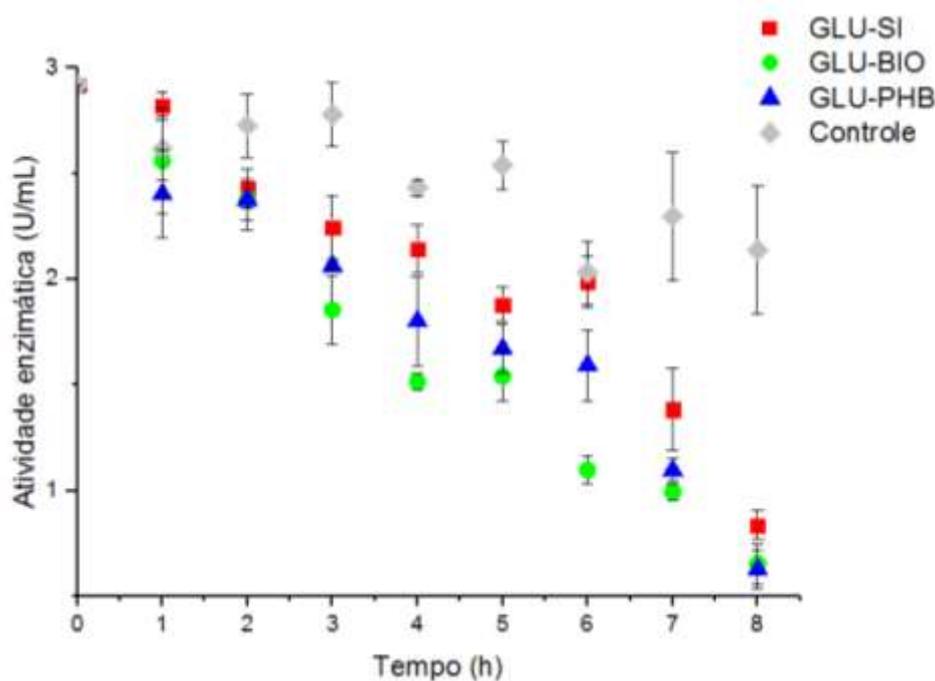
Fonte: Autora (2024).

A atividade enzimática do extrato enzimático bruto atingiu menores valores após 6 h de imobilização, na presença da sílica-gel e em 8 h na presença do biocarvão e PHB (análise estatística Apêndice A, Tabela 06). A Figura 06 mostra que na imobilização utilizando o PHB houve maior queda da atividade enzimática do extrato enzimático, indicando maior imobilização entre os suportes pelo método de adsorção. Já o extrato enzimático controle, sem

a presença do suporte, manteve a atividade enzimática com valores aproximados da amostra inicial, com uma pequena redução nos valores pela instabilidade da enzima livre. Logo, é possível observar que a enzima foi imobilizada em todos os suportes após 8 h de imobilização pelo método de adsorção.

Durante a imobilização por adsorção a enzima pode se desprender do suporte, por ser um método reversível. Então os suportes foram funcionalizados com glutaraldeído, para a formação de ligação covalente (Figura 07) resultando em ligações mais fortes e método irreversível. Nesse método, todos os suportes apresentaram menores valores para a atividade enzimática do extrato enzimático após 8 h, comparando ao método de adsorção, indicando maior imobilização enzimática (análise estatística Apêndice A, Tabela 07).

Figura 07 – Perfil cinético de imobilização em sílica gel, biocarvão, PHB funcionalizados com glutaraldeído



Fonte: Autora (2024).

A perda da atividade enzimática durante o processo de imobilização nem sempre pode indicar que a enzima está sendo imobilizada, então a amostra controle indica o que pode acontecer com a enzima livre quando submetida às mesmas condições (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

Mishra *et al.* (2020) destacaram que a utilização da sílica como suporte inorgânico apresenta alta resistência química e a ataques microbianos, estabilidade estrutural e

biocompatibilidade, contribuindo para o aprimoramento das propriedades físico-químicas da enzima imobilizada. A sílica também contribui para a imobilização por conter alta área superficial, oferecendo propriedades de sorção de maior interesse, visto que essas propriedades reduzem as limitações de difusão, além de possuir grupos hidroxilas, que permitem a fixação enzimática (ZDARTA *et al.*, 2018).

Já o biocarbão pode apresentar variações nas propriedades físicas e químicas de acordo com as condições de pirólise. Para a produção desse suporte utilizou-se temperatura de 150-500 °C, mas a exposição em temperaturas elevadas, acima de 400 °C diminui a capacidade de troca iônica, apresentando menos grupos funcionais de hidrogênio e oxigênio, o que pode ter contribuído para menor imobilização nesse suporte (RAJAPAKSHA *et al.*, 2022).

O PHB é um material que apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade, atóxico e resistência mecânica, o que torna um produto com características para utilização como suporte em imobilização. Mas durante o processo, o tamanho das partículas pode influenciar na imobilização, visto que tem a possibilidade de alteração da área superficial específica disponível, partículas menores possuem maior área superficial específica, sendo essa área superficial maior um fator importante para a imobilização (ARAÚJO *et al.*, 2022).

Durante a produção da invertase é utilizado o pH 5.5 no cultivo e temperatura de crescimento do microrganismo em 30 °C, sendo então definidos esses valores como melhores parâmetros durante a imobilização, com agitação a 175 rpm. De acordo com a literatura, a temperatura e pH se mantêm a mesma do cultivo, observando nos trabalhos uma variação entre pH 5,0 a 6,0 e temperatura de 25 a 35 °C (FARIA *et al.*, 2021; CADENA *et al.*, 2010; ALAGÖZ *et al.*, 2022).

A utilização da mesma temperatura e pH utilizados durante o cultivo, para a imobilização também são indicados de modo que a enzima não fique exposta a condições diferentes das já usuais para a sua produção, pois com essas condições a enzima pode se manter mais estável durante a imobilização e não ocorrer perdas da atividade enzimática e mudanças na sua conformação antes da conclusão do processo (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

Uzun *et al.* (2013) definiu pH 5,0 o melhor para imobilização da invertase pelo método de adsorção utilizando como suporte nanopartículas de óxido de ferro enxertadas com polivinilimidazol e temperatura ótima em 55° C, sendo que o pH ideal da enzima imobilizada se manteve o mesmo da enzima livre, mas já a temperatura ótima aumentou 10° C comparada

a enzima livre. Já Azodi, Falamaki e Mohsenifar (2011) imobilizaram a invertase em sílica porosa por ligação covalente, apresentando pH e temperatura ótimos em 4,5 e 57 °C respectivamente.

Waifalkar *et al.* (2016) utilizaram o método de adsorção para imobilizar a invertase utilizando como suporte nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana, definindo o pH ótimo em 5,0. Andjelković *et al.* (2015) utilizaram o mesmo método e encontraram pH ótimo de valor semelhante para imobilização da invertase, mas utilizaram como suporte nanoargilas de beidelita, com esses trabalhos observa-se que é possível a imobilização da invertase em diferentes suportes, métodos e condições, visto que as enzimas também são produzidas de diferentes meios e não apresentam a mesma atividade enzimática.

5.3 Parâmetros de imobilização

Com os resultados da atividade enzimática pela média das amostras em triplicata apresentada, foi calculado o rendimento de imobilização e atividade recuperada. Os valores encontrados são representados na Tabela 03, com dados satisfatórios para imobilização em diferentes suportes, variando também de acordo com o método aplicado, visto que essa invertase bacteriana não se encontra purificada.

Tabela 03 – Parâmetros de imobilização com o rendimento e atividade recuperada

	Rendimento de imobilização (%)	Atividade recuperada (%)
Adsorção		
Sílica-gel	74,26 ± 0,99	31,54 ± 2,47
Biocarvão	76,24 ± 0,99	8,05 ± 0,71
PHB	63,70 ± 5,08	48,36 ± 3,55
Ligação covalente		
GLU-SI	72,24 ± 2,36	34,62 ± 3,61
GLU-BIO	77,32 ± 3,14	27,37 ± 1,08
GLU-PHB	76,72 ± 3,10	60,67 ± 4,07

Fonte: Autora (2024).

O rendimento de imobilização indica o percentual de enzimas que foram imobilizadas em relação a atividade enzimática inicial e a atividade recuperada indica o percentual de

atividade enzimática que a enzima apresenta após sua imobilização no suporte (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

É possível observar que o biocarvão apresentou resultados de rendimento de imobilização e atividade recuperada superiores no método de ligação covalente quando submetido as mesmas condições de imobilização do método de adsorção. Ao funcionalizar o suporte com glutaraldeído favorece a imobilização com a adição de grupos reativos e braço espaçador da enzima com a superfície, ocorrendo reação com grupos aminos (PRADO, 2021). A sílica gel não apresentou grande variação pelos diferentes métodos, sendo mais viável a imobilização por adsorção. Já o PHB se destacou com maiores valores para a atividade recuperada, mostrando ser o melhor suporte para imobilização da invertase bacteriana pelo método de ligação covalente.

O método de adsorção é considerado reversível, de baixo custo e com ligações fracas, sendo mais indicado para manter a atividade catalítica da enzima (NUNES *et al.*, 2021). As interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações de Van Der Waals são as dominantes para a adsorção, visto que a invertase externa é altamente hidrofílica, logo a efetividade da imobilização por adsorção pode ser influenciada pelas alterações hidrofóbicas ou hidrofílicas da superfície, carga e tamanho do material de suporte (ANDJELKOVIĆ *et al.*, 2015).

A ligação covalente proporciona ligações mais intensas entre o suporte e a enzima, sendo irreversível, como mantêm o contato com vários pontos da superfície, pode ocorrer um aumento da rigidez na estrutura da biomolécula, resultando na diminuição da atividade enzimática, além disso, a presença do glutaraldeído pode alterar a conformação do biocatalizador (PRADO, 2021).

Rasbold *et al.* (2021) encontrou 98% de rendimento de imobilização para a invertase produzida por um fungo e imobilizada em alginato de cálcio, essa enzima estava na forma purificada, o que explica maior valor no rendimento. Mendes *et al.* (2012) imobilizaram lipase em PHB com diferentes tamanhos de poros, pelo método de adsorção, concluindo que a imobilização em grandes esferas reduziu a atividade recuperada, atividade hidrolítica e atividade específica, pois com esferas maiores houve limitações de transferência de massa do substrato para o sitio ativo da enzima, sendo que utilizaram enzimas, suportes e métodos diferentes dos expostos nesse trabalho, logo, os resultados não são esperados iguais.

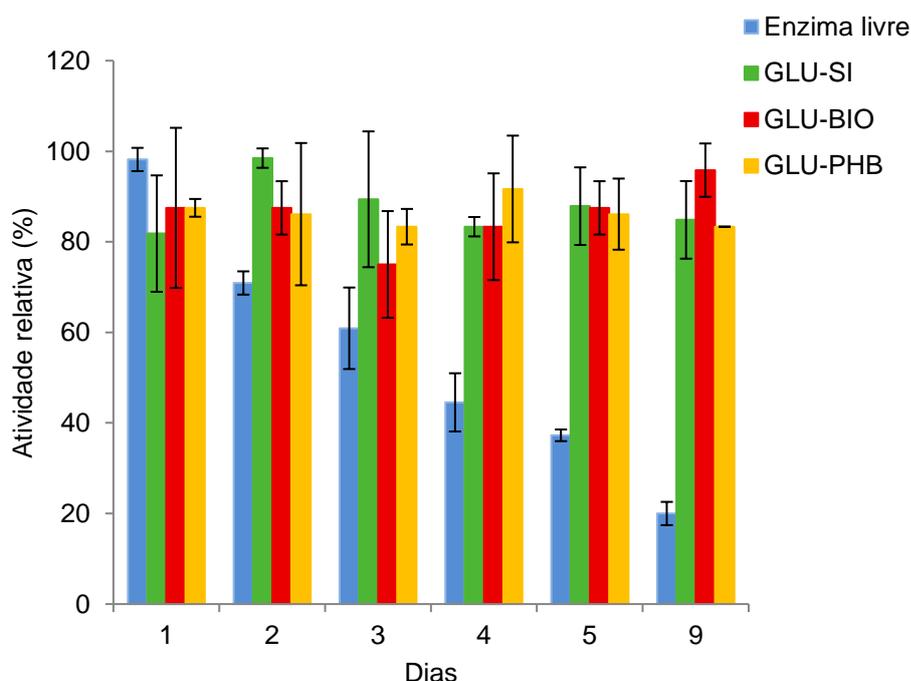
Araújo (2022) utilizou o PHB para imobilizar frutossiltransferase, pelo método de adsorção e ligação covalente, onde encontrou rendimento de imobilização de

aproximadamente 41% para o PHB puro e 55% para o PHB com glutaraldeído. Já a atividade recuperada foi de 17% o PHB puro e 11% o PHB com glutaraldeído, explicando que o rendimento de imobilização pode ser afetado por impurezas no extrato bruto, incluindo aminoácidos, polipeptídeos de baixo peso e carboidratos, sendo possíveis de interagir com a enzima e suporte.

5.4 Estabilidade de armazenamento

Os resultados da estabilidade de armazenamento da invertase imobilizada em sílica-gel, PHB, biocarvão e da enzima livre são apresentados na Figura 08.

Figura 08 – Estabilidade de armazenamento da enzima livre e imobilizada



Fonte: Autora (2024).

A atividade enzimática da invertase livre mostrou uma queda no segundo dia, enquanto as amostras imobilizadas mantiveram suas atividades próximas as iniciais (análise estatística Apêndice A, Tabela 08). Após 9 dias armazenadas em refrigerador a 4 °C, a enzima livre perdeu aproximadamente 80% da sua atividade enzimática inicial, enquanto as amostras imobilizadas continuaram com valores semelhantes. A enzima imobilizada nos três suportes apresentou estabilidade durante os 9 dias frente ao armazenamento, a adição do glutaraldeído contribuiu para maior estabilidade a longo prazo, pois esse proporciona ligações fortes e

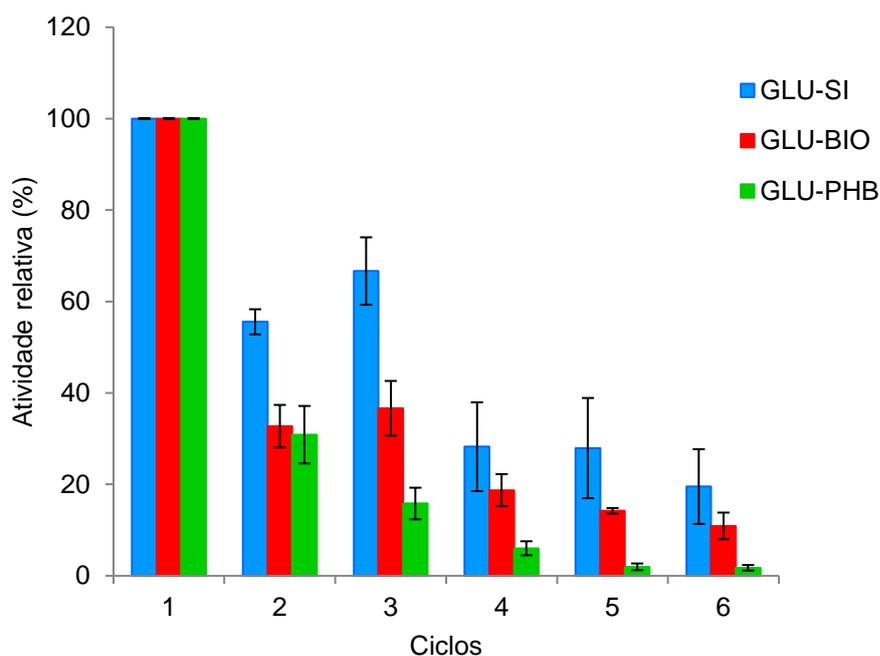
duradoura, evitando a perda por diminuição nas ligações e reversibilidade do processo (PAGÁN, 2015).

Mischa *et al.* (2020) avaliaram a estabilidade de armazenamento da invertase imobilizada em um suporte bio-híbrido composto por nanopartículas de sílica e semente de *Ocimum basilicum*, onde as enzimas imobilizadas apresentaram cerca de 45% e 78% da atividade após 60 dias, enquanto a enzima livre perdeu toda a atividade em 25 dias. Prado (2021) observou que após 4 dias de armazenamento, a enzima frutossiltransferase imobilizada em sílica gel pura apresentou atividade relativa de 1,5%, enquanto a imobilização funcionalizada manteve 6% da atividade. Esses resultados mostram que esses materiais orgânicos e inorgânico podem ser utilizados como suporte para imobilização de diferentes enzimas.

5.5 Estabilidade operacional das enzimas imobilizadas

Os resultados da estabilidade operacional estão dispostos na Figura 09, com a finalidade de avaliar a possibilidade do reuso da invertase GLU-BIO, GLU-SI e GLU-PHB a partir das concentrações do meio reacional, foram realizados seis ciclos operacionais para não ocorrer perda de suporte durante a análise.

Figura 09 – Estabilidade operacional da invertase em GLU-BIO, GLU-SI e GLU-PHB



Fonte: Autora (2024).

As amostras GLU-SI, mantiveram mais de 50% da sua concentração até o terceiro ciclo, sendo o de maior retenção, as amostras imobilizadas em biocarvão funcionalizado apresentaram até 30% ao terceiro ciclo, enquanto as amostras GLU-PHB mantiveram 30% da concentração até o segundo ciclo. Entretanto, todas as amostras apresentaram valores de concentração até o último ciclo e permaneceram constantes a partir do quarto ciclo. Essa diminuição gradual das concentrações pode ser explicada pela perda de material durante a filtração a vácuo e lavagem entre cada ciclo. Principalmente o biocarvão que é um material mais fino e de menor massa, não é transferido integralmente na troca de meio reacional, resultando em diferentes proporções.

Por se tratar de um suporte inorgânico, a sílica tende a apresentar maior resistência mecânica e fácil reutilização, além de que a adição do glutaraldeído nesse suporte contribui na formação de ligações mais fortes e enrijecimento da estrutura tridimensional (ASHKAN *et al.*, 2021; MENDES *et al.*, 2011). Em processos batelada a imobilização em sílica seria mais interessante, por suportar mais tempo, mas para processos contínuos, tem a possibilidade de utilizar a enzima imobilizada em PHB e biocarvão, visto que apresenta redução de custo e economia de tempo.

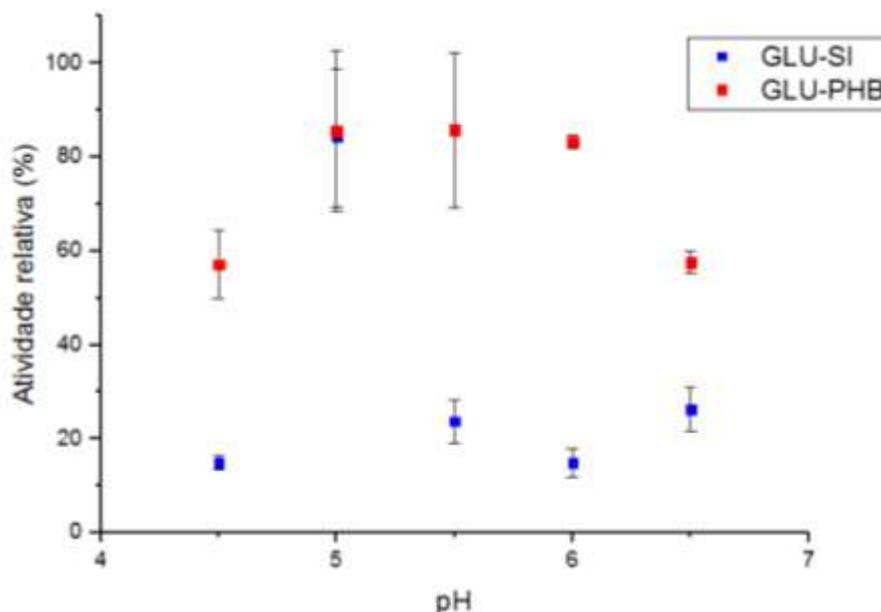
Na imobilização da lipase em PHB estudadas por Binhayeeding *et al.* (2020), mostraram que a enzima imobilizada reteve 50% da sua atividade inicial por 15 ciclos. Já Garcia *et al.* (2021) estudaram a reticulação da biomassa catalítica do *Aspergillus oryzae* IPT-301 com glutaraldeído para produção do FOS, onde analisaram a estabilidade operacional por 12 ciclos e encontraram como resultados 88,90% da atividade inicial para a enzima imobilizada após os 12 ciclos e 50,30% para a enzima livre. Enquanto Miranda *et al.* (2014) relataram estabilidade operacional de aproximadamente 70% da atividade inicial após cinco ciclos de reações, para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em partículas mesoporosas de PHB.

Li *et al.* (2018) avaliaram a estabilidade operacional da lacase imobilizada em biocarvão, relatando a perda de 66,20% da atividade inicial após os 7 ciclos. Utomo, Yuniawati, Wonorahardo (2019) imobilizaram a celulase de *Trichoderma viride* utilizando a sílica como suporte, avaliando a estabilidade operacional por três ciclos, sendo que o biocatalisador manteve atividade de 75,2% no segundo ciclo e 58,8% no terceiro ciclo.

5.6 Estabilidade frente ao pH

Os resultados da estabilidade de pH da invertase immobilizadas em PHB e sílica-gel funcionalizadas com glutaraldeído se encontram na Figura 10.

Figura 10 – Estabilidade de pH da imobilização em PHB



Fonte: Autora (2024).

Para as GLU-PHB, o biocatalizador se mostrou mais estável entre o pH 5,0 e 6,0, já pH 4,5 e 6,5, a enzima ainda reteve mais de 50% da sua atividade, verificando então estabilidade em todos os pHs testados. Para as amostras GLU-SI, apresentou maior estabilidade em pH 5,0, tendo uma queda de aproximadamente 85% da atividade em pH 4,5 e 6,0 e de aproximadamente 75% para pH 5,5 e 6,5.

A imobilização tende a proteger a estrutura da enzima aos efeitos do pH, sendo assim, maior faixa da estabilidade de pH favorece o armazenamento e aplicações industriais (VERMA; KUMAR; KUMAR, 2019). Assim como na estabilidade térmica, as amostras GLU-PHB, apresentam estabilidade semelhante a enzima livre, logo, esse suporte pode está oferecendo um ambiente favorável para a enzima (BASTOS, 2022; MISHRA *et al.*, 2020). O fato do pH da imobilização GLU-SI ser maior em 5,0 pode está ligada a limitação difusional do substrato, visto que como o microambiente e a estrutura terciária da enzima se altera na ligação covalente, logo a atividade diminui em determinados pHs (MALHOTRA; BASIR, 2020). Quando o suporte não possui força iônica e as moléculas da enzima ficam imobilizadas

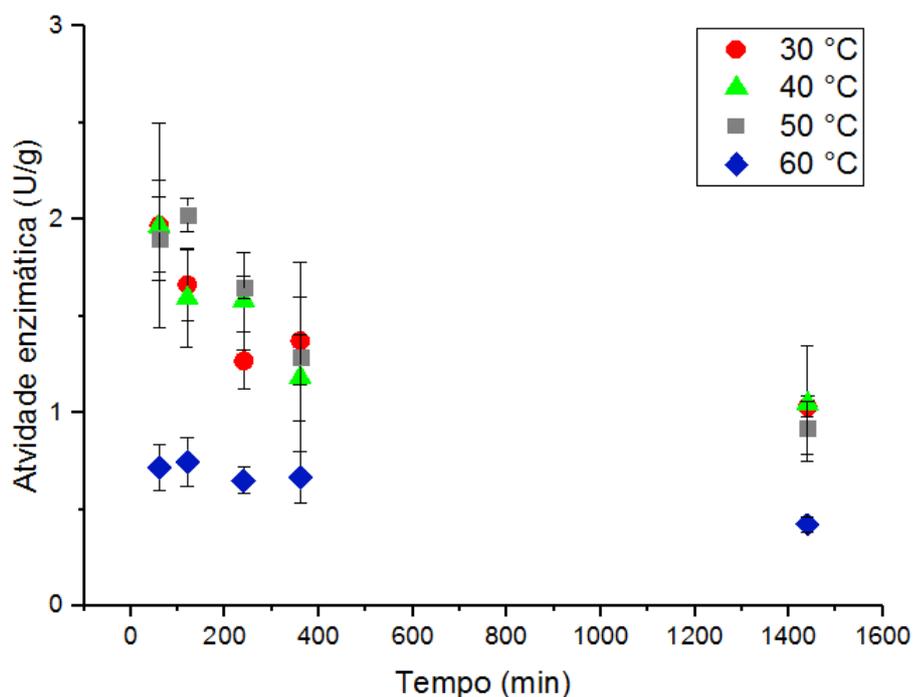
na superfície externa, o pH do meio de reação tende a não sofrer alteração (SANNINO *et al.*, 2020).

Araújo (2021) encontrou maior estabilidade da frutossiltransferase imobilizada em PHB funcionalizado e para a imobilização em PHB puro, apresentou atividade relativa entre 67-100%, para pH de 5,5 a 7,0. Rasbold *et al* (2021) verificaram aumento da estabilidade em faixa de pH alcalino e ácido para a imobilização da invertase em quitosana ativada com glutaraldeído comparada com a enzima livre, pois a formação da ligação covalente em diferentes pontos do suporte garante a estabilidade da estrutura tridimensional da biomolécula, assim como na imobilização com o PHB.

5.7 Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos

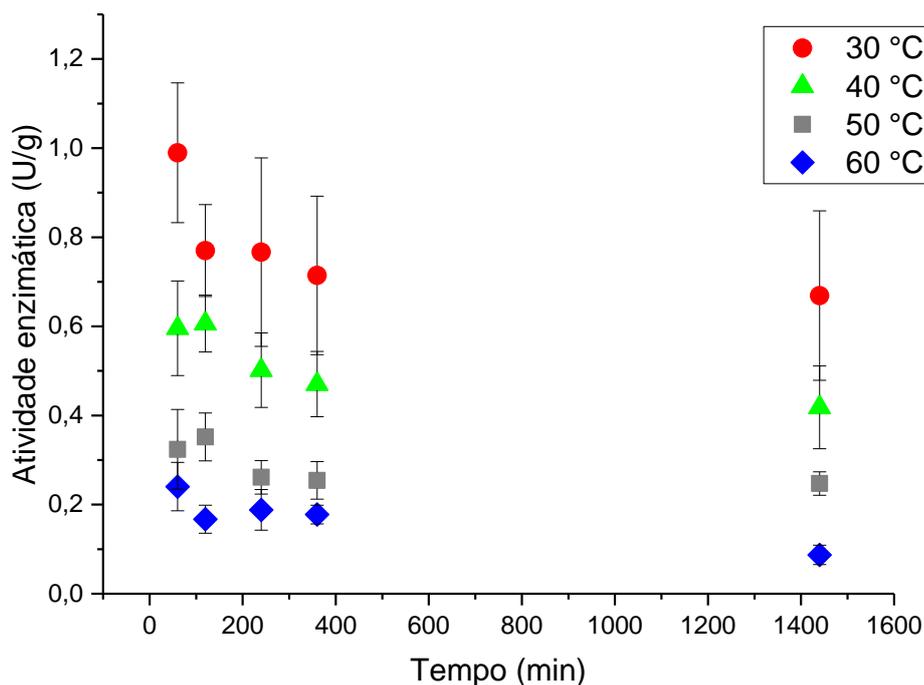
A estabilidade térmica das imobilizações em GLU-PHB e GLU-SI, foram determinadas em uma faixa de temperatura de 30 a 60 °C, variando de 60 a 1440 min, podendo ser observadas na Figura 11 e 12.

Figura 11 – Estabilidade térmica das enzimas imobilizadas em GLU-PHB



Fonte: Autora (2024).

Figura 12 – Estabilidade térmica das enzimas imobilizadas em GLU-SI



Fonte: Autora (2024).

Para a invertase GLU-PHB, o biocatalisador apresentou maiores atividades a 30 °C, 40 °C e 50 °C, dando maior destaque a temperatura de 50 °C, sendo que essa também é a temperatura já utilizada para a reação da enzima. Já a 60 °C as atividades apresentaram menores valores, mantendo constante até 360 min, com provável inativação térmica em temperaturas mais elevadas, logo, o suporte orgânico apresentou mais resistência a temperaturas brandas. De acordo com Bastos (2022) a invertase bacteriana livre apresentou resultados semelhantes a estabilidade térmica da enzima imobilizada em PHB.

A imobilização em GLU-SI, reteve maiores valores de atividade enzimática a 30 °C e 40 °C assim como na imobilização GLU-PHB. As atividades não obtiveram grandes variações entre 360 min e 1440 min, nas temperaturas 30 °C e 40 °C. Já para a temperatura de 50 °C, mantiveram constantes a partir de 240 min. Em 60 °C a imobilização apresentou valores mais baixos de atividade enzimática, comparando as demais temperaturas. O suporte inorgânico tende a ser mais resistente termicamente quando comparado ao suporte orgânico, o que foi possível observar com menor variação entre os tempos de cada temperatura (SHARMA et al., 2022).

A invertase imobilizada pode apresentar estabilidade térmica diferente para cada suporte, visto que ocorrem variações com o tipo de substrato, interações ocorridas durante a imobilização, quantidades de grupos funcionais e características físico-químicas do suporte

(CORRÊA, 2020; LIU *et al.*, 2012).

Waifalkar *et al.* (2016) mostraram maior estabilidade térmica em temperaturas acima de 60 °C para invertase imobilizada em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana, quando analisaram temperaturas de 30 °C a 80 °C em tampão, realizadas com sacarose a 1% em tampão acetato de sódio 50 mM. Lorenzoni *et al.* (2014) imobilizaram a invertase em partículas de quitosana, analisando a estabilidade térmica de 50 °C a 60 °C, onde os resultados mostraram que após 200 h, o biocatalisador apresentou 83% da atividade inicial para a temperatura de 50 °C e 50% para 60 °C.

A partir de uma regressão linear, calculada pela curva de desnaturação térmica, foi obtida a constante de desnaturação térmica de primeira ordem (K_d), enquanto a energia de desativação térmica (E_d) foi determinada a partir da regressão linear da Equação de Arrhenius. Com esses resultados, obtiveram os demais parâmetros termodinâmicos, sendo o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), as variações de entalpia (ΔH_d), energia livre de Gibbs (ΔG_d) e entropia (ΔS_d), conforme apresentado na Tabela 04.

Tabela 04 – Parâmetros termodinâmicos para a invertase imobilizada em PHB e sílica-gel funcionalizadas em diferentes temperaturas de incubação

Parâmetros	Imobilização	Temperatura °C			
		30	40	50	60
K_d (min^{-1})	GLU-PHB	0,0004	0,0004	0,0007	0,0005
	GLU-SI	0,0002	0,0004	0,0005	0,001
$t_{1/2}$ (min)	GLU-PHB	1733	1733	990	1386
	GLU-SI	3466	1733	1386	693
E_d (kJ/mol)	GLU-PHB			10,48	
	GLU-SI			42,39	
ΔH_d (kJ/mol)	GLU-PHB	7,96	7,88	7,80	7,71
	GLU-SI	39,87	39,79	39,70	39,62
ΔG_d (kJ/mol)	GLU-PHB	104,31	107,83	109,86	114,27
	GLU-SI	106,05	107,83	110,76	112,36
ΔS_d (kJ/mol.K)	GLU-PHB	-0,317	-0,319	-0,315	-0,319
	GLU-SI	-0,218	-0,217	-0,219	-0,218

Fonte: Autora (2024).

Durante o tempo de análise, as enzimas imobilizadas em GLU-PHB e GLU-SI

apresentaram declínio térmico na variação entre 30 °C a 60 °C. Para os parâmetros K_d e $t_{1/2}$, nas temperaturas de 30 °C e 40 °C obteve os mesmos resultados para a enzima imobilizada em GLU-PHB. Com o aumento da temperatura, o $t_{1/2}$ foi diminuindo e o K_d aumentando, indicando a desnaturação térmica. A 40 °C, as enzimas imobilizadas nos dois suportes apresentaram o mesmo valor para K_d . O $t_{1/2}$ apresentou maiores resultados para a imobilização em GLU-SI até 50 °C, sendo que a 60 °C nessa imobilização foi o menor valor comparando com todas as temperaturas na imobilização dos dois suportes. O tempo de meia vida é conceituado como o tempo necessário para que a enzima perca 50% da sua atividade enzimática inicial. Já a constante de desativação considera os fatores irreversíveis para a desnaturação térmica da enzima, logo para a enzima ser considerada mais estável, é necessário maior tempo de meia vida e menor constante de desativação térmica, o que foi observado nas enzimas imobilizadas nos dois suportes (ABDEL-MAGEED *et al.*, 2022).

Os dados apresentados mostram que a enzima imobilizada em GLU-SI exibiu maiores resultados para K_d e $t_{1/2}$ a 30 °C e já a imobilização em GLU-PHB apontaram baixos valores de K_d até 60 °C, sendo que as imobilizações nesses suportes podem inibir o movimento da enzima e assim conservar a rigidez e estrutura conformacional com o aumento da temperatura, indicando estabilidade (ABDEL-MAGEED *et al.*, 2022).

A imobilização em GLU-SI apresentou uma E_d (42,39 kJ/mol) quatro vezes maior em comparação a enzima imobilizada em GLU-PHB (10,48 kJ/mol). Visto que a energia de ativação para a desnaturação térmica vai determinar a quantidade mínima de energia fornecida para a enzima ser desnaturada, é mais viável que esses resultados sejam expressos em altos valores e positivos, pois quanto maior o valor entende-se que a enzima imobilizada necessitou de mais energia durante o processo de inativação térmica irreversível devido a estabilização da estrutura conformacional após a imobilização, o que também vai influenciar nos resultados da entalpia e entropia (SILVA *et al.*, 2021; BOLINA; MENDES, 2023).

A enzima imobilizada em GLU-SI apresentaram valores superiores de entalpia em todas as temperaturas, comparando com a imobilização em GLU-PHB, o que já era esperado, visto que a imobilização em GLU-SI mostra maior linearização nos gráficos da temperatura. A entalpia (ΔH) caracteriza o número de ligações não covalentes quebradas, armazenando assim energia, logo enzimas imobilizadas necessitaria de mais energia para se desnaturar, pois a ligação covalente aumenta a resistência e dificulta a quebra das ligações químicas. Portanto maiores valores para entalpia e menores valores de entropia estão associadas a alta termoestabilidade da enzima (BUSTAMANTE-VARGAS *et al.*, 2019).

Os resultados da variação de energia de Gibbs (ΔG) mostram que com o aumento da temperatura, os valores também foram aumentando para a imobilização nos dois suportes, sendo todos positivos, apontando resistência a desnaturação. A ΔG indica a quantidade que a conformação inicial está preservada ou ativa, sendo assim, quando esse valor é baixo a enzima entra em desnaturação, apresentando menos energia disponível em relação ao estado inicial, já com o aumento desse valor, representa um processo não espontâneo (HEIDTMANN *et al.*, 2012; BUSTAMANTE-VARGAS *et al.*, 2019).

Para as imobilizações nos dois suportes, os valores expressados da entropia (ΔS_d) foram negativos em todas as temperaturas. Valores negativos para ΔS_d indicam menor aleatoriedade causada pela desnaturação térmica, visto como um processo que irá demandar mais energia para atingir a desnaturação térmica, por não ser natural (SAQIB *et al.*, 2010; KALIES; DO, 2023).

Para processos industriais são necessárias enzimas com alta estabilidade térmica, pois quanto maior a temperatura submetida, mais rápida será a velocidade da reação e assim serão utilizados menores volumes, sendo assim, as enzimas imobilizadas em GLU-PHB e GLU-SI podem ser aplicadas a processos industriais de acordo com a estabilidade térmica (CORRADINI *et al.*, 2021).

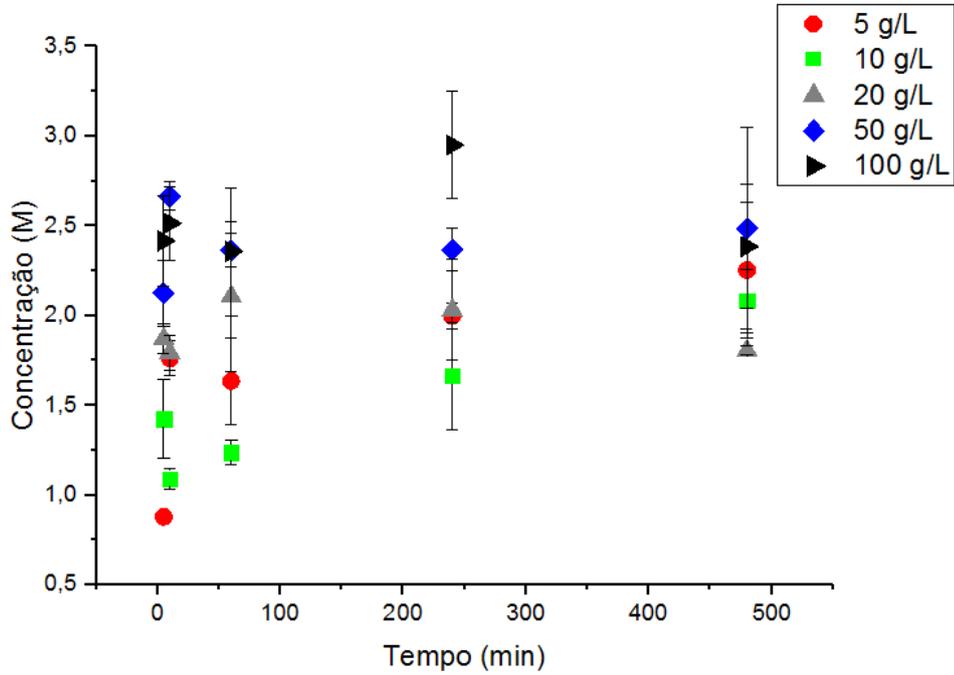
Ferreira *et al.* (2019) ao analisarem a estabilidade térmica da lipase não comercial para hidrólise de óleo de semente de algodão, mostraram a diminuição do $t_{1/2}$ e o aumento do K_d com o aumento da temperatura, variando entre 35 °C a 50 °C, justificada pela desnaturação irreversível e a termoestabilidade da enzima foi indicada pelo valor elevado de E_d , encontrando 94,25 kJ/mol. Bustamante-Vargas *et al.* (2019) avaliaram a estabilidade térmica da pectinase imobilizada em espuma rígida de poliuretano, com temperaturas entre 50 °C e 80 °C observando a desnaturação térmica com o aumento da temperatura, encontrando E_d de 91,63 kJ/mol, ΔG_d entre 118,80 e 123,22 kJ/mol, ΔH_d entre 88,95 e 88,70 kJ/mol e ΔS_d de -0,092 e -0,098 kJ/mol.K.

5.8 Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e determinação da cinética de reação

A cinética da reação foi analisada durante 8 h em diferentes concentrações de substrato no meio reacional, observando a influência do consumo de sacarose no decorrer do tempo, como apresentado na Figura 13 e Figura 14, para os biocatalisadores GLU-PHB e

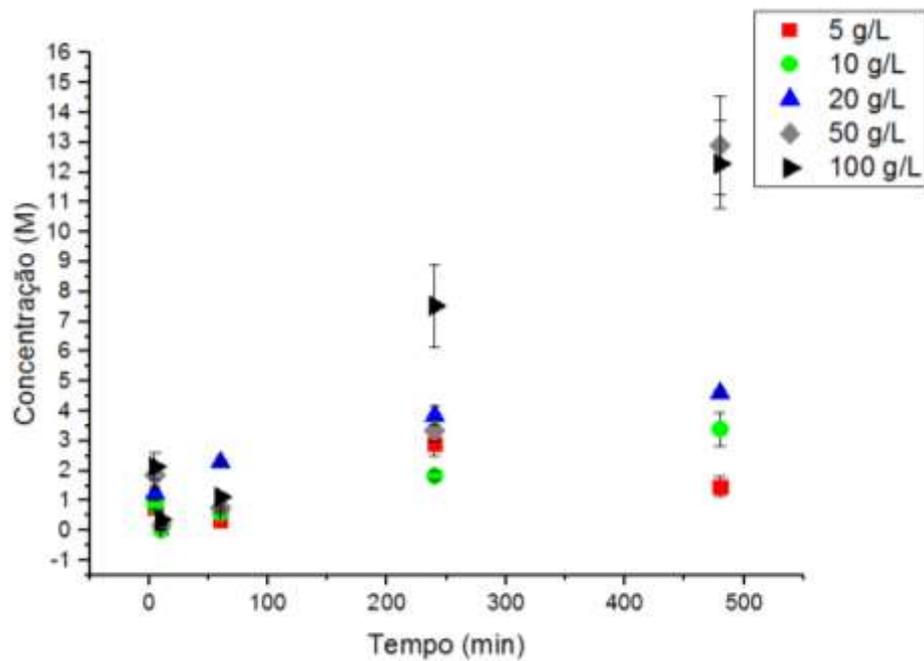
GLU-SI, respectivamente.

Figura 13 – Concentração de frutose em função do tempo para a imobilização GLU-PHB



Fonte: Autora (2024).

Figura 14 – Concentração de frutose em função do tempo para a imobilização GLU-SI



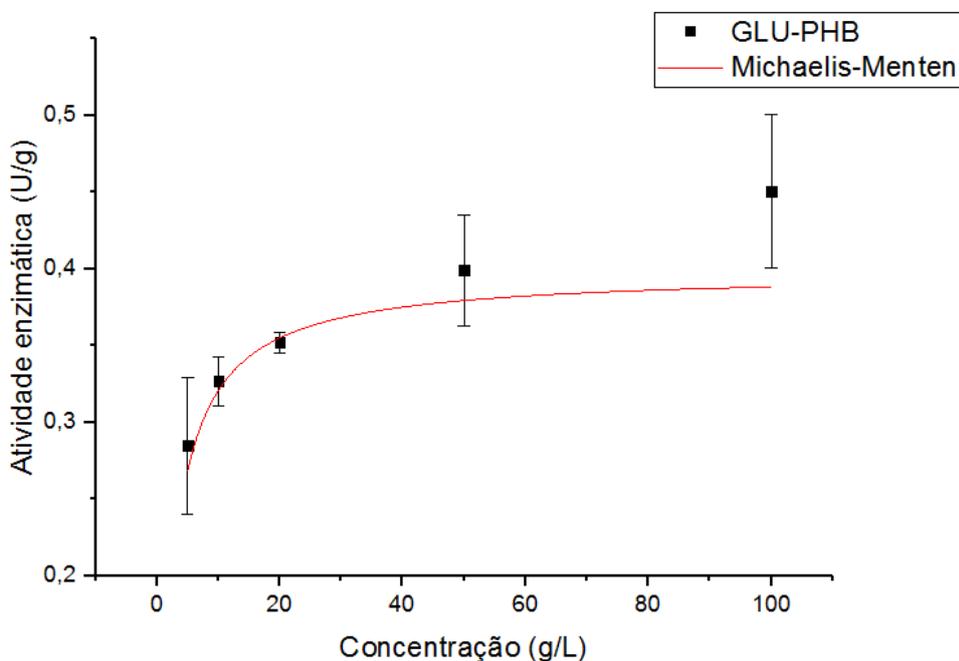
Fonte: Autora (2024).

Para as amostras GLU-PHB, a 5 g/L e 10 g/L ocorre um aumento constante na concentração de frutose após 1 h de reação. Na concentração de 20 g/L a concentração de frutose apresentou valor mais alto com 10 min e após uma h esse valor foi caindo. A 50 g/L a concentração manteve constante após 1 h. Já para 100 g/L as amostras apresentaram valores de maiores concentrações de frutose em comparação aos demais e um pico após 4 h.

Para as amostras GLU-SI em 5 g/L houve uma queda no valor da concentração de frutose após 8 h. Em 10 g/L e 20 g/L os valores da concentração foram aumentando constantemente no decorrer do tempo. A 50 g/L e 100 g/L as concentrações de frutose aumentaram em mais de 10 vezes após 8 h, apresentando resultados distintos apenas em 4 h.

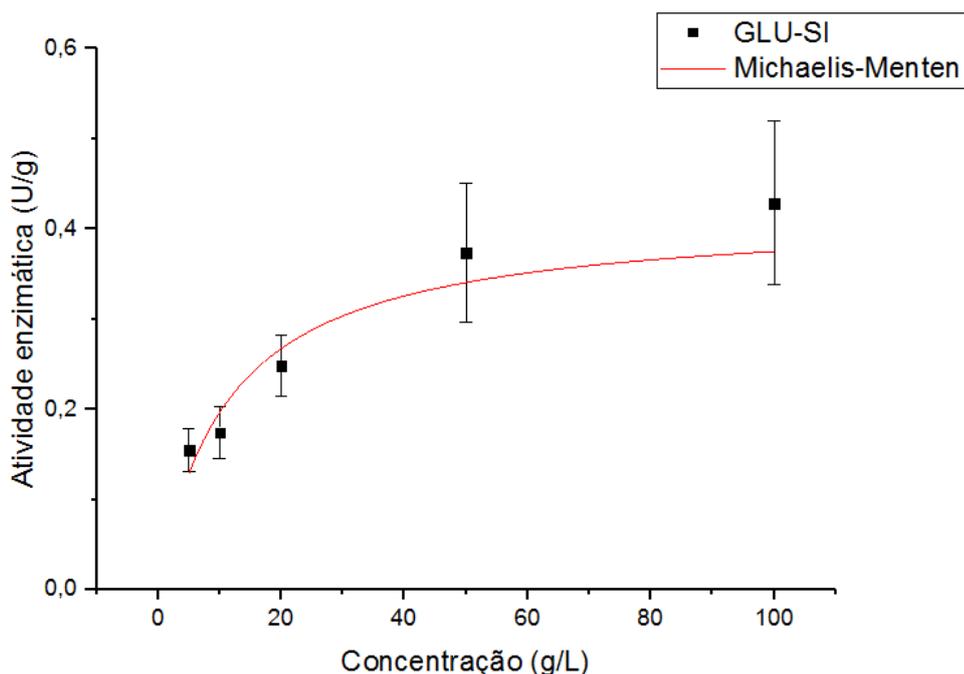
Com a finalidade de avaliar a cinética enzimática com a análise da atividade enzimática para as imobilizações GLU-PHB e GLU-SI, observando como esses valores variam em relação a concentração de substrato já utilizado, foi realizado um ajuste de acordo com o modelo de Michaelis-Menten, utilizando o software Origin Pro 2017, como pode ser visto nas Figuras 15 e 16.

Figura 15 – Modelo de Michaelis-Menten para a imobilização GLU-PHB



Fonte: Autora (2024).

Figura 16 – Modelo de Michaelis-Menten para a imobilização GLU-SI



Fonte: Autora (2024).

Nos dois gráficos é possível observar que a atividade enzimática aumentou com o aumento da concentração de substrato, em um mesmo comportamento, obtendo maiores valores para as concentrações de 50 g/L e 100 g/L. Em concentrações mais baixas, como 5 g/L e 10 g/L, entende-se que a quantidade de substrato foi insuficiente para a realização da reação enzimática de forma satisfatória, mas a tendência ao aumento da atividade nessas concentrações, mostra que a imobilização foi eficaz para a solução da inibição da enzima pelo substrato (ROCHA, 2021).

O modelo de Michaelis-Menten propõe associar a enzima com o seu substrato para a formação do complexo enzima-substrato, a partir da constante de dissociação de equilíbrio (K_m), sendo assim, o substrato então vai se converter em produto, através de reações químicas na enzima, com taxa constante (ARCUS; MULHOLLAND, 2020).

O ajuste do modelo de Michaelis-Menten aos dados experimentais de atividade enzimática dos biocatalisadores GLU-PHB e GLU-SI foi realizado para obtenção dos parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 05, onde foi possível determinar valores de V_{max} e K_m .

Tabela 05 – Parâmetros cinéticos obtidos para a invertase imobilizada em PHB e sílica-gel funcionalizadas

Parâmetros cinéticos	Suporte	Michaelis-Menten
V_{max} (U/g)	GLU-PHB	0,40 ± 0,02
	GLU-SI	0,42 ± 0,07
K_m (g/L)	GLU-PHB	2,40 ± 0,92
	GLU-SI	11,19 ± 4,38
R²	GLU-PHB	0,77
	GLU-SI	0,85

Fonte: Autora (2024).

As amostras GLU-PHB e GLU-SI apresentaram valores próximos de V_{max} indicando a mesma eficiência de imobilização, pois o valor de V_{max} representa onde todos os sítios ativos estão saturados com substrato, não restando enzima livre para se ligar a esse, mostrando a velocidade com que essa enzima pode hidrolisar um substrato. Mas são valores teóricos aproximados pelo modelo matemático, visto que, nem sempre nas concentrações definidas vai ocorrer total ligação ao substrato (CASTRO *et al.*, 2015).

Baixos valores de V_{max} podem significar que o agente funcionalizante não fornece o efeito necessário para uma boa ligação da enzima com o suporte e altos valores indicam a necessidade de menos substrato para converter em produto (CASTRO *et al.*, 2015; RIBEIRO, 2016).

Já o valor de K_m foi menor para a imobilização GLU-PHB indicando maior afinidade da enzima pelo substrato, pois também a relação do V_{max} pelo K_m também seria menor para essa enzima imobilizada. O processo de imobilização pode aumentar o valor K_m , pois acarreta alterações na estrutura da enzima imobilizada, devido à adição de agentes funcionalizantes e restrições difusionais, afetando assim o acesso do substrato aos sítos ativos da enzima, além da superfície irregular que os suportes apresentam (ABDEL-MAGEED *et al.*, 2022; VALERIO *et al.*, 2013).

Ao imobilizar a invertase em material mesoporo SBA-15, Ribeiro (2016) encontrou 0,67 g/L.min e 0,15 g/L para V_{max} e K_m , respectivamente, sendo que esse valor aumentou quando os materiais de suportes foram funcionalizados por diferentes compostos orgânicos. Prado (2021) encontrou V_{max} de 2,52 U/g e K_m de 124 g/L para a frutossiltransferase imobilizada em sílica-gel funcionalizada, justificando que o valor de V_{max} inferior pode estar ligado ao baixo transporte de massa ou aprisionamento dentro dos poros da sílica, limitando assim a ação do sítio ativo ao substrato.

Valerio *et al.* (2013) notaram um aumento ao valor de K_m após a imobilização da invertase em nanopartículas de quitosana, mostrando que a enzima imobilizada reduziu a afinidade da enzima pelo substrato, mas ainda assim manteve a capacidade máxima de conversão da invertase.

Szymańska *et al.* (2013) avaliaram os parâmetros cinéticos de hidrólise da sacarose na imobilização da invertase em espuma celular mesoporosa, encontrando 47,42 mM para K_m e 2,40 mM/min para V_{max} . Enquanto Hakkoymaz e Mazi (2020) encontraram V_{max} de 13,04 $\mu\text{mol}/\text{min}$ e K_m de 4,5 mM para a imobilização da invertase em poli(N -vinilpirrolidona- co - butil acrilato- co - N -hidroximetilacrilamida) com a concentração de sacarose variando entre 3-30 mM. Esses estudos mostram que uma maior afinidade e eficiência para hidrólise da sacarose vão variar de acordo com os suportes e métodos utilizados.

6 CONCLUSÕES

A imobilização da invertase produzida a partir da bactéria *Bacillus tequilensis* revelou-se como uma estratégia promissora para a produção de biocatalisadores estáveis e eficientes para a hidrólise da sacarose em açúcar invertido. A caracterização dos suportes após a imobilização demonstrou a presença da enzima imobilizada em todos os suportes, indicando o sucesso do processo de imobilização.

A imobilização em PHB apresentou maior rendimento de imobilização e atividade recuperada, já a imobilização no biocarvão apresentou menores valores nos dois parâmetros de imobilização, comparado aos outros suportes. A funcionalização com o glutaraldeído aumentou o rendimento de imobilização e atividade recuperada dos três suportes. Como as imobilizações da invertase em PHB e sílica-gel apresentaram maior atividade enzimática, esses dois suportes mostram mais potencial para aplicação industrial.

Os biocatalisadores imobilizados demonstraram uma notável estabilidade durante o armazenamento, com atividade enzimática mantida ao longo de nove dias, ao contrário da enzima livre, que perdeu atividade. A estabilidade operacional dos biocatalisadores variou entre os diferentes suportes e métodos de imobilização, onde a imobilização GLU-SI mostrou mais estável para processos em batelada, suportando mais ciclos, enquanto a imobilização em GLU-PHB e GLU-BIO tem maior possibilidade para uso em processos contínuos, visando economia de tempo e custo. A imobilização em PHB funcionalizado mostrou-se mais estável

frente a variações de pH, enquanto a imobilização em GLU-SI apresentou maior estabilidade em temperatura.

A concentração de substrato com maior valor de atividade enzimática foi encontrada a 100 g/L para as amostras imobilizadas em PHB e sílica, destacando a importância da concentração adequada do substrato para maximizar a eficiência dos biocatalisadores.

Em suma, os resultados deste estudo fornecem resultados valiosos para o desenvolvimento de biocatalisadores eficientes e estáveis para aplicações industriais na produção de açúcar invertido a partir da invertase bacteriana imobilizada em GLU-PHB e GLU-SI, contribuindo para avanços significativos no campo da biotecnologia enzimática.

7 TRABALHOS FUTUROS

Realizar a purificação da invertase bacteriana, para menor interferência e maior porcentagem de imobilização da enzima;

Estudar pré-tratamentos, controle de produção e métodos de imobilização para a possibilidade do biocarvão ser um suporte mais promissor;

Avaliar possíveis agentes funcionalizantes capazes de aumentar a estabilidade química e física dos suportes para aplicações em alimentos;

Estudar a aplicação da invertase imobilizada em sílica-gel e PHB funcionalizados em reatores de leito fixo.

8 REFERÊNCIAS

ABDEL-MAGEED, H.M.; NADA, D.; RADWAN, R.A.; MOHAMED, S. A.; GOHARY, N. A. E. L. Optimization of catalytic properties of *Mucor racemosus* lipase through immobilization in a biocompatible alginate gelatin hydrogel matrix for free fatty acid production: a sustainable robust biocatalyst for ultrasound-assisted olive oil hydrolysis. **3 Biotech**, v. 12, p. 01-16, 2022.

AFTAB, A., KHAN, Z, U, ALI, S. Production, kinetics and immobilization of microbial invertases for some commercial applications-a review. **International Journal of Biology and Biotechnology**, v. 18, p. 377-388, 2021.

AGGARWAL, R.; DUTTA, T.; SHEIKH, J. Extraction of pectinase from *Candida* isolated from têxtil emill effluent and its application in bio-scouring of cotton. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, p. 100291, 2020.

AGUILAR, J. G. DOS S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

AITA, B. C.; SPANNEMBERG, S. S.; SCHMALTZ, S.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V.; KUHN A, R. C.; MAZUTTI, M. A. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agro industrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, 103193, 2019.

ALAGÖZ, D.; VARAN, N. E.; TOPRAK, A.; YILDIRIM, D.; TUKEL, S. S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of xylanase on differently functionalized silica gel supports for orange juice clarification. **Process Biochemistry**, v. 113, p. 270-280, 2022.

ALBERTINI, A. V. P.; CADENA, P.G.; SILVA, J.L.; NASCIMENTO, G.A.; REIS, A.L.S.; FREIRE, V.N.; SANTOS, R.P.; MARTINS, J. L.; CAVADA B. S.; NETO, P. J. R.; PIMENTEL, M. C. B.; MARTÍNEZ, C. R.; PORTO, A. L. F.; FILHO, J. L. L. Performance of invertase immobilized on glass–ceramic supports in batch bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 187, p. 341-350, 2012.

AL-DHABI, N. A.; ESMAIL, G. A.; GHILAN, A. K. M.; ARASU, M. V.; DURAIKANDIYAN, V.; PONMURUGAN, K. Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from *Streptomyces sp.* Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications. **Journal of King Saud University – Science**, v. 32, p. 1258-1264, 2020.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1017–1026, 2019.

ANDJELKOVIĆ, U.; MILUTINOVIĆ-NIKOLIĆ, A.; JOVIĆ-JOVIČIĆ, N.; BANKOVIĆ, P.; BAJT, T.; MOJOVIĆ, Z.; VUJČIĆ, Z.; JOVANOVIĆ, D. Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilisation on modified beidellitenanoclays. **Food Chemistry**, v. 168, p. 262-269, 2015.

ANDJELKOVIĆ, U.; PIĆURIĆ, S.; VUJČIĆ, Z. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. **Food Chemistry**, v. 120, p. 799-804, 2010.

ARAUJO, I. Imobilização de frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em polihidroxibutirato e sua caracterização bioquímica para a produção de frutooligosacarídeos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2021.

ARAUJO, I. M.; BECALETTE, P. C.; SILVA, E. S.; DIAS, G. S.; XAVIER, M. C. A.; ALMEIDA, A. F.; MAIORANO, A. E.; MORALES, S. A. V.; PERNA, R. F. Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 98, p. 419-430, 2022.

ARCUS, V. L.; MULHOLLOND, A. J. Temperature, dynamics, and enzyme-catalyzed reaction rates. **Annual Review of Biophysics**, v. 49, p.163-180, 2020.

ASHKAN, Z.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; JAMLIDOOST, M.; TASHAKOR, A. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 708-721, 2021.

AZODI, M.; FALAMAKI, C.; MOHSENIFAR, A. Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on functionalized porous silicon. **Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic**, v. 69, p. 154-160, 2011.

BANERJEE, A. K.; LAYA MIMÓ, M. S.; VERA VEGAS, W. J. Silica gel in organic synthesis. **Russian Chemical Reviews**, v. 70, p. 971-990, 2001.

BARDESTANI, R.; PATIENCE, G. S.; KALIAGUINE, S. Experimental methods in chemical engineering: specific surface area and pore size distribution measurements—BET, BJH, and DFT. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 97, p. 2781-2791, 2019.

BARRET, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isothermas. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, p. 373-379, 1951.

BASTOS, L. T. A. Produção de invertases a partir de microrganismos isolados de frutos amazônicos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, UFT, Palmas 2022.

BAYRAMOĞLU, G.; DOZ, T.; OZALP, V. C.; ARICA, M. Y. Improvement stability and performance of invertase via immobilization on to silanized and polymer brush grafted magnetic nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1442-1450, 2017.

BAYRAMOĞLU, G.; KARAKIŞLA, M.; ALTINTAŞ, B.; METIN, A.U.; SAÇAK, M.; ARICA, M. Y. Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of enzymes: Stability and catalytic properties of invertase, **Process Biochemistry**, v. 44, p. 880-885, 2009.

BEDZO, O. K. K.; TROLLOPE, K.; GOTTUMUKKALA, L. D.; COETZEE, G.; GORGENS, J. F. Amberlite IRA 900 versus calcium alginate in immobilization of a novel, engineered beta-fructofuranosidase for short-chain fructooligosaccharide synthesis from sucrose. **Biotechnology Progress**, v. 35, p. 2797, 2019.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101368, 2019.

BI, Q.; LIU, P.; WU, J.; LU, F.; HAN, X.; WANG, W.; ZHAO, J. Transcriptomic and metabolomic analysis of the mechanism by which *Bacillus tequilensis* inhibits *Alternaria alternata* to control pear black spot. **Biological Control**, v. 187, p. 105394, 2023.

BINHAYEEDING, N.; YUNU, T.; PICHID, N.; KLOMKLAO, S.; SANGKHARAK, K. Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 174-185, 2020.

BOLINA, I. C. A.; MENDES, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the thermal inactivation of lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk silica. **Biotechnology Letters**, v. 46, p. 85–95, 2023.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v.90, p.66-80, 2020.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-39, 1938.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; JUNGES, A., VENQUIARUTO, L. D.; ORO, C. E. D.; JULIO- OROZCO, D. J.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V.; PAROUL, N.; BACKES, G. T.; DALLAGO, R. M. Thermal inactivation kinetics and thermodynamic properties of immobilised *Aspergillus niger* pectinase in rigid polyurethane foam. **International Food Research Journal**, v. 26, p. 1535 - 1545, 2019.

CABRERA, M. P.; ASSIS, C. R. D.; NERI, D. F. M.; PEREIRA, C. F.; SORIA, F.; CARVALHO, L. B. High sucrolytic activity by invertase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles. **Biotechnology Reports**, v. 14, p. 38–46, 2017.

CADENA, P. G.; JERONIMO, R. A. S.; MELO, J. M.; SILVA, R. A.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. B. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1595-1602, 2010.

CALIFANO, V.; COSTANTINI, A. Immobilization of cellulolytic enzymes in mesostructured silica materials. **Catalysts**, v. 10, p. 01-31, 2020.

CAMPELLO, G. S. Imobilização de β -galactosidase (Lactozym®) em Eupergit® e sua caracterização. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Rio Grande – RS, 2010.

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

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 199-207, 2015.

CHEN, Q. F.; HAN, M.; YANG, Y.; ZHOU, H.; CHEN, J.; LIU, W. Real-time assay of invertase activity using isoquinolinyboronic acid as turn-on fluorescent sensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 415, p. 5297-5309, 2023.

CHEN, S.; SHEU, D.; DUAN, K. Production of fructooligosaccharides using β -fructofuranosidase immobilized onto chitosan-coated magnetic nanoparticles. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, p. 1105-1110, 2014.

CHILIVERI, S. R.; LINGA, V. R. A novel thermostable, alkaline pectatelyase from *Bacillus tequilensis* SV11 with potential in textile industry. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 264-272, 2014.

CLARSON, S., GROSS, R., PATWARDHAN, S., POOJARI, Y. (2014). On The Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B onto Surface Modified Porous Silica Gel Particles. **Bio-Inspired Silicon-Based Materials**, v. 05, p. 63-72, 2014.

COLLAÇO, A. C. A.; AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI, E. D. C.; FREIRE, D. M. G. Development of an integrated process involving palm industry co-products for monoglyceride/diglyceride emulsifier synthesis: Use of palm cake and fiber for lipase production and palm fatty-acid distillate as raw material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 135, p. 110039, 2021.

CORRADINI, F. A. S.; MILESSI, T. S.; GONÇALVES, V. M.; RULLER, R.; SARGO, C. R.; LOPES, L. A.; ZANGIROLAMI, T. C.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. High stabilization and hyperactivation of a recombinant β -xylosidase through immobilization strategies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 145, p. 109725, 2021.

CORRÊA, W.; M. Produção de biocatalisador através da técnica de adsorção física a partir da lipase de *Burkholderia cepacia* e estudo da influência de aditivos no processo de imobilização. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção e de Manufatura) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas, Limeira, 2020.

CORTÉS-CAMARGO, S.; ACUÑA-AVILA, P. E.; ARRIETA-BÁEZ, D.; MONTAÑEZ-BARRAGÁN, B.; MORATO, A. I.; SANZ-MARTÍN, J. L.; BARRAGÁN-HUERTA, B. E. Biosurfactant production by *Bacillus tequilensis* ZSB10: Structural characterization, physicochemical, and antifungal properties. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 24, p. 773-782, 2021.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DEEPAK, V.; PANDIAN, S. B. R. K.; KALISHWARALAL, K.; GURUNATHAN, S. Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6644-6646, 2009.

EMREGUL, E.; SUNGAR, S.; AKBULUT, U. Polyacrylamide–gelatine carrier system used for invertase immobilization. **Food Chemistry**, v. 97, p. 591-597, 2007.

EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 2065–2082, 2015.

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

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v.8, p. 1808- 1825, 2013.
FURLANI, I. L.; AMARAL, B. S.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Imobilização enzimática: Conceitos e efeitos na proteólise. **Química Nova**, v. 43, p. 463-473, 2020.

FERREIRA, M. M.; DE OLIVEIRA, G.F; BASSO, R. C.; MENDES, A. A.; HIRATA, D. B. Optimization of free fatty acid production by enzymatic hydrolysis of vegetable oils using a non-commercial lipase from *Geotrichum candidum*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, p. 1647-1659, 2019.

FERREIRA, M. M.; SANTIAGO, F. L. B.; DA SILVA, N. A. G.; LUIZ, J. H. H.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A.; HIRATA, D. B. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55-63, 2021.

GARCIA, R. L.; DIAS, G. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A.; SILVA, E. D.; MAIORANO, A. E.; TARDIOLI, P. W.; PERNA, R. F. Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT- 301 for high transfructosylation activity: Optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, p. 273–285, 2021.

GATSON, J.; BENZ, B. F.; CHANDRASEKARAN, C.; SATOMI, M.; VENKATESWARAN, K.; HART, M. E. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, p. 1475–84, 08 2006.

GIRELLI, A. M.; QUATTROCCHI, L.; SCUTO, F. R. Silica-chitosan hybrid support for laccase immobilization. **Journal of Biotechnology**, v. 318, p. 45-50, 2020.

GODLEWESKA, P.; SCHMIDT, H. P.; OK, Y. S.; OLESZCZUK, P. Biochar for composting improvement and contaminants reduction. A review. **Bioresource Technology**, v. 246, p. 193-202, 2017.

GOMEZ, J. M.; ROMERO, M. D.; FERNÁNDEZ, T. M.; GARCÍA, S. Immobilization and enzymatic activity of β -glucosidase on mesoporous SBA-15 silica. **Journal of Porous Materials**, v. 17, p. 657–662, 2010.

GONÇALVES, M. C. P.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E; PERNA, R. F.; KIECKBUSCH, T. G. Entrapment of glutaraldehydecrosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, p. 1-10, 2020.

HAKKOYMAZ, O.; MAZI, H. An immobilized invertase enzyme for the selective determination of sucrose in fruit juices. **Analytical Biochemistry**, V. 611, 2020.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; DE PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C.; KALILL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 15, p. 41-49, 2012.

HEMANSI, R. G.; KUHAD, R. C.; SAINI J. K. Cost effective production of complete cellulase system by newly isolated *Aspergillus niger* RCKH-3 for efficient enzymatic saccharification: Medium engineering by overall evaluation criteria approach (OEC). **Biochemical Engineering Journal**, v. 132, p.182-190, 2018.

IDRIS, A. S. O.; PANDEY, A.; RAO, S.; SUKUMARAN, R. K. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 265-271, 2017.

ISAK, I.; PATEL, M.; RIDELL, M.; WEST, M.; BOWERS, T.; WIJEYEKOON, S.; LLOYD, J. Quantification of polyhydroxyalkanoates in mixed and pure cultures biomass by Fourier transform infrared spectroscopy: comparison of different approaches. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, p. 139-146, 2016.

JANG, S. A.; PARK, J. H.; LIM, H. J.; OH, J. Y.; BAE, K. H.; LEE, K. J.; SONG, J. K.; KIM, D. Bio-specific immobilization of enzymes on electrospun PHB nanofibers. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 145, p. 109749, 2021.

JEONG, D. W.; HYEON, J. E.; LEE, M.; KO, Y. J.; KIM, M.; HAN, S. O. Efficient utilization of brown algae for the production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by using an enzyme complex immobilized on *Ralstonia eutropha*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 189, p. 819-825, 2021.

JIANG, Y.; ZHENG, J.; WANG, M.; XU, W.; WANG, Y.; WEN, L.; DONG, J. Pros and cons in various immobilization techniques and carriers for enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 196, p. 01-23, 2024.

KALIES, G.; DO, D. D. Momentum work and the energetic foundations of physics. IV. The essence of heat, entropy, enthalpy, and Gibbs free energy. **AIP Advances**, v. 13, p. 1-17, 2023.

KAVITHA, G.; RENGASAMY, R.; INBAKANDAN, D. Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.111, p. 102-108, 2018.

KOLI, A. C.; GAIKAR, V. G. Continuous Cane Sugar Inversion Process Using Immobilized Invertase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology (1986)**, v. 92, p.787-92, 2016.

KOTWAL, S. M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 311-322, 2009.

KOVALENKO, G. A.; PERMINOVA, L. V.; CHUENKO, T. V.; RUDINA, N. A. Catalytic properties of lipase adsorbed on nanocarbon-containing mesoporous silica in esterification and transesterification reactions. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, p. 582–588, 2016.

KULSHRESTHA, S.; TYAGI, P.; SINDHI, V.; YADAVILLI, K. S. Invertase and its applications – A brief review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, p. 792-797, 2013.

KUMAR, D.; NAGAR, S.; BHUSHAN, I.; KUMAR, L. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 51– 61, 2013.

LABUS K, WOLANIN K, RADOSIŃSKI Ł. Comparative Study on Enzyme Immobilization Using Natural Hydrogel Matrices—Experimental Studies Supported by Molecular Models Analysis. **Catalysts**, v. 10, p. 01-23, 2020.

LEE, W. C.; HUANG, C. T. Modelling of ethanol production using *Zymomonasmobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal**, v, 04, p. 217–227, 2000.

LEHMANN, J.; RILLING, M. C.; THIES, J.; MASIELLO, C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D. Biochar effects on soil biota – A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 1812-1836, 2011.

LI, N.; XIA, Q.; NIU, M.; PING, Q.; XIAO, H. Immobilizing laccase on different species wood biochar to remove the chlorinated biphenyl in wastewater. **Scientific Reports**, v. 8, p. 13947, 2018.

LINCOLN, L.; MORE, S. S. Bacterial invertases: Occurrence, production, biochemical characterization, and significance of transfructosylation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, p. 803-813, 2017.

LIU, J.; BAI, S.; JIN, Q.; ZHONG, H.; LI, C.; YANG, Q. Improved catalytic performance of lipase accommodated in the mesoporous silicas with polymer-modified microenvironment. **Langmuir**, v. 28, p. 9788-9796, 2012.

LORENZONI, A.; S.; G.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 193-197, 2014.

MACHÍN, B.; CHAVES, S.; ÁVILA, C.; PERA, L. M.; CHEHÍN, R. N.; PINGITORE, E. V. Highly reusable invertase biocatalyst: Biological fibrils functionalized by photocrosslinking. **Food Chemistry**, v. 331, p. 127322, 2020.

MAHESH, M.; ARIVIZHIVENDHAN, K. V.; MAHARAJA, P.; BOOPATHY, R.; HAMSAVATHANI, V.; SEKARAN, G. Production, purification and immobilization of pectinase from *Aspergillus ibericus* on to functionalized nanoporous activated carbon (FNAC) and its application on treatment of pectin containing waste water. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 43–54, 2016.

MALHOTRA, I.; BASIR, S. F. Application of invertase immobilized on chitosan using glutaraldehyde or tris(hydroxymethyl)phosphine as cross-linking agent to produce bioethanol. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 191, p. 838–851, 2020.

MANIKANDAN, N. A.; PAKSHIRAJAN, K.; PUGAZHENHI, G. A closed-loop biorefinery approach for polyhydroxybutyrate (PHB) production using sugars from carob pods as the sole

raw material and downstream processing using the co-product lignin. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123247, 2020.

MANOOCHEHRI, H.; HOSSEINI, N. F.; SAIDIJAM, M.; TAHERI, M.; REZAEI, H.; NOURI, F. A review on invertase: Its potentials and applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, 2020.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATOS, K. A. N.; LIMA, D. P.; BARBOSA, A. P. P.; MERCADANTE, A. Z.; CHISTÉ, R. C. Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) are by-products classified as very high carotenoid sources. **Food Chemistry**, v. 272, p. 216-221, 2019.

MELLER, K.; SZUMSKI, M.; BUSZEWSKI, B. Microfluidic reactors with immobilized enzymes—Characterization, dividing, perspectives. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 244, p. 84-106, 2016.

MELO, D. P.; BRAVO, A. H.; CRUZ, J. C.; REYES, L. H. Invertase Immobilization on Magnetite Nanoparticles for Efficient Fructooligosaccharide Generation: A Comprehensive Kinetic Analysis and Reactor Design Strategy. **ChemEngineering**, v. 7, p. 01-18, 2023.

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

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

MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications, **Bioresource Technology**, v. 115, p. 126-135, 2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, n. 3, 1959.

MIRANDA, J. S.; SILVA, N. C. A.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; LAGE, F. A. P.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 392–403, 2014.

MISHRA, A.; MELO, J. S.; AGRAWAL, A.; KASHYAP, Y.; SEN, D. Preparation and application of silica nanoparticles-*Ocimum basilicum* seeds bio-hybrid for the efficient immobilization of invertase enzyme. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 188, p. 110796, 2020.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 205-220, 2015.

NADEEM, H.; RASHID, M. H.; SIDDIQUE, M. H.; AZEEM, F.; MUZAMMIL, S.; JAVED, M. R.; ALI, M. A.; RASUL, I.; RIAZ, M. Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1202-1210, 2015.

NASCIMENTO, V. M.; ANTONIOLLI, G. T. U.; LEITE, R. S. R.; FONSECA, G. G. Effects of the carbon source on the physiology and invertase activity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* FT858. **3 Biotech**, v. 10, p. 01-09, 2020.

NAZAROVA, E. A.; YUSHKOVA, E. D.; IVANETS, A. I.; PROZOROVICH, V. G.; KRIVOSHAPKIN, P. V.; KRIVOSHAPKINA E. F. α -Amylase Immobilization on Ceramic Membranes for Starch Hydrolysis. **Starch journal**, v. 74, p. 1-9, 2021.

NUNES, Y. L.; MENEZES, F. L.; SOUSA, I. G.; CAVALCANTE, A. L. G.; CAVALCANTE, F. T. T.; MOREIRA, K. S.; OLIVEIRA, A. L. B.; MOTA, G. F.; SOUZA, J. E. S.; FALCÃO, I. R. A.; ROCHA, T. G.; VALÉRIO, R. B. R.; FECHINE, P. B. A.; SOUZA, M. C. M.; SANTOS, J. C. S. Chemical and physical Chitosan modification for designing enzymatic industrial biocatalyst: How to choose the bbeststrategy?. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 1124-1170, 2021.

NZEREUGU, P. U.; OMAH, A. D.; EZEMA, F. I.; IWUOHA, E. I.; NWANYA, A. C. Silica extraction from rice husk: Comprehensive review and applications. **Hybrid Advances**, v. 4, p. 100111, 2023.

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.

OZCAN, O.; YILDIRIM, R. M.; TOKER, O. S.; AKBAS, N.; OZULKU, G.; YAMAN, M. The effect of invertase concentration on quality parameters of fondant. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 4242-4250, 2019.

ÖZTOP, H. N.; AKYILDIZ, F.; SARAYDIN, D. Poly (acrylamide/vinylsulfonic acid) hydrogel for invertase immobilization. **Microscopy Research and Technique**, v. 83, p. 1487-1498, 2020.

PAGÁN, M.; SUAZO, D.; DEL TORO, N.; GRIEBENOW, K. A Comparative study of different protein immobilization methods for the construction of efficient nano- structured lactate oxidase-SWCNT-biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64, p. 138-146, 2015.

PANDEY, D.; DAVEREY, A.; ARUNACHALAM, K. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. **Journal of Cleaner Production**, v. 255, p. 120267, 2020.

PATEL, V.; SHAH, C.; DESHPANDE, M.; MADAMWAR, D. Zinc oxide nanoparticles supported lipase immobilization for biotransformation in organic solvents: A facile synthesis of geranyl acetate, effect of operative variables and kinetic study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 1630–1651, 2016.

PEDRO, K. C. N. R.; DA SILVA, J. V. V.; CIPOLATTI, E. P.; MANOEL, E. A.; CAMPISANO, I. S. P.; HENRIQUE, C. A.; LANGONE, M. A. P. Adsorption of lipases on porous silica-based materials for esterification in a solvent-free system. **3 BIOTECH**, v. 13, P. 01-14, 2023.

PÉREZ DE LOS SANTOS, A. I.; CAYETANO-CRUZ, M.; GUTIÉRREZ-ANTÓN, M. A.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.; FARRÉS, A.; HIDALGO-LARA, M. E. Improvement of catalytical properties of two invertases highly tolerant to sucrose after expression in *Pichia pastoris*. Effect of glycosylation on enzyme properties. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 83, p. 48–56, 2016.

PERNA, R. F.; CUNHA, J. S.; GONÇALVES, M. C. P.; BASSO, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. Microbial fructosyltransferase: production by submerged fermentation and evaluation of pH and temperature effects on transfructosylation and hydrolytic enzymatic activities. **International Journal of Engineering Research and Science**, v.4, p. 43-50, 2018.

PEŞINT, G. B.; YÜNĞEVIŞ, B. E.; DEMİRÇELİK, I. P. Enhanced invertase binding from baker's yeast via cryogels included boronic acids. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 01-13, 2023.

PRADO, J. P. Z. Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel pura e funcionalizada para produção de frutooligossacarídeos. 2021. 104 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2021.

RAJAPAKSHA, A. U.; CHEN, S. S.; TSANG, D. C. W.; ZHANG, M.; VITHANAGE, M.; MANDAL, S.; GAO, B.; BOLAN, N. S.; OK, Y. S. Engineered/designer biochar for contaminant removal/immobilization from soil and water: Potential and implication of biochar modification. **Chemosphere**, v. 148, p. 276-291, 2016.

RAMOS, E. Z.; JÚNIOR, R. H. M.; DE CASTRO, P. F.; TARDIOLI, P. W.; MENDES, A. A.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43-51, 2015.

RANA, K.; RANA, N.; CHAUHAN, N.; GHABRU, A.; DEVI, S.; CHAUHAN, S. Comparative study of *Bacillus* and *Enterobacter* for upscaling of invertase production for utilization in food industry. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 17, p. 01-09, 2023.

RASBOLD, L. M.; DELAI, V. M.; DA CRUZ KERBER, C. M.; SIMÕES, M. R.; HEINEN, P. R.; DA CONCEIÇÃO SILVA, J. L.; SIMÃO, R. C. G.; KADOWAKI, M. K.; MALLER, A. Production, immobilization and application of invertase from new wild strain

Cunninghamella echinulata PA3S12MM. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, p. 2832-2843, 2021a.

RASBOLD, L. M.; HEINEN, P. R.; SILVA, J. L. C.; SIMÃO, R. C. G.; KADOWAKI, M. K.; MALLER, A. *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM invertase: Biochemical characterization of a promiscuous enzyme. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, 2021b.

REMONATTO, D.; JUNIOR, R. H. M.; MONTI, R.; BASSAN, J. C.; PAULA, A. V. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1-20, 2022.

RIBEIRO, L. M. O. Imobilização da enzima invertase em material mesoporoso SBA-15 com superfícies funcionalizadas por diferentes compostos orgânicos. 106 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Materiais) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

ROCHA, R. J. Imobilização de frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em bagaço de cana-de-açúcar para a produção de fruto-oligossacarídeos. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alenas, Poços de Caldas, MG, 2021.

RODRIGUES, M. V. N.; RODRIGUES, R. A. F.; SERRA, G. E.; ANDRIETTA, S. R.; FRANCO, T. T. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. **Food Science and Technology**, v. 20, p. 103–109, 2000.

RODRÍGUEZ-RESTREPO, Y. A.; ORREGO, C. E. Immobilization of enzymes and cells on lignocellulosic materials. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, p. 787–806, 2020.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, p. 641- 646, 2010.

SANNINO, F.; COSTANTINI, A.; RUFFO, F.; ARONNE, A.; VENEZIA, V.; CALIFANO, V. Covalent immobilization of β -glucosidase into mesoporous silica nanoparticles from anhydrous acetone enhances its catalytic performance. **Nanomaterials**, v. 10, p. 108, 2020.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489-511, 2012.

SHARMA, S.; GUPTA, S.; ARYA, S. K.; KAUR, A. Enzyme immobilization: implementation of nanoparticles and an insight into polystyrene as the contemporary immobilization matrix. **Process Biochemistry**, v. 120, p. 22-34, 2022.

SILVA, M. B. P. O.; ABDAL, D.; PRADO, J. P. Z.; DIAS, G. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A.; ALMEIDA, A. F.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, e2020283, 2021.

SILVA, R. D. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R.; Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos (Brazil)**, v. 23, p. 337-341, 2003.

SIROHI, R.; PANDEY, J. P.; GAUR, V. K.; GNANSOUNOU, E.; SINDHU, R. Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). **Bioresource Technology**, v. 311, p. 123536, 2020.

SONDHI, S.; SHARMA, P.; GEORGE, N.; CHAUHAN, P. S.; PURI, N.; GUPTA, N. An extracellular thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus tequilensis* SN4, with a potential to biobleach softwood pulp. **3 Biotech**, v. 5, p. 175–185, 2015.

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

SOUZA, P. M.; ALIAKBARIAN, B.; FERREIRA FILHO, E. X.; MAGALHÃES, P. O.; PESSOA JUNIOR, A.; CONVERTI, A.; PEREGO, P. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17–21, 2015.

SU, H.; WANG, Y.; CHEN, X.; ZHANG, M.; LI, C.; ZHAO, F. Rapid biosynthesis of biosurfactants by *Bacillus tequilensis* SL9 isolated from oily sludge: Characterization, optimization, and potential applications. **Journal of Surfactants and Detergents**, p. 1–12, 2023.

SUN, S.; ZHANG, Y.; LIU, K.; CHEN, X.; JIANG, C.; HUANG, M.; ZANG, H.; LI, C. Insight into biodegradation of cellulose by psychrotrophic bacterium *Pseudomonas sp.* LKR-1 from the cold region of China: Optimization of cold-active cellulase production and the associated degradation pathways. **Cellulose**, v. 27, p. 315-333, 2020.

SUN, T.; MIAO, J.; SALEEM, M.; ZHANG, H.; YANG, Y.; ZHANG, Q. Bacterial compatibility and immobilization with biochar improved tebuconazole degradation, soil microbiome composition and functioning. **Journal of Hazardous Materials**, v. 398, p. 122941, 2020.

SZYMAŃSKA, K.; PUDŁO, W.; MROWIEC-BIAŁOŃ, J.; CZARDYBON, A.; KOCUREK, J.; JARZĘBSKI, A. B. Immobilization of invertase on silica monoliths with hierarchical pore structure to obtain continuous flow enzymatic microreactors of high performance. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 170, p. 75-82, 2013.

TASKIN, E.; BUENO, C. C.; ALLEGRETTA, I.; TERZANO, R.; ROSA, A. H.; LOFFREDO, E. Multianalytical characterization of biochar and hydrochar produced from waste biomasses for environmental and agricultural applications. **Chemosphere**, v. 233, p. 422-430, 2019.

TAVERNINI, L.; ROMERO, O.; ABURTO, C.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; ILLANES, A.; WILSON, L. Development of a hybrid bioinorganic nanobiocatalyst: Remarkable impact of

the immobilization conditions on activity and stability of β -Galactosidase. **Molecules**, v. 26, p. 4152, 2021.

TEIXEIRA, A. J.; WESCHENFELDER, L. M.; ANTUNES, A.; ZENI, J.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L. Commercial and non-commercial pectinase and cellulase on the enzymatic hydrolysis efficacy of rice husk and Tifton 85 hay. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 41, p. 45100, 2018.

TIZCHANG, S.; KHIABANI, M. S.; MOKARRAM, R. R.; HAMISHEHKAR, H.; MOHAMMADI, N. S.; CHISTI, Y. Immobilization of β -galactosidase by halloysite-adsorption and entrapment in a cellulose nanocrystals matrix. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1865, p. 129896, 2021.

UTOMO, Y.; YUNIAWATI, N.; WONORAHARDO, S. Preliminary study of immobilized cellulase in silica from the rice husk ash to hydrolysis sugarcane bagasse preliminary study of immobilized cellulase in silica from the rice husk ash to hydrolysis sugarcane bagasse. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 276, p. 1-7, 2019.

UZUN, K., ÇEVIK, E., ŞENEL, M., BAYKAL, A. Reversible immobilization of invertase on Cu-chelated polyvinylimidazole-grafted iron oxide nanoparticles. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1807–1816, 2013.

VEGA, R.; ZÚNIGA-HANSEN, M. E. The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. **Food Chemistry**, v. 173, p. 784–789, 2015.

VALERIO, S. G.; ALVES, J. S.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 462-468, 2013.

VERMA, R.; KUMAR, A.; KUMAR, S. Synthesis and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of thermostable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* X1. **Process Biochemistry**, v. 80, p. 72–79, 2019.

WAIFALKAR, P. P.; PARIT, S. B.; CHOUGALE, A. D.; SAHOO, S. C.; PATIL, P. S.; PATIL, P. B. Immobilization of invertase on chitosan coated γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles to facilitate magnetic separation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 482, p. 159-164, 2016.

WANG, M.; QI, W.; YU, Q.; SU, R.; HE, Z. Cross-linking enzyme aggregates in the macropores of silica gel: A practical and efficient method for enzyme stabilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 168-174, 2010.

WANG, R.; LI, H.; QIN, Z.; WANG, Y.; YANG, Q.; ZHANG, H.; LI, M. Antifungal activity and application of *Bacillus tequilensis* A13 in biocontrol of *Rehmannia glutinosa* root-rot disease. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 10, p. 1–12, 2023.

WANG, X.; ZHOU, G.; ZHANG, H.; DU, S.; XU, Y.; WANG, C. Immobilization and catalytic activity of lipase on mesoporous silica prepared from biocompatible gelatin organic template. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 357, p. 3027- 3032, 2011.

XIE, J.; ZHANG, Y.; SIMPSON, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. **Current Opinion in Food Science**, v. 43, p. 27-35, 2022.

XUE, Y.; PATEL, A.; SANT, V.; SANT, S. Semiquantitative FTIR Analysis of the Crosslinking Density of Poly(ester amide)-Based Thermoset Elastomers. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 301, p. 296-305, 2015.

ZDARTA, J.; MEYER, A.S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, p. 92, 2018.

ZHANG, G.; LI, S.; XU, Y.; WANG, J.; WANG, F.; XIN, Y.; SHEN, Z.; ZHANG, H.; MA, M.; LIU, H. Production of alkaline pectinase: A case study investigating the use of tobacco stalk with the newly isolated strain *Bacillus tequilensis* CAS-MEI-2-33. **BMC Biotechnology**, v. 19, p. 1–11, 2019.

ZHOU, H.; ZHU, H.; REN, Z.; LI, X.; ZHONG, J.; LIU, E. Efficacy of *Bacillus tequilensis* strain JN-369 to biocontrol of rice blast and enhance rice growth. **Biological Control**, v. 160, p. 104652, 2021.

ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n.9, p. 3894, 2013.

APÊNDICE

APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela 06 – Perfil cinético do extrato enzimático durante a imobilização sem funcionalização

Tempo (h)	Extrato enzimático (U/mL)			
	Controle	Sílica-gel	Biocarvão	PHB
1	2,66 ^a	2,20 ^a	2,16 ^a	2,37 ^a
2	2,73 ^{ab}	1,78 ^b	1,79 ^{ab}	2,60 ^a
3	2,78 ^b	1,79 ^{ab}	1,90 ^{ab}	2,16 ^a
4	2,43 ^c	1,14 ^{cd}	1,52 ^{ab}	1,53 ^b
5	2,54 ^d	1,23 ^c	1,49 ^{ab}	1,47 ^{bc}
6	2,03 ^e	0,72 ^{ef}	1,31 ^{ab}	1,29 ^{bc}
7	2,29 ^f	0,60 ^e	0,85 ^b	1,07 ^{bc}
8	2,14 ^g	0,73 ^{ef}	1,14 ^{ab}	1,01 ^c

*Letras iguais, não apresentam diferença significativa entre si (Teste de Tukey p<0,05)

Tabela 07 – Perfil cinético do extrato enzimático durante a imobilização com funcionalização

Tempo (h)	Extrato enzimático (U/mL)			
	Controle	GLU-SI	GLU-BIO	GLU-PHB
1	2,66 ^a	2,83 ^a	2,58 ^a	2,48 ^a
2	2,73 ^{ab}	2,42 ^b	2,37 ^a	2,35 ^a
3	2,78 ^b	2,20 ^{bc}	1,91 ^b	2,07 ^{ab}
4	2,43 ^c	2,09 ^{bc}	1,53 ^c	1,78 ^b
5	2,54 ^d	1,90 ^c	1,61 ^{bc}	1,68 ^b
6	2,03 ^e	1,96 ^c	1,11 ^d	1,66 ^b
7	2,29 ^f	1,39 ^d	1,00 ^{de}	1,11 ^c
8	2,14 ^g	0,81 ^e	0,66 ^e	0,68 ^d

*Letras iguais, não apresentam diferença significativa entre si (Teste de Tukey p<0,05)

Tabela 08 – Estabilidade de armazenamento

Dias	Imobilização			
	Enzima livre	GLU-SI	GLU-BIO	GLU-PHB
1	2,82 ^a	1,41 ^a	0,55 ^a	1,64 ^a
2	2,04 ^{ab}	1,70 ^a	0,55 ^a	1,62 ^a
3	1,75 ^{ab}	1,54 ^a	0,47 ^a	1,57 ^a
4	1,28 ^b	1,43 ^a	0,52 ^a	1,72 ^a
5	1,07 ^b	1,52 ^a	0,55 ^a	1,62 ^a
9	0,57 ^b	1,46 ^a	0,60 ^a	1,57 ^a

*Letras iguais, não apresentam diferença significativa entre si (Teste de Tukey $p < 0,05$)