

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

$\beta$ -D-frutofuranosidases de *Fusarium graminearum*:  
produção, purificação, imobilização e determinação  
das propriedades bioquímicas de enzimas solúveis e  
secas em *Spray dryer*

**HELOÍSA BRESSAN GONÇALVES**

Tese apresentada ao  
programa de pós-graduação  
em Biotecnologia, UNESP-  
Araraquara, como parte das  
exigências para obtenção do  
título de Doutor em  
Biotecnologia.

**ARARAQUARA/SP  
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

$\beta$ -D-frutofuranosidases de *Fusarium graminearum*:  
produção, purificação, imobilização e determinação  
das propriedades bioquímicas de enzimas solúveis e  
secas em *Spray dryer*

Heloísa Bressan Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Tese apresentada ao  
programa de pós-graduação  
em Biotecnologia, UNESP-  
Araraquara, como parte das  
exigências para obtenção do  
título de Doutor em  
Biotecnologia.

**ARARAQUARA/SP**  
**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

G635b      Gonçalves, Heloísa Bressan  
               $\beta$ -D-frutofuranosidases de *Fusarium graminearum*:  
              produção, purificação, imobilização e determinação das  
              propriedades bioquímicas de enzimas solúveis e secas em  
              spray dryer / Heloísa Bressan Gonçalves. –  
              Araraquara : [s.n], 2013  
              96 f. : il.

              Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
              Instituto de Química  
              Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

              1. Bioquímica. 2. Invertase. 3. Imobilização.

              4. Frutooligossacarídeos. I. Título.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

**“A mente que se abre a uma nova idéia,  
jamais retorna ao seu tamanho original”.**

Albert Einstein

**Dedico este trabalho aos meus pais,  
Benjamim e Nica, por apoiarem,  
exatamente, todos os passos e decisões da  
minha vida**

## **AGRADECIMENTOS**

**“Uma andorinha só, não faz verão”.**

(Ditado popular)

Agradeço a Deus, que me proporcionou a idéia, e também a coragem e a persistência para executá-la.

Agradeço ao Professor Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, que me acolheu para a realização de mais um trabalho e aceitou mais uma vez minhas idéias e minha teimosia, sendo muitas vezes companheiro de momentos desastrosos, e outras vezes criativos. Muito obrigada.

Ao Professor João Atílio Jorge, que me convenceu ao passo seguinte, o doutorado, que agora concluo. E também pelas sugestões e incentivos constantes ao trabalho, pela acolhida em meus momentos de desesperos.

A Professora Maria de Lourdes Teixeira Polizelli, pelos conhecimentos científicos, conselhos e amizade.

Ao professor Wanderley Pereira Oliveira e a Claudia Regina Fernandes Souza e a Professora Patrícia Gomes Cardoso e Patrícia Nirlana da Costa Souza que abriram as portas de seus laboratórios e me receberam de forma amável para a realização de parte do trabalho.

Aos técnicos Ricardo, Maurício e Mariana, pelo auxílio na preparação do material, equipamentos, e também pela convivência e amizade.

A meus pais, Nica e Benjamim e minha Avó Iolanda, que sempre apoiaram minhas decisões e opiniões, por mais malucas que pudessem parecer, me mostrando os melhores caminhos a seguir. Mesmo sem conhecimentos acadêmicos, seus conselhos foram sempre corretos e nunca me deixaram vagar sozinha.

Aos meus irmãos, Hortência e Fernando, e Hugo e Kamila que apóiam minhas decisões e nunca deixam de me amar.

À Telma Saito, por estar sempre presente, ao meu lado quando sinto a falta dos ausentes e por sua ajuda, amizade de todas as horas e companheirismo.

Ao Jeanitos, que sinto saudades diariamente. Por ser uma pessoa em quem me espelhar e por ser meu amigo de todas as horas.

Ao Andre Lucca, por seus ouvidos e pela amizade sincera. Também sentirei sua falta

À Josana e José Carlos, sempre, sempre disponíveis para me ajudarem nas dúvidas, acadêmicas ou não, e pela sincera amizade.

À Mariana, com quem dividi moradia e muitos bons momentos em Ribeirão Preto, por ajudar e participar de minhas decisões

Aos amigos: Alanina, Mariele, Alessandra, Karelen, Mateusico, Amanda, Vivian que passaram pelo laboratório e pela minha vida e deixaram saudades.

Às amigas que considero pessoas importantes na minha vida: Marina, Mariana, Juliana e Ana Paula, que mesmo distante sempre estiveram perto de mim e me apoiaram.

Aos amigos de laboratório: Berabita, Tati, Larissa, Vanessa, Gláucia e Gabi que passaram comigo estes anos de doutorado, por dividirem comigo, minha felicidade.

Aos colegas de laboratório, Gabriela, Vanessa, Paulo, Jorge, Carla, Caio, Luciana, Aline Polizelli, Aline Zorzetto, Juliana, Andrezza, Ana, Fernanda, Lili, Maller, Michele, Rose, Marita e pelos momentos de distração e conversas sérias e furadas.

Às secretárias da Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, pela atenção dedicada ao meu doutorado a distância. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Às amigas Angélica, Bel, Liana, Lidi e Karina com quem dividi minhas primeiras responsabilidades da vida adulta e com quem aprendi muitas coisas importantes fora do mundo acadêmico.

Ao grupo de corrida de rua, Botafogo Runners, que aos poucos e sem perceber, experimentei sensações entre o alívio e a euforia, me transformando em “atleta”, me proporcionando momentos agradáveis e descontraídos durante a fase estressante de redação da tese. Principalmente a Renata, Luana, Karina, Dani Aprile, Fabi pelo carinho e amizade, e pelos incentivos constantes e companheirismo em tantos quilômetros.

**Amigos, vocês estarão sempre em minhas lembranças por mais que os anos passem e os quilômetros nos distanciem.**

# **ÍNDICE DE GERAL**

|                                                                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE DE GERAL .....                                                                                                                | i    |
| ÍNDICE DE TABELAS .....                                                                                                              | v    |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                                                                              | viii |
| ABREVIATURAS E UNIDADES .....                                                                                                        | xii  |
| RESUMO .....                                                                                                                         | xiv  |
| ABSTRACT .....                                                                                                                       | xvi  |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                  | 1    |
| 1.1. $\beta$ -D-frutofuranosidases .....                                                                                             | 4    |
| 1.2. Processos fermentativos para produção de enzimas .....                                                                          | 6    |
| 1.2.1. Fermentação submersa (FSbm) .....                                                                                             | 7    |
| 1.2.2. Fermentação em Substrato Sólido .....                                                                                         | 8    |
| 1.3. Aplicações das $\beta$ -D-frutofuranosidases .....                                                                              | 9    |
| 1.4. Frutooligossacarídeos (FOS) .....                                                                                               | 10   |
| 1.5. Imobilização de $\beta$ -D-frutofuranosidases .....                                                                             | 12   |
| 1.6. Secagem do extrato bruto extracelular contendo $\beta$ -D-frutofuranosidase em<br><i>Spray Dryer</i> .....                      | 14   |
| 2. OBJETIVOS .....                                                                                                                   | 16   |
| 2.1. Geral .....                                                                                                                     | 17   |
| 2.2. Específicos .....                                                                                                               | 17   |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                          | 18   |
| 3.1. Seleção da linhagem produtora de $\beta$ -D-frutofuranosidases em Fermentação<br>Submersa .....                                 | 19   |
| 3.2. Manutenção dos Microrganismos .....                                                                                             | 20   |
| 3.3. Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidases em Fermentação submersa (FSBm) .....                                                  | 20   |
| 3.3.1. Composição do meio de cultura Khanna .....                                                                                    | 20   |
| 3.4. Obtenção das Enzimas Extracelular e Intracelular em FSbm .....                                                                  | 21   |
| 3.5. Determinação da Atividade Enzimática e Quantificação de Proteínas .....                                                         | 21   |
| 3.6. Otimização das condições de cultivo em FSbm para a produção de $\beta$ -D-<br>frutofuranosidase por <i>F. graminearum</i> ..... | 22   |
| 3.6.1. Plackett & Burman (PB) para 8 variáveis independentes .....                                                                   | 22   |
| 3.6.2. Planejamento fracionado $2^{5-1}$ .....                                                                                       | 23   |
| 3.6.3. Delineamento do composto central rotacional (DCCR) para 2 variáveis<br>independentes .....                                    | 24   |

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7. Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidases por <i>F. graminearum</i> em Fermentação Substrato Sólido (FSS) .....      | 25 |
| 3.7.1. Composição das soluções de sais .....                                                                              | 25 |
| 3.8. Obtenção da $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular em FSS .....                                                   | 26 |
| 3.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....                                                                      | 27 |
| 3.10. Purificação da $\beta$ -D-frutofuranosidase extra-celular produzida por <i>F. graminearum</i> .....                 | 27 |
| 3.11. Determinação da massa molecular .....                                                                               | 28 |
| 3.12. Caracterização da $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular purificada .....                                        | 28 |
| 3.12.1. Influência da temperatura e pH na atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica ....                                   | 29 |
| 3.12.2. Efeito de diferentes compostos químicos na atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica .....                         | 29 |
| 3.12.3. Determinação das constantes cinéticas .....                                                                       | 29 |
| 3.13. Secagem da $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular em <i>Spray Dryer</i> .....                                    | 30 |
| 3.13.1. Caracterização bioquímica dos extratos secos em <i>Spray Dryer</i> .....                                          | 31 |
| 3.14. Imobilização da $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular em agarose ativada em brometo de cianogênico (BrCN) ..... | 31 |
| 3.15. Imobilização da $\beta$ -D-frutofuranosidase extra-celular em suportes alternativos                                 | 32 |
| 3.15.1. Efeito da temperatura na estabilidade da $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada em suportes alternativos .....  | 33 |
| 3.16. Produção de frutuoooligossacarídeos pelos derivados contendo $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular .....        | 33 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                           | 34 |
| 4.1. Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidases em Fermentação Submersa (FSbm) .....                                       | 35 |
| 4.2. Otimização das condições de cultivo em FSbm para a produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular .....       | 39 |
| 4.2.2. Planejamento fracionado $2^{5-1}$ .....                                                                            | 42 |
| 4.2.3. Delineamento do composto central rotacional (DCCR) para 2 variáveis independentes .....                            | 45 |
| 4.3. Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase por <i>F. graminearum</i> em Fermentação em Substrato Sólido (FSS) .....    | 49 |
| 4.3.1. Efeito de diferentes soluções umidificantes na FSS sobre a produção de $\beta$ -D-frutofuranosidases .....         | 52 |
| 4.3.2. Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular em função do tempo de cultivo .....                          | 55 |

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4. Purificação da $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por <i>F. graminearum</i> .....                               | 57 |
| 4.5. Caracterização bioquímica da $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular purificada de <i>F. graminearum</i> .....    | 59 |
| 4.5.1. Influência da temperatura e do pH sobre a atividade frutofuranosidásica .                                         | 59 |
| 4.5.2. Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade frutofuranosidásica .....                               | 61 |
| 4.5.3. Parâmetros cinéticos .....                                                                                        | 64 |
| 4.6. Secagem da $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular em <i>Spray Dryer</i> .....                                    | 66 |
| 4.6.1. Efeito do tempo de armazenamento do extrato seco contendo $\beta$ -D-frutofuranosidase .....                      | 71 |
| 4.6.2. Caracterização bioquímica da atividade enzimática dos extratos secos em <i>Spray dryer</i> .....                  | 73 |
| 4.7. Imobilização da $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular em suportes alternativos..                                | 76 |
| 4.7.1. Reutilização da $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada .....                                                    | 77 |
| 4.7.2. Efeito da temperatura na estabilidade da $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada em suportes alternativos .....  | 78 |
| 4.8. Produção de frutooligossacarídeos (FOS) por $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada em suportes alternativos ..... | 82 |
| 5. CONCLUSÕES .....                                                                                                      | 84 |
| 6. REFERÊNCIAS.....                                                                                                      | 87 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Fungos filamentosos produtores de $\beta$ -D-frutofuranosidases.....                                                                                                                                                    | 6  |
| <b>Tabela 2.</b> Fungos filamentosos investigados quanto à produção de $\beta$ -D-frutofuranosidases.....                                                                                                                                | 19 |
| <b>Tabela 3.</b> Valores utilizados no delineamento de Plackett & Burman.....                                                                                                                                                            | 23 |
| <b>Tabela 4.</b> Valores utilizados no Planejamento fracionado $2^{5-1}$ .....                                                                                                                                                           | 24 |
| <b>Tabela 5.</b> Valores utilizados no DCCR.....                                                                                                                                                                                         | 24 |
| <b>Tabela 6.</b> Fungos testados quanto a produção de $\beta$ -D-frutofuranosidases em FSbm presentes na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da FFCLRP-USP.....                                                  | 36 |
| <b>Tabela 7.</b> Influência de diferentes fontes de carbono na produção de $\beta$ -D-frutofuranosidases por <i>Fusarium graminearum</i> .....                                                                                           | 38 |
| <b>Tabela 8.</b> Valores reais e codificados das variáveis independentes e as respostas obtidas para o delineamento experimental PB 16 para produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo <i>F. graminearum</i> ..... | 40 |
| <b>Tabela 9.</b> Efeitos obtidos para o delineamento PB 16 analisando a atividade $\beta$ -frutofuranosidásica como fator dependente.....                                                                                                | 41 |
| <b>Tabela 10.</b> Valores codificados das variáveis independentes e as respostas obtidas para planejamento fracionado $2^{5-1}$ para produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo <i>F. graminearum</i> .....        | 43 |
| <b>Tabela 11.</b> Efeitos obtidos para o planejamento fracionado $2^{5-1}$ analisando a atividade $\beta$ -frutofuranosidásica como fator dependente.....                                                                                | 44 |
| <b>Tabela 12.</b> Valores das respostas obtidas no DCCR para a produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase pelo fungo <i>F. graminearum</i> .....                                                                                           | 45 |
| <b>Tabela 13.</b> Análise de efeitos e interações para atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica no DCCR.....                                                                                                                             | 46 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 14.</b> Análise de variância para a o DCCR.....                                                                                                                                                                                                                                     | 47 |
| <b>Tabela 15.</b> Fontes de carbono/substratos utilizados para a produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase em FSS pelo fungo <i>Fusarium graminearum</i> .....                                                                                                                                 | 51 |
| <b>Tabela 16.</b> Purificação da $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular produzida por <i>F. graminearum</i> em FSS.....                                                                                                                                                                    | 59 |
| <b>Tabela 17.</b> Efeito de diferentes compostos sobre a atividade invertásica de <i>F. graminearum</i> produzida em FSS.....                                                                                                                                                                 | 64 |
| <b>Tabela 18.</b> Parâmetros cinéticos da $\beta$ -D-frutofuranosidase em diferentes substratos.....                                                                                                                                                                                          | 66 |
| <b>Tabela 19.</b> Efeito do tipo e da concentração dos adjuvantes utilizados para secagem em <i>Spray Dryer</i> do extrato bruto contendo $\beta$ -D-frutofuranosidase de <i>F. graminearum</i> sobre o rendimento do processo, a temperatura de saída do ar e vazão de alimentação real..... | 70 |
| <b>Tabela 20.</b> Caracterização físico química da $\beta$ -D-frutofuranosidase de <i>F. graminearum</i> seca em <i>spray dryer</i> e atividade enzimática pós secagem e após 1 ano de armazenamento.....                                                                                     | 72 |
| <b>Tabela 21.</b> Suportes testados para imobilização de $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular de <i>F. graminearum</i> .....                                                                                                                                                             | 77 |

# ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Reação de hidrólise da sacarose catalisada pela $\beta$ -D-frutofuranosidase (modificado de Guimarães, 2012).....                                                                                                                                                                              | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Síntese de frutooligossacarídeos a partir de molécula de sacarose (adaptado de Velázquez-Hernández <i>et al.</i> , 2009).....                                                                                                                                                                  | 11 |
| <b>Figura 3.</b> Superfície de resposta para a produção $\beta$ -D-frutofuranosidásica extracelular (U/mL) em função do tempo de cultivo e da concentração de farelo de trigo como fonte de carbono.....                                                                                                        | 48 |
| <b>Figura 4.</b> Fotomicrografias da FSS utilizando farelo de trigo como fonte de carbono/substrato (A) e crescimento de fungo <i>F. graminearum</i> sobre substrato sólido após 7 dias de cultivo a 30 °C (B).....                                                                                             | 52 |
| <b>Figura 5.</b> Produção $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo <i>F. graminearum</i> em FSS tendo farelo de trigo como substrato, umidificadas com diferentes soluções (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 7 dias a 30°C em ambiente com umidade relativa de 60%.....                     | 54 |
| <b>Figura 6.</b> Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo <i>F. graminearum</i> em FSS tendo farelo de trigo como substrato, umidificadas com água de torneira em diferentes proporções (m/v), sendo o cultivo realizado por 7 dias a 30°C em ambiente com umidade relativa de 60%..... | 55 |
| <b>Figura 7.</b> Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo <i>F. graminearum</i> em função do tempo de cultivo em FSS com farelo de trigo como substrato/fonte de carbono, umidificado com água de torneira (1:1, m/v) a 30 °C em ambiente com umidade relativa de 60%.....              | 56 |
| <b>Figura 8.</b> Perfis cromatográficos em colunas DEAE-celulose (A) e Sephacryl S200 (B) para a $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por <i>F. graminearum</i> em FSS utilizando farelo de trigo como fonte de carbono/substrato. Símbolos: (■) Absorbância 280 nm, (●) Atividade invertásica (U/mL).....    | 58 |
| <b>Figura 9.</b> Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE 12% (A) e PAGE 6% (B) para a $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular de <i>F. graminearum</i> corados com Comassie Brilliant-Blue R250.....                                                                                                               | 58 |

**Figura 10.** Determinação temperatura ótima aparente (A), pH ótimo aparente (B), estabilidades térmica (C) e ao pH (D) para  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *F. graminearum* em FSS. Símbolos: C) 30°C (■), 40°C (●), 50°C (▲), 60°C (▼), 70°C (◄), D) 0 min (□), 10 min (○), 30 min (Δ) e 50 min (▽).....61

**Figura 11.** Extrato bruto seco contendo  $\beta$ -D-frutofuranosidase utilizando amido capsul 2% (A), celulose microcristalina 2% (B) e trealose 2% (C). Mag = 40x (A, B e C) e fotografias macroscópicas (A', B' e C').....73

**Figura 12.** Determinação da temperatura ótima (A) e do pH ótimo (B) aparentes para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por *F. graminearum* em FSS seca em *Spray Dryer*. Símbolos: Enzima solúvel (►) e enzimas secas com celulose microcristalina 5% (■),  $\beta$ -ciclodextrina 5% (●), lactose 5% (▲), amido capsul 5% (▼), trealose 5% (◄).....75

**Figura 13.** Estabilidade térmica a 70°C (A) e a diferentes valores de pH por 1 hora (B) para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *F. graminearum* em FSS seca em *Spray Dryer*. Símbolos: Enzima solúvel (►) e enzimas secas com celulose microcristalina 5% (■),  $\beta$ -ciclodextrina 5% (●), lactose 5% (▲), amido capsul 5% (▼), trealose 5% (◄).....75

**Figura 14.** Reutilização dos suportes carregados com  $\beta$ -D-frutofuranosidase. Suportes: algodão (■); papel filtro (●); pano mutiuso Ballerina® (▲); bagaço de cana(▼); barbante (◄) e gase (►).....78

**Figura 15.** Estabilidade térmica a 60°C (A) e 70°C (B) da  $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada em suportes alternativos: algodão (■); papel filtro (●); pano multiuso Ballerina® (▲), bagaço de cana de açúcar (▼); barbante (◄); gase (►), BrCN (◆) e enzima solúvel (♦).....79

**Figura 16.** Estabilidade dos derivados ao pH 3,0 (A), 5,0 (B), 7,0 (C) e 9,0 (D) contendo a  $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada em suportes alternativos: algodão (■), papel filtro (●), pano multiuso Ballerina®(▲), bagaço de cana de açúcar (▼), barbante (◄), gase (►), enzima solúvel (♦) e BrCN (◆).....81

**Figura 17.** Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise da sacarose pela  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *F.graminearum* imobilizada em bagaço de cana de açúcar (6), barbante (7) e papel filtro (8), e atividade transfrutossilativa da enzima para a produção de FOS. Linhas: (1) 1-questose 1% (m/v), (2) nistose 1% (m/v), (3) sacarose 1% (m/v), (4) glicose 1% (m/v), (5) frutose 1% (m/v). Tempo de reação 6 horas a 50°C.....83

## **ABREVIATURAS E UNIDADES**

Abs – absorbância

BDA – batata dextrose ágar

BrCN – bromo cianogênio

DEAE - Diethylaminoethyl

EC – Enzyme Commission

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

FSbm – Fermentação Submersa

FSS – Fermentação em Substrato Sólido

$g$  – aceleração da gravidade

kDa – mil Daltons

$K_m$  – constante de Michaelis-Menten

m/v – massa por volume

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

qsp – quantidade suficiente para

rpm – rotações por minuto

SDS – duodecil sulfato de sódio

$T_{50}$  – tempo de meia vida

TLC – Thin Layer Chromatography

V – volts

$V_{m\acute{a}x}$  – velocidade máxima

U - unidade de atividade

$\lambda$  – comprimento de onda

## RESUMO

As  $\beta$ -D-frutofuranosidases, também conhecidas como invertases, são hidrolases que catalisam a hidrólise da sacarose em uma mistura equimolar de  $\beta$ -D-glicose e  $\beta$ -D-frutose que recebe o nome de açúcar invertido. Estas enzimas podem ser encontradas em diversos organismos, como vegetais, animais, bactérias, leveduras e em fungos filamentosos, sendo que os últimos merecem destaque pela alta produção enzimática e estabilidade. O objetivo deste trabalho foi estudar a  $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por *Fusarium graminearum* em Fermentação Submersa (FSbm) e Fermentação em Substrato Sólido (FSS) purificando-a e caracterizando-a bioquimicamente, além de submeter esta enzima a secagem em *Spray dryer* e imobilização em suportes de baixo custo. O fungo *F. graminearum* foi selecionado como bom produtor da enzima, com maiores níveis de produção encontrados quando cultivado em substrato sólido com farelo de trigo umidificado com água de torneira (1:1; m/v) por 9 dias (150 U/g substrato). A  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular obtida foi purificada 8,41 vezes com recuperação de 14%, obtendo-se em PAGE 7% uma única banda protéica, e em SDS-PAGE 12%, 2 bandas proteicas (94 kDa e 70 kDa) supondo-se um heterodímero, uma vez que a enzima nativa, estimada pela coluna de filtração Sephacryl S200, apresentou 159 kDa. A temperatura ótima de atividade ficou na faixa de 55-60°C e o pH ótimo 4,5. Foi totalmente estável em temperaturas entre 30°C e 50°C por 1 hora, e com atividade residual acima de 80% entre pH 3,0 e 8,0 por 30 minutos. A  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular foi ativada pelos íons  $Mn^{2+}$  e  $K^+$ . A enzima foi capaz de hidrolisar sacarose e rafinose, mas não a inulina, com maior afinidade para a rafinose, com  $K_m$  de 21,16 mM e  $V_{max}$  maior quando utilizada a sacarose como substrato (1639,34 U/mg proteína). O extrato bruto extracelular obtido em FSS contendo a enzima extracelular foi seco, de forma eficaz e com alto rendimento, em *Spray dryer* utilizando carboidratos como adjuvantes para proteção térmica (amido, celulose microcristalina, trealose,  $\beta$ -ciclodextrina e lactose). A enzima após secagem foi mais estável quanto a temperatura e ao pH, além de reter o tempo útil de armazenamento. Também foi feita a imobilização da  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular em suportes alternativos de baixo custo (tela de polietileno, algodão, barbante, EVA, pano multiuso Ballerina<sup>®</sup>, papel filtro e gase). Todos os derivados apresentaram aumento no tempo de exposição a altas temperaturas e pH desfavoráveis, além da atividade de transfrutosilação, sintetizando frutooligosacarídeos como 1-questose e nistose. Portanto, conclui-se que as  $\beta$ -D-frutofuranosidases produzidas por *F. graminearum* possuem bom potencial biotecnológico e são promissoras para o emprego industrial, atuando em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de serem produzidas utilizando fontes de nutrientes de baixo custo, e ainda por possuir a capacidade de transfrutosilação aumentando ainda mais da importância do estudo desta proteína.

# **ABSTRACT**

The  $\beta$ -D-fructofuranosidases, also known as invertase, are hydrolases which catalyze the hydrolysis of sucrose in an equimolar mixture of  $\beta$ -D-glucose and  $\beta$ -D-fructose that is called invert sugar. These enzymes can be found in many organisms, such as plants, animals, bacteria, yeasts and filamentous fungi, and the latter must be highlighted for high enzyme production and stability. The objective of this work was to study the  $\beta$ -D-fructofuranosidase produced by *Fusarium graminearum* in Submerged Fermentation (SbmF) and Solid Substrate Fermentation (SSF) purifying and characterizing them biochemically, and submit this enzyme to drying using Spray dryer and immobilization on low cost supports. The *F. graminearum* was selected as a good enzyme producing strain, with higher production levels found when the fungus was grown on wheat bran as solid substrate moistened with tap water (1:1, w/v) for 9 days (150 U/g substrate). The extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase obtained was purified 8.41-fold with recovery of 14%. A single protein band was obtained in 7% PAGE, and two protein bands (94 kDa and 70 kDa) in 12% SDS-PAGE indicating a heterodimeric structure, since the native enzyme, estimated by gel filtration using Sephacryl S200 column presented 159 kDa. The optimum temperature for activity was 55-60°C and optimum pH 4.5. It was completely stable at temperatures between 30°C and 50°C for 1 hour, and residual activity above 80% between pH 3.0 and 8.0 for 30 minutes was observed. This  $\beta$ -D-fructofuranosidase was activated by  $Mn^{2+}$  and  $K^+$ . The enzyme was able to hydrolyze sucrose and raffinose, but not inulin, with a higher affinity for raffinose, with a  $K_m$  of 21.16 mM and  $V_{max}$  was higher when sucrose was used as substrate (1639.34 U/mg protein). The crude extract containing the extracellular enzyme was dried in an effective and high performance way using Spray dryer using carbohydrates as heat shields (starch, microcrystalline cellulose, trehalose,  $\beta$ -cyclodextrin and lactose). The enzyme after drying was more stable to temperature and pH, as well as its usable storage was increased. The extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase was also immobilized in low cost alternative supports (polyethylene fabric, cotton, twine, EVA, Ballerina® multipurpose cloth, filter paper and gauze). All derivatives showed an increase in time of exposure to high temperatures and unfavorable pH. In addition, the transfructosilation activity to produce fructooligosaccharides as 1-kestose and nystose was observed for all derivatives. Therefore, it is concluded that  $\beta$ -D-fructofuranosidases produced by *F. graminearum* have good biotechnological potential and are promising for industrial employment, with activity in a wide range of pH and temperature, and they are produced using low cost nutrients sources, and yet they have the transfructosilation ability, increasing the importance of the study of this protein.

# **1. INTRODUÇÃO**

Ainda que algumas biomoléculas possam ser obtidas de fontes vegetais e animais, os microrganismos merecem destaque por apresentarem vantagens econômicas. Microrganismos podem ser cultivados em grandes quantidades em períodos de tempo relativamente curtos, por diferentes métodos de fermentação, produzindo quantidades abundantes e regulares de produto. Adicionalmente, as moléculas produzidas por microrganismos, de modo geral, são mais estáveis do que as análogas obtidas de animais e vegetais, e podem ser manipulados geneticamente aumentando ainda mais a produção da molécula desejada (Lekha e Lonsane, 1997).

Dentre os microrganismos, os fungos têm se destacado na produção de diferentes biomoléculas, dentre elas, as enzimas, que podem ser biotecnologicamente atrativas, uma vez que torna o processo industrial mais rápido, barato e ecologicamente correto (Krishna, 2005). A aplicação em diversas áreas como, por exemplo, nas indústrias de alimentos, bebidas e farmacêuticas, entre outras, permite a redução dos gastos de energia e do tempo de produção, além de não gerarem subprodutos tóxicos (Said e Pietro, 2004; Sanjay e Sugunan, 2005).

Estes biocatalisadores têm a função natural de degradar macromoléculas presentes no meio ambiente, como a celulose, o amido, a lignina e as proteínas para que seus produtos possam ser absorvidos e metabolizados como nutrientes. São utilizadas desde a antiguidade na obtenção de alimentos e flavorizantes a partir da proteína da soja e na bebida sakê, a partir do arroz (Bon *et al.*, 2008). O uso controlado de enzimas pode levar ao melhoramento do sabor, cor, textura, aparência e valor nutricional dos alimentos (Bon *et al.*, 2008).

As enzimas são catalizadores que atuam nas rotas metabólicas dos seres vivos sobre condições ótimas. Algumas propriedades das enzimas fazem com que estas sejam melhores aproveitadas que os catalisadores químicos tradicionais, tal como a

grande eficiência catalítica, considerando que o principal objetivo de qualquer processo de biotransformação é obter uma elevada conversão de substrato em produto a um curto espaço de tempo. Além dessa característica, as enzimas apresentam uma elevada especificidade e seletividade dependendo da sua função metabólica, atuando sobre condições suaves de reação como pressão, pH e temperatura. Adicionalmente, minimizam os danos ao meio ambiente por se tratarem de compostos biológicos que podem ser facilmente degradados (Silva, 2009).

São conhecidas mais de 2000 enzimas e, apesar da excelente propriedade catalítica que apresentam, pouco mais de 400 são exploradas comercialmente, sendo a maioria enzimas extracelulares e de origem microbiana. A evolução metabólica das enzimas seguiu um processo de otimização segundo a função que desempenha fisiologicamente nos organismos, sem considerar a necessidade de utilização *in vitro* para aplicações industriais. Desta forma, muitas enzimas não são suficientemente estáveis as condições de reações desejadas, tais como a agitação mecânica, aos solventes, as altas temperaturas, pH extremos e a necessidade de cofatores, assim como a inibição por elevadas concentrações de substratos e produtos. Em função dessas adversidades, a tecnologia enzimática surge como uma ferramenta importante que tem como objetivo superar todos os inconvenientes que impeçam a aplicação destas proteínas em processos industriais (Klibanov, 1983).

Considerando os processos biotecnológicos, os fungos e seus produtos estão presentes na panificação, fabricação da cerveja e do álcool, produção de antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, produtos farmacêuticos, processamento de frutas e legumes, clarificação de sucos de frutas, extração de cafés e na produção de adoçantes. Dentre as diferentes enzimas conhecidas, tais como, tanases, fitases, trealases, xilanases, amilases e celulasas, as  $\beta$ -D-frutofuranosidasas merecem

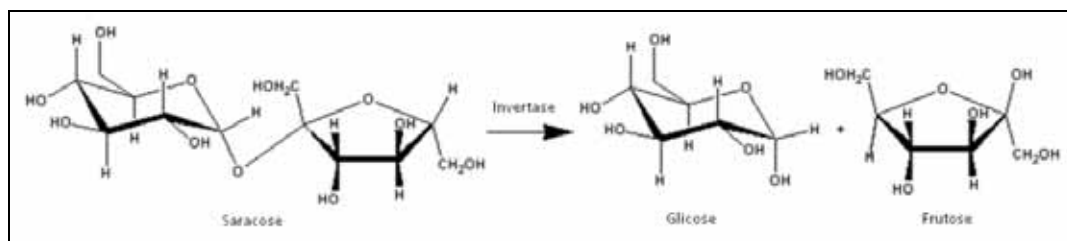
destaque. Estas hidrolases compreendem um grupo de enzimas de origem animal, vegetal e microbiana pertencente à família GH32 (glicosídeo hidrolases). As inulinases (EC 3.2.1.7), levanases (EC 3.2.1.65) e as  $\beta$ -D-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) são algumas das enzimas que compõem este grupo (<http://brenda-enzymes.info/>), e evidenciam-se por sua vasta empregabilidade industrial e principalmente por apresentar uma ampla possibilidade de novas aplicações.

### **1.1. $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASES**

As  $\beta$ -D-fructofuranosidases (FFases), também conhecidas como invertases, são enzimas que podem ser encontradas no interior das células ou serem secretadas para o meio, sendo uma das primeiras hidrolases a serem estudadas. Em 1828, sua atividade foi identificada pela primeira vez ao ser observado que a levedura de panificação fermentava a sacarose em meio aquoso (Barros, 1990). Em 1913 ela foi utilizada como enzima modelo para estudos de catálise enzimática por Michaelis-Menten e começou a ser comercializada, sendo uma enzima que pode ser utilizada em diversos processos industriais (Vitolo, 2004). De modo geral, essa enzima possui atividade de hidrólise sobre sacarose em concentrações abaixo de 10% (m/v), enquanto que em concentrações acima de 20% (m/v) de sacarose possui atividade transfrutossilativa (Rubio, *et al.*, 2002), com excessão a  $\beta$ -D-fructofuranosidase de *A. phoenicis* que apresentou transfrutossilação mesmo abaixo de 10% (m/v) (Aziani *et al.*, 2012)

Estas hidrolases catalisam a hidrólise da sacarose em uma mistura equimolar de  $\beta$ -D-glicose e  $\beta$ -D-frutose (figura 1) (Álvaro-Benito, 2007) que recebe o nome de açúcar invertido, cujas vantagens centram-se principalmente nos fatos de possuir índice de

dulçor 20% superior ao de uma solução de sacarose de concentração equivalente e de seus constituintes não cristalizarem quando usado em concentração elevada (Bayramoglu *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Reação de hidrólise da sacarose catalisada pela β-D-frutofuranosidase (modificado de Guimarães, 2012).

As β-D-frutofuranosidases podem ser encontradas em diversos organismos. Nos vegetais auxiliam no transporte do floema, que é um vaso condutor rico em sacarose, e possui uma alta atividade β-frutofuranosidásica, importante para prover a chegada dos monossacarídeos às células receptoras (Patrick, 1997). Também podem ser encontradas em bactérias como *Escherichia coli*, em leveduras como em *Saccharomyces cerevisiae* (Arruda e Vitolo, 1999) e *Rhodotorula glutinis* (Rubio *et al.*, 2002), e em fungos filamentosos como em *Paecilomyces variotii* (Giraldo *et al.*, 2012), *Aspergillus caepitosus* (Alegre *et al.*, 2009) e *Aspergillus ochraceus* (Guimarães *et al.*, 2007) entre outros (Tabela 1), sendo que em cada microrganismo a produção enzimática apresenta suas particularidades, com pequenas alterações na temperatura de incubação, pH do meio de cultivo, fonte de carbono e influência de sais na composição do meio de cultura. De acordo com essas alterações, isoformas de β-D-frutofuranosidases que diferem quanto ao seu pH ótimo de atividade, podendo ser ácidas, neutras e alcalinas podem ser obtidas (Winter e Hubber, 2000). As funções específicas das diferentes isoformas de β-D-frutofuranosidases ainda não estão bem

esclarecidas, mas parece que elas estão relacionadas à entrada de sacarose em diferentes vias de utilização (Sturm, 1999).

**Tabela 1.** Fungos filamentosos produtores de  $\beta$ -D-frutofuranosidases.

| <b>Fungos</b>                       | <b>Referências</b>                                                                                                       |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i>           | Mátrai <i>et al.</i> , 2000.                                                                                             |
| <i>Aspergillus japonicus</i>        | Chen e Liu, 1996.                                                                                                        |
| <i>Aspergillus nidulans</i>         | Chen <i>et al.</i> , 1996.                                                                                               |
| <i>Aspergillus niger</i>            | Romero-Gómez <i>et al.</i> , 2000; Aranda <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2005; Reddy <i>et al.</i> , 2010. |
| <i>Aspergillus nomius</i>           | Mátrai <i>et al.</i> , 2000.                                                                                             |
| <i>Aspergillus oryzae</i>           | Poonawalla <i>et al.</i> , 1965; Kurakake <i>et al.</i> , 2008.                                                          |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Almeida <i>et al.</i> , 2005.                                                                                            |
| <i>Colletotrichum falcatum</i>      | Poonawalla <i>et al.</i> , 1965.                                                                                         |
| <i>Fusarium oxysporum</i>           | Onodera e Maruyama, 1979; Nishizawa <i>et al.</i> , 1980.                                                                |
| <i>Fusarium solani</i>              | Bhatti <i>et al.</i> , 2006.                                                                                             |
| <i>Neurospora sitophila</i>         | Dixon e Fogarty, 1974.                                                                                                   |
| <i>Neurospora crassa</i>            | Poonawalla <i>et al.</i> , 1965.                                                                                         |
| <i>Penicillium chrysogenum</i>      | Poonawalla <i>et al.</i> , 1965.                                                                                         |
| <i>Termitomyces clypeatus</i>       | Chowdhury <i>et al.</i> , 2009.                                                                                          |

## **1.2. PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS**

Os fungos filamentosos podem produzir  $\beta$ -D-frutofuranosidases quando inoculados em fermentação submersa (FSbm) (Guimarães *et al.*, 2009) ou também,

fermentação em substrato sólido (FSS) (Giraldo *et al.*, 2012; Alegre *et al.*, 2009). A FSS é caracterizada pelo desenvolvimento do microrganismo em substrato, sem fase líquida livre, que atua como suporte físico e muitas vezes, serve como fonte de nutrientes. Na cultura submersa o microrganismo fica em suspensão em um meio de cultura líquido no qual estão dissolvidos ou suspensos todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do organismo (Vandenberghe *et al.*, 2000).

### **1.2.1. Fermentação submersa (FSbm)**

A fermentação submersa é o processo de produção de enzimas mais utilizado industrialmente. Neste processo a célula desenvolve-se no meio de cultivo contendo o substrato, geralmente sob agitação. As fermentações geralmente são realizadas em biorreatores aerados e agitados, e os parâmetros operacionais, tais como pH, temperatura, agitação, consumo de O<sub>2</sub> e formação de CO<sub>2</sub>, são controlados rigidamente (Bon *et al.*, 2008).

Este processo fornece algumas vantagens, tais como a facilidade do controle de variáveis físico-químicas, a maior eficiência na absorção de nutrientes e excreção de metabólitos pelas células, a alta produção de micélios em ambiente compacto e controlado, e em um tempo de incubação bastante reduzido, devendo-se considerar ainda, chances menores de contaminação se condições assépticas para o inóculo forem corretamente utilizadas (Xiao *et al.*, 2004). Porém, oferece algumas desvantagens, tais como os elevados custos para a manutenção da agitação e da aeração, e também a formação de espuma (Bon *et al.*, 2008).

A operação do processo de fermentação submersa pode ser por batelada simples, na qual uma suspensão celular é adicionada ao meio de cultivo e não ocorre a adição ou retirada de meio, porém, as concentrações de nutrientes diminuem e

aumentam as de produtos e número de células. Outro processo pode ser utilizado para contornar esse problema, sendo que alguns nutrientes são adicionados de forma intermitente ou contínua ao biorreator, permitindo o crescimento celular e a formação de produtos, sem a retirada de material. Este processo é denominado batelada alimentada, sendo muito utilizado para a produção de enzimas extracelulares, tais como celulasas, amilases e proteases. Já a batelada contínua consiste na contínua alimentação com nutrientes e retirada de produtos. Este sistema é vantajoso pela possibilidade de se operar o sistema por longos períodos (Bon *et al.*, 2008).

A produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase por microrganismos pode ser influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio e outros componentes minoritários do meio de cultivo, pela temperatura, pH inicial do meio e tempo de crescimento do microrganismo. A otimização desses parâmetros para se produzir esta enzima pode ser feita testando-se individualmente cada uma das condições ou de maneira conjunta, analisando-se vários parâmetros simultaneamente, através de experimentos de planejamento fatorial.

### **1.2.2. Fermentação em Substrato Sólido**

A fermentação em substrato sólido foi definida como um processo em que o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem na superfície de substratos sólidos na ausência de água livre (Bon *et al.*, 2008; Singhanian *et al.*, 2009). A água livre, indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida (Soccol, 1994). Os substratos utilizados são geralmente produtos agrícolas, tais como arroz, trigo, cevada, milho e soja, além de resíduos agroindustriais como o bagaço de cana de açúcar, farelo de

trigo, farelo de arroz, farelo de milho, sabugo de milho, casca de arroz, resíduos de maçã, banana e chás, (Pandey *et al.*, 2000; Bon *et al.*, 2008; Guimarães, 2012).

A FSS pode apresentar vantagens que não são possíveis em FSbm, principalmente pela simplicidade na composição dos meios de cultura, alta produtividade e concentração elevada do produto de interesse e diminuição de possíveis contaminantes, aumentando o interesse para esse tipo de fermentação (Ashokkumar *et al.*, 2001). Outra vantagem é o baixo custo de produção, já que os resíduos agroindustriais são os substratos preferidos dos microrganismos fermentadores (Sageentha *et al.*, 2004).

### **1.3. APLICAÇÕES DAS $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASES**

As  $\beta$ -D-frutofuranosidases já têm sido utilizadas comercialmente na fabricação de colutórios para a higiene bucal e também na produção do xarope de açúcar invertido, sendo este muito empregado na confecção de bombons com centro parcial ou totalmente liquefeitos, já que este açúcar não cristaliza, mesmo em altas concentrações. Outra aplicação para esta enzima é a utilização para a hidrólise de açúcares como a rafinose, gentianose e inulina (Rubio *et al.*, 2002)

Nas indústrias sucro-alcooleiras, pode ser utilizada para a remoção da sacarose de resíduos líquidos, como em melaço de cana de açúcar ou beterraba, evitando assim a cristalização do açúcar durante o armazenamento do melaço. As  $\beta$ -D-frutofuranosidases também podem participar do processo de produção do etanol, aumentando a concentração de açúcares redutores nos meios de cultura, fazendo propagar microrganismos que não fermentam a sacarose (Vitolo, 2004).

Existe ainda, uma ânsia pelo emprego dessas  $\beta$ -D-frutofuranosidases para a produção dos frutooligossacarídeos, que são açúcares não convencionais, não

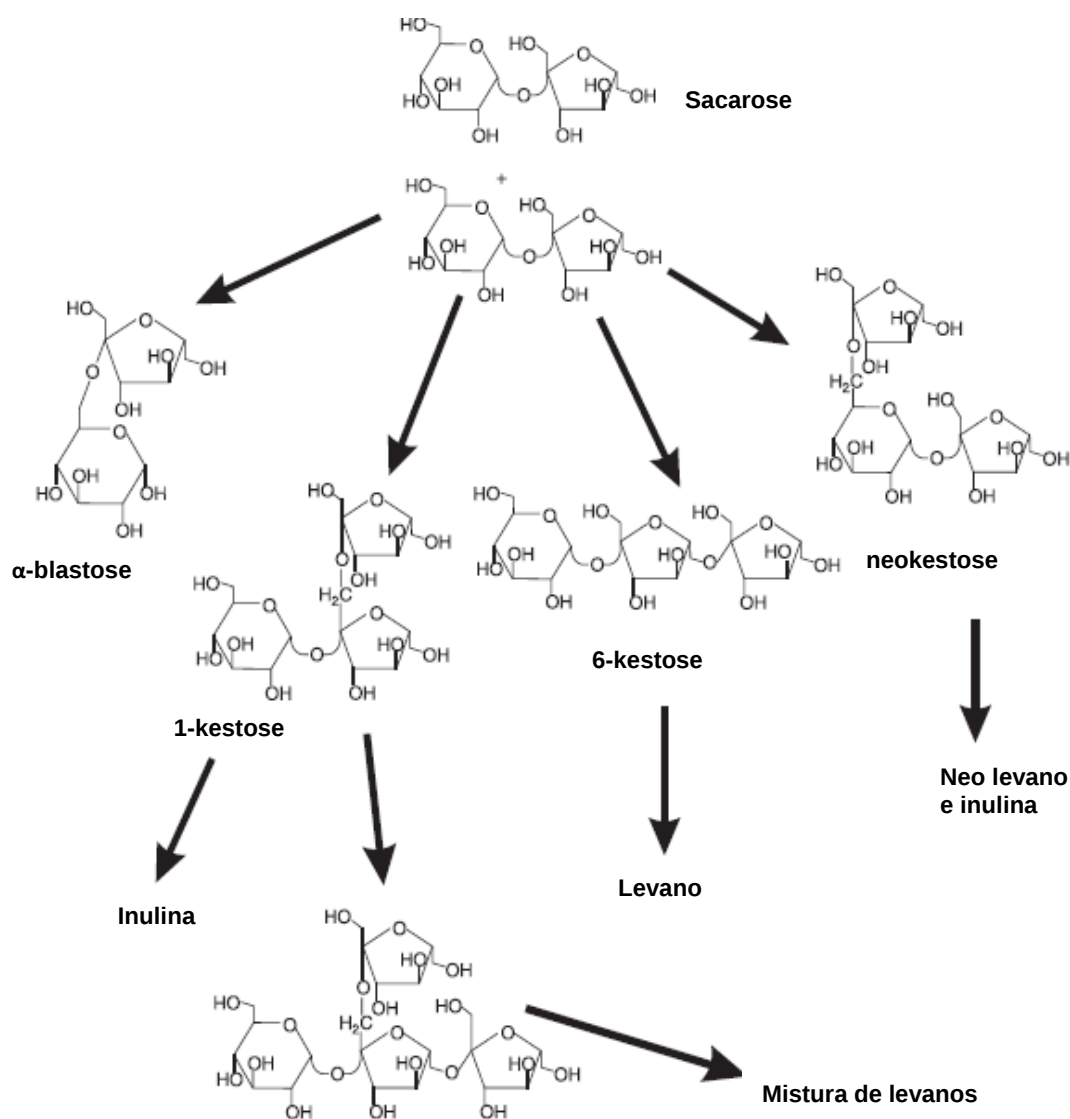
metabolizados pelo organismo humano e também, com baixas calorias. Apresentam importância na indústria de açúcar devido as suas excelentes características funcionais prebióticas, atraindo maior atenção por esta característica do que pela sua doçura (Fernández *et al.*, 2004).

#### **1.4. FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)**

Os FOS são oligômeros de frutose formados a partir de uma reação de transfrutosilação, onde ocorre a transferência de unidades frutossil para a sacarose, formando uma molécula composta por uma unidade de sacarose e uma ou mais de frutose (Figura 2). Os principais FOS são nistose (GF2), que possui uma unidade de frutose; 1-questose (GF3), com duas unidades de frutose; e frutofuranosilnistose (GF4), com três unidades de frutose ligadas a sacarose (Yun, 1996; Guimarães, 2012). Os FOS são açúcares não convencionais encontrados naturalmente em alimentos como cebola, alho e beterraba, e não podem ser hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais. São considerados alimentos funcionais de baixo valor calórico que promovem efeitos reguladores na microbiota intestinal (Mussato e Mancilha, 2007; Prata *et al.*, 2010; Guimarães, 2012).

Para a síntese deste oligômeros, duas enzimas podem ser utilizadas, as frutossiltransferases com atividade única transfrutossilativa e também as  $\beta$ -D-frutofuranosidases microbianas, que além da atividade hidrolítica da sacarose, ainda podem apresentar atividade de transfrutosilação, na presença de sacarose em concentrações a partir de 10% (m/v) (Aziani *et al.*, 2002) catalisando a síntese de frutooligossacarídeos (FOS), geralmente com 2-4 unidades de frutose unidas por ligações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1 ou 2 $\rightarrow$ 6) glicosídicas com uma glicose terminal (Sangeetha *et al.*, 2005).

Os FOS são considerados prebióticos e possuem um interesse particular por suas excelentes propriedades funcionais e biológicas. Baixas calorias e não carcinogênicos são características bastante visadas atualmente. Ainda estimulam o crescimento de bifidobactérias da flora intestinal, e contribuem para a prevenção do câncer de colo do útero e redução dos índices de colesterol, fosfolípidos e triglicerídeos no soro sanguíneo (Cuervo *et al.*, 2004.; Sangeetha *et al.*, 2005). Os FOS são empregados como componentes em alimentos funcionais e podem custar cerca de US\$ 200/Kg (Godshall, 2007).



**Figura 2.** Síntese de frutooligossacarídeos a partir de molécula de sacarose (adaptado de Velázquez-Hernández *et al.*, 2009)

A ingestão de 12,5g/dia de FOS por 3 dias produziram efeitos significativos de queda na contagem de anaeróbios totais nas fezes, levando ao aumento da colonização de bifidobactérias (Bouhnik *et al.*, 1996) e ainda colabora eficientemente na diminuição de patologias associadas ao alto número destas bactérias intestinais, como acne, cirrose hepática, constipação, intoxicação alimentar, diarreia associada a antibióticos, problemas digestivos, alergias e intolerâncias a alimentos e gases intestinais (Passos e Park, 2003).

Estima-se que na Holanda consuma-se entre 2 a 12g de FOS por dia per capita (Hartemink *et al.*, 1997) e que no Japão exista um consumo diário estimado em 13,7mg/ kg de peso corpóreo/dia (Spigel *et al.*, 1994). O consumo aceitável diário de FOS no Japão é de 0,8 g por kg de peso corpóreo por dia, e é neste país que encontra-se o maior mercado comercial de FOS, com um volume comercializado de mais de 400 ton. Em 1990 de acordo com Yun (1996), foi mostrado que os oligossacarídeos são um dos produtos mais populares como alimentos funcionais naquele país, sendo o valor gasto com a produção de diversos FOS cerca de US\$ 46 milhões em 1990.

### **1.5. IMOBILIZAÇÃO DE $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASES**

O emprego industrial de enzimas produzidas por fungos é bastante interessante e apresenta um mercado bastante promissor, mas esbarra em várias dificuldades, mesmo quando produzidas em altas quantidades e com bons níveis de atividade catalítica. Uma dessas dificuldades é a sua baixa estabilidade em soluções aquosas, uma vez que a água facilita degradações físicas e/ou químicas destas.

Por isso, o emprego da enzima imobilizada em suportes pode ser eficiente, facilitando a aplicação dessas proteínas comercialmente, favorecendo seu uso frente a adversidades como agitação mecânica, presença de solventes, temperaturas elevadas

e pH extremos, os quais interferem na estabilidade da enzima (Klibanov, 1983). A ligação covalente a polímeros reativos hidrofílicos, solúveis ou insolúveis em água, é a técnica ideal para enzimas comerciais evitando a perda da atividade e contaminação do produto pela liberação da enzima devido a reutilização desta (Manecke e Goldstein, 1976). Uma variedade de suportes com grupos aminos pendentes podem ser utilizados para imobilizar enzimas. Materiais contendo celulose, por exemplo, são utilizados para ligação covalente com enzimas por sua estabilidade físico-química e também pela facilidade com que podem ser modificados (Godbole *et al.*, 1990). Para imobilização da enzima em tais suportes, eles devem ser convertidos em trocadores aniônicos, pelo contato com polietilenimina (D'Souza *et al.*, 1983). Enzimas com baixo pI, como a  $\beta$ -D-frutofuranosidase, podem se ligar covalentemente a superfície do suporte-PEI por adsorção seguida por ligação cruzada (Yamazaki *et al.*, 1984).

Outro tipo de imobilização de proteína é do tipo reversível por adsorção iônica. A ligação da proteína com o suporte é do tipo eletrostática (ligação iônica e pontes de hidrogênio) onde essas interações são individualmente fracas. No entanto, são abundantes suficientemente para gerar uma união estável entre a enzima e o suporte, e pode constituir um protocolo conveniente para a imobilização de algumas enzimas industriais. A reversibilidade de um derivado implica na possibilidade de obtenção de uma completa desorção da enzima, com a aplicação de uma força iônica alta, quando a atividade do catalisador não é rentável. O suporte pode ser recuperado livre de proteínas e voltar a ser utilizados em novas imobilizações (Silva, 2009).

A utilização da enzima imobilizada em suportes pode ser eficiente, principalmente quando proteínas com interesses industriais apresentam limitações por falta de estabilidade sobre as condições exigidas na sua manipulação, e também quando se faz necessário a recuperação e a reciclagem do biocatalizador. Uma vez

imobilizadas, as enzimas, como as  $\beta$ -D-frutofuranosidases, deixam de ser um catalisador solúvel e passam a apresentar algumas vantagens que só um catalisador heterogêneo possui, tais como a possibilidade de reutilização ou o uso contínuo, fácil separação da mistura de reação, possibilidade de modulação das propriedades catalíticas, prevenção de contaminação do produto com proteínas indesejáveis, prevenção de uma contaminação microbiana e uma possível estabilização da estrutura tridimensional da enzima (Silva, 2009).

#### **1.6. SECAGEM DO EXTRATO BRUTO EXTRACELULAR CONTENDO $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EM *SPRAY DRYER***

Um outro desafio na produção de enzimas comerciais, é a manutenção de sua estabilidade durante o processo de embalagem, armazenagem, expedição e longo prazo de prateleira (Millqvist-Fureby *et al.*, 1999). Apesar das formulações líquidas serem econômicas e convenientes nos processos de produção e extração, as proteínas em solução são susceptíveis de degradação e desnaturação (Arakawa *et al.*, 2001). Formulações sólidas secas foram desenvolvidas para melhorar a estabilidade da enzima (Yoshii *et al.*, 2005), o armazenamento e transporte (Namaldi *et al.*, 2006). A tecnologia de *Spray dryer* tem sido amplamente utilizada para a secagem de materiais sensíveis ao calor, incluindo enzimas e alimentos, para obtenção de produtos em pó diretamente a partir do líquido (Nijdam e Langrish, 2005). De acordo com Carpenter e Crowe (1989), proteínas podem ser secas em *Spray dryer* sem perdas apreciáveis de suas funções, se forem adicionados à solução inicial agentes estabilizantes como carboidratos ou outros polímeros, pode-se obter proteção da proteína de possíveis danos causados devido as altas temperaturas proporcionadas pelo processo de secagem.

Considerando a urgência de pesquisas inovadoras e aprimoramento de dados referentes as  $\beta$ -D-frutofuranosidases produzidas por fungos filamentosos, novas investigações fazem-se necessárias para um melhor entendimento e aproveitamento desta enzima. Além disso, o conhecimento de tais propriedades é substancial na busca de produtos de interesse industrial obtidos pela ação desta enzima, bem como a redução de custos de produção pela utilização de produtos agroindustriais.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. GERAL

O presente trabalho teve por objetivo selecionar uma cepa fúngica produtora de  $\beta$ -D-frutofuranosidases, estudando as condições de otimização para a produção destas enzimas sob FSbm e FSS, purificando-as, imobilizando-as e caracterizando-as, além de submetê-las ao processo de secagem em *Spray dryer*.

## 2.2. ESPECÍFICOS

- Selecionar, dentre as linhagens fúngicas presentes na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, da FFCLRP-USP a melhor produtora de  $\beta$ -D-frutofuranosidases;
- Depois de selecionada a melhor linhagem produtora, otimizar as condições de cultivo em fermentações submersa (FSbm) e em fermentação de substrato sólido (FSS) para a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase;
- Purificar a  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular produzida em FSS;
- Determinar temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e ao pH e influência de íons e outros compostos na atividade enzimática das  $\beta$ -D-frutofuranosidases;
- Secar a enzima extracelular utilizando equipamento *Spray dryer* e caracterizá-la quanto a temperatura, pH e tempo de armazenamento.
- Imobilizar a  $\beta$ -D-frutofuranosidade extracelular produzida em FSS utilizando suportes alternativos de baixo custo e caracterizar o derivado quanto a temperatura e pH de atividade.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. SELEÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Vinte e quatro fungos presentes na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da FFCLRP-USP foram testados quanto a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidases utilizando Fermentação Submersa (FSbm) em meio Khanna (Khanna *et al.*, 1995), adicionado inicialmente de farinha de centeio 1% (m/v) como fonte de carbono por 72 horas a 30°C e 100 rpm tendo com controles positivos, as cepas já descritas como produtoras testadas neste mesmo laboratório, *Aspergillus phoenicis* (Rustiguel *et al.*, 2010) e *Aspergillus niveus* (Guimarães *et al.*, 2009) (vide Tabela 2).

**Tabela 2.** Fungos filamentosos investigados quanto à produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidases.

| Fungos filamentosos |                                  |    |                              |
|---------------------|----------------------------------|----|------------------------------|
| 1                   | <i>Aspergillus phoenicis</i>     | 13 | <i>Aspergillus niger</i>     |
| 2                   | <i>Aspergillus niveus</i>        | 14 | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| 3                   | <i>Trichoderma harzianum</i>     | 15 | Cinza 05C*                   |
| 4                   | <i>Aspergillus versicolor</i>    | 16 | Verde H03*                   |
| 5                   | <i>Penicillium herquei</i>       | 17 | Doce rosa*                   |
| 6                   | <i>Cladosporium</i>              | 18 | LH 05C*                      |
| 7                   | <i>Colletotricum</i>             | 19 | Cilagem 05*                  |
| 8                   | <i>Fusarium graminearum</i>      | 20 | Verde claro 07*              |
| 9                   | <i>Aspergillus aculeatus</i>     | 21 | Bege H01*                    |
| 10                  | <i>Aspergillus flavus</i>        | 22 | Cinza escuro H01*            |
| 11                  | <i>Aspergillus parasiticus</i>   | 23 | Preto VI*                    |
| 12                  | <i>Aspergillus thermomutatus</i> | 24 | Amarelo vinhaça*             |

\* Microrganismos não identificados

### **3.2. MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS**

As cepas foram mantidas em estufa a 27°C por um período de 6 a 8 dias. Posteriormente, foram armazenadas em refrigerador a 4°C até a utilização. Os repiques foram realizados periodicamente a cada 30 dias em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar), previamente autoclavados a 120°C, 1,5 atm por 30 minutos.

### **3.3. PRODUÇÃO DE $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSBM)**

Foi utilizado meio de cultura Khanna (Khanna *et al.*, 1995), em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio, pH inicial 6,0, adicionados de diferentes fontes de carbono. Foram realizados cultivos contendo fontes de carbono complexas como resíduos ou produtos agroindustriais de baixo custo (1% m/v) (farelo de trigo, bagaço de laranja, sabugo de milho, serragem, bagaço de cana de açúcar) e também mono e dissacarídeos em concentração de 2% (m/v) (lactose, glicose, sacarose, frutose e maltose). Os meios foram previamente autoclavados a 120°C a 1,5 atm por 30 minutos e depois inoculados com suspensão de micélio fúngico sendo os cultivos incubados a 30°C sob agitação orbital de 100 rpm, por 72-144 horas.

#### **3.3.1. Composição do meio de cultura Khanna**

- |                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| • Solução de sais de Khanna [20x] | 5 mL   |
| • Extrato de levedura             | 0,1 g  |
| • Fonte de carbono                |        |
| • Água destilada q.s.p.           | 100 mL |

#### Solução de sais de Khanna [20x]

|                                             |          |
|---------------------------------------------|----------|
| • $\text{NH}_4\text{NO}_3$                  | 2 g      |
| • $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 1,3 g    |
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,362 g  |
| • KCl                                       | 0,098 g  |
| • $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 0,007 g  |
| • $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 0,0138 g |
| • $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,0066 g |
| • $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,0062 g |
| • Água destilada q.s.p.                     | 100 mL   |

### **3.4. OBTENÇÃO DAS ENZIMAS EXTRACELULAR E INTRACELULAR EM FSBM**

Após o período de incubação da FSbm, as culturas foram filtradas a vácuo em papel de filtro Whatman nº 1, com auxílio de uma bomba a vácuo sendo o filtrado livre de células obtido utilizado para mensurar a atividade enzimática extracelular. O micélio foi triturado com areia tratada e ressuspenso em água destilada gelada. Após a centrifugação (23000g por 10 minutos) o *pellet* foi descartado e o sobrenadante utilizado para mensurar a atividade enzimática intracelular.

### **3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS**

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se sacarose 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 como substrato. Foram utilizados 200 µl do substrato e 200 µl de extrato enzimático mantidos a 50°C por 10 min de reação ou imediatamente retirada alíquota de 100 µl para ser utilizado como branco de leitura. Os

açúcares redutores obtidos foram mensurados com a utilização de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de glicose por minuto nas condições de ensaio. A quantificação de proteínas foi realizada como descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A unidade foi definida como mg de proteína por mL de amostra.

### **3.6. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM FSBM PARA A PRODUÇÃO DE $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE POR *F. graminearum***

#### **3.6.1. Plackett & Burman (PB) para 8 variáveis independentes**

A otimização da produção da enzima extracelular foi realizada através da metodologia do planejamento fatorial. Primeiramente, foi realizado um delineamento experimental de Plackett & Burman (PB) (1946) para 8 variáveis independentes (Tabela 3). As variáveis foram utilizadas em seu nível superior (+1) e inferior (-1). Para tanto, organizou-se uma matriz de 16 ensaios, a qual foi adicionada 3 pontos centrais, totalizando 19 ensaios. Os cultivos de *F. graminearum* foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 25mL do meio de cultura Khanna. A solução de sais utilizada foi preparada com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  20 g/L, KCl 0,98 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,13 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,07g/L,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,066 g/L e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,062 g/L.

**Tabela 3.** Valores utilizados no delineamento de Plackett & Burman.

| Variável                             | Código         | -1  | 0    | 1   |
|--------------------------------------|----------------|-----|------|-----|
| Farelo de trigo (%)                  | X <sub>1</sub> | 1,0 | 1,5  | 2,0 |
| Bagaço de cana (%)                   | X <sub>2</sub> | 0   | 0,25 | 0,5 |
| Peptona (%)                          | X <sub>3</sub> | 0   | 0,05 | 0,1 |
| Extrato de levedura (%)              | X <sub>4</sub> | 0   | 0,1  | 0,2 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM) | X <sub>5</sub> | 0   | 11   | 22  |
| MgSO <sub>4</sub> (mM)               | X <sub>6</sub> | 0   | 1    | 2   |
| Solução de sais (mL)                 | X <sub>7</sub> | 0   | 5    | 10  |
| Tempo (horas)                        | X <sub>8</sub> | 24  | 72   | 120 |

### 3.6.2. Planejamento fracionado 2<sup>5-1</sup>

Foi realizado um planejamento fracionado 2<sup>5-1</sup> para 5 variáveis independentes selecionados de acordo com PB realizado. As variáveis foram utilizadas em seu nível superior (+1) e inferior (-1) sendo a quinta variável uma combinação das 4 primeiras (X<sub>1</sub> . X<sub>2</sub> . X<sub>3</sub> . X<sub>4</sub> = X<sub>5</sub>) (Tabela 4). Para isso, foi utilizada uma matriz de 16 ensaios, adicionada de 3 pontos centrais, totalizando 19 ensaios. Os cultivos de *F. graminearum* foram realizados utilizando as condições que melhor favoreceram a produção enzimática no experimento de PB anterior, peptona 0,1% (m/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM, solução de sais 10 mL por frasco Erlenmeyer, variando-se dessa vez a concentração de farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar, fontes de carbono primária (FC1) e secundária (FC2) respectivamente, tempo de cultivo, pH inicial e temperatura de cultivo.

**Tabela 4.** Valores utilizados no Planejamento fracionado  $2^{5-1}$ 

| Variáveis                      | Código         | -1  | 0    | +1  |
|--------------------------------|----------------|-----|------|-----|
| FC1 - Farelo de trigo (%) (FT) | X <sub>1</sub> | 1   | 1,5  | 2   |
| FC2- Bagaço de cana (%) (BC)   | X <sub>2</sub> | 0   | 0,25 | 0,5 |
| Tempo (horas) (tempo)          | X <sub>3</sub> | 24  | 72   | 120 |
| Temperatura (°C) (T)           | X <sub>4</sub> | 25  | 30   | 35  |
| pH inicial (pH)                | X <sub>5</sub> | 4,5 | 6    | 7,5 |

### 3.6.3. Delineamento do composto central rotacional (DCCR) para 2 variáveis independentes

Considerando que as influências da concentração de farelo de trigo e tempo de cultivo foram significantes, foi realizado um Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) para estas variáveis independentes (X<sub>1</sub> – farelo de trigo % (m/v) e X<sub>2</sub> – Tempo de cultivo (horas)), utilizando-se 11 ensaios, sendo 6 fatoriais ( $\pm 1$ ), 2 axiais ( $\pm 1,41$ ) e 3 no ponto central (0) (Tabela 5). A análise de variância foi feita utilizando-se ANOVA, com o valor de  $p < 0,10$  e  $p < 0,05$  sendo considerados significantes. As análises e superfície de resposta foram geradas utilizando o programa Statistica 7.0 (StatSoft).

**Tabela 5.** Valores utilizados no DCCR

| Variáveis           | Código         | -1,41 | -1  | 0   | +1  | +1,41 |
|---------------------|----------------|-------|-----|-----|-----|-------|
| Farelo de trigo (%) | X <sub>1</sub> | 3,0   | 3,3 | 4,0 | 4,7 | 5,0   |
| Tempo (Horas)       | X <sub>2</sub> | 96    | 110 | 144 | 178 | 192   |

### **3.7. PRODUÇÃO DE $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASES POR *F. graminearum* EM FERMENTAÇÃO SUBSTRATO SÓLIDO (FSS)**

Foram testados vários produtos e resíduos agroindustriais de baixo custo e/ou alta abundância nos descartes industriais como substratos/fontes de carbono (bagaço de laranja, serragem fina, bagaço de cana de açúcar lavado, serragem, trigo moído, milho moído, soja moída, trigo em grãos, sabugo de milho, farinha de centeio, farelo de trigo e casca de laranja). Os frascos Erlenmeyer de capacidade de 125 mL foram preenchidos com  $\frac{1}{4}$  de seu volume com tais substratos e umidificados com água de torneira ou água destilada, e soluções de sais de Vogel ou sais de Khanna ou sais SR em diferentes proporções (1:0,5; 1:1; 1:2 e 1:3 m/v). Os meios foram previamente autoclavados a 120°C, 1,5 atm por 30 minutos. Os cultivos foram mantidos a 30°C de 1 a 15 dias com umidade relativa do ar de aproximadamente 60% monitorada com termohigrômetro digital (CAAL, model 303C).

#### **3.7.1. Composição das soluções de sais**

##### **SOLUÇÃO DE SAIS DE SR [20x] (Rizzati, *et al.*, 2001)**

|                                             |        |
|---------------------------------------------|--------|
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,24 g |
| • $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 0,3 g  |
| • $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$        | 1 g    |

##### **SOLUÇÃO DE SAIS DE KHANNA [20x] (Khanna, *et al.*, 1995)**

|                                             |          |
|---------------------------------------------|----------|
| • $\text{NH}_4\text{NO}_3$                  | 2 g      |
| • $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 1,3 g    |
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,362 g  |
| • $\text{KCl}$                              | 0,098 g  |
| • $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 0,007 g  |
| • $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 0,0138 g |
| • $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,0066 g |

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,0062 g
- Água destilada q.s.p. 100 mL

#### **SOLUÇÃO DE SAIS DE VOGEL [50x] (Vogel, 1964)**

- $\text{Na}_3 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  150g
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  100g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  250g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  10g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  5g
- Solução de Traços de Elementos 5mL
- Clorofórmio 2 mL
- Água destilada q.s.p. 100mL

#### **SOLUÇÃO DE TRAÇOS DE ELEMENTO**

- $\text{Na}_3 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5g
- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,25g
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,05g
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,05g
- Clorofórmio 1mL
- Água destilada q.s.p. 100mL

### **3.8. OBTENÇÃO DA $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR**

#### **EM FSS**

A enzima extracelular foi extraída com a adição de 30 mL água destilada gelada ao cultivo, sendo este submetido a intensa agitação por 10 minutos a 4°C em agitador magnético. Após este procedimento, as culturas foram filtradas em gase, sendo descartada a massa micelial, juntamente com os resíduos do substrato. Os sobrenadantes foram centrifugados a 23000g por 10 minutos a 4°C para remoção de

partículas finas. Os filtrados, livres de resíduos sólidos, foram utilizados para ensaios enzimáticos, como descrito no item 3.5.

### **3.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

Amostras miceliais obtidas em 7 dias de cultivo em Fermentação em Substrato Sólido utilizando farelo de trigo como fonte de carbono/substrato foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol em água (10-90%, em volume) e finalmente com etanol absoluto, pulverizadas com ouro coloidal e submetidas a análise por MEV utilizando um equipamento Zeiss EVO50 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com sistema de processamento digital IXRF 500.

### **3.10. PURIFICAÇÃO DA $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRA-CELULAR PRODUZIDA POR *F. graminearum***

O extrato bruto contendo a enzima extracelular produzido em FSS utilizando farelo de trigo como fonte de carbono/substrato, após ser dialisado *overnight* contra água destilada foi submetido a precipitação com etanol gelado (1:1; v/v) e centrifugado a 23000g por 15 minutos. O precipitado contendo a enzima foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 10mM pH7,0 e posteriormente, aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose (1 cm x 12 cm) equilibrada previamente com o mesmo tampão descrito acima. Foi utilizado um gradiente linear de NaCl (0-1M) para eluição das frações. Foram coletados 3mL/fração e a vazão foi mantida em 1 mL/min. As frações que apresentaram atividade foram reunidas em um pool, o qual foi dialisado *overnight* contra tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e após liofilizado foi aplicado em coluna de exclusão molecular, Sephacryl S200 (1 cm x 80 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH7,0 adicionado de NaCl 50 mM. Foram coletados

frações de 1 mL e a vazão foi mantida em 0,3 mL/min. As frações contendo atividade invertásica foram recolhidas em um único *pool* e então dialisada overnight contra água destilada e liofilizada.

Após concentrada, a amostra purificada foi aplicada em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE 6%) (Davis, 1964) e em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) (Laemmli, 1970), utilizando-se uma fonte ajustada para 120 V e 40 mA, corados com Comassie Brilliant-Blue R250.

### **3.11. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR**

A massa molecular nativa foi determinada utilizando-se coluna de exclusão molecular Sephacryl S200 (1 x 80 cm), como descrito anteriormente. Foram utilizados como marcadores de massa molecular  $\beta$ -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). O volume livre da coluna ( $V_o$ ) foi de 86,3 mL, determinado com Blue Dextran 2000.

Já a massa molecular da  $\beta$ -D-frutofuranosidase desnaturada foi determinada utilizando-se SDS-PAGE 12% e como marcadores de massa molecular foram utilizados  $\alpha$ -2-macroglobulina (169 kDa),  $\beta$ -galactosidase (112,5 kDa), lactoferrina (92 kDa), piruvatoquinase (67 kDa), fumarase (60 kDa), desidrogenase láctica (36,5 kDa) e triose fosfato isomerase (31,5 kDa)

### **3.12. CARACTERIZAÇÃO DA $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRA-CELULAR PURIFICADA**

### **3.12.1. Influência da temperatura e pH na atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica**

A análise da influência da temperatura e pH reacionais sobre a atividade invertásica foi realizada entre 30°C e 80°C, e valores de pH entre 3,0 e 10,0, respectivamente, utilizando tampão Mcllvaine pH 3,0-8,0 e tampão CAPS pH 9,0 e 10,0.

A estabilidade térmica da enzima purificada foi verificada incubando-se alíquotas enzimáticas em diferentes temperaturas (30 °C - 70°C) ou diferentes valores de pH (3,0 – 10,0), sendo frações retiradas em intervalos de 10 minutos e armazenadas em banho de gelo para posterior determinação da atividade enzimática.

### **3.12.2. Efeito de diferentes compostos químicos na atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica**

Para avaliar o efeito de diferentes compostos (NaCl, AgNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, AlCl<sub>3</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, HgCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, EDTA e  $\beta$ -mercaptoetanol) sobre a atividade enzimática, estes foram adicionados a mistura reacional em concentrações finais de 1mM e 10mM. Depois do tempo reacional, as alíquotas foram retiradas e ensaiadas para a atividade enzimática.

### **3.12.3. Determinação das constantes cinéticas**

As constantes cinéticas ( $K_m$ ,  $V_{max}$  e  $V_{max}/K_m$ ) para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular purificada foram determinadas pela representação gráfica do duplo-recíproco de acordo com Lineweaver-Burk (1934) utilizando o programa Enzyplot (Leone *et al.* 1995). Os substratos utilizados foram sacarose, rafinose e inulina em concentrações que variaram entre 0 – 50 mM.

### **3.13. SECAGEM DA $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR EM SPRAY DRYER**

Os experimentos de secagem foram realizados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Farmacêuticos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

O extrato bruto extracelular obtido do cultivo de *F. graminearum* em FSS utilizando farelo de trigo como substrato foi submetido a secagem utilizando o equipamento *Spray dryer* SD 05 – Lab-Plant (Reino Unido) com câmara de secagem de 215 mm de diâmetro e 500 mm de altura. A temperatura de entrada do ar foi padronizada em 100 °C e a temperatura de saída do ar variou entre 66,8°C e 70°C. Para a proteção da amostra enzimática durante o processo de secagem foram adicionados ao extrato bruto diferentes agentes protetores, como amido Capsul<sup>®</sup> (AC), celulose microcristalina (CM), trealose (TR),  $\beta$ -ciclodextrina (CD) e lactose (LC) em proporções de 2%, 5% e 10% (m/v).

A operação teve início com a alimentação e aquecimento do gás de secagem, e assim que o equipamento encontrou-se estável, foi iniciada a alimentação da solução enzimática já preparada com as diferentes concentrações dos adjuvantes. Uma vez a solução enzimática na câmara de secagem, foram efetuadas medidas em intervalos regulares, da temperatura de saída do gás ( $T_{gs}$ ) verificando-se a estabilidade do equipamento. A retirada de amostra do produto seco foi realizada aproximadamente 30 minutos após o início da operação.

As amostras secas foram utilizadas para análises físico-químicas do produto de secagem, sendo determinados a umidade, distribuição granulométrica, atividade de água e atividade invertásica residual da amostra seca. A umidade do produto seco foi verificada utilizando estufa de convecção forçada. Para distribuição granulométrica foi

dispersada uma quantidade da amostra seca sobre uma lâmina de vidro e as imagens foram obtidas em microscópio óptico acoplado com câmera fotográfica (Olympus – modelo BX60MIV). As fotos foram analisadas por sistema de análise de imagens (Image Pro-Plus<sup>®</sup>, 2009) utilizando o diâmetro médio para a contagem das partículas (o que se refere ao comprimento médio dos diâmetros medidos em intervalos de dois graus e passando através do centro da partícula). A taxa de recuperação do produto ou o rendimento do processo foram calculados através de percentual entre a massa de pó total coletada e a massa de sólidos alimentada no equipamento (Souza, 2003).

### **3.13.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS EXTRATOS SECOS EM *SPRAY DRYER***

As reações para verificação da influência da temperatura e do pH na atividade invertásica foram realizadas entre 40°C e 80°C, e o pH entre 3,0 e 10,0, utilizando tampão McIlvaine (pH 3,0-8,0) e tampão CAPS (pH 9,0 e 10,0), tanto para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase em solução aquosa quanto para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase seca com adjuvantes.

### **3.14. IMOBILIZAÇÃO DA $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR EM AGAROSE ATIVADA EM BROMETO DE CIANOGENICO (BrCN)**

A quantidade de 1g de agarose 4BCL ativada com brometo de cianoanogênio (BrCN) foi hidratada com 100mL de água destilada e o pH ajustado para 2,0, por 30 minutos, sob agitação constante em agitador de rolos. Após a ativação, 1g do suporte hidratado foi adicionado a 10mL da solução enzimática em tampão fosfato de potássio 5mM pH 7,0 (1:10 v/v). A suspensão foi deixada sob agitação *overnight*, e então filtrada e lavada com água destilada. O derivado foi conservado a 4°C.

### **3.15. IMOBILIZAÇÃO DA $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRA-CELULAR EM SUPORTES ALTERNATIVOS**

Para os experimentos de imobilização foi utilizado o extrato bruto contendo  $\beta$ -D-frutofuranosidase. Os suportes algodão para uso doméstico, papel de filtro, EVA (etil vinil acetato), pano multiuso Ballerina<sup>®</sup>, bagaço de cana de açúcar lavado, barbante e gase foram lavados exaustivamente com água corrente e deixados secar ao ar. Depois, foi adicionado a estes suportes solução de polietilenimina (PEI) 0,2% (v/v) pH 7,0 por 2 horas, seguido de nova lavagem em água corrente e secagem sob condição ambiental. A solução contendo  $\beta$ -D-frutofuranosidase foi adicionada aos suportes-PEI, por 16 horas, temperatura ambiente e agitação estável (25 a 30 rotações por minuto). Após esse tempo, as ligações cruzadas foram ativadas pela presença de glutaraldeído (2%, v/v) por 1 hora. A preparação foi lavada para remoção do excesso do ligante e grupos aldeídos remanescentes (Godbole *et al.*, 1990).

Para a determinação da atividade enzimática imobilizada, foi padronizado o pedaço do derivado a ser utilizado de aproximadamente 3x3 mm, para que todos apresentassem a mesma área e volume. Estes pedaços dos derivados foram colocados para reagir em substrato sacarose 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 50mM pH5,0 por 2 horas e os açúcares redutores formados foram quantificados, como descrito anteriormente.

Os derivados obtidos foram testados quanto a capacidade de realizarem diferentes ciclos cataíticos sequencialmente. Para isso, os derivados foram colocados em contato com substrato sacarose por 30 minutos a 50°C. Após a reação, foram retirados e lavados em água corrente para serem novamente utilizados em um novo ciclo catalítico.

#### **3.15.1. Efeito da temperatura na estabilidade da $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada em suportes alternativos**

Os pedaços padronizados de derivados obtidos foram incubados em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 em temperaturas de 60°C e 70°C ou adicionados em tampão McIlvaine pH 3,0, pH 5,0, pH 7,0 e pH 9,0, sendo estes retirados em diferentes intervalos de tempo e mantidos em banho de gelo, para posterior verificação da atividade invertásica. Como controle foram utilizados a enzima extracelular solúvel e o derivado BrCN, e as alíquotas dos controles foram incubadas nas mesmas condições acima citadas.

#### **3.16. PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARIDEOS PELOS DERIVADOS CONTENDO $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR**

A atividade transfrutossilativa da  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *F. graminearum* foi investigada. Os derivados obtidos a partir de barbante, papel filtro e bagaço de cana de cana de açúcar foram submetidos a reação tendo como substrato sacarose 20% (m/v) em tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0 a 50°C por 6 horas. A presença de frutooligossacarideos foi verificada qualitativamente por cromatografia em camada delgada (TLC). Como fase móvel, foi utilizada solução constituída por butanol: etanol: água destilada (5:3:2; v/v/v). Após secagem em temperatura ambiente, a placa foi revelada com solução de orcinol 0,2% em ácido sulfúrico: metanol (1:9; v/v), e posterior aquecimento da placa a 100°C para visualização das manchas. Os padrões utilizados foram sacarose, glicose, frutose e os FOS nistose e 1-kestose.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1. PRODUÇÃO DE B-D-FRUTOFURANOSIDADES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSBM)

Quanto a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular, as cepas testadas, com exceção dos controles positivos (*A. phoenicis* e *A. niveus*), não apresentaram altos níveis de produção enzimática e, por isso, foi avaliada a produção da enzima intracelular. Vários fungos foram capazes de produzir esta enzima, como *A. parasiticus*, *A. thermomutatus* e Verde H03. No entanto, o fungo *Fusarium graminearum*, mesmo não sendo tão eficiente como os mencionados anteriormente (Tabela 6), foi selecionado para dar continuidade ao estudo, considerando-se a originalidade dos dados. Examinando o gênero *Aspergillus*, apresentado na tabela 6, possui muitas espécies são boas produtoras de  $\beta$ -D-frutofuranosidases, como *A. aculeatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* e *A. fumigatus*, sendo que muitas já foram assim caracterizadas (tabela 1).

Considerando a baixa produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo estudado, foi analisada a influência de diferentes fontes de carbono adicionadas ao meio de cultivo com o intuito de aumentar a produção enzimática. Quando o meio foi adicionado com açúcares simples (lactose, glicose, sacarose, frutose, maltose), não houve favorecimento da produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidases pelo fungo. Ao contrário, quando utilizado farelo de trigo e soja moída, a produção das enzimas se tornou aparente, a extracelular com atividades de 6,3 U/mL e 5,7 U/mL, respectivamente e a intracelular com atividades de 17,2 U/mL e 14,7 U/mL para o farelo de trigo e soja moída, respectivamente (Tabela 7). Mesmo observando-se a produção elevada da enzima intracelular utilizando fontes de carbono como trigo em grãos (20,24 U/mL), o farelo de trigo foi apontado como a melhor fonte de carbono, uma vez que a aplicação industrial de enzimas visa componentes com menos custos para sua obtenção.

**Tabela 6.** Fungos testados quanto a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidases em FSbm presentes na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da FFCLRP-USP.

| Cepa fúngica                         | Atividade Invertásica (U/mL) |                                   |                      |
|--------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
|                                      | Extracelular                 | Intracelular                      | Extra + intracelular |
| 1. <i>Aspergillus phoenicis</i>      | 8,72 $\pm$ 0,42              | 10,69 $\pm$ 1,45                  | 19,41                |
| 2. <i>Aspergillus niveus</i>         | 3,92 $\pm$ 0,76              | 5,68 $\pm$ 0,45                   | 9,60                 |
| 3. <i>Trichoderma harzianum</i>      | 0,18 $\pm$ 0,08              | 0,16 $\pm$ 0,06                   | 0,34                 |
| 4. <i>Aspergillus versicolor</i>     | 1,12 $\pm$ 0,08              | 2,26 $\pm$ 0,48                   | 3,38                 |
| 5. <i>Penicillium herquei</i>        | 0                            | 0,10 $\pm$ 0,05                   | 0,10                 |
| 6. <i>Clodosporium</i> sp.           | 0                            | 1,78 $\pm$ 0,11                   | 1,78                 |
| 7. <i>Colletotricum</i> sp.          | 1,17 $\pm$ 0,31              | 3,25 $\pm$ 0,39                   | 4,42                 |
| 8. <i>Fusarium graminearum</i>       | 0,58 $\pm$ 0,05              | <b>4,90 <math>\pm</math> 0,79</b> | 5,48                 |
| 9. <i>Aspergillus aculeatus</i>      | 1,20 $\pm$ 0,42              | 7,06 $\pm$ 0,79                   | 8,26                 |
| 10. <i>Aspergillus flavus</i>        | 1,28 $\pm$ 0,24              | 3,01 $\pm$ 0,79                   | 4,29                 |
| 11. <i>Aspergillus parasiticus</i>   | 2,32 $\pm$ 0,16              | 16,53 $\pm$ 0,96                  | 18,89                |
| 12. <i>Aspergillus thermomutatus</i> | 3,73 $\pm$ 0,74              | 12,21 $\pm$ 0,96                  | 15,94                |
| 13. <i>Aspergillus niger</i>         | 1,68 $\pm$ 0,48              | 8,32 $\pm$ 0,76                   | 10,00                |
| 14. <i>Aspergillus fumigatus</i>     | 0,72 $\pm$ 0,12              | 5,86 $\pm$ 1,41                   | 6,58                 |
| 15. Cinza 05C                        | 0                            | 8,88 $\pm$ 1,10                   | 8,88                 |
| 16. Verde H03                        | 0                            | 15,57 $\pm$ 2,24                  | 15,57                |
| 17. Doce rosa                        | 0                            | 4,45 $\pm$ 0,45                   | 4,45                 |
| 18. LH 05C                           | 1,22 $\pm$ 0,45              | 5,76 $\pm$ 0,59                   | 6,98                 |
| 19. Cilagem 05                       | 0,66 $\pm$ 0,11              | 11,09 $\pm$ 1,78                  | 11,75                |
| 20. Verde claro 07                   | 0,88 $\pm$ 0,16              | 4,53 $\pm$ 1,01                   | 5,41                 |
| 21. Bege H01                         | 0,51 $\pm$ 0,05              | 4,37 $\pm$ 0,36                   | 4,88                 |
| 22. Cinza escuro H01                 | 0,67 $\pm$ 0,09              | 0,83 $\pm$ 0,02                   | 1,50                 |

FSbm – meio Khanna adicionado de farinha de centeio 1% por 72h sob agitação 100 rpm a 30 °C. Os fungos Preto VI e Amarelo vinhaça, não estão mostrados na tabela, já que não produziram  $\beta$ -D-frutofuranosidases.

O farelo de trigo Mais Vitta<sup>®</sup> e a soja moída Mais Vitta<sup>®</sup> utilizados neste trabalho foram comprados no mercado local. O farelo de trigo possui em sua composição 25% de carboidratos, 18% de proteínas e 36% de fibras, e sem quantidade significativa de gordura. Já a soja moída, possui 31% de carboidratos, 23% de proteínas, 20% de gorduras totais e 17% de fibras alimentares. Henz *et al.* (2009) analisaram oito tipos diferentes de farelo de trigo e encontraram em média 88,25% de matéria seca, 17,57% de proteína bruta, 2,73% de gordura bruta, 3,74% de matéria mineral, 45,1% de fibra, 0,98% de fósforo, de 0,05% de sódio, de potássio 0,84%, 0,08% de cálcio e 0,33% de magnésio.

A alta concentração de nutrientes como carboidratos, proteínas e fibras do farelo de trigo e da soja moída, proporcionou o aumento da produção da enzima extracelular em 34 e 32 vezes respectivamente, comparando quando a sacarose 1% (m/v) foi adicionada ao meio de cultura. Este fator pode ter sido importante para o crescimento do fungo sobre o substrato, proporcionando melhores condições para produção da enzima.

Outros microrganismos também preferiram fontes de carbono complexas para produção de altos níveis enzimáticos, como é o caso do *A. phoenicis* que produziu 15 vezes mais  $\beta$ -D-frutofuranosidase quando o farelo de trigo foi adicionado ao meio de cultura comparando-se com a sacarose (Rustiguel *et al.*, 2010). A  $\beta$ -D-frutofuranosidase do fungo *Aspergillus ochraceus*, foi obtida utilizando-se uma fonte de carbono complexa, o bagaço de cana de açúcar, sob agitação a 40°C por 4 dias (Guimarães *et al.*, 2007). No entanto, há muitos trabalhos descritos que trazem como fonte de carbono mono ou dissacarídeos para a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase por microrganismos. Gutiérrez-Alonso *et al.* (2009) mostraram a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase por *Rhodotorula dairenensis* utilizando a adição de maltose 2% (m/v)

ao meio de cultivo. Para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632, utilizou-se sacarose 1% (m/v) (Rashad e Nooman, 2009)

**Tabela 7.** Influência de diferentes fontes de carbono na produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidases por *Fusarium graminearum*.

| Fontes de carbono        | Atividade invertásica (U/mL)      |                  |                      |
|--------------------------|-----------------------------------|------------------|----------------------|
|                          | Extracelular                      | Intracelular     | Extra + intracelular |
| Lactose                  | 1,12 $\pm$ 0,04                   | 2,02 $\pm$ 0,25  | 3,14                 |
| Glicose                  | 0,18 $\pm$ 0,05                   | 0,42 $\pm$ 0,22  | 0,60                 |
| Sacarose                 | 0,18 $\pm$ 0,05                   | 6,37 $\pm$ 0,19  | 6,55                 |
| Frutose                  | 0,34 $\pm$ 0,05                   | 1,60 $\pm$ 0,20  | 1,94                 |
| Maltose                  | 0,10 $\pm$ 0,14                   | 0,61 $\pm$ 0,07  | 0,71                 |
| Amido                    | 0,53 $\pm$ 0,02                   | 0,77 $\pm$ 0,09  | 1,30                 |
| Aveia                    | 0,13 $\pm$ 0,05                   | 9,86 $\pm$ 1,14  | 9,99                 |
| Farelo de trigo          | <b>6,26 <math>\pm</math> 1,41</b> | 17,17 $\pm$ 2,99 | 23,43                |
| Bagaço de laranja        | 3,76 $\pm$ 0,84                   | 13,12 $\pm$ 3,47 | 16,88                |
| Milho moido              | 0,37 $\pm$ 0,19                   | 8,90 $\pm$ 0,28  | 9,27                 |
| Sabugo de milho          | 4,40 $\pm$ 0,55                   | 5,17 $\pm$ 0,64  | 9,57                 |
| Serragem fina            | 4,26 $\pm$ 0,14                   | 4,69 $\pm$ 0,19  | 8,95                 |
| Farinha de centeio       | 0,64 $\pm$ 0,33                   | 4,54 $\pm$ 1,11  | 5,18                 |
| Bagaço de cana sem lavar | 0,13 $\pm$ 0,11                   | 8,88 $\pm$ 1,27  | 9,01                 |
| Bagaço de cana lavado    | 2,53 $\pm$ 0,06                   | 2,29 $\pm$ 0,22  | 4,82                 |
| Soja moída               | <b>5,73 <math>\pm</math> 1,90</b> | 14,74 $\pm$ 2,51 | 20,47                |
| Trigo em grãos           | 0,82 $\pm$ 0,82                   | 20,24 $\pm$ 1,72 | 21,06                |

FSbm – meio Khanna por 72 horas sob agitação 100 rpm a 30 °C.

## **4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM FSBM PARA A PRODUÇÃO DE $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR**

### **4.2.1. Plackett & Burman (PB) para 8 variáveis independentes**

O delineamento experimental de Plackett-Burman é uma ótima ferramenta para a realização de uma seleção de variáveis, podendo ser utilizado para no mínimo 4 variáveis independentes (Rodrigues e lemma, 2009). Quando existem muitas variáveis a serem analisadas, propõe-se que seja realizado um PB, e a partir de seus resultados as variáveis não significativas ou não importantes para o aumento da produção enzimática sejam descartadas.

Neste primeiro experimento, foi analisado o efeito das concentrações dos componentes do meio de cultivo na produção enzimática. Na tabela 8 podem ser observadas as atividades enzimáticas obtidas para delineamento experimental realizado, sendo o experimento 10 o que proporcionou a melhor condição para a produção enzimática, sendo farelo de trigo 1% (m/v), bagaço de cana de açúcar 0,5% (m/v), peptona 0,1% (m/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM e solução de sais 10 mL tendo 120 horas de cultivo. Utilizando um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), a influência da variável  $X_1$  (Farelo de trigo),  $X_3$  (peptona),  $X_4$  (extrato de levedura)  $X_7$  (solução de sais) e  $X_8$  (tempo) foi significativa. Já, utilizando nível de confiança de 90% ( $p < 0,1$ ), a influência da variável  $X_2$  (bagaço de cana de açúcar) passou a ser significativa (Tabela 9). O valor  $R^2$  obtido para este planejamento foi de 0,84. Segundo Haaland (1989), quanto mais próximo de 1,0 o valor do  $R^2$ , mais seguro será o modelo apresentado e as respostas preditas.

**Tabela 8.** Valores reais e codificados das variáveis independentes e as respostas obtidas para o delineamento experimental PB 16 para produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo *F. graminearum*.

| Ensaio | Farelo<br>trigo (%)<br>X <sub>1</sub> | Bagaço<br>cana (%)<br>X <sub>2</sub> | Peptona<br>(%)<br>X <sub>3</sub> | Extrato<br>leved (%)<br>X <sub>4</sub> | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>(mM)<br>X <sub>5</sub> | MgSO <sub>4</sub><br>(mM)<br>X <sub>6</sub> | Solução<br>sais (mL)<br>X <sub>7</sub> | Tempo<br>(horas)<br>X <sub>8</sub> | Atividade<br>(U/mL) |
|--------|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| 1      | 2 (+)                                 | 0 (-)                                | 0 (-)                            | 0 (-)                                  | 22 (+)                                                    | 0 (-)                                       | 0 (-)                                  | 120 (+)                            | 2,53                |
| 2      | 2 (+)                                 | 0,5 (+)                              | 0 (-)                            | 0 (-)                                  | 0 (-)                                                     | 2 (+)                                       | 0 (-)                                  | 24 (-)                             | 1,92                |
| 3      | 2 (+)                                 | 0,5 (+)                              | 0,1(+)                           | 0 (-)                                  | 0 (-)                                                     | 0 (-)                                       | 10 (+)                                 | 24 (-)                             | 3,92                |
| 4      | 2 (+)                                 | 0,5 (+)                              | 0,1 (+)                          | 0,2 (+)                                | 0 (-)                                                     | 0 (-)                                       | 0 (-)                                  | 120 (+)                            | 3,25                |
| 5      | 1 (-)                                 | 0,5 (+)                              | 0,1 (+)                          | 0,2 (+)                                | 22 (+)                                                    | 0 (-)                                       | 0 (-)                                  | 24 (-)                             | 0,07                |
| 6      | 2 (+)                                 | 0 (-)                                | 0,1 (+)                          | 0,2 (+)                                | 22 (+)                                                    | 2 (+)                                       | 0 (-)                                  | 24 (-)                             | 0,84                |
| 7      | 1 (-)                                 | 0,5 (+)                              | 0 (-)                            | 0,2 (+)                                | 22 (+)                                                    | 2 (+)                                       | 10 (+)                                 | 24 (-)                             | 2,53                |
| 8      | 2 (+)                                 | 0 (-)                                | 0,1 (+)                          | 0 (-)                                  | 22 (+)                                                    | 2 (+)                                       | 10 (+)                                 | 120 (+)                            | 5,76                |
| 9      | 2 (+)                                 | 0,5 (+)                              | 0 (-)                            | 0,2 (+)                                | 0 (-)                                                     | 2 (+)                                       | 10 (+)                                 | 120 (+)                            | 5,53                |
| 10     | 1 (-)                                 | 0,5 (+)                              | 0,1 (+)                          | 0 (-)                                  | 22 (+)                                                    | 0 (-)                                       | 10 (+)                                 | 120 (+)                            | 7,38                |
| 11     | 1 (-)                                 | 0 (-)                                | 0,1 (+)                          | 0,2 (+)                                | 0 (-)                                                     | 2 (+)                                       | 0 (-)                                  | 120 (+)                            | 2,15                |
| 12     | 2 (+)                                 | 0 (-)                                | 0 (-)                            | 0,2 (+)                                | 22 (+)                                                    | 0 (-)                                       | 10 (+)                                 | 24 (-)                             | 2,61                |
| 13     | 1 (-)                                 | 0,5 (+)                              | 0 (-)                            | 0 (-)                                  | 22 (+)                                                    | 2 (+)                                       | 0 (-)                                  | 120 (+)                            | 1,00                |
| 14     | 1 (-)                                 | 0 (-)                                | 0,1 (+)                          | 0 (-)                                  | 0 (-)                                                     | 2 (+)                                       | 10 (+)                                 | 24 (-)                             | 2,61                |
| 15     | 1 (-)                                 | 0 (-)                                | 0 (-)                            | 0,2 (+)                                | 0 (-)                                                     | 0 (-)                                       | 10 (+)                                 | 120 (+)                            | 3,46                |
| 16     | 1 (-)                                 | 0 (-)                                | 0 (-)                            | 0 (-)                                  | 0 (-)                                                     | 0 (-)                                       | 0 (-)                                  | 24 (-)                             | 1,46                |
| 17     | 1,5 (0)                               | 0,25 (0)                             | 0,05 (0)                         | 0,1 (0)                                | 11 (0)                                                    | 1 (0)                                       | 5 (0)                                  | 72 (0)                             | 2,84                |
| 18     | 1,5 (0)                               | 0,25 (0)                             | 0,05 (0)                         | 0,1 (0)                                | 11 (0)                                                    | 1 (0)                                       | 5 (0)                                  | 72 (0)                             | 3,07                |
| 19     | 1,5 (0)                               | 0,25 (0)                             | 0,05 (0)                         | 0,1 (0)                                | 11 (0)                                                    | 1 (0)                                       | 5 (0)                                  | 72 (0)                             | 3,30                |

**Tabela 9.** Efeitos obtidos para o delineamento PB 16 analisando a atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica como fator dependente.

|                                                       | Efeitos | Erro Padrão | t(29) | p-valor            |
|-------------------------------------------------------|---------|-------------|-------|--------------------|
| Média                                                 | 3,02    | 0,12        | 23,95 | 0,000 <sup>A</sup> |
| X <sub>1</sub> - Farelo de trigo (%)                  | 0,74    | 0,27        | 2,71  | 0,011 <sup>A</sup> |
| X <sub>2</sub> - Bagaço de cana (%)                   | 0,53    | 0,27        | 1,94  | 0,061 <sup>B</sup> |
| X <sub>3</sub> - Peptona (%)                          | 0,67    | 0,27        | 2,46  | 0,019 <sup>A</sup> |
| X <sub>4</sub> - Extrato de levedura (%)              | -0,89   | 0,27        | -3,27 | 0,002 <sup>A</sup> |
| X <sub>5</sub> - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM) | -0,43   | 0,27        | -1,59 | 0,122              |
| X <sub>6</sub> - MgSO <sub>4</sub> (mM)               | -0,29   | 0,27        | -1,06 | 0,294              |
| X <sub>7</sub> - Solução de sais (mL/frasco)          | 2,65    | 0,27        | 9,67  | 0,000 <sup>A</sup> |
| X <sub>8</sub> - Tempo (horas)                        | 1,60    | 0,27        | 5,82  | 0,000 <sup>A</sup> |

<sup>A</sup> – fatores significantes (p < 0,05)

<sup>B</sup> – fatores significantes (p < 0,1)

#### 4.2.2. Planejamento fracionado 2<sup>5-1</sup>

Dando continuidade a otimização da produção da  $\beta$ -D-frutofuranosidase em FSbm foi realizado também um planejamento 2<sup>5-1</sup>. Os cultivos de *F. graminearum* foram realizados utilizando as melhores condições para a produção enzimática, como definidos no ensaio 10 no PB, ou seja, as melhores concentrações dos componentes do meio de cultivo foram fixadas para os demais experimentos. A atividade invertásica foi avaliada e os dados apresentados na tabela 10, sendo que para esse experimento, também avaliadas algumas condições de cultivo, não utilizadas em PB, para o crescimento e produção da enzima pelo fungo (temperatura e pH inicial do meio). Utilizando um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), a influência da variável  $X_1$  (Farelo de trigo) e  $X_3$  (tempo de cultivo) foram significativas, e também as interações entre as variáveis  $X_1$  e  $X_3$  (farelo de trigo e tempo de cultivo),  $X_1$  e  $X_4$  (farelo de trigo e temperatura),  $X_2$  e  $X_5$  (bagaço de cana de açúcar e pH inicial) e  $X_3$  e  $X_4$  (tempo de cultivo e temperatura) (Tabela 11). O  $R^2$  obtido foi de 0,93.

Considerando os resultados apresentados nos experimentos de PB e planejamento fracionado 2<sup>5-1</sup>, pode-se inferir que o meio de cultivo otimizado para a produção da enzima por *F. graminearum* deve conter farelo de trigo 2% (m/v), bagaço de cana 0,5% (m/v), peptona 0,1% (m/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM e solução de sais 10mL/frasco, além da temperatura de cultivo de 35°C e pH inicial 6,5 sob agitação de 100 rpm.

**Tabela 10.** Valores codificados das variáveis independentes e as respostas obtidas para planejamento fracionado  $2^{5-1}$  para produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo *F. graminearum*.

| <b>Ensaio</b> | <b>Farelo<br/>trigo (%)<br/><math>X_1</math></b> | <b>Bagaço<br/>cana (%)<br/><math>X_2</math></b> | <b>Tempo<br/>(horas)<br/><math>X_3</math></b> | <b>Temperatura<br/>(°C)<br/><math>X_4</math></b> | <b>pH<br/>inicial<br/><math>X_5</math></b> | <b>Atividade<br/>(U/mL)</b> |
|---------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|
| 1             | 1 (-)                                            | 0 (-)                                           | 24 (-)                                        | 25 (-)                                           | 6,5 (+)                                    | 0,85                        |
| 2             | 1 (-)                                            | 0 (-)                                           | 24 (-)                                        | 35 (+)                                           | 4,5 (-)                                    | 0,13                        |
| 3             | 1 (-)                                            | 0 (-)                                           | 120 (+)                                       | 25 (-)                                           | 4,5 (-)                                    | 5,72                        |
| 4             | 1 (-)                                            | 0 (-)                                           | 120 (+)                                       | 35 (+)                                           | 6,5 (+)                                    | 2,34                        |
| 5             | 1 (-)                                            | 0,5 (+)                                         | 24 (-)                                        | 25 (-)                                           | 4,5 (-)                                    | 0,29                        |
| 6             | 1 (-)                                            | 0,5 (+)                                         | 24 (-)                                        | 35 (+)                                           | 6,5 (+)                                    | 0,62                        |
| 7             | 1 (-)                                            | 0,5 (+)                                         | 120 (+)                                       | 25 (-)                                           | 6,5 (+)                                    | 4,62                        |
| 8             | 1 (-)                                            | 0,5 (+)                                         | 120 (+)                                       | 35 (+)                                           | 4,5 (-)                                    | 3,21                        |
| 9             | 2 (+)                                            | 0 (-)                                           | 24 (-)                                        | 25 (-)                                           | 4,5 (-)                                    | 0,98                        |
| 10            | 2 (+)                                            | 0 (-)                                           | 24 (-)                                        | 35 (+)                                           | 6,5 (+)                                    | 0,73                        |
| 11            | 2 (+)                                            | 0 (-)                                           | 120 (+)                                       | 25 (-)                                           | 6,5 (+)                                    | 3,83                        |
| 12            | 2 (+)                                            | 0 (-)                                           | 120 (+)                                       | 35 (+)                                           | 4,5 (-)                                    | 6,85                        |
| 13            | 2 (+)                                            | 0,5 (+)                                         | 24 (-)                                        | 25 (-)                                           | 6,5 (+)                                    | 1,08                        |
| 14            | 2 (+)                                            | 0,5 (+)                                         | 24 (-)                                        | 35 (+)                                           | 4,5 (-)                                    | 0,16                        |
| 15            | 2 (+)                                            | 0,5 (+)                                         | 120 (+)                                       | 25 (-)                                           | 4,5 (-)                                    | 4,27                        |
| 16            | 2 (+)                                            | 0,5 (+)                                         | 120 (+)                                       | 35 (+)                                           | 6,5 (+)                                    | <b>7,10</b>                 |
| 17            | 1,5 (0)                                          | 0,25 (0)                                        | 72 (0)                                        | 30 (0)                                           | 6 (0)                                      | 4,91                        |
| 18            | 1,5 (0)                                          | 0,25 (0)                                        | 72 (0)                                        | 30 (0)                                           | 6 (0)                                      | 4,66                        |
| 19            | 1,5 (0)                                          | 0,25 (0)                                        | 72 (0)                                        | 30 (0)                                           | 6 (0)                                      | 3,67                        |

**Tabela 11.** Efeitos obtidos para o planejamento fracionado  $2^{5-1}$  analisando a atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica como fator dependente.

|                                                | Contraste | Erro padrão | t(22) | p-valor            |
|------------------------------------------------|-----------|-------------|-------|--------------------|
| Mean/Interc.                                   | 3,02      | 0,13        | 22,41 | 0,000 <sup>A</sup> |
| X <sub>1</sub> - Farelo de trigo (%)           | 1,18      | 0,29        | 4,03  | 0,000 <sup>A</sup> |
| X <sub>2</sub> - Bagaço de Cana (%)            | 0,30      | 0,29        | 1,05  | 0,304              |
| X <sub>3</sub> - Tempo (h)                     | 4,26      | 0,29        | 14,50 | 0,000 <sup>A</sup> |
| X <sub>4</sub> - Temperatura (°C)              | 0,25      | 0,29        | 0,85  | 0,401              |
| X <sub>5</sub> - pH inicial                    | 0,09      | 0,29        | 0,31  | 0,753              |
| FT (X <sub>1</sub> ) x BC (X <sub>2</sub> )    | 0,22      | 0,29        | 0,75  | 0,456              |
| FT (X <sub>1</sub> ) x tempo (X <sub>3</sub> ) | 0,79      | 0,29        | 2,70  | 0,013 <sup>A</sup> |
| FT (X <sub>1</sub> ) x T (X <sub>4</sub> )     | 1,38      | 0,29        | 4,72  | 0,000 <sup>A</sup> |
| FT (X <sub>1</sub> ) x pH (X <sub>5</sub> )    | 0,34      | 0,29        | 1,15  | 0,259              |
| BC (X <sub>2</sub> ) x tempo (X <sub>3</sub> ) | 0,42      | 0,29        | 1,46  | 0,158              |
| BC (X <sub>2</sub> ) x T (X <sub>4</sub> )     | 0,47      | 0,29        | 1,62  | 0,117              |
| BC (X <sub>2</sub> ) x pH (X <sub>5</sub> )    | 1,65      | 0,29        | 5,64  | 0,000 <sup>A</sup> |
| tempo (X <sub>3</sub> ) x T (X <sub>4</sub> )  | 0,69      | 0,29        | 2,37  | 0,026 <sup>A</sup> |
| tempo (X <sub>3</sub> ) x pH (X <sub>5</sub> ) | -0,16     | 0,29        | -0,56 | 0,579              |
| T (X <sub>4</sub> ) x pH (X <sub>5</sub> )     | 0,37      | 0,29        | 1,26  | 0,218              |

<sup>A</sup> – fatores significantes (p < 0,05); FT – farelo de trigo; BC – bagaço de cana de açúcar, T – temperatura

#### 4.2.3. Delineamento do composto central rotacional (DCCR) para 2 variáveis independentes

Os valores das atividades  $\beta$ -D-frutofuranosidásicas de cada um dos ensaios, considerando as variáveis independentes, concentração de farelo de trigo e tempo de cultivo, selecionadas anteriormente pela sua significância, estão mostrados na tabela 12. O experimento 7 foi o que proporcionou melhores condições para a produção enzimática extracelular (16,41 U/mL) por *F. graminearum*.

**Tabela 12.** Valores das respostas obtidas no DCCR para a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase pelo fungo *F. graminearum*.

| Ensaio | Farelo de trigo (%)<br>$X_1$ | Tempo (horas)<br>$X_2$ | Atividade (U/mL) |
|--------|------------------------------|------------------------|------------------|
| 1      | 3,3 (-)                      | 110 (-)                | 4,32             |
| 2      | 3,3 (-)                      | 178 (+)                | 1,76             |
| 3      | 4,7 (+)                      | 110 (-)                | 6,32             |
| 4      | 4,7 (+)                      | 178 (+)                | 4,08             |
| 5      | 4,0 (0)                      | 192 (+1,41)            | 1,92             |
| 6      | 4,0 (0)                      | 96 (-1,41)             | 7,04             |
| 7      | 5,0 (+1,41)                  | 144 (0)                | <b>16,41</b>     |
| 8      | 3,0 (-1,41)                  | 144 (0)                | 4,81             |
| 9      | 4,0 (0)                      | 144 (0)                | 12,42            |
| 10     | 4,0 (0)                      | 144 (0)                | 10,16            |
| 11     | 4,0 (0)                      | 144 (0)                | 12,56            |

Considerando a produção enzimática as duas variáveis apresentaram significância em parâmetros distintos. A variável farelo de trigo foi significativa no parâmetro linear, e a variável tempo no parâmetro quadrático em nível de significância de 90% ( $p < 0,1$ ). Com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), apenas o tempo, no parâmetro quadrático mostrou-se significativo (Tabela 13).

**Tabela 13.** Análise de efeitos e interações para atividade  $\beta$ -D-frutofuranosidásica no DCCR.

|                           | Efeitos | Erro padrão | t(5)  | p-valor            |
|---------------------------|---------|-------------|-------|--------------------|
| Média                     | 11,72   | 1,74        | 6,72  | 0,000 <sup>A</sup> |
| Farelo de trigo $X_1$ (L) | 5,18    | 2,13        | 2,42  | 0,059 <sup>B</sup> |
| Farelo de trigo $X_1$ (Q) | -2,83   | 2,55        | -1,11 | 0,317              |
| Tempo $X_2$ (L)           | -3,01   | 2,13        | -1,40 | 0,217              |
| Tempo $X_2$ (Q)           | -8,99   | 2,55        | -3,52 | 0,016 <sup>A</sup> |
| Farelo de trigo x tempo   | 0,16    | 3,02        | 0,05  | 0,959              |

<sup>A</sup> – fatores significantes ( $p < 0,05$ )

<sup>B</sup> – fatores significantes ( $p < 0,1$ )

Baseado na análise de variância (Tabela 14), o teste  $F$  mostrou que o modelo, aqui apresentado, é confiável, sendo o valor calculado (16,23) cerca de 5 vezes maior que o tabelado (3,11), indicando que o modelo de segunda ordem é estatisticamente significativo e preditivo. Desta forma a atividade enzimática (Y) pode ser predita em função das variáveis farelo de trigo (%) e tempo (horas) através de uma modelo equacional codificado (Equação 1). Considerando apenas os parâmetros significativos, é possível construir um modelo equacional codificado reduzido (Equação 2).

**Tabela 14.** Análise de variância para a o DCCR.

| Fonte de<br>variação | Soma dos<br>quadrados | Graus de<br>liberdade | Quadrado<br>médio | $F_{\text{calculado}}$ |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|
| Regressão            | 180,02                | 2                     | 92,51             | 16,23                  |
| Resíduo              | 45,62                 | 8                     | 5,7               |                        |
| Total                | 230,64                | 10                    |                   |                        |

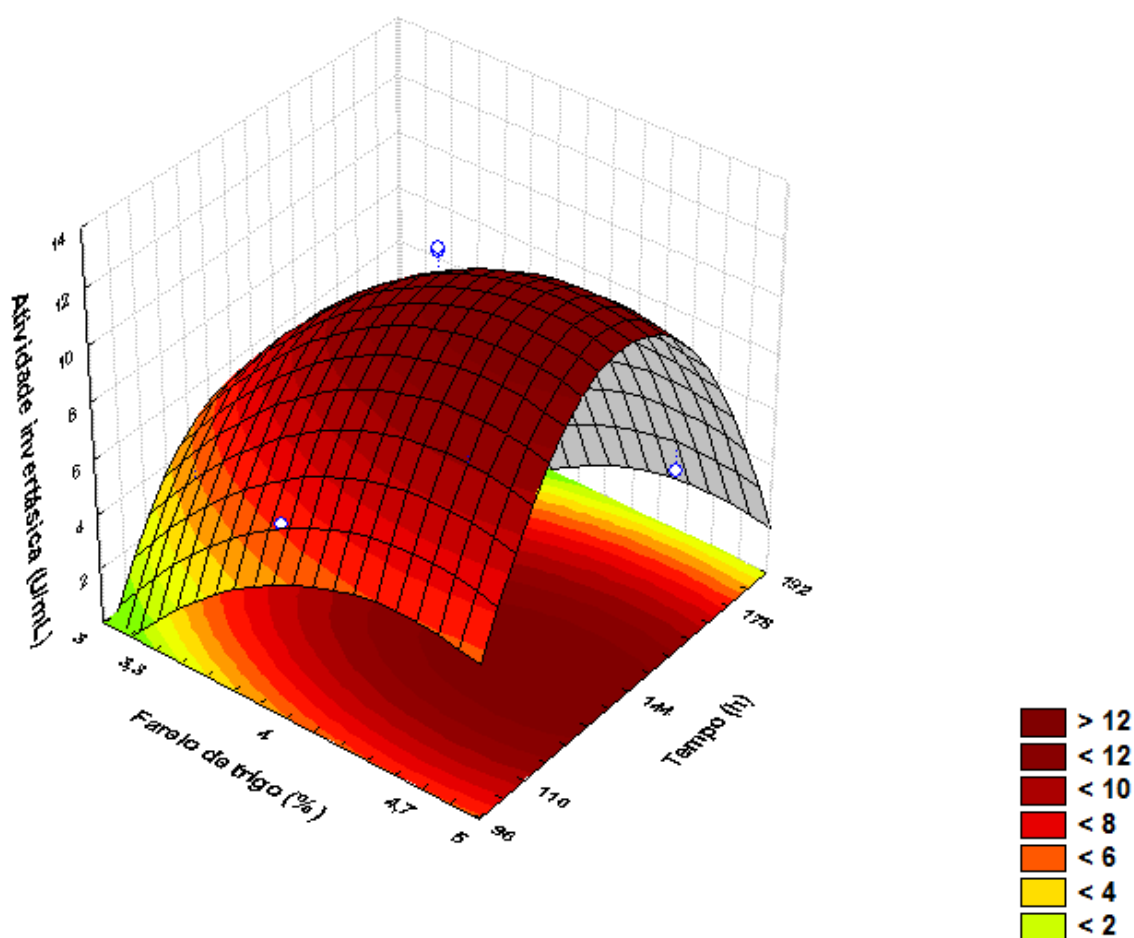
$F_{0,95;5;27}=3,11$   
 $R^2 = 0,80 / 90\%$

**Equação 1:**  $Y = 11,7 + 2,6X_1 - 1,4X_1^2 - 1,5X_2 - 4,5X_2^2 + 0,1X_1 \cdot X_2$

**Equação 2:**  $Y = 11,7 + 2,6X_1 - 4,5X_2^2$

Sendo as análises significativas, a partir do modelo reduzido foi gerada a superfície de resposta para determinação das melhores faixas de concentração de farelo de trigo e tempo de cultivo para a produção enzimática. Na figura 3 pode ser observado que a produção enzimática máxima pode ser obtida entre 110 e 160 horas e em concentrações de 4,0 - 5,0% (m/v) de farelo de trigo como fonte de carbono.

Considerando os resultados dos experimentos de planejamento fatorial, foi visto as condições de cultivo que favoreceram a produção da enzima pelo *F. graminearum* foi farelo de trigo 4,0% (m/v), bagaço de cana 0,5% (m/v), peptona 0,1% (m/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM, solução de sais 10mL/frasco, pH inicial de cultivo 7,5 a 35°C. Nestas condições o microrganismo foi capaz de produzir cerca de 5 vezes mais enzima, quando comparado ao primeiro experimento utilizando farinha de centeio 1% (m/v) como fonte de carbono.



**Figura 3.** Superfície de resposta para a produção  $\beta$ -D-frutofuranosidásica extracelular (U/mL) em função do tempo de cultivo e da concentração de farelo de trigo como fonte de carbono.

Os experimentos de planejamento fatorial foram úteis na otimização das condições de cultivo para produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo *F. graminearum*. Nas condições otimizadas o fungo foi capaz de produzir e exteriorizar a enzima (16U/mL). Neste processo foi possível determinar tanto os componentes necessários ao meio de cultivo (farelo de trigo, bagaço de cana, peptona,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), para o desenvolvimento microbiano e produção enzimática, descartando outros que não influenciaram a produção enzimática (extrato de levedura e  $\text{MgSO}_4$ ), como também as condições de cultivo, aumentando-se o período fermentativo e ajustando

temperatura e pH inicial, o que proporcionou ao fungo melhores condições para síntese da enzima podendo reduzir os custos do processo. Comparando-se com algumas  $\beta$ -D-frutofuranosidases já descritas, a  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular de *F. graminearum* foi produzida de forma mais vagarosa, no entanto a redução temperatura de cultivo pode ser um fator interessante para sua aplicabilidade, já que requer menos energia para a manutenção da temperatura. Alegre *et al.* (2009) verificaram a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase por *A. caespitosus* em 72 horas, mantendo a temperatura em 40°C, sendo que as mesmas condições foram observadas para *A. niveus* (Guimarães *et al.*, 2009), *A. phoenicis* (Rustiguel *et al.*, 2010) e *Paecylomyces variotii* (Giraldo *et al.*, 2011). Para a produção invertásica pelo fungo *A. ochraceus* foi observado o tempo de 96 horas de cultivo em temperatura de 40°C (Guimarães *et al.*, 2007).

A otimização da produção enzimática por microrganismos, apesar de apresentar um potencial fantástico para o mercado dessas proteínas, ainda é muito pouco utilizado. A utilização do planejamento fatorial já foi descrita para otimização da produção de algumas enzimas microbianas como  $\alpha$ -amilase. (Tanyildizi *et al.*, 2005), alcalino-protease (Chauhan e Gupta, 2004) e lipase (Kempka, 2007).

#### **4.3. PRODUÇÃO DE $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE POR *F. graminearum* EM FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO (FSS)**

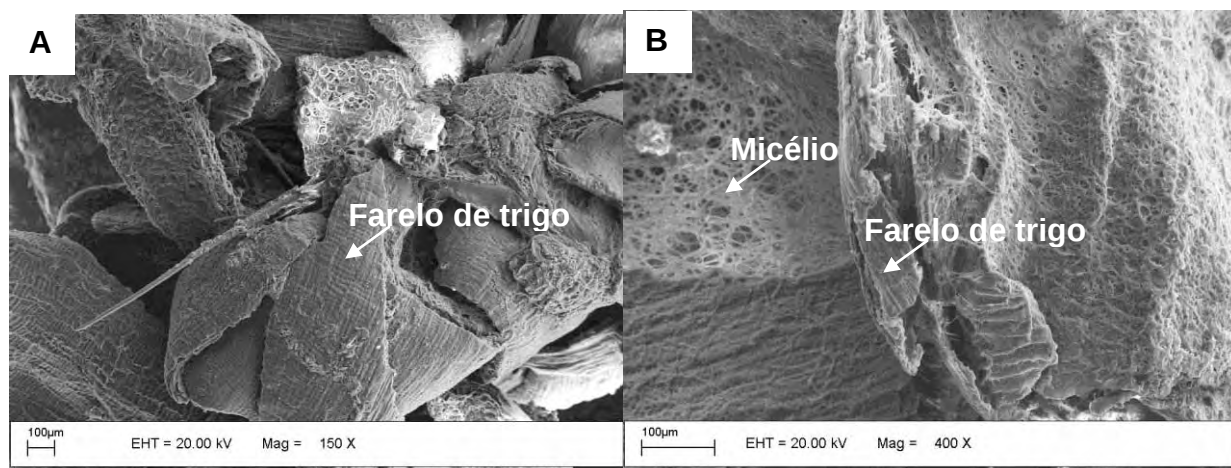
A Fermentação em Substrato Sólido (FSS) foi realizada na tentativa de aumentar os níveis de produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase por *F. graminearum*. A produção enzimática em FSS apresenta algumas vantagens quando comparada a FSbm, como a similaridade das condições ambientais naturais para o crescimento do fungo, utilização de substratos com baixo custo como resíduos ou produtos agroindustriais, e ainda produção de altos índices enzimáticos (Rustiguel *et al.*, 2011).

Assim como para a fermentação submersa, o farelo de trigo e a soja moída proporcionaram as melhores condições para a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase por *F. graminearum* quando utilizados como fontes de carbono/substratos em FSS. O farelo de trigo foi preferido por se tratar de um resíduo agroindustrial com valores reduzidos em relação ao grão de soja (Tabela 15). Já os resíduos bagaço de laranja, serragem fina, bagaço de cana de açúcar lavado e serragem não foram bons substratos para a produção dessa enzima (dados não mostrados). Os dados descritos sobre a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase em FSS ainda são escassos. Alguns resíduos agroindustriais já foram apontados na produção de enzimas em FSS, incluindo o bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho, palha de arroz, palha de trigo, casca de soja, sabugo de milho, casca de banana, resíduo de chá e bagaço de maçã. No entanto, o farelo de trigo é o mais comum dentre os resíduos utilizados (Sangeetha *et al.*, 2004). Além do baixo custo de produção em FSS, outra vantagem é a simplicidade na operação, alta produtividade e concentração do produto e baixa incidência do crescimento de organismos contaminantes (Balasubramaniam *et al.*, 2001). Rustiguel *et al.* (2011) descreveram o sucesso da produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase em FSS pelo fungo *Aspergillus phoenicis* utilizando farelo de soja como fonte de carbono/substrato umedecido com água de torneira (1:0,5, m/v). As  $\beta$ -D-frutofuranosidasas foram produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* utilizando resíduos de cenoura vermelha como fonte de carbono/substrato (Rashad e Nooman, 2009).

**Tabela 15.** Fontes de carbono/substratos utilizados para a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase em FSS pelo fungo *F. graminearum*.

| Fonte de carbono/ substrato                                                                                 | Atividade/ g de substrato<br>(U/g substrato) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Trigo moído                                                                                                 | 2,40 $\pm$ 0,22                              |
| Milho moído                                                                                                 | 4,80 $\pm$ 1,35                              |
| Soja moída                                                                                                  | 110,57 $\pm$ 11,69                           |
| Trigo em grãos                                                                                              | 3,06 $\pm$ 2,07                              |
| Sabugo de milho                                                                                             | 6,40 $\pm$ 1,50                              |
| Farinha de centeio                                                                                          | 2,40 $\pm$ 0,56                              |
| Farelo de trigo                                                                                             | 108,11 $\pm$ 5,49                            |
| Casca laranja                                                                                               | 15,08 $\pm$ 1,29                             |
| FSS – umedecida com água de torneira (1:1, m/v), incubado por 7 dias a 30°C e 60% de umidade relativa do ar |                                              |

Na figura 4 o crescimento abundante de *F. graminearum* sobre o farelo de trigo pode ser observado. Este resíduo mostrou-se eficaz como suporte e fonte de nutrientes para a propagação do fungo, e também proporcionou as condições necessárias para produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase. O fungo cresceu de forma constante formando uma rede de micélio e em um curto espaço de tempo (7 dias) já não era possível identificar os flocos de farelo de trigo, apenas a massa micelial branca. O baixo custo deste resíduo agroindustrial é um fator importante que deve ser considerado para obtenção de culturas fúngicas e a produção de enzimas.



**Figura 4.** Fotomicrografias da FSS utilizando farelo de trigo como fonte de carbono/substrato (A) e crescimento de fungo *F. graminearum* sobre substrato sólido após 7 dias de cultivo a 30 °C (B).

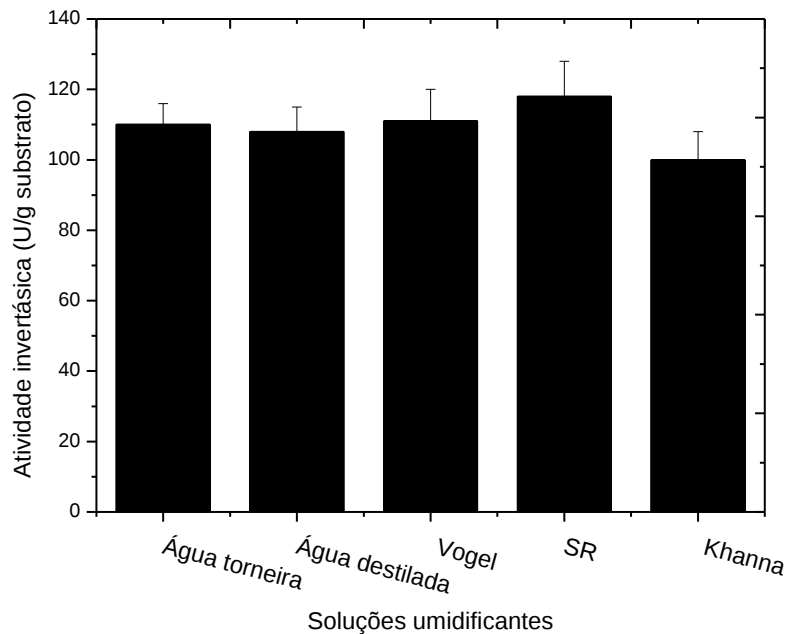
#### 4.3.1. Efeito de diferentes soluções umidificantes na FSS sobre a produção de $\beta$ -D-frutofuranosidases

A solução umidificante do meio de cultura na FSS tem importância fundamental para o crescimento do fungo e produção de enzimas. O nível de umidade em FSS pode influenciar a biossíntese e secreção de enzimas, devido à interferência do umidificante nas propriedades físicas das partículas sólidas (substrato), diminuindo assim a porosidade e impedindo a penetração do oxigênio e conseqüentemente o crescimento do microrganismo (Ramesh e Lonsane, 1990).

No caso da produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase em FSS utilizando farelo de trigo como substrato/fonte de carbono pelo fungo *F. graminearum*, as 5 soluções umidificantes proporcionaram, de forma muito semelhante, a produção da enzima extracelular pelo fungo, sendo que a variação ocorreu entre 118,2 U/g substrato (solução de sais SR) e 100,4 U/g substrato (solução de sais Khanna). A produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase quando o substrato/fonte de carbono foi umidificado com água de torneira foi de 110,7 U/g substrato (Figura 5), e por não apresentar diferenças

significantes com relação as demais, esta solução foi escolhida para posteriores experimentos por ser de fácil acesso e baixo custo. A água de torneira é uma solução que contém sais e íons em baixas concentrações, como ppm (partes por milhão) e pode ter compostos que também que contribuam para o desenvolvimento do microrganismo, e conseqüentemente, para a produção da enzima. A composição da água da torneira utilizada para este experimento foi alumínio 0,009 mg/L, ferro 0,008 mg/L, fluoreto de 0,2 mg/L, 0,019 nitrogênio mg/L, cloro 1,15 mg/L. A lei brasileira estabelece alguns valores máximos aceitáveis para consumo humano, de água, tal como alumínio (0,2 mg/L), cloreto (250 mg/L), ferro (0,3 mg/L), manganês (0,1 mg/L), de sódio (200 mg/L), sulfato (250 mg/L), sulfeto de hidrogênio (0,05 mg/L) e zinco (5 mg/L). Para a reprodução de tais concentrações, seria necessário a análise química desta água e ainda a utilização de equipamentos de pesagem muito precisos, o que torna o processamento praticamente inviável. Assim, pode-se dizer que, mesmo que a água de torneira apresente diferenças regionais, ainda assim, devem possuir semelhanças consideráveis em suas composições.

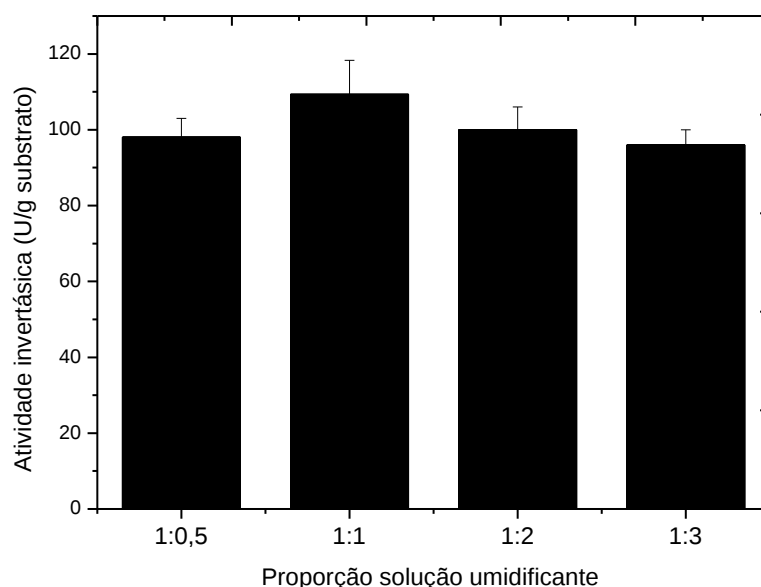
Rustiguel *et al.* (2010) observaram que para *A. phoenicis* a maior produção enzimática ocorreu quando ao cultivo foi adicionado de água de torneira, diferindo de Goulart *et al.* (2003) que utilizaram água destilada para umidificar o meio de cultivo para a produção enzimática por *Rhizopus* sp.. Alegre *et al.* (2009) constataram que *A. caespitosus* teve maior produção enzimática quando o substrato foi umedecido com solução de sais de SR, semelhante ao observado por Giraldo (2011) para o fungo *A. terreus*.



**Figura 5.** Produção  $\beta$ -D-frutofurnosidase extracelular pelo fungo *F. graminearum* em FSS tendo farelo de trigo como substrato, umidificados com diferentes soluções (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 7 dias a 30°C em ambiente com umidade relativa de 60%.

Uma vez escolhida a água de torneira como umidificante para a FSS utilizando como substrato/fonte de carbono farelo de trigo, foi verificada a influência de diferentes proporções deste umidificante na produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidases por *F. graminearum*. A proporção que mais favoreceu a produção enzimática foi 1:1 (m/v) com 109,3 U/g substrato, sendo que as demais proporções praticamente não apresentaram diferenças quanto a produção da enzima (Figura 6).

A umidade do substrato/fonte de carbono é fundamental para a produção enzimática pelo fungo. Em casos onde o meio está sem umidade, além da produção ser reduzida, a exteriorização da enzima pelo fungo pode ser dificultada, tornando praticamente impossível sua obtenção. No entanto, se existe quantidade excedente do umidificante, a aderência do fungo ao substrato pode ser dificultada, e este por falta de acesso a sua fonte de nutrientes poderá não produzir a enzima para degradá-lo.

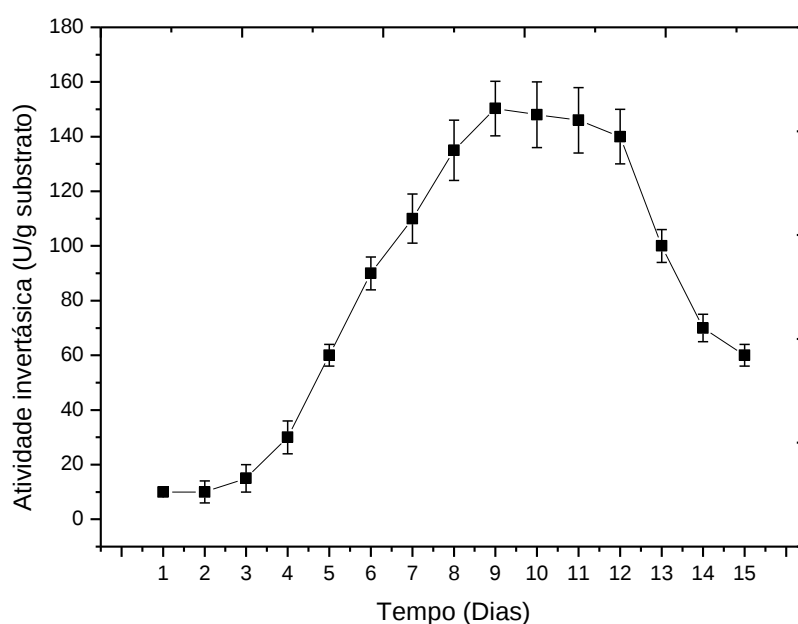


**Figura 6.** Produção de  $\beta$ -D-frutofurnosidase extracelular pelo fungo *F. graminearum* em FSS tendo farelo de trigo como substrato, umidificados com água de torneira em diferentes proporções (m/v), sendo o cultivo realizado por 7 dias a 30°C em ambiente com umidade relativa de 60%

#### **4.3.2. Produção de $\beta$ -D-frutofurnosidase extracelular em função do tempo de cultivo**

Para se verificar qual o melhor tempo de cultivo para a produção máxima de  $\beta$ -D-frutofurnosidase, meios com farelo de trigo como substrato/fonte de carbono umidecidos com água de torneira na proporção 1:1 (m/v) foram utilizados. Neste caso, a maior produção enzimática (150 U/ g substrato) foi obtida entre o 9º e 12º dias do cultivo como mostrado na figura 7. Em tempos superiores, a produção enzimática foi diminuída, o que pode ser explicado pelo aumento de fontes de carbono prontamente assimiláveis, como a glicose obtida da hidrólise dos carboidratos presentes, bem como um possível aumento de proteases que degradariam a  $\beta$ -D-frutofuranosidase.

O período de cultivo do microrganismo para a produção da enzima de 9 dias, mostrou-se tardio quando comparado com os dados apresentados para  $\beta$ -D-frutofuranosidases produzidas por outros fungos em FSS, e isso pode ser devido ao crescimento vagaroso do fungo no substrato, e conseqüente retardo na produção de produtos extracelulares. O período de 72 horas de incubação foi utilizado para a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidases pelos fungos *A. caespitosus* (Alegre *et al.*, 2009), *A. niger* (Balasubramaniam *et al.*, 2001) e *A. phoenicis* (Rustiguel *et al.*, 2010). Para o fungo *Fusarium* sp. (Shaheen *et al.*, 2008) o período de 96 horas de cultivo foi o melhor para a produção enzimática e para *Rhizopus* sp. a melhor produção da enzima pelo fungo foi obtida após 168 horas de cultivo (Goulart *et al.*, 2003).

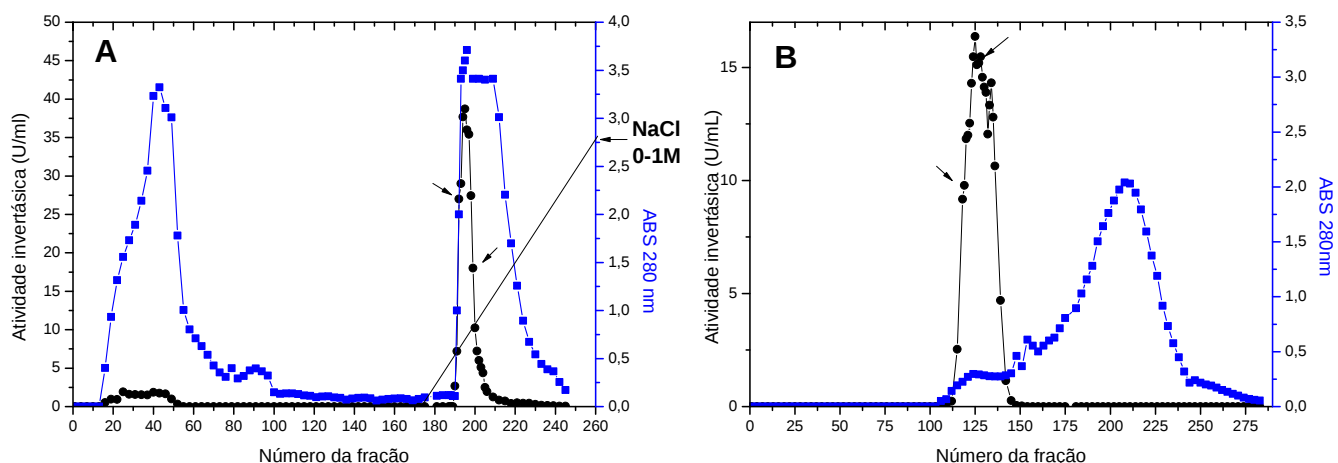


**Figura 7.** Produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo *F. graminearum* em função do tempo de cultivo em FSS com farelo de trigo como substrato/fonte de carbono, umidificado com água de torneira (1:1, m/v) a 30°C em ambiente com umidade relativa de 60%.

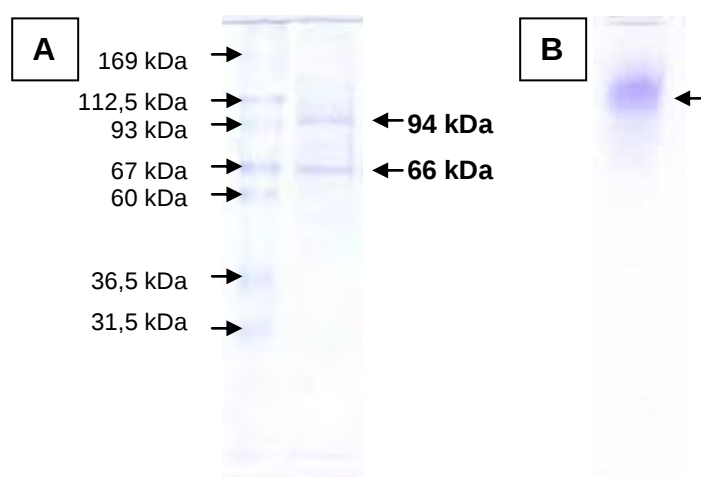
#### **4.4. PURIFICAÇÃO DA $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRA-CELULAR PRODUZIDA POR *F. graminearum***

O extrato bruto extracelular obtido em FSS por *F. graminearum* foi aplicado em coluna cromatográfica DEAE-Celulose, sendo a fração invertásica eluída como única forma com 0,25 M de NaCl através de um gradiente linear (0-1 M) (Figura 8A). As frações com atividade enzimática foram reunidas em um *pool*, dialisado contra água destilada overnight, liofilizado, e aplicado em coluna de exclusão de massa molecular Sephacryl S200 (Figura 8B), sendo eluída como única forma. Desta forma, a enzima foi purificada 8,41 vezes com recuperação de 14% (Tabela 16). Em PAGE, revelou-se uma única banda proteica e em SDS-PAGE, foram reveladas 2 bandas proteicas de 94 kDa e 66 kDa (Figuras 9 A e B), supondo-se um heterodímero, uma vez que a massa molecular nativa, estimada pela coluna de filtração Sephacryl S200 foi de 159 kDa .

A  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular de *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 produzida em FSS com resíduos de cenoura, foi purificada 29 vezes com rendimento de 4,7% em coluna DEAE-Celulose e Sephacryl S300, sendo a massa molecular da proteína estimada em 95,5 kDa (Rashad e Nooman, 2009). A  $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por *A. phoenicis* foi purificada 12,5 vezes utilizando colunas cromatográficas DEAE-Celulose e Sephacryl S200 com rendimento final de 7,5%, sendo caracterizada como homodímero com duas subunidades de 70 kDa (Rustiguel *et al.*, 2010). Comparando-se a estas  $\beta$ -D-frutofuranosidases descritas, o processo de purificação aqui apresentado foi mais eficiente.



**Figura 8.** Perfis cromatográficos em colunas DEAE-celulose (A) e Sephacryl S200 (B) para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por *F. graminearum* em FSS utilizando farelo de trigo como fonte de carbono/substrato. Símbolos: (■) Absorbância 280 nm, (●) Atividade invertásica (U/mL).



**Figura 9.** Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE 12% (A) e PAGE 6% (B) para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular de *F. graminearum* corados com Comassie Brilliant-Blue R250.

**Tabela 16.** Purificação da  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *F. graminearum* em FSS.

| Passo purificação | Vol (mL) | Atividade (U totais) | Proteína (mg total) | Ativ. Esp. (U/mg) | Rec. (%) | Fator purific. (vezes) |
|-------------------|----------|----------------------|---------------------|-------------------|----------|------------------------|
| Extrato bruto     | 100      | 1626                 | 199                 | 8,17              | 100      | 1                      |
| Etanol (1:1)      | 30       | 871                  | 35                  | 24,88             | 53,57    | 3,04                   |
| DEAE-celulose     | 24       | 370                  | 12                  | 30,83             | 22,75    | 3,77                   |
| Sephacryl S200    | 12       | 227                  | 3,3                 | 68,78             | 13,96    | 8,42                   |

Vol = volume; Ativ. Esp. = atividade específica; Rec. = recuperação; Fator purific. = fator de purificação

#### 4.5. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *F. graminearum*

##### 4.5.1. Influência da temperatura e do pH sobre a atividade frutofuranosidásica

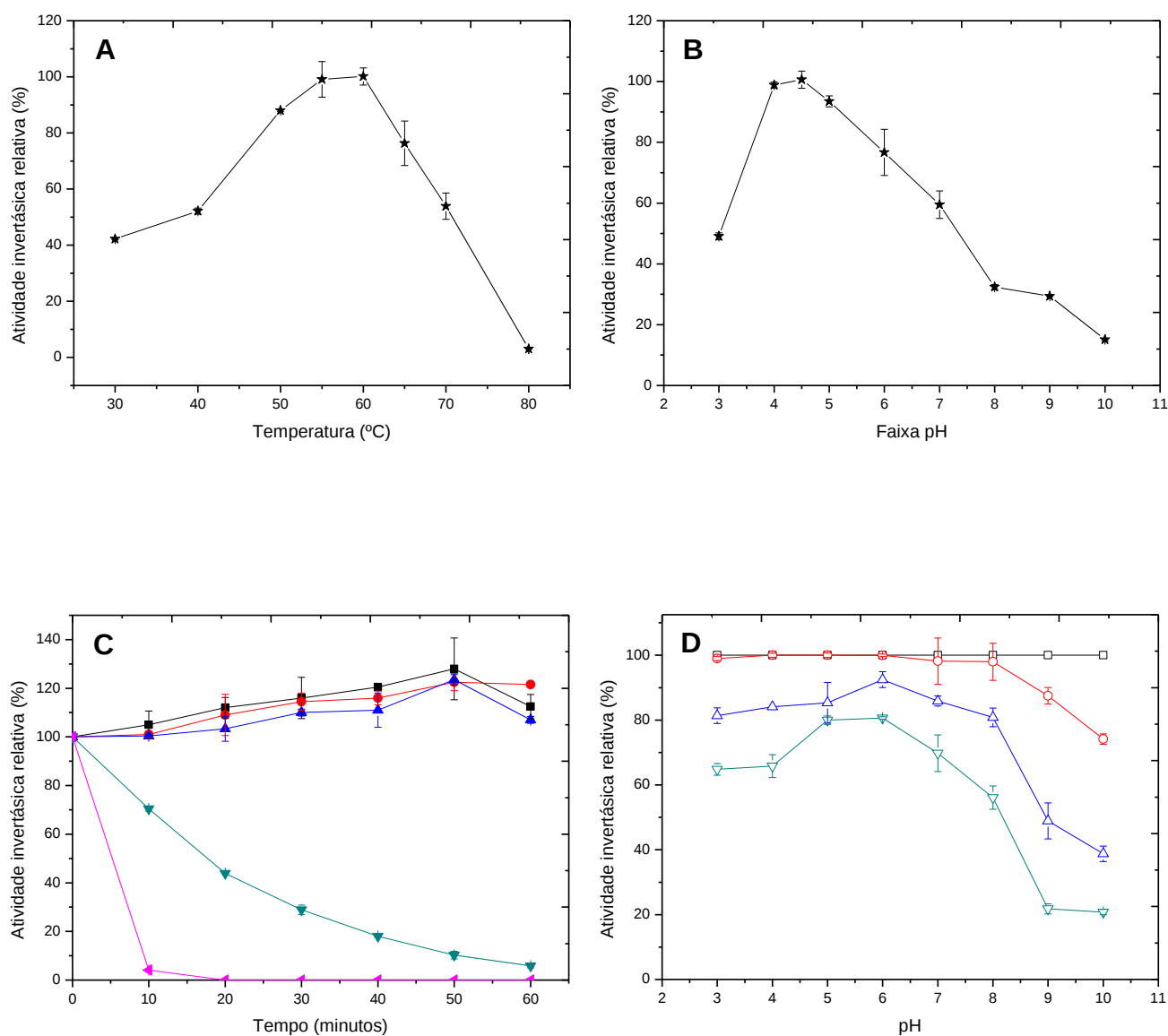
A  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *F. graminearum* teve atividade máxima de 55 - 60°C e em pH 4,5 (Figura 10 A e B). Os valores ótimos obtidos se assemelham com os dados já descritos para as  $\beta$ -D-frutofuranosidases produzidas por *R. dairenensis* (Gutiérrez-Alonso, *et al.*, 2009), *A. phoenicis* (Rustiguel *et al.*, 2010) e *S. cerevisiae* (Rashad e Nooman, 2009).

Adicionalmente, a  $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por *F. graminearum* foi totalmente estável em temperaturas entre 30°C e 50°C por 1 hora, mantendo cerca de

70% de atividade a 60°C por 10 minutos. Considerando a temperatura de 70°C, o T<sub>50</sub> foi de apenas 6 minutos (Figura 10C). O aumento de temperatura provoca maior agitação das moléculas, melhorando as possibilidades de elas se chocarem para reação. No entanto, se a temperatura continua se elevando, a agitação das moléculas se torna tão intensa que as ligações que estabilizam a estrutura espacial da enzima se rompem causando sua desnaturação (Nelson e Cox, 2005).

Quanto a exposição a diferentes valores de pH, a enzima foi estável, com atividade residual acima de 80% entre o pH 3,0 e 8,0 por 30 minutos e acima de 75% para pH entre 3,0 e 10,0 por 10 minutos (Figura 10D). Considerando que a remoção de um próton a partir do resíduo de um aminoácido na proteína, pode eliminar uma interação essencial para estabilizar a conformação ativa da enzima (Nelson e Cox, 2005), a redução da estabilidade da enzima após 30 minutos de exposição em valores acima do pH 7,0 pode ocorrer devido a desprotonação de aminoácidos importantes presentes no sítio ativo desta proteína, levando a desestruturação e, conseqüentemente redução da atividade catalítica.

As  $\beta$ -D-frutofuranosidases de *F. graminearum* foram mais estáveis que a produzida por *Aspergillus caespitosus*, sendo estáveis a 50°C e com meia vida (T<sub>50</sub>) de 50 minutos e 60 minutos para as formas intra e extracelular, respectivamente (Alegre et al., 2009). No entanto a  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *Rhodotorula glutinis* foi mais estável a temperatura de 60°C durante 30 minutos. Por outro lado, quanto a estabilidade ao pH, houve diminuição de 93% da atividade enzimática em pH 8,0 (Rubio et al., 2002)



**Figura 10.** Determinação temperatura ótima aparente (A), pH ótimo aparente (B), estabilidades térmica (C) e ao pH (D) para  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *F. graminearum* em FSS. Símbolos: C) 30°C (■), 40°C (●), 50°C (▲), 60°C (▼), 70°C (◄), D) 0 min (□), 10 min (○), 30 min (Δ) e 50 min (▽).

#### 4.5.2. Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade frutofuranosidásica

Avaliando o efeito de diferentes compostos sobre a atividade enzimática, o  $Mn^{2+}$  foi o íon que mais ativou a  $\beta$ -D-frutofuranosidase estudada (127%), seguido por  $K^+$ , com atividade catalítica elevada 75%, quando adicionado 1mM do sal. Quando

concentração elevada (10 mM) foi adicionada ao meio reacional, foi observado um aumento na atividade enzimática também na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (54%) e  $\text{Mg}^{2+}$  (44%) e diminuição da atividade quando presente  $\text{Mn}^{2+}$  (87%) e  $\text{K}^+$  (64%). A enzima foi totalmente inibida na presença de 1mM de  $\text{Hg}^{2+}$  e parcialmente inibida (76%) quando adicionado  $\text{Ba}^{2+}$  na reação enzimática (Tabela 17). A presença de íons na solução protéica pode afetar seu pH, de forma inespecífica, os íons podem interagir com a carga dos grupos laterais dos aminoácidos na proteína (Kunz, 2006). Esta interação pode modificar a estrutura conformacional da enzima, ou ainda, o íon pode agir diretamente no sítio ativo, afetando a interação com o substrato. O íon mercúrio pode agir com grupos tióis ou podem reagir com grupos com resíduos de histidina e triptofano reduzindo a atividade enzimática, enquanto que, a ativação na presença de cátions divalentes pode ser explicada por reações não específicas com a proteína, uma vez que muitos íons metálicos agem como cofatores, aumentando a atividade catalítica de uma variedade de enzimas (Gonçalves *et al.*, 2012).

Assim como a  $\beta$ -D-frutofuranosidase estudada, a enzima produzida por *A. niveus* também foi ativada por  $\text{Mn}^{2+}$ , além dos íons  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^{2+}$  (Guimarães *et al.*, 2009). Alegre *et al.* (2009) mostraram a ativação da enzima produzida por *A. caepitosus* pelo mesmo íon, com 49% de aumento na atividade enzimática intracelular e 26% para a enzima extracelular, sendo também ativadas por  $\text{Ca}^{2+}$  e inibidas por  $\text{Hg}^{2+}$ . Para *R. glutinis*, a presença de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  favoreceu a atividade invertásica (Rubio *et al.*, 2002). Ao contrário do exposto para a enzima estudada, a  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *A. phoenicis* foi inibida na presença do íon  $\text{Mn}^{2+}$ , mas apresentou ativação quando o  $\text{K}^+$  esteve presente na reação enzimática (Rustiguel *et al.*, 2010).

A presença de EDTA e  $\beta$ -mercaptoetanol, não afetaram significativamente a atividade catalítica da proteína (Tabela 17). Este último atua perturbando as pontes dissulfetos entre as subunidades, o que pode causar a diminuição da atividade catalítica da enzima (Riul *et al.*, 2013). A inibição por  $\beta$ -mercaptoetanol, ao contrário do apresentado neste trabalho, já foi descrita para várias enzimas, como tanases de *A. niger* (Aguilar e Gutiérrez-Sanches, 2001), *P. variotii* (Battessin e Macedo, 2007) e *Rhizopus oryzae* (Mukherjee e Banerjee, 2006). O EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) é um composto quelante, capaz de formar complexos estáveis com vários íons metálicos e na maioria das enzimas afeta a atividade catalítica negativamente. A  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *A. phoenicis* foi sensível a este agente tendo sua atividade reduzida 26% (Rustiguel, *et al.* 2011). No entanto, para a enzima produzida por *F. graminearum* o EDTA não mostrou efeito significativo na atividade enzimática, sugerindo que esta proteína não é dependente de um íon metálico divalente específico.

**Tabela 17.** Efeito de diferentes compostos sobre a atividade invertásica de *F. graminearum* produzida em FSS.

| Atividade invertásica relativa (%) |                |               |                         |               |              |
|------------------------------------|----------------|---------------|-------------------------|---------------|--------------|
|                                    | 1mM            | 10mM          |                         | 1mM           | 10mM         |
| <b>NaCl</b>                        | 100,12 ± 2,68  | 123,44 ± 6,15 | <b>ZnCl<sub>2</sub></b> | 126,61 ± 5,39 | 67,57 ± 2,01 |
| <b>AgNO<sub>3</sub></b>            | 108,65 ± 4,03  | 117,19 ± 2,67 | <b>CoCl<sub>2</sub></b> | 142,23 ± 2,02 | 94,98 ± 4,67 |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>            | 128,02 ± 9,97  | 154,51 ± 0,40 | <b>FeCl<sub>3</sub></b> | 145,95 ± 3,32 | 62,37 ± 6,73 |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>            | 129,12 ± 7,35  | 144,12 ± 0,55 | <b>HgCl<sub>2</sub></b> | 0             | 0            |
| <b>MnCl<sub>2</sub></b>            | 227,31 ± 12,38 | 187,12 ± 4,04 | <b>BaCl<sub>2</sub></b> | 34,46 ± 3,30  | 76,55 ± 6,68 |
| <b>KCl</b>                         | 174,81 ± 3,94  | 164,49 ± 5,37 | <b>β-ME*</b>            | 92,50 ± 9,02  | 90,25 ± 4,67 |
| <b>NH<sub>4</sub>Cl</b>            | 89,79 ± 2,67   | 69,97 ± 8,06  | <b>EDTA*</b>            | 99,95 ± 1,34  | 91,56 ± 6,11 |
| <b>AlCl<sub>3</sub></b>            | 137,51 ± 9,33  | 120,45 ± 6,01 | <b>ausente</b>          | 100           | 100          |
| <b>CuCl<sub>2</sub></b>            | 110,32 ± 8,37  | 103,96 ± 4,01 |                         |               |              |

\*β-ME= β-mercaptoetanol; EDTA= ácido etilenodiaminotetracético

#### 4.5.3. Parâmetros cinéticos

As constantes cinéticas ( $K_m$ ,  $V_{max}$  e  $V_{max}/K_m$ ) da β-D-frutofuranosidase de *F. graminearum* purificada são apresentadas na Tabela 18. A enzima foi capaz de hidrolisar a sacarose e a rafinose, mas não a inulina. A enzima responsável pela degradação da inulina é conhecida como inulinase (EC 3.2.1.7) liberando moléculas de frutose a partir da porção terminal do açúcar não-redutor. Apesar da semelhança na ação das enzimas invertase e inulinase, a última se distingue pela alta afinidade com substratos de maior peso molecular, tais como inulina. Algumas invertases são capazes de hidrolisar a inulina, e a relação S/I (atividade catalítica relativa com

sacarose e inulina) é comumente utilizada para discriminar as inulinases das invertases. Adicionalmente, a enzima que não apresenta a capacidade de hidrolizar inulina, é chamada de invertase verdadeira (Vandamme *et al.*, 2003).

A  $\beta$ -D-frutofuranosidase em estudo apresentou maior afinidade para a rafinose, com  $K_m$  de 24,16 mM. A velocidade máxima ( $V_{max}$ ) e razão  $V_{max}/K_m$  foram maiores quando utilizada a sacarose como substrato com valores de 1639,34 U/mg proteína e 51,82 U/mg proteína  $mM^{-1}$ , respectivamente (Tabela 18). Além disso, a capacidade de hidrolisar tanto sacarose como rafinose indicam que a enzima é capaz de atacar os  $\beta$ -D-frutofuranosídeos terminais de frutose (Guimarães *et al.*, 2007).

Para o fungo filamentoso *A. niger* AS00123 o  $K_m$  foi de 35,67 mM na presença de sacarose como substrato (L'Hocine *et al.*, 2000). Já para as enzimas produzidas por *S. cerevisiae* (Talekar *et al.*, 2010) e por *Cladosporium cladosporioides* (Almeida *et al.*, 2005) os valores de  $K_m$  foram 10,8 mM e 447 mM, respectivamente. Guimarães *et al.* (2007) testaram além da sacarose, rafinose e inulina, tendo valores de  $K_m$  de 13,40 mM, 7,37 mM e 2,66 mM, respectivamente, para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por *A. ochraceus*.

**Tabela 18.** Parâmetros cinéticos da  $\beta$ -D-frutofuranosidase em diferentes substratos.

| Substrato | $V_{\text{máx}}$<br>(U/mg proteína) | $K_m$<br>(mM) | $V_{\text{máx}}/K_m$<br>(U/mg proteína mM <sup>-1</sup> ) |
|-----------|-------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------|
| Sacarose  | 1639,34                             | 31,63         | 51,82                                                     |
| Rafinose  | 1041,66                             | 24,16         | 43,11                                                     |

$V_{\text{máx}}$  = Velocidade máxima;  $K_m$  = Constante de Michaelis Menten

#### 4.6. SECAGEM DA $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR EM SPRAY DRYER

Os rendimentos do processo de secagem estão apresentados na tabela 19. As partículas secas contendo a enzima foram mantidas em temperatura abaixo da temperatura de entrada do ar de secagem (100°C) por todo o processo. Enquanto a água evapora das partículas, ocorre um efeito de resfriamento, o que impede que a temperatura de secagem do material se eleve acima da temperatura no bulbo de secagem do ar (Namaldi *et al.*, 2006). Durante o processo de secagem por pulverização, a temperatura de saída do secador de ar ( $T_{gs}$ ) foi mantida em torno de 67,8°C (com um mínimo de 66,8°C e um máximo de 70°C) e isto faz com que a secagem por pulverização seja um método conveniente para a secagem das enzimas, dependendo do tipo e da concentração de adjuvante utilizada (Tabela 19).

A taxa de fluxo real de alimentação ( $W_{\text{real}}$ ) variou entre 3,8g/min e 4,6g/min (Tabela 19). A lipase de *Cercospora kikuchii* seca em *Spray dryer* utilizando diferentes adjuvantes também mostrou redução na  $T_{gs}$  (75,7°C) e a taxa de fluxo real de alimentação variou entre 2,63g/min e 9,36g/min (Costa-Silva *et al.*, 2010). O mesmo ocorre com as duas outras enzimas secas por *Spray dryer*, a tripsina utilizando carboidratos como adjuvantes, com a temperatura de saída do ar mantida entre 65°C e

70°C, e a temperatura de entrada de 180°C, e fluxo real de 4,6mL/min (Millqvist-et Fureby *al.*, 1999), e a serino-protease alcalina, que foi seca com diferentes aditivos, com temperatura de entrada variando entre 70°C e 130°C e a temperatura de saída do ar de 56°C a 90°C (Namaldi *et al.*, 2006).

Os melhores rendimentos depois do processo de secagem foram encontrados quando o extrato contendo  $\beta$ -D-frutofuranosidase foi seco utilizando-se o amido capsul 10% (m/v) e trealose 10% (m/v), com 63,6% e 56,9% de recuperação, respectivamente (Tabela 19). Adicionalmente, considerando todos os adjuvantes analisados, pode-se visualizar a diferenças entre os rendimentos do extrato seco em pó de 63,6% para o amido capsul (10%) e 22,4% para a celulose microcristalina (2%). A razão provável para este baixo rendimento, pode ser uma ineficiente obtenção do pó durante o processo de secagem por pulverização, sendo as partículas finas arrastadas juntamente com o ar de exaustão, ou também, deve-se considerar a deposição de pó na câmara de secagem que pode contribuir para a diminuição do rendimento (Costa-Silva *et al.*, 2011).

A adição dos carboidratos foi fundamental para a preservação da atividade enzimática (Tabela 20). A proporção de carboidratos na amostra pode estar relacionada matriz protetora da proteína, e a utilização de diferentes concentrações destes foi demonstrada analisado seu melhor rendimento. A atividade invertásica foi verificada utilizando-se o pó seco obtido diluído em a tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, nas mesmas proporções de resíduos sólidos presentes no extrato bruto líquido. Entre todas as preparações avaliadas, aquelas contendo trealose 2% mostraram os melhores resultados para a manutenção da atividade enzimática (62,6 U/mL), seguido por amido capsul 10% e 5% (53,1 e 50,48 U/mL, respectivamente) e trealose 10% (40,7 U/mL) (Tabela 20). Quando a serino-protease alcalina foi seca utilizando-se

glicose 0,5% (m/v) e maltodextrina 0,5% (m/v) como aditivos, a perda de atividade foi superior a 25% e 15%, respectivamente, com a temperatura do ar de entrada do secador por pulverização de 110°C (Namaldi *et al.*, 2006).

Durante o processo de secagem, muitas enzimas podem perder parte de sua atividade. A desnaturação das proteínas pode ocorrer devido a altas temperaturas observadas no fluxo de ar, elevadas forças durante o processo de atomização, estresse térmico na câmara de secagem. A utilização de carboidratos como adjuvantes no processo têm a função de reduzir a perda da atividade enzimática da proteína em altas temperaturas. Dois mecanismos podem explicar, ao menos em parte, a função dos carboidratos na proteção da enzima. Na primeira hipótese, os carboidratos entrariam no lugar da água para preservar a estrutura nativa da proteína, uma vez que, em meio aquoso, água e proteína estabelecem ligações de hidrogênio, que devem ser refeitas quando em estado sólido. Os carboidratos podem satisfazer as condições na formação de tais ligações com as proteínas. Uma segunda hipótese seria formação de uma matriz cristalina que dificultaria a alteração da conformação da proteína, preservando assim sua atividade (Millqvist-Fureby *et al.*, 1999).

A melhor atividade  $\beta$ -D-frutofuranosidásica foi encontrada quando a trealose e o amido capsul foram usados como excipientes. Já quando utilizado a celulose microcristalina, foram encontrados níveis de atividade enzimática reduzidos. O pó contendo a enzima utilizando trealose e amido capsul são visualmente amorfos, enquanto a celulose microcristalina apresenta-se como uma matriz vítrea (Figura 11). Outra característica observada, que confirma estes dados é a diferença entre os diâmetros das partículas de extrato seco. A média dos diâmetros das partículas de extrato seco utilizando a celulose microcristalina (33,11  $\mu\text{m}$ ) foi mais elevada do que a observada para os pós obtidos com a trealose (10,81  $\mu\text{m}$ ) ou o amido capsul (8,15  $\mu\text{m}$ ).

(Tabela 20). Os aspectos micro e macroscópicos do pó contendo a enzima podem ser claramente notados na figura 11. O formato amorfo encontrado no amido capsul é facilmente distinguível da forma arredondada do pó de trealose e da matriz cristalina da celulose microcristalina.

A atividade de água e a umidade do extrato em pó, embora sejam características importantes para a manutenção e estabilidade da atividade enzimática, não foram descritas por outros autores, mas por serem essenciais foram investigados. Todos os extratos secos apresentaram atividade de água abaixo do valor mínimo para a proliferação de microrganismos decompositores, o que é bastante desejado (Tabela 20). Por exemplo, bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm valores de atividades de água mais elevados, 0,9, 0,88 e 0,8, respectivamente, do que os encontrados nos pós secos por *Spray dryer* aqui apresentados (0,19-0,31). A umidade dos pós, também não excedeu ao valor esperado, e os extratos com teor de humidade mais elevados foram os que utilizaram  $\beta$ -ciclodextrina 5% e 10% como adjuvante (Tabela 20).

**Tabela 19.** Efeito do tipo e da concentração dos adjuvantes utilizados para secagem em *Spray dryer* do extrato bruto contendo  $\beta$ -D-frutofurosidase de *F. graminearum* sobre o rendimento do processo, a temperatura de saída do ar e vazão de alimentação real.

| Resultados obtidos |                      |                              |                     |              |
|--------------------|----------------------|------------------------------|---------------------|--------------|
| Amostra            | T <sub>gs</sub> (°C) | W <sub>real</sub><br>(g/min) | R <sub>ec</sub> (%) | Ac+E         |
| AC10%              | 68,33 ± 0,51         | 4,21                         | <b>63,63</b>        | <b>36,37</b> |
| AC5%               | 69,00 ± 1,67         | 3,95                         | 54,89               | 45,11        |
| AC2%               | 66,80 ± 1,30         | 4,22                         | 38,12               | 61,68        |
| CM10%              | 68,80 ± 4,08         | 4,39                         | 50,87               | 49,13        |
| CM5%               | 67,60 ± 0,54         | 4,32                         | 41,44               | 58,56        |
| CM2%               | 70,02 ± 0,63         | 4,60                         | 22,42               | 77,58        |
| TR10%              | 67,16 ± 0,40         | 4,63                         | 56,91               | 43,09        |
| TR5%               | 67,16 ± 0,40         | 4,51                         | 50,56               | 49,44        |
| TR2%               | 67,16 ± 0,40         | 4,51                         | 25,53               | 74,47        |
| CD10%              | 68,16 ± 0,98         | 4,32                         | 53,89               | 46,11        |
| CD5%               | 67,20 ± 0,44         | 4,29                         | 54,02               | 45,98        |
| CD2%               | 68,66 ± 1,96         | 3,80                         | 42,11               | 57,79        |
| LC10%              | 67,16 ± 0,40         | 4,31                         | 56,33               | 43,67        |
| LC5%               | 66,80 ± 0,44         | 4,26                         | 50,73               | 49,27        |
| LC2%               | 66,83 ± 0,40         | 4,16                         | 32,54               | 67,46        |

**AC:** amido capsul; **CM:** celulose microcristalina; **TR:** trealose; **CD:**  $\beta$ -ciclodextrina; **LC:** lactose; T<sub>gs</sub>: temperatura de saída do ar; W<sub>real</sub>: vazão de alimentação real; R<sub>ec</sub>: Recuperação; **Ac+E:** perdas durante o processo.

#### 4.6.1. EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DO EXTRATO SECO CONTENDO $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE

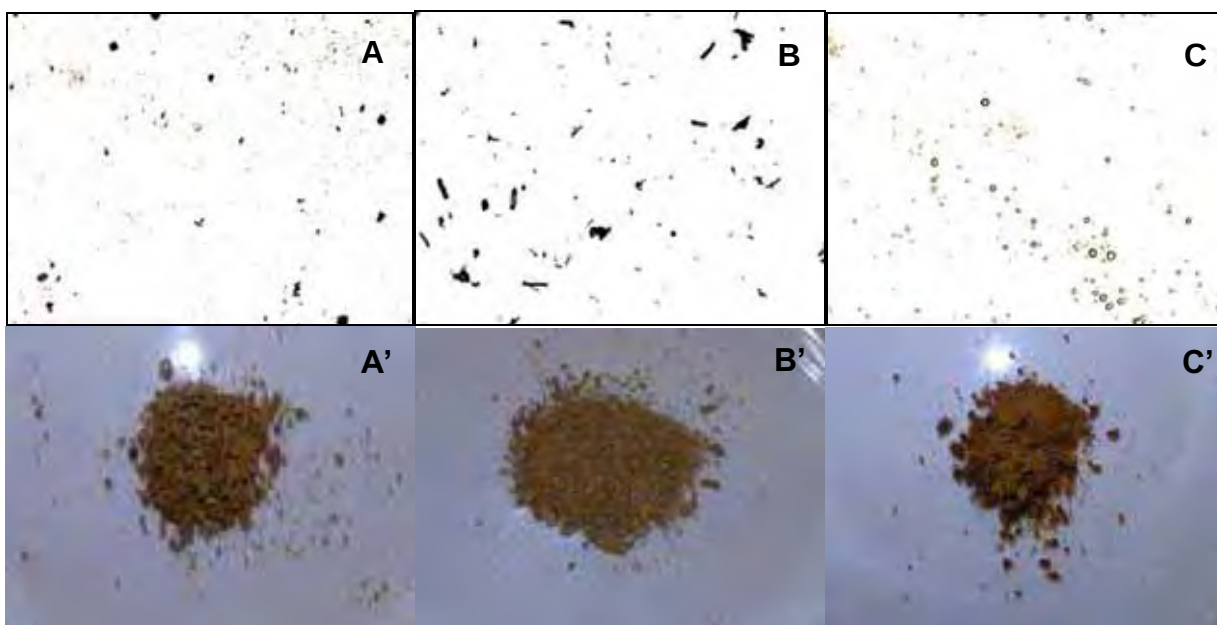
A estabilidade da atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica do extrato seco após 1 ano de armazenamento a 25°C foi investigada (tabela 20). Foi utilizado como controle a atividade enzimática imediatamente após a secagem (valor referente a 100%). Os melhores resultados foram encontrados principalmente quando utilizado  $\beta$ -ciclodextrina como adjuvante (74,3 - 59,4%), seguido de trealose 5%, amido capsul 2% e celulose microcristalina 10%, com atividades residuais de 36,3%, 25,1% e 25,5%, respectivamente. Apenas lactose não foi um agente estabilizador eficiente para a estocagem do extrato seco, uma vez que a enzima foi totalmente inativada após tal período.

A estabilidade de armazenamento de outras enzimas, após processo de secagem foram verificadas. Para a lipase de *C. kikuchii* seca por *Spray dryer* utilizando-se 10% (m/v) de lactose,  $\beta$ -ciclodextrina, maltodextrina, manitol, goma arábica e trealose, a maioria dos adjuvantes foram capazes de manter, pelo menos, 50% da atividade enzimática a 5°C e 40% da atividade a 25°C, após 8 meses e a enzima seca utilizando  $\beta$ -ciclodextrina foi estável durante o armazenamento com atividade residual de 72% a 5°C no mesmo período (Costa-Silva *et al.*, 2011). A serino-protease alcalina (SAP) de *Lactobacillus subtilis* foi seca em *Spray dryer* utilizando a glicose e maltodextrina como adjuvantes, e mantiveram atividade residual de pelo menos, 70% a 4°C durante 6 meses (Namaldi, *et al.*, 2006). É importante destacar que a atividade  $\beta$ -D-fructofuranosidásica do extrato seco de *F. graminearum* apresentou melhor estabilidade do que as citadas anteriormente.

**Tabela 20.** Caracterização físico química da  $\beta$ -D-frutofurosidase de *F. graminearum* seca em *Spray dryer* e atividade enzimática pós secagem e após 1 ano de armazenamento.

| Resultados obtidos |                    |                    |               |                          |                                |
|--------------------|--------------------|--------------------|---------------|--------------------------|--------------------------------|
| Amostra            | X <sub>p</sub> (%) | A <sub>w</sub> (-) | dp (μm)       | Ativ. invertásica (U/ml) | Ativ. Resid. depois 1 ano (%)* |
| AC10%              | 3,92 ± 0,68        | 0,214 ± 0,00       | 7,84 ± 8,26   | 53,12 ± 7,24             | 16,83 ± 1,58                   |
| AC5%               | 5,34 ± 0,39        | 0,203 ± 0,00       | 6,97 ± 7,58   | 50,48 ± 5,31             | 16,06 ± 2,66                   |
| AC2%               | 6,56 ± 0,27        | 0,283 ± 0,03       | 9,64 ± 6,10   | 23,92 ± 9,61             | 25,19 ± 1,79                   |
| CM10%              | 4,40 ± 0,24        | 0,228 ± 0,04       | 22,86 ± 8,26  | 4,07 ± 0,98              | 25,54 ± 6,74                   |
| CM5%               | 4,80 ± 0,31        | 0,242 ± 0,00       | 30,02 ± 25,38 | 24,34 ± 3,05             | 9,25 ± 1,41                    |
| CM2%               | 7,89 ± 0,01        | 0,280 ± 0,03       | 46,45 ± 27,88 | 18,4 ± 0,56              | 17,81 ± 3,66                   |
| TR10%              | 6,13 ± 0,03        | 0,263 ± 0,04       | 7,84 ± 6,04   | 40,72 ± 2,14             | 21,60 ± 1,53                   |
| TR5%               | 7,19 ± 0,19        | 0,273 ± 0,00       | 13,78 ± 13,31 | 29,76 ± 2,48             | 36,30 ± 2,02                   |
| TR2%               | ND                 | 0,306 ± 0,02       | ND            | 62,64 ± 4,63             | 18,53 ± 2,24                   |
| CD10%              | 11,13 ± 0,18       | 0,191 ± 0,00       | 9,66 ± 10,07  | 20,72 ± 1,92             | 74,31 ± 6,42                   |
| CD5%               | 10,43 ± 0,05       | 0,219 ± 0,00       | 10,51 ± 11,55 | 27,76 ± 0,79             | 62,07 ± 3,72                   |
| CD2%               | 6,69 ± 0,05        | 0,238 ± 0,03       | 6,35 ± 6,31   | 26,16 ± 1,92             | 59,44 ± 7,91                   |
| LC10%              | 4,82 ± 0,61        | 0,246 ± 0,02       | 7,48 ± 6,62   | 10,56 ± 3,62             | 0                              |
| LC5%               | 5,39 ± 0,37        | 0,276 ± 0,00       | 9,76 ± 7,45   | 31,12 ± 4,86             | 4,02 ± 0,88                    |
| LC2%               | 7,18 ± 0,24        | 0,295 ± 0,00       | 8,98 ± 6,87   | 24,24 ± 3,73             | 22,04 ± 2,57                   |

**AC:** amido capsul; **CM:** celulose microcristalina; **TR:** trealose; **CD:**  $\beta$ -ciclodextrina; **LC:** lactose; **X<sub>p</sub>:** umidade; **A<sub>w</sub>:** atividade de água; **dp:** diâmetro médio da partícula; \*Atividade invertásica residual comparando as atividades logo após a secagem e após 1 ano a 25°C.



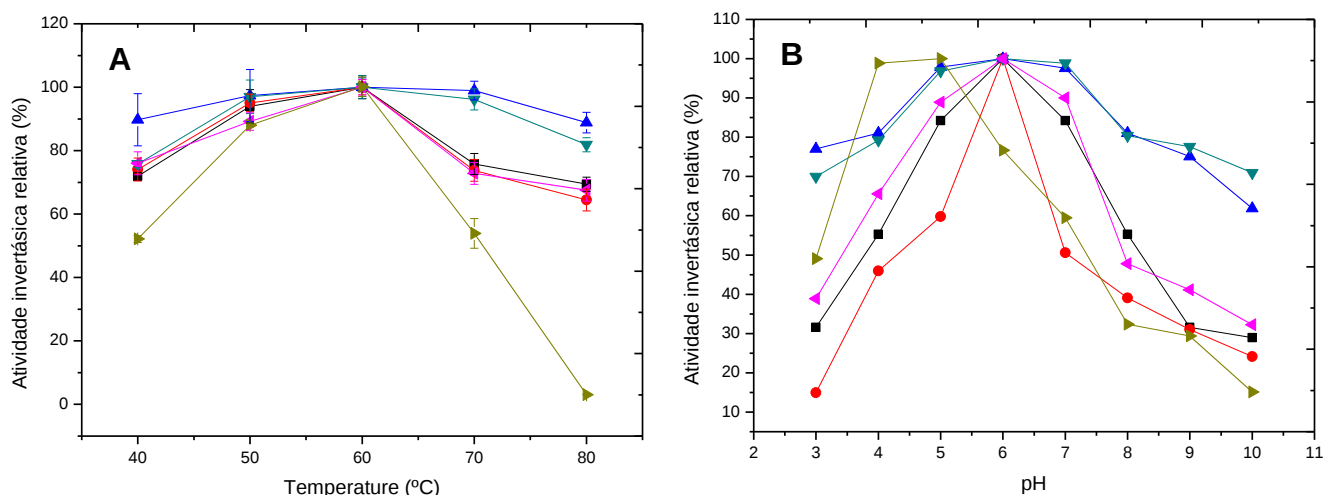
**Figura 11.** Extrato bruto seco contendo  $\beta$ -D-frutofuranosidase utilizando amido capsul 2% (A), celulose microcristalina 2% (B) e trealose 2% (C). Mag = 40x (A, B e C) e fotografias macroscópicas (A', B' e C').

#### 4.6.2. Caracterização bioquímica da atividade enzimática dos extratos secos em *Spray dryer*.

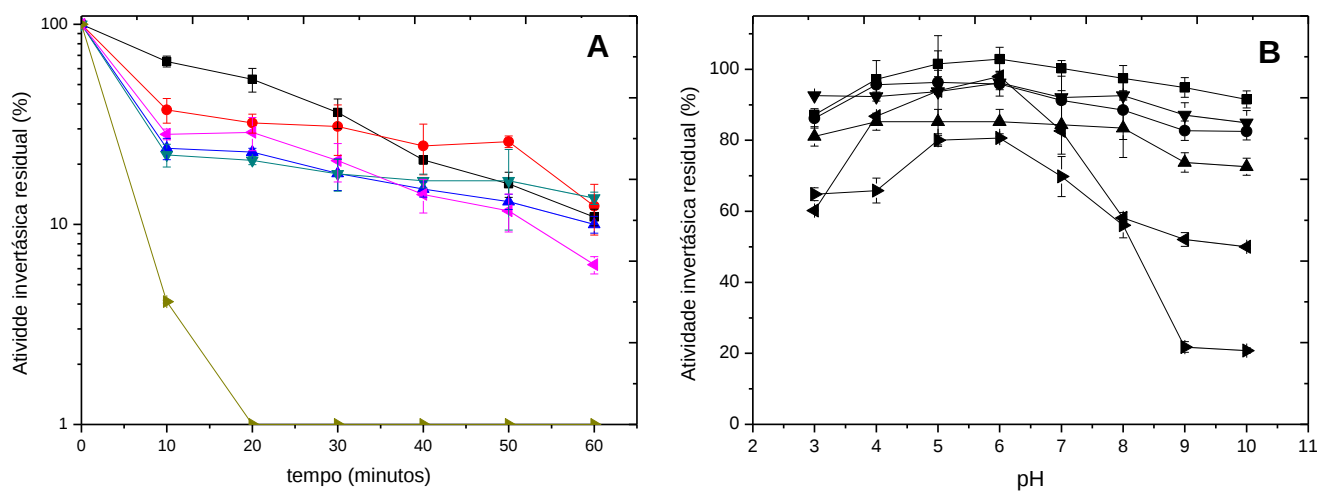
A  $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por *F. graminearum* apresentou atividade máxima em temperatura de 60°C para todos os pós secos obtidos e o pH ótimo aparente foi de 4,5-5,0 para a amostra solúvel e 6,0 para todas as amostras de  $\beta$ -D-frutofuranosidases secas (Figura 12 A e B). Os valores ótimos obtidos se assemelham com os dados já descritos para as  $\beta$ -D-frutofuranosidases produzidas por *R. dairenensis* (55-60°C e pH 5,0) (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2009), *A. phoenicis* (60°C e pH 4,5) (Rustiguel *et al.*, 2010) e *S. cerevisiae* (50°C e pH 6,0) (Rashad e Nooman, 2009). Apesar dos valores ótimos de temperatura e pH serem importantes para a caracterização do extrato enzimático depois de seco, este dado não foi descrito por outros autores.

A estabilidade térmica da  $\beta$ -D-frutofuranosidase seca e solúvel foram analisadas a 70°C. Nessa temperatura, a enzima solúvel mostrou baixa capacidade de manter-se estável com com atividade residual abaixo de 5% quando incubada por 10 minutos. A tentativa de manter a estabilidade em alta temperatura foi realizada e ao contrário, do que foi visto para enzima solúvel, as amostras secas contendo carboidratos como protetores, tiveram um prolongamento em sua vida útil, sendo que a amostra contendo celulose microcristalina apresentou atividade residual acima de 50% por 20 minutos (Figura 13A). Estes resultados já eram esperados, uma vez que a secagem em *Spray dryer* é realizada em temperaturas muito mais elevadas que o comum para a manutenção destas proteínas, sendo por isso adicionados diferentes compostos, na tentativa de proteger a integridade das enzimas.

Quanto a estabilidade a diferentes valores de pH, os extratos contendo  $\beta$ -D-frutofuranosidase, depois de secos, se mostraram, mais estáveis que a enzima solúvel. Quando utilizados celulose microcristalina, amido capsul, lactose e  $\beta$ -ciclodextrina a atividade enzimática manteve-se acima de 75% durante o período de uma hora para valores de pH entre 3,0 e 10,0, enquanto que a enzima solúvel apresentou queda significativa (40% aproximadamente) quando exposta em pH 8,0, no mesmo período analisado (Figura 13B).



**Figura 12.** Determinação da temperatura ótima (A) e do pH ótimo (B) aparentes para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por *F. graminearum* em FSS seca em *Spray dryer*. Símbolos: Enzima solúvel ( $\blacktriangleright$ ) e enzimas secas com celulose microcristalina 5% ( $\blacksquare$ ),  $\beta$ -ciclodextrina 5% ( $\bullet$ ), lactose 5% ( $\blacktriangle$ ), amido capsul 5% ( $\blacktriangledown$ ), trealose 5% ( $\blacktriangleleft$ ).



**Figura 13.** Estabilidade térmica a 70°C (A) e a diferentes valores de pH por 1 hora (B) para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *F. graminearum* em FSS seca em *Spray dryer*. Símbolos: Enzima solúvel ( $\blacktriangleright$ ) e enzimas secas com celulose microcristalina 5% ( $\blacksquare$ ),  $\beta$ -ciclodextrina 5% ( $\bullet$ ), lactose 5% ( $\blacktriangle$ ), amido capsul 5% ( $\blacktriangledown$ ), trealose 5% ( $\blacktriangleleft$ ).

#### 4.7. IMOBILIZAÇÃO DA $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE EXTRA-CELULAR EM SUPORTES ALTERNATIVOS

A preocupação em imobilizar a  $\beta$ -D-frutofuranosidase produzida por *F. graminearum* tem origem nas desvantagens da utilização de enzimas solúveis em processos industriais, e nas vantagens de baixo custo de reaproveitamento da proteína, aumento da estabilidade, e ainda, interações entre a enzima e componentes específicos da reação, excluindo-se a possibilidade de contaminação do produto final com a enzima (Lekha e Lonsane, 1997). Entretanto, muito dos materiais utilizados em imobilização são sintéticos e não-biodegradáveis, o que causa problemas no meio ambiente após sua utilização. Outros, por sua vez, são tóxicos ou mesmo conferindo ao produto propriedades indesejáveis tais como cor, sabor e aroma, o que os tornam inapropriados para imobilização principalmente na indústria de alimentos (Gemeiner *et al.*, 1993; Ogbonna *et al.*, 1996). Assim sendo, há a necessidade da busca de materiais alternativos para serem usados como suporte. Neste trabalho foram utilizados como suporte, o algodão para uso doméstico, papel de filtro, EVA (etil vinil acetato), pano multiuso Ballerina<sup>®</sup>, bagaço de cana de açúcar, barbante, gase, e como controle de ligação unipontual, BrCN.

Dentre os suportes utilizados, os que mostraram melhores condições para a imobilização da enzima foram papel de filtro, barbante e bagaço de cana de açúcar, nesta ordem de importância. Os suportes contendo grupos de celulose apresentaram melhores condições para a imobilização da enzima, sendo que o papel filtro e o barbante foram os que se mostraram melhores com 83% e 84%, respectivamente, de ligação da enzima ao suporte. Já os suportes EVA e tela de polietileno, não se mostraram aptos para a imobilização da  $\beta$ -D-frutofuranosidase (Tabela 21). O derivado BrCN foi utilizado como controle, pois este suporte se une de forma covalente e

uni pontual a proteína, em sua porção aminoterminal, permitindo que esta mantenha a mesma conformação dimensional de quando solúvel e não perca a mobilidade e ainda, afasta possíveis interferências de proteases, evitando ainda, a agregação proteica, sendo possível estudar suas propriedades praticamente livre de interferências (Silva, 2009)

Outros materiais alternativos já foram descritos como bons suportes para a imobilização de enzimas, como o caso de diversos compostos de natureza celulósica como o fio de linha de algodão (Godbole *et al.*, 1990), tecido de algodão (Sankaran *et al.*, 1989) e bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) (Poças *et al.*, 2004)

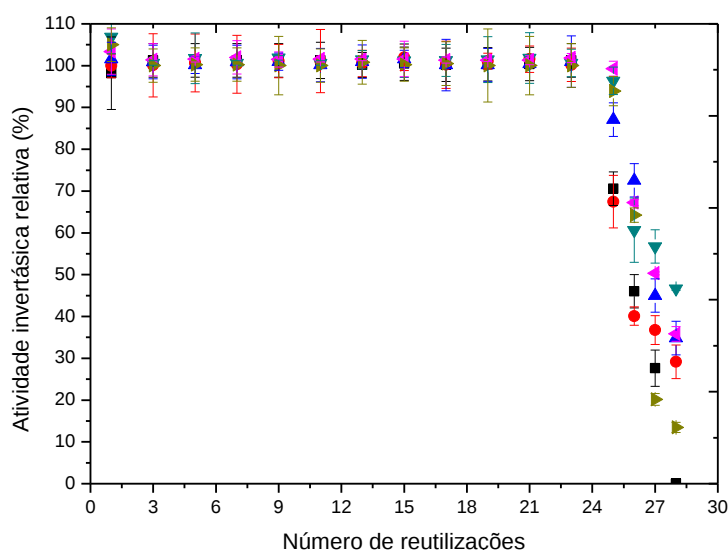
**Tabela 21.** Suportes testados para imobilização de  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular de *F. graminearum*

| <b>Suporte</b>   | <b>Atividade derivado (U/mL)</b> | <b>Quantidade da enzima imobilizada (%)</b> |
|------------------|----------------------------------|---------------------------------------------|
| Tela polietileno | 0                                | 0                                           |
| Algodão          | 3,51                             | 13 %                                        |
| Bagaço de cana   | 17,86                            | 66%                                         |
| Barbante         | 21,77                            | 83%                                         |
| EVA              | 0                                | 0                                           |
| Ballerina®       | 8,94                             | 34%                                         |
| Papel filtro     | 22,11                            | 84%                                         |
| Gase             | 19,17                            | 73%                                         |
| Solúvel          | 26,22                            | 100%                                        |

#### **4.7.1. Reutilização da $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada**

Uma característica importante da enzima imobilizada para o emprego comercial é a quantidade de vezes que o derivado pode ser reutilizado sem perder a sua

capacidade catalítica. Todos derivados apresentaram alta capacidade de reuso, sem redução significativa da função por até 25 vezes (Figura 14), resultado bastante semelhante ao apresentado por Godbole *et al.* (1990) que imobilizou  $\beta$ -D-frutofuranosidase em linha de algodão, sendo reutilizada 28 vezes, e para a glicose-oxidase e catalase co-imobilizadas em tecido de algodão e que apresentaram capacidade de reutilização de 25 vezes sem perda de suas propriedades catalíticas (Sankaran *et al.*, 1989).



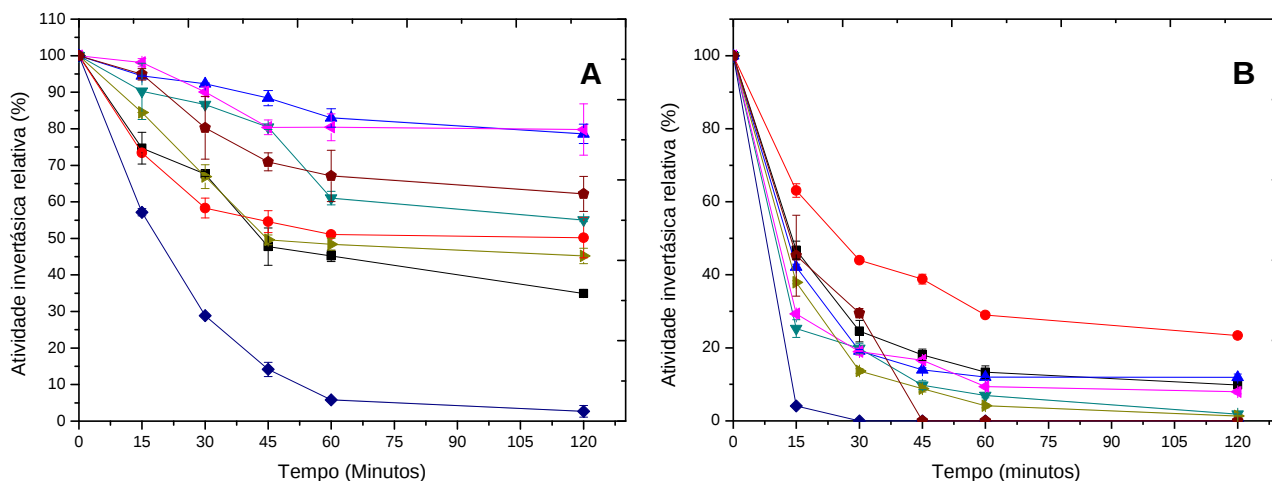
**Figura 14.** Reutilização dos suportes carregados com  $\beta$ -D-frutofuranosidase. Suportes: algodão (■); papel filtro (●); pano mutiuso Ballerina® (▲); bagaço de cana de açúcar (▼); barbante (◄) e gase (►).

#### 4.7.2. Efeito da temperatura na estabilidade da $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada em suportes alternativos

Os derivados obtidos em pano multiuso Ballerina® e barbante foram bastante estáveis, com atividade enzimática acima de 80% quando expostos a temperatura de 60°C por mais de 120 minutos. A enzima imobilizada em BrCN apresentou atividade de

aproximadamente 60% pelo mesmo período. Já a enzima solúvel apresentou redução de 50% de sua atividade em apenas 20 minutos de exposição a tal temperatura (Figura 15A). Quando expostos a temperatura de 70°C, todos os derivados testados, bem como a enzima livre foram menos estáveis. Ainda assim, quando comparada a enzima solúvel, com T<sub>50</sub> de apenas 8 minutos, a enzima imobilizada em papel filtro, apresentou atividade de 50% por 27 minutos (Figura 15B).

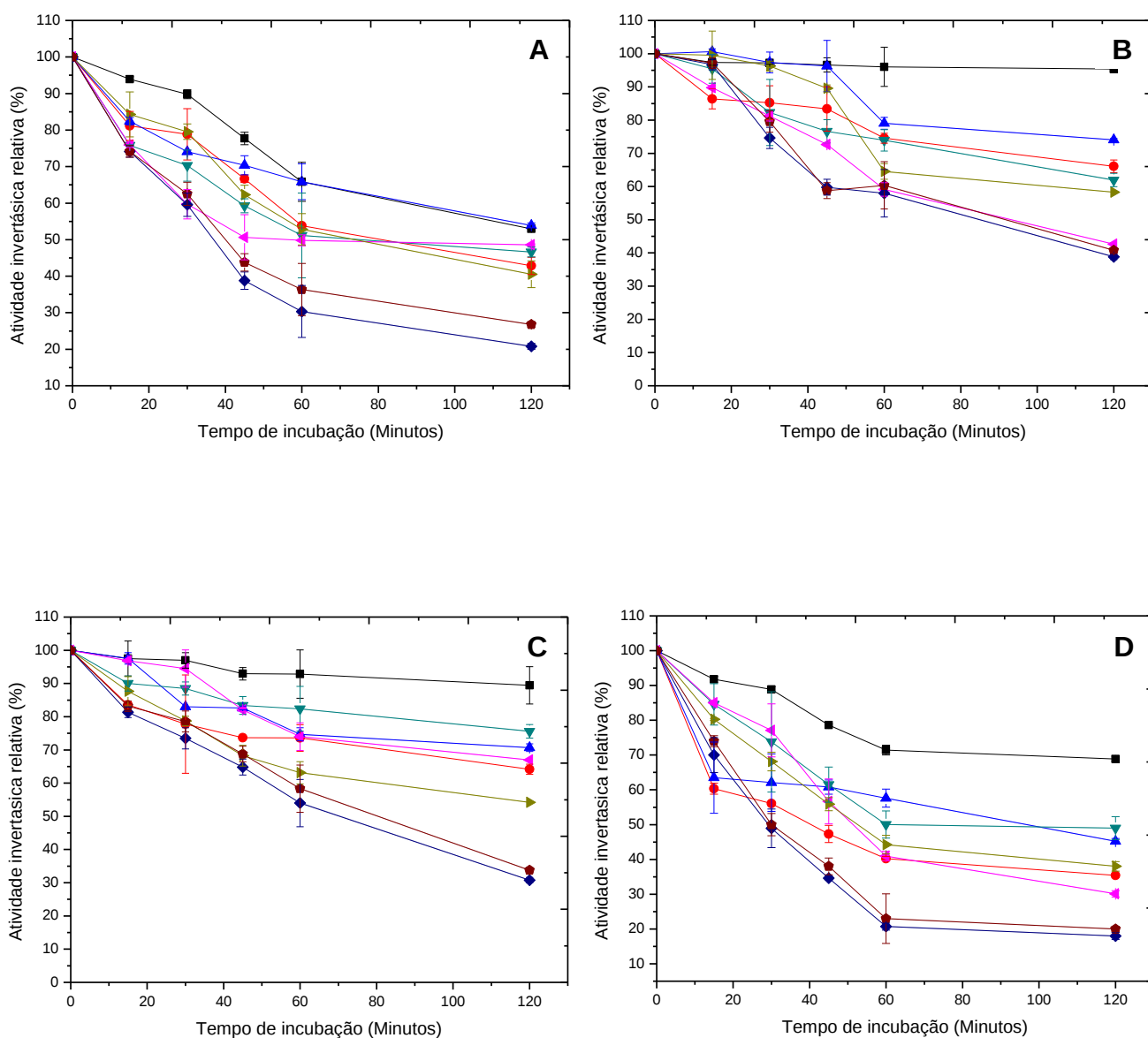
Os resultados encontrados para a  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *F. graminearum* imobilizadas em suportes alternativos, mostraram maior potencial de emprego biotecnológico do que os descritos para  $\beta$ -D-frutofuranosidase de leveduras imobilizada em álcool polivinil (PVA), uma vez que esta não apresenta diferenças quando comparada a enzima solúvel, sendo a atividade de ambas, imobilizada e solúvel, muito reduzida a 60°C e praticamente inexistente a 70°C (Imai *et al.*, 1983)



**Figura 15.** Estabilidade térmica a 60°C (A) e 70°C (B) da  $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada em suportes alternativos: algodão (■); papel filtro (●); pano multiuso Ballerina® (▲), bagaço de cana de açúcar (▼); barbante (◄); gase (►), BrCN (◆) e enzima solúvel (♦).

Quando expostos em pH 3,0 todos os suportes, com exceção dos controles, tiveram atividade invertásica relativa acima de 50% por 80 minutos, sendo que os derivados em algodão e pano multiuso Ballerina<sup>®</sup>, continuaram com a mesma estabilidade por 120 minutos (Figura 16A). Em pH 5,0 todos os derivados mostraram estabilidade elevada, sendo que a enzima imobilizada em algodão se manteve totalmente estável por tempo superior a 120 minutos (dados não mostrados), enquanto os demais derivados apresentaram atividade maior que 60% durante 1 hora (Figura 16B). Quando mantidos em pH 7,0, os derivados foram relativamente estáveis com 50% de sua atividade catalítica mantida por 120 minutos, sendo que quando utilizado o algodão a atividade ficou acima de 90% por 120 minutos (Figura 16C). Finalmente em pH 9,0, o  $T_{50}$  ficou por volta de 45 minutos para todos os derivados, com exceção daquele obtido com algodão que mostrou-se mais uma vez bastante estável com atividade invertásica acima de 70% por 120 minutos (Figura 16D). Com relação aos controles, estes sempre mantiveram a atividade invertásica relativa abaixo dos demais suportes, com  $T_{50}$  variando entre 30 minutos para pH 9,0, 80 minutos para pH 5,0 e 7,0, e 40 minutos quando exposto ao pH 3,0.

Já era esperado, que assim como a enzima se torna mais estável em temperaturas elevadas, a estabilidade a pH extremos também se modifique, melhorando o tempo possível de exposição destes com relação ao controle. O aumento do tempo que a  $\beta$ -D-frutofuranosidase permanece exposta a estes valores de pH favorece seu desempenho no caso de ser aplicada industrialmente.



**Figura 16.** Estabilidade dos derivados ao pH 3,0 (A), 5,0 (B), 7,0 (C) e 9,0 (D) contendo a  $\beta$ -D-frutofuranosidase imobilizada em suportes alternativos: algodão (■), papel filtro (●), pano multiuso Ballerina® (▲), bagaço de cana de açúcar (▼), barbante (◄), gase (►), enzima solúvel (◆) e BrCN (◆).

#### 4.8. PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS) POR $\beta$ -D-FRUTOFURANOSIDASE IMOBILIZADA EM SUPORTES ALTERNATIVOS

A capacidade dos derivados obtidos com os suportes alternativos em sintetizar FOS através da atividade transfrutossilativa foi analisada. A produção de fructooligossacarídeos é almejada, uma vez que é um produto de alto valor e interesse comercial. Aliando-se com a empregabilidade facilitada da enzima imobilizada em suportes de baixo custo, eleva-se ainda mais o interesse nesse composto produzido pela  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *F. graminearum*. Na figura 17 podem as manchas na TLC são correspondentes a formação de nistose e 1-questose pela enzima imobilizada em barbante, papel filtro e bagaço de cana de açúcar.

Os FOS podem ser produzidos por frutossiltransferases (FTases), que apresentam apenas atividade transfrutossilativa, transferindo o grupo frutossil para uma molécula aceptora como a sacarose ou fructooligossacarídeos (Yun, 1996) ou pela ação das  $\beta$ -D-frutofuranosidases (FFases) com alta atividade de transfrutossilação, além da hidrolítica, como é o caso da enzima de *F. graminearum* descrita neste trabalho. Vários autores já descreveram o isolamento de cepas microbianas produtoras de  $\beta$ -D-frutofuranosidases com atividade de transfrutossilação, como a de *Schwanniomyces occidentalis* (Álvaro-Benito *et al.*, 2007), *Thermoascus aurantiacus* (Katapodis e Christakopoulos, 2004) com síntese de 6-questose. A levedura *S. cerevisiae* sintetizou 5 frutanos intermediários a partir da liberação de glicose e frutose no meio, dentre eles 1-questose, 6-questose e neoquestose (Farine *et al.*, 2001). Os FOS 1-questose e nistose também foram produzidos diretamente em meio de cultivo contendo 25% (m/v) de sacarose, quando utilizado o fungo *A. phoenicis* em fermentação por biofilme (Aziani *et al.*, 2012)



**Figura 17.** Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise da sacarose pela  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *F.graminearum* imobilizada em bagaço de cana de açúcar (6), barbante (7) e papel filtro (8), e atividade transfrutossilativa da enzima para a produção de FOS. Linhas: (1) 1-questose 1% (m/v), (2) nistose 1% (m/v), (3) sacarose 1% (m/v), (4) glicose 1% (m/v), (5) frutose 1% (m/v). Tempo de reação 6 horas a 50°C.

## **5. CONCLUSÕES**

No presente trabalho, a produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase por *F. graminearum* foi efetiva em fermentação submersa e em substrato sólido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono/substrato, sendo que nesta última, a produção da enzima foi bastante elevada. Este tipo de fermentação para a produção de proteínas, ainda que não seja muito difundido, tem mercado crescente, assim como a produção de compostos com interesses biotecnológicos por fungos filamentosos. Estes microrganismos, ao contrário das bactérias e leveduras, são capazes de crescer em substratos sólidos de resíduos ou produtos agroindustriais, sem fase líquida, de forma a preencher todos os espaços vazios, maximizando a produção em extensões relativamente pequenas. O uso de resíduos pode reduzir custos de produção sendo outro aspecto que merece destaque.

A  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular produzida em FSS e purificada apresentou elevada temperatura de atividade com boa estabilidade de 30 a 50°C. Por outro lado, o pó enzimático obtido em *Spray dryer* na presença de protetores foi ainda mais resistente a exposição a altas temperaturas e a pH desfavoráveis, além de aumentar o tempo possível de armazenamento da enzima, sem que ela perca sua atividade catalítica. Deve ser considerado as condições de armazenamento e transporte de enzimas, uma vez que sua atividade pode esvair-se em tempo prolongado ou temperatura elevada, o que torna maior o interesse na comercialização em forma de pó.

A imobilização da enzima em suportes alternativos também favoreceu a melhoria da estabilidade dessa enzima, além de oferecer possibilidade de reuso dos derivados por vários ciclos catalíticos. A utilização de materiais de baixo custo como algodão doméstico ou bagaço de cana de açúcar no lugar de produtos sintéticos e não-

biodegradáveis, além da eliminação da desvantagem de utilização da enzima solúvel, é atrativa para o emprego biotecnológico da  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *F. graminearum*.

Outra característica muito importante e desejada, que a enzima de *F. graminearum* apresentou foi a capacidade de transfrutossilação da sacarose para a produção de frutooligossacarídeos. A possibilidade de produção dos FOS por fungos filamentosos, só aumenta o interesse pela utilização da  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *F. graminearum*, podendo reduzir custos e aumentar sua produtividade quando em FSS.

As atividades extracelulares foram aumentadas na presença de  $Mn^{2+}$  e  $K^+$ , enquanto que o  $Hg^{2+}$  causou a inibição da atividade enzimática. A  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular é heterodímero com subunidades de 94kDa e 70kDa, capaz de hidrolisar sacarose e rafinose como maior afinidade para este último.

Com essas considerações, acreditamos que o trabalho contribuiu com dados relevantes tanto para o conhecimento bioquímico básico da  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *F. graminearum*, como para a produção e aplicação desta enzima do ponto de vista industrial.

## **6. REFERÊNCIAS**

AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SANCHEZ, G. Review: sources, properties, applications and potencial uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 5, p. 373-382, 2001.

ALEGRE, A. C. P.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 612-622, 2009.

ALMEIDA, A. C. S.; ARAUJO, L. C.; ABREU, C. A. M.; LIMA, M. A. G. A.; PALHA, M. L. A. P. F. Sucrose hydrolisis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporoides*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2005.

ÁLVARO-BENITO, M.; ABREU, M.; FERNÁNDEZ-ARROJO, L.; PLOU, F. J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BALLESTEROS, A.; POLAINA, J.; FERNANDEZ-LOBATO, M. Characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 75-81, 2007.

ARAKAWA, T.; PRESTELSKI, S. J.; KENNY, W. C.; CARPENTER, J. F. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1/3, p. 307-326, 2001.

ARANDA, C.; ROBLEDO, A.; LOERA, O.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRIGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. Fungal invertase experssion in solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 229-233, 2006.

ARRUDA, L.; VITOLO, M Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 23-33, 1999.

ASHOKKUMAR, B.; NAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 331-338, 2001.

AZIANI, G.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of fructooligosaccharides by *Aspergillus phoenicis* biofilm on polyethylene as inert support. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 40–45, 2012.

BALASUBRAMANIAM, A. K.; NAGARAJAN, K. V.; PARAMASAMY, G. Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 12, p. 1241-1247, 2001.

BARROS, D. P. **Imobilização da invertase em quitina de krill (*Euphausiasuperba*)**. 1990. 121 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotti* **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1832-1837, 2007.

- BAYRAMOGLU, G.; AKGOL, S.; BULUT, A.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Covalent immobilization of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 117-126, 2003.
- BHATTI, H. N.; MUHAMMAD, A.; ABBAS, A.; NAWAZ, R.; SHEIKH, M. A. Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4617-4623, 2006.
- BON, E. P. S.; PEREIRA, N.; GORRSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S. **Enzimas em biotecnologia, produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. v. 1, cap. 5, p. 95-120.
- BOUHNİK, Y.; FLURIÉ, B.; RIOTTOT, M.; BISETTI, N.; GAILING, M. F.; GUIBERT, A.; BORNET, F.; RAMBAUD, J. C. Effects of fructooligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. **Nutrition and Cancer**, v. 26, n. 1, p. 21-29, 1996.
- CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. **Biochemistry**, v. 28, n. 9, p. 3916-3922, 1989.
- CHAUHAN, B.; GUPTA, R. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2115-2122, 2004.
- CHEN, J.; SAXTON, J.; HEMMING, F. W.; PEBERDY, J. F. Purification and partial characterization of the high and low molecular weight form (S- and F- form) of invertase secreted by *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1296, p. 207-218, 1996.
- CHEN, W.; LIU, C. Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 153-160, 1996.
- CHOWDHURY, S.; GHORAI, S.; BANIK, S. P.; PAL, S.; BASAK, S.; KHOWALA, S. Characterization of a novel low molecular weight sucrase from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1075-1082, 2009.
- COSTA-SILVA, T. A.; SAID, S.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Stabilization of endophytic fungus *Cercospora kikuchii* lipase by spray drying in the presence of maltodextrin and  $\beta$ -cyclodextrin. **Drying Technology**, v. 28, p. 1245-1254, 2010.
- COSTA-SILVA, T. A.; NOGUEIRA, M. A.; SOUSA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; SAID, S. Lipase production by endophytic fungus *Cercospora kikuchii*: stability of enzymatic activity after spray drying in the presence of carbohydrates. **Drying Technology**, v. 29, p. 1112-1119, 2011.
- CUERVO, R.; GUILARTE, B.; JUÁREZ, A.; MARTÍNEZ, J. Production of fructooligosaccharides by  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp. 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 268-272, 2004.

DAVIS, B. J. Disk eletroforesis II, method and application to serunm proteins. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 121, p. 407-427, 1964.

DIXON, M. M.; FOGARTY, W. M. Production and some properties of an extracellular invertase from *Neurospora sitophila*. **Biochemical Society Transactions**, v. 2, p. 1339-1341, 1974.

D'SOUZA, S. F.; MELO, J. S.; DESHPANDE, A.; NADKARNI, G. B. Immobilization of yeast cells by adhesion to glass surface using polyethylemine. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 643-648, 1983.

FARINE, S.; VERLUIJS, C.; BONNICI, P. J.; HECK, A.; L'HOMME, C.; PUIGSEVER, A.; BIAGINI, A. Application of a high performance anion exchange chromatography to study invertase-catalised hydrolysis of sucrose and formation of intermedited fructan products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 55-60, 2001.

FERNÁNDEZ, R. C.; MARESMA, B. G.; JUÁREZ, A.; MARTÍNEZ, J. Production of fructooligosaccharides by  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp 27H. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 268-272, 2004.

GEMEINER, P.; STEFUCA, V.; BALES, V. Biochemical engineering of biocatalysts immobilized on cellulosic materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 7, p. 551-556, 1993.

GIRALDO, M. A.; SILVA, T. M.; SALVATO, F.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Thermostable invertases from *Paecylomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 463-472, 2011.

GODBOLE, S. S.; KUBAL, B. S.; D'SOUZA, S. F. Hydrolysis of concentrated sucrose syrups by invertase immobilized on anion exchanger waste cotton thread. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 214-217, 1990.

GODSHALL, M. A. **Future directions for the sugar industry**. 2003. Disponível em: <<http://www.spriinc.org/buton10bftpp.html>>. Acesso em: 01 dez. 2012.

GONÇALVES, H. B.; RIUL, A. J.; QUIAPIM, A. C.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submreged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 1-12, 2012.

GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R. Purificação parcial de invertase a partir de *Rhizopus* sp. em fermentação semi-sólida. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 199-203, 2003.

GUIMARÃES, L. H. S. Carbohydrates from biomass: sources and transformation by microbial enzymes. In: CHANG, C. F. **Carbohydrates**: comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology. Shangai : InTech, 2012. Cap. 20, p. 441-458.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Production and characterization of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 1, p. 52-57, 2007.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOMERA, A. F.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Production of  $\beta$ -fructofuranosidases by *Aspergillus niger* using agroindustrial residues as carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 237-241, 2009.

GUTIÉRREZ-ALONSO, P.; FERNÁNDEZ-ARROJO, L.; PLOU, F. J.; FERNÁNDEZ-LOBATO, M. Biochemical characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis* with transfructosylating activity. **FEMS Yest Research**, v. 9, n. 5, p. 768-773, 2009.

HAALAND, P. D. Statistical problem solving. In: \_\_\_\_\_. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 1-18.

HARTEMINK, R.; VANLAERE, K. M. J.; ROMBOUTS, F. M. Growth of enterobacteria on fructooligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 383, p. 367-374, 1997.

HENZ, J. R.; NUNES, R. V.; SILVA, W. T. M. da; SCHENKNECHT, F. R.; ALMEIDA, S. de; FRANK, R.; POZZA, P. C.; NUNES, C. G. V. Composição química e valores energéticos de diferentes farelos de trigo para aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 19., 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Pirassununga: Lawbook, 2009. Disponível em: <http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/nutricao-nao-ruminantes/21791-Composio-qumica-valores-energticos-diferentes-farelos-trigo-para-aves.html>>. Acesso em: 19 set. 2011.

IMAI, K.; SHIOMI, T.; SATO, K.; FUJISHIMA, A. Preparation of immobilized invertase using poly(vinyl alcohol) membrane. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 2, p. 613-617, 1983.

JAIN, N. K.; ROY, I. Effect of trehalose on protein structure. **Protein Science**, v. 18, n. 1, p. 24-36, 2009.

KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOS, P. Induction and partial characterization of intracellular  $\beta$ -fructofuranosidase from *Thermoascus aurantiacus* and its application in the synthesis of 6-kestose. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 667-672, 2004.

KEMPKA, A. P.; LIPKE, N. L.; PINHEIRO, T. da L. F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D. M.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. de. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KLIBANOV, A. M. Enzymes: nature's chemical machines. **Technology Review**, v. 86, p. 40-48, 1983.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation system – an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1/2, p. 1-30, 2005.

KUNZ, W. Specific ion effects in liquids, in biological systems, and at interfaces. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 8, p. 1611-1617, 2006.

KURAKAKE, M.; OGAWA, K.; SUGIE, M.; TAKEMURA, A.; SUGIURA, K.; KOMAKI, T. Two types of  $\beta$ -fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 591-596, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 250-260, 1997.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; CIANCAGLINI, P. Enzyplot: a microcomputer assistant program for teaching enzyme kinetics. **Biochemistry Educational**, v. 37, p. 35-37, 1995.

L'HOCINE, L.; WANG, Z.; JIANG, B.; XU, S. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. **Journal of Biotechnology**, v. 81, p. 73-84, 2000.

LINEWEAVER, H.; BURK D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

GOLDSTEIN, L.; MANECKE, G. Enzyme Technology. In: WINGARD, L. B.; KATCHALSKI –KATZIR, E.; GOLDSTEIN, L. **Applied Biochemistry and Bioengineering**. New York: Academic Press, 1976. v. 1, p. 23-126.

MÁTRAI, T.; MAYER, S.; KÓKAI, S.; SALAMON, I. Invertase production of common storage moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus fumigatus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 187-191, 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.

MILLQVIST-FUREBY, A.; MALMSTEN, M.; BERGENSTAHL, B. Spray dryer of trypsin-surface characterization and activity preservation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 188, p. 243-253, 1999.

MUKHERJEE, G.; BANERJEE, R. Biosynthesis of tannase and gallic acid from tannin rich substrates by *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. **Journal Basic Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 42-48, 2006.

MUSSATTO, S. I.; MANCILLA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 587–597, 2007.

NAMALDI, A.; ÇALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine protease powders. **Drying Technology**, v. 24, p. 1495–1500, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzimas. In: \_\_\_\_\_. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier. 2005. Cap. 8, p. 189-224

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; BHAT, M. K.; HOSCHKE, A. Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2461-2466, 2005.

NIJDAM, J. J.; LANGRISH, T. A. G. An investigation of milk powders produced by a laboratory-scale spray dryer. **Drying Technology**, v. 23, n. 5, p. 1043-1056, 2005.

NISHIZAWA, M.; MARUYAMA, Y.; NAKAMURA, M. Purification and characterization of invertase isoenzymes from *Fusarium oxysporum*. **Agricultural Biology and Chemistry**, v. 44, p. 489-498, 1980.

OGBONNA, J.C.; TOMIYAMA, S.; TANAKA, H. Development of a method for immobilization of non-flocculating cells in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 8, p. 737-744, 1996.

ONODERA, K.; MARUYAMA, Y. Purification and crystallization of invertases from *Fusarium oxysporum*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 25, p. 335-337, 1979.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I. Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

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

PATRICK, J. W. Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 191-222, 1997.

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

POÇAS, E. C.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; CAMILIOS NETO, D. Application of loofa sponge (*Luffa cylindrica*) as carrier for invertase immobilization for invert sugar syrup production. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 53-58, 2004.

POONAWALLA, F. M.; PATEL, K. L.; IYENGAR, M. R. S. Invertase production by *Penicillium chrysogenum* and other fungi in submerged fermentation. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 749-754, 1965.

PRATA, M. B.; MUSSATO, S. I.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Fructooligo saccharide production by *Penicillium expansum*. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 837-840, 2010.

RAMESH, M. V.; LONSANE, B. K. Characteristics and novel features of thermostable alpha-amylase produced under solid-state fermentation. **Starch-Starke**, v. 42, p. 233-238, 1990.

RASHAD, M. M.; NOOMAN, M. U. Production, purification and characterization of extracellular invertase from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 by solid-state fermentation of red carrot residue. **Australian Journal of Basic and Applied Science**, v. 3, n. 3, p. 1910-1919, 2009.

REDDY, P. P.; REDDY, G. S. N.; SULOCHANA, M. B. Highly thermostable  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* PSSF21 and its application in the synthesis of fructooligosaccharides from agro industrial residue. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 86-98, 2010.

RIUL, A. J.; GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis* **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85/86, p. 126-133, 2013.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 156-160, 2001.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Noções sobre experimentos fatoriais. In: \_\_\_\_\_. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Cárita, 2009. Cap. 3, p. 358.

ROMERO-GÓMEZ, S. J.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1255-1258, 2000.

RUBIO, M. C.; RUNCO, R.; NAVARRO, A. R. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 6, p. 605-609, 2002.

RUSTIGUEL, C. B.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. A novel silver activated extracellular  $\beta$ -D-Fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme**, v. 67, p. 10-15, 2010.

RUSTIGUEL, C. B.; OLIVEIRA, A. H. C.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Biochemical properties of an extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase II produced by *Aspergillus phoenicis* under solid-state fermentation using soy bran as substrate **Electronical Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 2, 2011.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: \_\_\_\_ **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 1, p. 1-8.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide production using fructosyltransferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR202. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1085-1088, 2005.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. **Biotechnological Products and Process Engineering**, v. 65, p. 530-537, 2004.

SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Invertase immobilized on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching. **Catalysis Communication**, v. 6, p. 81-86, 2005.

SANKARAN, K.; GODBOLE, S. S.; D'SOUZA, S. F. Preparation of spray-dried, sugar free egg powder using glucose oxidase and catalase co-immobilized on cotton cloth. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 11, n. 9, p. 617-619, 1989.

SHAHEEN, I.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, T. Production, purification and thermal characterization of invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. under solid-state fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1152-1158, 2008.

SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. 171 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, K.; SOCCOL, C. L.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOCCOL, C.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J. M. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 330-336, 1994.

- SOUZA, C. R. F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* link pelos processos *spray dryer* e leito de jorro**. 2003. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
- SPIEGEL, J. E.; ROSE, R.; KARABELL, P. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v. 48, p. 85-89, 1994.
- STURM, A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiology**, v. 121, p. 1-7, 1999.
- TALEKAR, S.; GHODAKE, V.; KATE, A.; SAMANT, N.; KUMAR, C.; GADAGKAR, S. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 10, 4760-4765, 2010.
- TANYILDIZI, M. S.; ÖZER, D.; ELIBOL, M. Optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2291-2296, 2005.
- VANDAMME, E. J.; DERYCKE, D. G. Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 139-176, 1983.
- VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 175-178, 2000.
- VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M. L.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; BRAVO-PATÍÑO, A.; CAJERO-JUÁREZ, M.; CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 1763-78, 2009.
- VITOLO, M. Invertases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 12, p. 207-221.
- VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **American Naturalist**, v. 98, p. 435-446, 1964.
- WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 1, p. 31-67, 2000.
- XIAO, J. H.; CHEN, D. X.; LIU, J. W.; LIU, Z. L.; WAN, W. H.; FANG, N.; XIAO, Y.; QI, Y.; LIANG, Z. Q. Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1105-1116, 2004.
- YAMAZAKI, H.; CHEOK, R. K. A.; FRASE, A. D. E. Immobilization of invertase on polyethylenimine-coated cotton cloth. **Biotechnology Letters**, v. 6, p. 165-170, 1984.

YOSHII, H.; OHASHI, T.; KUGIMOTO, Y.; FURUTA, T.; LINKO, P. Stability of alcohol dehydrogenase (ADH) during droplet drying and storage. **Drying Technology**, v. 23, p. 1217-1227, 2005.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides - occurrence, preparation and applications. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 19, p. 107-117, 1996.