UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LARISSA MIDIANE TODERO

Produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo filamentoso *Aspergillus thermomutatus* objetivando a produção de frutooligossacarídeos (FOS)

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

ARARAQUARA/SP

2018

LARISSA MIDIANE TODERO

Produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo filamentoso *Aspergillus thermomutatus* objetivando a produção de frutooligossacarídeos (FOS)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

ARARAQUARA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Todero, Larissa Midiane
T637p Produção de *B*-D-frutofuranosidase pelo fungo *Aspergillus thermomutatus* objetivando a produção de frutooligossacarídeos (FOS) / Larissa Midiane Todero. – Araraquara : [s.n.], 2018
88 f. : il.

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

1. *Aspergillus*. 2. Invertase. 3. Oligossacarídeos.

4. Microbiologia - Sínteses. 5. Enzimas - Aplicações industriais. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção de -D-frutofuranosidase pelo fungo filamentoso *Aspergillus thermomutatus* objetivando a produção de frutooligossacarídeos (FOS)"

AUTORA: LARISSA MIDIANE TODERO
ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

Profª. Drª. DANIELLE BISCARO PEDROLLI
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. CAREM GLEDES VARGAS RECHIA
Deparamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 26 de julho de 2018

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Larissa Midiane Todero
Nome em citações bibliográficas: TODERO, L. M.; TODERO, LARISSA M.

ENDEREÇO PROFISSIONAL:

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre. 14040-901 - Ribeirão Preto, SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/ TITULAÇÃO

2016 – Atual – Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Título: Produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo filamentoso *Aspergillus thermomutatus* objetivando a produção de frutooligossacarídeos (FOS). Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2012 – 2015 – Bacharel em Biotecnologia. Universidade Federal de Alfenas, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2017 – Manipulação Genética de Fungos, (Carga horária: 4h). Sociedade Brasileira de Microbiologia, Brasil.

2017 – Escrita Científica, (Carga horária: 6h). Universidade de São Paulo, Brasil.

2015 – Gestão de Projetos: premissas e aplicações do PMBOK, (Carga horária: 45 horas). Universidade Federal de Alfenas, Brasil.

2015 – Noções básicas de Soros e Vacinas, (Carga horária: 4 horas). Instituto Butantã, Brasil.

2014 – Toxicologia Forense, (Carga horária: 9 horas). Universidade de Alfenas, Unifenas, Brasil.

2013 – Citogenética, (Carga horária: 9h). Universidade Federal de Alfenas, Brasil.

2013 – Escrita Científica, (Carga horária 3h). Universidade Federal de Alfenas, Brasil.

2012 – Biotecnologia: Técnicas Básicas, aplicações e desafios, (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Alfenas, Brasil.

PROJETO DE PESQUISA

2014 – 2015 Síntese de biolubrificantes a partir do óleo de fritura pelo processo de hidroesterificação mediada por biocatalisadores heterogêneos (PIBIC).

PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

Artigos completos publicados em periódicos

TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; CORRADINI, M. C. C.; BARBOZA, J. C. S.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 1601-1613, 2015.

BASSI, J. J.; TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; KHEDY, G. I.; DUCAS, J. D.; CUSTÓDIO, A. P.; PINTO, M. A.; MENDES, A. A. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900-909, 2016.

LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; TODERO, L. M.; LUIZ, J. H. H.; MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis

by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-67, 2016.

Resumos Completos publicados em anais de congressos

TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; MENDES, A. A. Imobilização de lipases em suporte hidrofóbico mesoporoso e determinação das propriedades catalíticas em reações de hidrólise e esterificação. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2015, Fortaleza – CE. XX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM) e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB).

MENDES, A. A.; LAGE, F. A. P.; TODERO, L. M.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. Immobilization of microbial lipase by physical adsorption on hydrophobic support and application in 2-ethyl-1-hexyl oleate synthesis. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2015, Fortaleza – CE. XX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM) e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB).

BASSI, J. J.; TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; CORRADINI, M. C.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Enzymatic synthesis of banana flavor (isoamyl butyrate) by esterification reaction catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2015, Fortaleza – CE. XX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM) e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB).

Apresentações de trabalhos

TODERO, L. M.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Produção de Beta-D-frutofuranosidase pelo fungo filamentoso *Aspergillus thermomutatus* em fermentação submersa para a produção de frutooligossacarídeo. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).

TODERO, L. M.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Optimization of the β-D-frutofuranosidase production by *Aspergillus thermomutatus* under submerged fermentation. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; CORRADINI, M. C.C.; BASSI, J. J.; MENDES, A. A. Síntese de biolubrificantes a partir do óleo de fritura pelo processo de hidroesterificação mediada por biocatalisadores heterogêneos. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C.C.; MENDES, A. A. Imobilização de lipases em suporte hidrofóbico mesoporoso e determinação das propriedades catalíticas em reações de hidrólise e esterificação. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

BASSI, J. J.; TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; CORRADINI, M. C.C.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Triagem de biocatalisadores e otimização da produção de ésteres de frutose (Biossurfactantes) em meio orgânico. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

LAGE, F. A. P.; TODERO, L. M.; CORRADINI, M. C.C.; BASSI, J. J.; MENDES, A. A. Preparação de biocatalisadores por imobilização de lipases de *Rhizomucor miehei* e *Mucor javanicus* em suporte hidrofóbico para posterior aplicação em reações de síntese de ésteres de interesse industrial. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

MENDES, A. A.; LAGE, F. A. P.; TODERO, L. M.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C.C. Immobilization of microbial lipase by physical adsorption on hydrophobic support and application in 2-ethyl-1-hexyl oleate synthesis. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

BASSI, J. J.; TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; CORRADINI, M. C.C.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Enzymatic synthesis of banana flavor (isoamyl butyrate) by

esterification reaction catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

29° Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2017. (Congresso).

2° Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial. 2017. (Encontro).

XX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM) e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB). 2015. (Simpósio).

V Ciclo de Palestras em Biotecnologia. 2015. (Seminário).

Ciclo de seminários e Debates do Laboratório de Bioprocessos. 2014. (Seminário).

Imobilização de Enzimas como ferramenta na produção de Biocatalisadores. 2014. (Palestra).

Workshop Genômica, análise de transcriptomas e epigenômica: Princípios e aplicações. (Seminário).

III Jornada da Biologia da UNIFAL-MG. 2013. (Jornada).

IV Ciclo de Palestras em Biotecnologia. 2013. (Seminário).

II Ciclo de Seminários em Genética. 2013. (Seminário).

I Mesa-Redonda com os Egressos do Programa Ciências sem Fronteiras. 2013. (Mesa-Redonda)

III Jornada Científica de Biotecnologia da UNIFAL-MG. 2012. (Congresso).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Nivaldo Tódero e Vania M. Tódero, que
me incentivaram a sempre ser melhor e
são a razão de tudo. A minhas irmãs Vanessa
e Andressa, pelo companheirismo e amor
Sem vocês eu não seria nada!

AGRADECIMENTOS

A Deus, força maior, pela vida.

Aos meus pais, Nivaldo Todero e Vania Maria Tódero, que são meu exemplo de vida. Obrigada pelos ensinamentos de vida, em especial a não desistir e não abaixar a cabeça. Obrigada por me ajudarem a ser sempre uma pessoa melhor! Vocês são a força para tudo que consegui. Amo vocês!

A minhas irmãs, Andressa e Vanessa, que me apoiaram quando precisei, me fizeram rir e sempre me ajudaram nos momentos mais difíceis. Obrigado por tudo que vocês fizeram por mim! Amo vocês!

À Chalana, que entrou na minha vida em 2014, e trouxe consigo o Argo, que juntos me proporcionaram momentos felizes e de descontração ao longo de todo o mestrado. Meus finais de semanas não seriam o mesmo sem vocês!

A minha prima, Milene de Oliveira, que nestes últimos meses têm me ajudado e, juntas, amparamos uma a outra a passar pelas dificuldades da vida. Muito obrigada!

A Isabela Gobbo, pelo grande apoio e amor. Obrigada por sempre me dar forças para continuar, acreditar em mim e me fazer enxergar que sempre podemos ser melhores. Obrigada por todos os momentos que você esteve ao meu lado. Agradeço imensamente ter você perto de mim.

Ao Prof. Dr. Luis Henrique, pela oportunidade dada, confiança depositada, pelos esclarecimentos e ensinamento fundamentais para este trabalho. Muito obrigada!

A Thais Barboni, que me ajudou em tudo que precisei. Obrigada pelas conversas, pelos sorvetes da Rose, pelos momentos compartilhados e pelas risadas. Você é uma ótima pessoa! Muito obrigada!

A Rayza Cavalcantti, uma das pessoas mais forte que já conheci. Obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio, por mostrar a força que nós, mulheres, temos! E por trazer um pedacinho do Nordeste com você sempre! Você vai superar as adversidades da vida, saiba que admiro você muito!

A Pedro Henrique, pela ajuda e por me fazer quebrar a cabeça muitas vezes. Obrigada pelos momentos de reflexão sobre diversos assuntos, pelas risadas, pela parceria e pelos lanches também! Muito obrigada, você já é um grande pesquisador.

A Fernanda Mansano, pela amizade e apoio nos grandes momentos deste mestrado. Obrigada pela companhia, seja nas madrugadas no laboratório até nos bares da vida. Ainda teremos muitos momentos juntas!

A Isabela Amatto, pela sua alegria e bondade. Obrigada pelos Bom dia na maior alegria, pela sua luz e felicidade que inundava o laboratório. Não deixe ninguém tirar de você a sua inocência e bondade! Você é mais forte do que pensa!

A Chadia Maestrello, pelo auxilio no laboratório e pelas risadas compartilhadas.

A Isamara Camuri, companheira de quarto e vida nestes anos de mestrado. Juntas descobrimos as maravilhas e dificuldades do mestrado e de dividir um quarto! Obrigada por tudo e você vai ir muito longe ainda, independente do caminho que você vai seguir!

A Luiz Cláudio Ferreira, Tio de coração, que nestes últimos anos me ensinou muito além de só andar a cavalo, me ensinou a ser forte e a seguir sempre aquilo que se quer. Muito obrigada pelos ensinamentos da vida, pela ajuda, pelos momentos de distração, pelas cavalgadas e pelas lembranças! Ainda andaremos muito a cavalo juntos!

Ao técnico Mauricio pelo auxilio e apoio no laboratório.

A Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia e a técnica Luciana Angulo Faria Rocha do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/RP pela disponibilidade, rapidez e serviço prestado para a finalização deste trabalho.

A Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Química da UNESP- Araraquara/SP e seus funcionários, em especial a secretária da Pós-Graduação em Biotecnologia, pela disposição e atenção dada.

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, ajudaram na produção deste trabalho, Muito Obrigada!

“A vida não é digna de se viver. Ela é para ser tomada e surrada. E combatida, e formada na sua imagem. É aí onde o sentido repousa. No que você pode insinuar-se à vida. Para aqueles que simplesmente aturam a vida, sim: ela é uma piada muito sórdida. Mas para aqueles que a formam com a sua vontade, a piada está em quem se coloca no caminho”

Xena – Princesa Guerreira

RESUMO

As β-D-frutofuranosidases (EC 3.2.1.26), também conhecidas como invertases, são responsáveis pela produção de uma mistura equimolar de glicose e frutose a partir da hidrólise da sacarose, conhecida como açúcar invertido, utilizada para diversos fins na indústria alimentícia. Em altas concentrações de sacarose, algumas dessas enzimas apresentam atividade de transfrutosilação, produzindo frutooligossacarídeos (FOS). Os FOS são oligossacarídeo prebióticos estruturalmente formados por unidades de frutose ligadas entre si formando um oligômero, o qual possui uma glicose terminal através de uma ligação glicosídica β (1-2), com fórmula geral GF_n. Devido a sua ligação β, os FOS não são metabolizados pelo organismo humano, podendo ser utilizados por diabéticos como um substituto a sacarose. Diante do interesse biotecnológico e industrial, e das diversas aplicações destas enzimas, o objetivo deste trabalho foi a produção de β-D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo *Aspergillus thermomutatus* em Fermentação Submersa (FSbm) e investigar a atividade de transfrutosilação da enzima. A maior produção enzimática (0,96 U/mL) em FSbm foi obtida em meio Khanna adicionado de 10 g/L de sacarose como fonte de carbono, inoculado com 10^6 esporos/mL de meio, mantido a 30°C, 100 rpm por 120 h. A temperatura e pH ótimos aparentes de atividade foram 60°C e 5,0, respectivamente. A enzima foi estável na temperatura de 40°C por 48 h, mantendo 75% de sua atividade inicial. A enzima apresentou atividade residual de 60% quando mantida nos pH 5,0 e 4,5 por 48 h. A atividade β-D-frutofuranosidásica foi ativada na presença de Mn^{2+}, sendo estável na maioria dos compostos testados. A atividade máxima de hidrólise alcançada foi de 2,2 U/mL na presença de 3 mmol/L de $MnSO_4$. A enzima também demonstrou atividade de transfrutosilação, produzindo nistose e kestose. As maiores concentrações de FOS (86,67 g/L, dos quais 1 g/L corresponde a nistose e 85 g/L a kestose) foram encontradas quando utilizado 50% (m/v) de sacarose como substrato, sendo a reação conduzida a 60°C por 72 h. Assim, conclui-se que a β-D-frutofuranosidase extracelular produzida por *A. thermomutatus* possui potencial biotecnológico e é promissora na aplicação industrial para produção de açúcar invertido e FOS.

Palavras-chave: *Aspergillus*; *Aspergillus thermomutatus*; ; Invertase; Fermentação Submersa; Frutooligossacarídeos; β-D-frutofuranosidase.

ABSTRACT

The β-D-fructofuranosidases (EC 3.2.1.26), also known as invertases, are responsible for the production of an equimolar mixture of glucose and fructose obtained by sucrose hydrolysis, known as invert sugar, which are used for several purposes in food industry. At high concentrations of sucrose, some of these enzymes present transfructosylating, producing fructooligosaccharides (FOS). FOS are prebiotic oligosaccharides with chemical structure composed of linked fructose units forming an oligomer, which are connected to a terminal glucose through a β(1-2) glycosidic bond, with general form of GF_n. FOS are not metabolized by the human body due to its β binding, therefore they can be used by diabetics as a substitute for sucrose. Due to this biotechnological and industrial interest and several applications of these enzymes, the present work aimed the production of extracellular β-D-fructofuranosidase by the fungus *Aspergillus thermomutatus* using Submerged Fermentation (FSbm) and to investigate the transfructosylating activity of the enzyme. In the optimization of FSbm, the highest enzymatic production (0.96 U/mL) was obtained using an inoculum concentration of 10^6 spores/mL in Khanna medium with 10 g/L sucrose as carbon source, maintained at 30 °C for 120 h. The apparent optimum temperature and pH for activity were 60°C and 5.0, respectively. The enzyme was stable at 40°C for 48 h, maintaining 75% of its initial activity. Considering the pH stability, the enzyme showed residual activity of approximately 60% for pH 5.0 and 4.5 after 48 h of incubation. β-D-fructofuranosidase activity was mainly activated by Mn^{2+}, and the enzyme activity was stable with most of the compounds tested. The maximum hydrolysis activity was 2.2 U/mL in the presence of 3 mmol/L of $MnSO_4$. The enzyme also showed transfructosylating activity, producing nystose and kestose. The highest concentrations of FOS (86.67 g/L, which 1 g/L corresponds to nystose and 85 g/L to kestose) were obtained when 50% (m/v) sucrose was used as substrate at 60°C for 72 h. Thus, the results obtained so far show that extracellular β-D-fructofuranosidases produced by *A. thermomutatus* have biotechnological potential to be applied in the industrial production of invert sugar and FOS.

Keywords: *Aspergillus*; *Aspergillus thermomutatus*; Fructooligosaccharides; Invertase; Submerged Fermentation; β-D-fructofuranosidase.

ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

Atm – Atmosfera (unidade de pressão)

BDA – Batata Dextrose Ágar

BSA – Albumina de Soro Bovina

cm – Centímetros

DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico

EC – *Enzyme Comission*

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

FAO – *Food and Agriculture Organization of USA*

FDA – *Food and Drug Administration*

FES – Fermentação em Estado Sólido

FFase – β-D-frutofuranosidase

FSbm – Fermentação Submersa

FOS - Frutooligossacarídeos

FTase – Frutosiltransferase

g – Grama

g – Aceleração da gravidade

GRAS – Geralmente Reconhecidos como Seguros

L – Litro

mg – Miligrama

mL – Mililitro

m/m – Massa por massa

m/v – Massa por volume

pH – Potencial Hidrogeniônico

rpm – Rotação por minuto

SDS – Duodecil sulfato de sódio

T_{50} – Tempo de meia vida

v/v – Volume por volume

YPD – Yeast Peptone Dextrose

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de hidrólise da sacarose catalisada pela β-D-frutofuranosidase ..27

Figura 2. Estrutura química dos frutooligossacarídeos 1-kestose, nistose e 1-frutofuranosilnistose 32

Figura 3. Esquema de produção dos frutooligossacarídeos 1-kestose, 6-kestose, nistose e frutofuranosilnistose 33

Figura 4. Representação esquemática da fermentação submersa e da produção enzimática de FOS. 34

Figura 5. Fluxograma simplificado dos experimentos realizados neste trabalho. 36

Figura 6. Influência da concentração de esporos de *A. thermomutatus* inoculados em meio Khanna e em meio Vogel suplementado com 10 (g/L) de sacarose, a 30°C por 72 horas de cultivo a 100 rpm, sobre a produção enzimática extracelular e intracelular. 54

Figura 7. Produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo *A. thermomutatus* em função da concentração de sacarose adicionada ao meio Khanna, a 30°C e 100 rpm, por 72 horas. 55

Figura 8. Influência do tempo de cultivo na produção de β-D-frutofuranosidase extracelular e intracelular pelo fungo *A. thermomutatus* em meio Khanna com 10 (g/L) de sacarose, a 30°C, 100 rpm. 57

Figura 9. Efeito da temperatura de cultivo na produção de β-D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo *A. thermomutatus* em meio Khanna com 1% (m/v) de sacarose,100 rpm por 120 horas. 58

Figura 10. Influência da concentração de glicose ou frutose na produção de β-D-frutofuranosidase extracelular e intracelular pelo fungo *A. thermomutatus* em meio Khanna com 10 (g/L) de sacarose, a 30°C,100 rpm por 120 horas 60

Figura 11. Influência da concentração de sacarose na atividade enzimática 62

Figura 12. Temperatura e pH ótimos aparente, termoestabilidade e estabilidade ao pH da β-D-frutofuranosidase extracelular presente no filtradoobtido do cultivo do fungo *A. thermomutatus* 63

Figura 13. Influência de diferentes concentrações de $MnSO_4$ na atividade β-D-frutofuranosidásica. 67

Figura 14. Perfil cromatográfico em Thyn Layer Chromatography (TLC) para os produtos obtidos pela ação da β-D-frutofuranosidase de *A. thermomutatus*, em diferentes tempos de reação, sobre sacarose 20% (m/v) como substrato.....70

Figura 15. Perfil cromatográfico em High Perfomance Liquid Chromatography (HPLC) dos produtos de hidrólise da sacarose pela β-D-frutofuranosidase extracelular de *A. thermomutatus* contida nofiltrado 71

Figura 16. Concentração de sacarídeos obtidos na reação de produção de FOS ...72

Figura 17. Influência da temperatura na produção de FOS pela enzima β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. thermomutatus*.. 74

Figura 18. Influência do tempo de reação na produção de FOS pela enzima β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. thermomutatus* nas temperaturas de 30°C e 60°C. 77

Figura 19. Produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. thermomutatus* em função da concentração de sacarose.. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Literatura encontrada de produção de β-D-frutofuranosidase por diferentes *Aspergillus* spp. 29

Tabela 2. Produção de β-D-frutofuranosidase em FSbm pelo fungo *A. thermomutatus* em função de diferentes fontes adicionais de carbono.....50

Tabela 3. Produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo *A. thermomutatus* em diferentes meios de cultura. 52

Tabela 4. Efeito de diferentes sais na atividade β-D-frutofuranosidásica extracelular do fungo *A. thermomutatus* em FSbm.....65

Tabela 5. Efeitos de diferentes compostos químicos na atividade β-D-frutofuranosidásica extracelular do fungo *A. thermomutatus*.....69

Tabela 6. Concentração de sacarídeos obtidos a partir da hidrólise da sacarose e da transfrutosilação em 48 horas de reação a 40°C. 71

Tabela 7. Conversão da sacarose (%, m/m), atividade de transfrutosilação (U_T), taxas de transferência (T_t) e de hidrólise (T_h) da enzima em diferentes temperaturas. 75

Tabela 8. Conversão da sacarose (%, m/m), atividade de transfrutosilação (U_T), taxa de transferência (T_t) e de hidrólise (T_h) da enzima em diferentes tempos nas temperaturas de 30 e 60°C.....78

Tabela 9. Conversão da sacarose (%, m/m), atividade de transfrutosilação (U_T), taxas de transferência (T_t) e de hidrólise (T_h) da enzima em diferentes concentrações de sacarose como substrato. 80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23

1.1 Fungos Filamentosos 25

1.1.1 O Gênero *Aspergillus* 25

1.2 Produção de β-D-frutofuranosidases por fungos filamentosos 27

1.3 Aplicação das β-D-frutofuranosidases 31

1.3.1 Frutooligossacarídeos (FOS) 31

2 OBJETIVOS 36

2.1 Objetivo Geral 36

2.2 Objetivos Específicos 36

3 MATERIAL E MÉTODOS 37

3.1 Manutenção da linhagem em laboratório 39

3.2 Preparo da suspensão de esporos 39

3.3 Produção de β-D-frutofuranosidase em fermentação submersa (FSbm) 39

3.4 Obtenção das enzimas intracelulares e extracelulares 40

3.5 Determinação da atividade β-D-frutofuranosidásica 40

3.6 Quantificação de proteínas 41

3.7 Influência de diferentes parâmetros sobre a produção de β-D-frutofuranosidase em FSbm 41

3.7.1 Influência de diferentes fontes adicionais de carbono 41

3.7.2 Influência de diferentes meios de cultivo na produção enzimática 42

3.7.3 Efeito da concentração de esporos do inóculo nas FSbm 44

3.7.4 Efeito do tempo e temperatura de fermentação na produção β-D-frutofuranosidásica 44

3.7.5 Influência da adição de uma segunda fonte adicional de carbono na FSbm 44

3.8 Caracterização da β-D-frutofuranosidase extracelular de *A. thermomutatus* 44

3.8.1 Efeito de diferentes concentrações da sacarose na atividade enzimática 44

3.8.2 Determinação da temperatura e pH ótimos para a atividade β-D-frutofuranosidásica 44

3.8.3 Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH da β-D-frutofuranosidase extracelular 45

3.8.4 Efeito de diferentes compostos na atividade β-D-frutofuranosidásica extracelular 45

3.9 Produção de frutooligossacarídeos pela β-D-frutofuranosidase extracelular de *A. thermomutatus* 46

3.9.1 Reação de produção de FOS 46

3.9.2 Determinação dos melhores parâmetros para a produção de FOS 46

3.9.3 Análise qualitativa da produção de FOS por TLC 46

3.9.4 Análise quantitativa da produção de FOS por HPLC 47

3.10 Análises dos experimentos e análises estatísticas 47

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 48

4.1 Produção de β-D-frutofuranosidase por *A. thermomutatus* em FSbm 48

4.1.1 Efeito de diferentes fontes adicionais de carbono sobre a produção frutofuranosidásica 48

4.1.2 Influência da composição do meio de cultura 50

4.1.3 Efeito da concentração de esporos na produção enzimática 52

4.1.4 Influência da concentração de sacarose no meio de cultivo 54

4.1.5 Influência do tempo de fermentação 56

4.1.6 Influência da temperatura na produção da β-D-frutofuranosidase 57

4.1.7 Influência de diferentes concentrações de glicose e frutose na produção enzimática 59

4.2 Caracterização da β-D-frutofuranosidase extracelular 61

4.2.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na atividade β-D-frutofuranosidásica 61

4.2.2 Influência da temperatura e do pH na atividade β-D-frutofuranosidásica62

4.2.3 Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade enzimática...64

4.3 Análise da produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase produzida pelo fungo *A. thermomutatus.* 69

4.3.1 Análise qualitativa pela *Thyn Layer Chromatography* (TLC) 69

4.3.2 Análise quantitativa da produção de FOS por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).....70

4.3.2.1 Produção de FOS utilizando $MnSO_4$ na reação.....72

4.3.2.2 Produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. thermomutatus* em função da temperatura de reação.....73

4.3.2.3 Produção de FOS em função do tempo de reação para as temperaturas de 30°C e 60°C 76

4.3.2.4 Influência da concentração de sacarose na reação de produção de FOS.....78

5 CONCLUSÕES 81

REFERÊNCIAS.....80

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os consumidores têm procurado alimentos que, além do valor nutricional, também ajudem no bem-estar e na saúde. Por essa razão, a formulação dos alimentos tem sido modificada para trazer estes benefícios ao serem consumidos, recebendo o nome de ‘alimentos funcionais’ (FLORES-MALTOS et al. 2014; SANGEETHA, RAMESH e PRAPULLA, 2005). Todo alimento pode ser considerado funcional já que fornece energia e nutrientes essenciais para a vida, entretanto o termo “produtos funcionais” implica em alimentos que, além da nutrição, oferecem também benefícios à saúde e reduzem o risco de doenças (CLYDESDALE, 2004; DOMINGUEZ et al., 2014).

O mercado global de alimentos funcionais em meados do ano 2000 já girava em torno dos U$ 33 bilhões. Nos Estados Unidos mais de U$ 15 bilhões eram faturados anualmente com os alimentos funcionais. O Japão, outro mercado importante nesse setor, em 2000 já arrecadava U$ 2 bilhões de dólares com estes alimentos e com a estimativa de crescimento de U$ 14 bilhões. Outros países importantes para este mercado de alimentos funcionais são o Reino Unido, Holanda, Alemanha e França (MENRAD, 2003; SANGEETHA, RAMESH e PRAPULLA, 2005)

Assim, nos últimos anos, os consumidores têm se deparado cada vez mais com estes produtos funcionais, sendo os probióticos e os prebióticos os mais conhecidos e estudados (DE PRETER et al., 2011). Os alimentos funcionais são produtos naturais que possuem compostos bioativos como, por exemplo, os prebióticos. Compostos bioativos são principalmente fitoquímicos e, com o consumo regular, geram impactos positivos na saúde, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares, cânceres, além de agirem diretamente no intestino, ajudando na absorção de nutrientes, como o cálcio (DOMINGUEZ et al., 2006; SANGEETHA, RAMESH e PRAPULLA, 2005).

De acordo com a literatura e a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United States*), os prebióticos são definidos como “uma substância que fermentada seletivamente permite alterações específicas, tanto na composição e/ou atividade da microbiota intestinal, conferindo benefícios no bem-estar e na saúde” (GIBSON et al., 2004; SLAVIN, 2013). Para um composto ser classificado como prebiótico, este deve preencher alguns critérios como: i) não ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastrointestinal, ou seja, deve possuir baixa sensibilidade à hidrólise pelas enzimas da saliva, pâncreas e estômago; ii) ser fermentado pela microbiota

intestinal, estimulando o crescimento e metabolismo de uma ou mais bactérias do cólon; iii) modificar a composição microbiana do colón, facilitando o desenvolvimento de espécies benéficas, induzindo efeitos benéficos na saúde (DOMINGUEZ et al., 2014; FLORES-MALTOS et al., 2014; SLAVIN, 2013). Atualmente sabe-se que as comunidades bacterianas do trato intestinal humano têm grande importância na função do trato gastrointestinal e, consequentemente, na saúde humana (GIBSON et al., 2004).

Os prebióticos vêm sendo amplamente pesquisados pela sua grande diversidade e efeitos na saúde. Além disso, tem se buscado sua obtenção otimizada, seja pela extração direta das plantas ou pela síntese enzimática (DOMINGUEZ et al., 2006, 2014; FLORES-MALTOS et al., 2014).

Alguns compostos considerados prebióticos são carboidratos não digeríveis como, por exemplo, oligossacarídeos e polissacarídeos, e alguns peptídeos e lipídeos (DOMINGUEZ et al., 2014; FLORES-MALTOS et al., 2014; SLAVIN, 2013). De acordo com Dominguez e colaboradores (2014), a demanda mundial de prebióticos, em 2014, já era estimada em cerca de 167 mil toneladas e 390 milhões de euros, destacando-se entre os produtos com atividade prebiótica, os frutooligossacarídeos, a inulina, os isomaltooligossacarídeos e as polidextroses.

Os frutooligossacarídeos (FOS) são encontrados em diferentes vegetais como, por exemplo, na cebola, na banana e na chicória (DOMINGUEZ et al., 2014; FLORES-MALTOS et al., 2014; YUN, 1996). Eles podem ser produzidos também pela ação de enzimas, seja pela hidrólise da inulina pela ação das inulinases (EC 3.2.1.7), ou pela transfrutosilação da sacarose. A produção de FOS por transfrutosilação da sacarose acontece pelas ações das β-D-frutofuranosidases (FFase, EC 3.2.1.26), também conhecidas como invertases e das frutosiltransferases (FTase, EC 2.4.1.9) (CHEN e LIU, 1996; MAIORANO et al., 2008). As FFases têm principalmente ação hidrolítica sobre a sacarose, gerando uma mistura equimolar de D-glicose e D-frutose, a qual recebe o nome de açúcar invertido. Contudo, algumas FFases, em concentrações de sacarose superiores a 20% (m/v), apresentam também atividade de transfrutosilação. Já as FTases têm somente ação de transfrutosilação (ÁLVARO-BENITO et al., 2007; CHEN e LIU, 1996; MAIORANO et al., 2008; YUN, 1996).

Comercialmente, os frutooligossacarídeos são produzidos através da síntese enzimática a partir da sacarose, utilizando enzimas microbianas que possuem atividade de transfrutosilação (DOMINGUEZ et al., 2014). Estas enzimas podem ser

produzidas por diferentes microrganismos. De acordo com Dominguez e colaboradores (2014) diversos estudos têm reportado a produção de enzimas com atividade de transfrutosilação por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Aureobasidium*.

1.1 Fungos Filamentosos

O reino Fungi inclui organismos muito diversos, que vão desde cogumelos até leveduras, entre outros menos conhecidos. Mais de 100.000 espécies de fungos já foram descritas, porém estimativas sugerem que o número de espécies totais que existem nesse reino seja de 1,5 milhão (SILVA e MALTA, 2016; MADIGAN et al., 2016). Os fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos que obtém energia a partir das ligações químicas de vários compostos orgânicos. Esses microrganismos podem ser unicelulares, como as leveduras ou multicelulares, como os fungos filamentosos (SILVA e MALTA, 2016; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Entre outras características, a biossíntese de produtos naturais torna os fungos filamentosos um dos organismos mais pesquisados pela comunidade científica. Estes produtos naturais podem ser benéficos ao homem (como a penicilina, as enzimas, os ácidos orgânicos e pigmentos) ou maléficos, como alguns compostos secundários, como a aflotoxina (HOFFMEISTER e KELLER, 2007). Dentre estes produtos, as enzimas possuem um alto interesse industrial, visto que são utilizadas em diversos setores, como na produção de alimentos e fármacos.

Devido a sua excepcional capacidade de expressar e secretar proteínas para o meio externo, os fungos filamentosos se tornaram indispensáveis para a produção de enzimas de importância industrial (QUINTANILLA et al., 2015). Além disso, eles também possuem uma maquinaria de modificação pós-traducional que permite a glicosilação e dobramento correto das proteínas. Associado a estas características, um grande número de espécies destes fungos são reconhecidos como GRAS (Geralmente Reconhecidos Como Seguro) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos. Sendo assim, atualmente, grande parte das enzimas industriais nativas ou recombinantes são produzidas por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (MEYER, 2008).

1.1.1 O Gênero *Aspergillus*

Entre os diversos fungos utilizados na produção enzimática o gênero *Aspergillus* (filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, Ordem Eurotiales e família Trichocomaceae) é um dos mais importantes, sendo um modelo biológico clássico. Existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus* conhecidas, que foram isoladas do ar, do solo e de plantas em decomposição. As espécies de *Aspergillus* possuem um importante papel no âmbito biotecnológico, produzindo um grande número de enzimas extracelulares que são aplicadas nas indústrias. Das diversas espécies de *Aspergillus*, algumas das mais conhecidas são *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus flavus*. Os *Aspergillus* spp. são anamorfos, ou seja, a reprodução destes fungos é de forma assexual, caracterizada pela produção de fiálides e conídios em cadeia nas extremidades dos conidióforos, produzidos por mitose e subsequente divisão celular (WAINWRIGHT, 1995; KLICH, 2007; SILVA, 2009). As colônias de *Aspergillus* apresentam colorações que variam de branca, amarelada, amarelo-esverdeada, marrom, verde ou rosada (SILVA, 2009).

Muitas espécies de *Aspergillus* apresentam teleomorfos, nome dado à forma do fungo do filo Ascomycota capaz de se reproduzir sexuadamente. O fungo *Neosartorya pseudofischeri* é um exemplo de teleomorfo, tendo a sua forma assexuada o nome de *Aspergillus thermomutatus* (PETERSON, 1992; KLICH, 2007). Além disso, os fungos do gênero *Aspergillus* são caracterizados por seus metabólitos secundários, pelo crescimento em ágar sacarose-creatina, cor dos conídios e taxa de crescimento em certas temperaturas. Compostos orgânicos como peptídeos não ribossomais e terpenoídes, entre outros compostos, são produzidos em combinações únicas e diferentes para cada espécie de *Aspergillus* (GALAGAN et al., 2005; SAMSON et al., 2007).

A produção de diversas enzimas é obtida pelo cultivo de diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Alguns exemplos são as proteases, amilases, lactases, celulases, pectinases e fitases, entre outras, que já são produzidas industrialmente

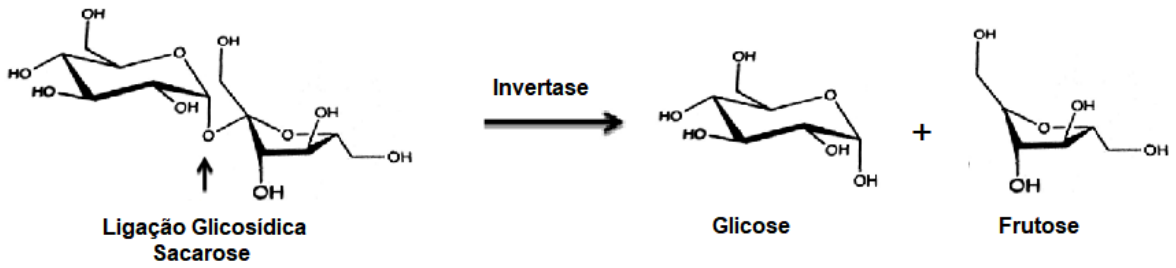
Dentre as enzimas produzidas por fungos filamentosos, as β-D-frutofuranosidases (EC 3.2.1.26) merecem destaque. Estas hidrolases pertencem à família GH32 (glicosídeo hidrolase) que abriga também as levanases (EC 3.2.1.65) e endo-inulinases (EC 3.2.1.7).

1.2 Produção de β-D-frutofuranosidases por fungos filamentosos

As β-D-frutofuranosidases (FFase) (EC 3.2.1.26), também conhecidas como invertases, são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação glicosídica (tipo α-β) de carboidratos como a sacarose, neste caso, gerando dois monossacarídeos, a D-glicose e D-frutose (Figura 1) (ÁLVARO-BENITO et al., 2007). A mistura de açúcares obtida após a hidrólise é denominada açúcar líquido invertido, já que ocorre uma inversão do poder óptico rotatório da solução. Também por isso essa enzima recebe o nome de invertase (NADEEM et al., 2015). Quando um feixe de luz polarizada atravessa uma solução de sacarose pura ocorre o desvio do feixe de luz para a direita, já que a sacarose é levemente dextrógira. Após a hidrólise, a solução equimolar de glicose e frutose passa a desviar o feixe de luz para a esquerda (NADEEM et al., 2015; TIMERMAN, 2012).

A β-D-frutofuranosidase é uma das primeiras enzimas estudadas na história. Em 1828, a sua atividade foi identificada pela primeira vez ao se observar uma levedura de panificação que fermentava a sacarose em meio aquoso (BARROS, 1990). Em 1890, já havia sido publicado um artigo de revisão para esta enzima (O'SULLIVAN; TOMPSON, 1890). Outro marco importante para a história dessa enzima foi o seu uso para a determinação do modelo cinético de Michaelis-Menten, que é utilizado até os dias de hoje para a maior parte das enzimas (MICHAELIS; MENTEN, 1913).

Figura 1. Reação de hidrólise da sacarose catalisada pela β-D-frutofuranosidase



Fonte: Autora.

As β-D-frutofuranosidases apresentam atividade em grandes faixas de pH, com o pH ótimo próximo a 4,5. A temperatura de produção da enzima varia de acordo com o organismo utilizado, mas sua temperatura ótima de atuação é próxima a 50°C. Atualmente, sabe-se que esta enzima é amplamente distribuída na biosfera. A β-D-

frutofuranosidase já foi encontrada em diversas plantas, como na pera japonesa (*Pyrus pyrifolia*), na ervilha (*Pisum sativum* L.) e na aveia (*Avena sativa*), e em microrganismos como *S. cerevisiae*, *Candida utilis* e *Aspergillus* spp., sendo estes últimos os mais utilizados em estudos de produção enzimática e nas indústrias (ROMERO-GÓMEZ et al., 2000; UMA et al., 2010). As propriedades das enzimas não só variam de acordo com cada microrganismo, mas também de acordo com a composição do meio de cultura, principalmente pela fonte de carbono utilizada, e ainda pelo tipo de fermentação (DOMINGUEZ et al., 2014; MAIORANO et al., 2008).

Os microrganismos são geralmente cultivados em dois tipos de fermentação, a Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação Submersa (FSbm). Na literatura se observa a produção de β-D-frutofuranosidases por diferentes fungos do gênero *Aspergillus* cultivados em ambas condições fermentativas, utilizando diferentes fontes de carbono, como pode ser observado na Tabela 1.

A FES é caracterizada pelo crescimento do microrganismo em um substrato, sem água livre, que é o suporte físico e fonte de nutrientes para o desenvolvimento do organismo. A FES tem algumas vantagens em relação à FSbm, como requerimento de menos espaço, menor custo de operação, simplicidade no processo e menor possibilidade de contaminação, reduzindo os gastos com a esterilização (SANGEETHA, RAMESH e PRAPULLA et al., 2005). No entanto a FES têm algumas desvantagens que desencorajam o uso desta técnica nas indústrias. Desvantagens como a formação de um gradiente de temperatura e pH, dificuldade de controle do oxigênio dissolvido durante o cultivo, da transferência de massa e energia, e problemas no controle da disponibilidade limitada da água, são fatores que dificultam a ampliação de escala desse tipo de fermentação (DOMINGUEZ et al., 2014; MAIORANO et al., 2008).

A FSbm, por outro lado, é o tipo de fermentação mais utilizado nas indústrias para a produção de enzimas. Cerca de 90% de todas as enzimas industriais são produzidas por FSbm (DOMINGUEZ et al., 2014; NADEEM et al., 2015). Neste processo o microrganismo cresce de forma livre e em suspensão em um meio de cultivo líquido no qual estão presentes, de forma dissolvida ou suspensa, todos os sais e nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (GONÇALVES et al, 2013; GONÇALVES; JORGE e GUIMARÃES, 2015). Como vantagens da FSbm podem ser mencionados o baixo custo com alta produtividade por volume de reator, o controle dos parâmetros fermentativos, a possibilidade de agitação, o que pode aumentar a

produção das enzimas, e facilitado *scale-up* se comparado a FES. Adicionalmente, o fermentado cru pode ser utilizado diretamente como fonte enzimática. Já as desvantagens são o alto custo para manter agitação e aeração do meio, e possível formação de espuma (BON et al., 2008; NADEEM et al., 2015; MAIORANO et al., 2008; DOMINGUEZ et al, 2014). Para melhorar a produção enzimática são definidas algumas variáveis como fontes de carbono e nitrogênio, e suas respectivas concentrações, tempo de cultivo, agitação e taxa de aeração, além de adição de vários sais minerais, pequenas quantidades de aminoácidos, polímeros e surfactantes (DOMINGUEZ et al., 2014; MAIORANO et al., 2008). Algumas desvantagens também são observadas, como a limitação na transferência e mistura de oxigênio que pode ocorrer devido à alta viscosidade do meio em decorrência da biomassa e morfologia fúngica (QUINTANILLA et al., 2015). De maneira a alcançar a maior produção de enzimas, vários fatores, como microrganismo a ser utilizado e os parâmetros de fermentação, devem ser otimizados (NADEEM et al., 2015).

Tabela 1. Produção de β-D-frutofuranosidase por diferentes *Aspergillus* spp.

Microrganismo	Fonte de carbono	Tipo de Fermentação	Temperatura e pH ótimos	Referência
A. caespitosus	Farelo de trigo	FES	50°C, 4,0-6,0	ALEGRE et al., 2009
		FSbm	60°C, 4,0-6,0	
Aspergillus casiellus	Farelo de soja	FES	70°C, 4,0	NOVAKI et al, 2010
Aspergillus flavus	Sacarose (3%)	FSbm	50°C, 6,0	UMA et al., 2010
A. nidulans	Sacarose (1%)	FSbm	54-62°C,	ALVES, JORGE e GUIMARÃES, 2013
	Farinha de centeio (1%)	FSbm	4,8-5,6	ALVES, JORGE e GUIMARÃES, 2013
Aspergillus niger	Sacarose (2%)	FSbm	65°C, 2,9-5,6	NADEEM et al., 2009
A. niger IMI 303386	Sacarose (2%)	FSbm	50°C, 5,5	NGUYEN et al., 2004
A. niger	Sacarose (17,5%)	FSbm	55°C, 4,4	L'HOCINE et al., 2000
Aspergillus niveus	Bagaço de cana de açúcar	FSbm	60°C, 4,5	GUIMARÃES et al., 2009
A. niveus	Casca de mandioca	FES	55°C, 4,5	FERNANDES, JORGE e GUIMARÃES, 2017
Aspergillus ochraceus	Bagaço de cana de açúcar	FSbm	60°C, 4,5	GUIMARÃES et al., 2007
Aspergillus parasiticus	Bagaço de cana de açúcar	FSbm	38-56°C, 4,5-6,2	LUCCA, JORGE e GUIMARÃES 2013
Aspergillus phoenicis	Farelo de trigo	FSbm	65°C, 4,5	RUSTIGUEL et al., 2015
			60°C, 4,5	RUSTIGUEL et al., 2010
Aspergillus terreus	Farinha de centeio	FSbm	55-65°C, 4,0-6,0	GIRALDO et al., 2014

Fonte: Autora.

1.3 Aplicação das β-D-frutofuranosidases

As β-D-frutofuranosidases podem ser aplicadas com diferentes objetivos, sendo uma de suas principais aplicações a produção de uma mistura equimolar de frutose e glicose (conhecida como xarope invertido ou açúcar invertido), que devido a alta doçura da frutose, pode ser utilizada como substituta da sacarose, já que não causa a cristalização do alimento (UMA et al., 2010). Esse xarope invertido pode ser utilizado em doces e umectantes. Além disso, a invertase é utilizada na produção de bebidas alcoólicas, ácido lático, glicerol, e outros produtos em que se utiliza a sacarose (KULSHRSTHA et al., 2013). Estas enzimas também são utilizadas nas indústrias farmacêuticas, na fabricação de mel artificial e como agentes plastificantes em cosméticos, e também em eletrodos enzimáticos para a detecção da sacarose. Além disso, podem agir como agente antimicrobiano, visto que possuem poder antioxidante, ajudando na prevenção de infecções microbianas (KULSHRSTHA et al., 2013).

Algumas β-D-frutofuranosidases têm, além do poder de hidrólise, a capacidade de catalisar reação de transfrutosilação. A transferência de um resíduo frutosil para um aceptor final como, por exemplo, a sacarose, gera os frutooligossacarídeos (FOS). Estes sacarídeos podem ser utilizados como substituto da sacarose e, além disso, geram diversos benefícios quando implementados na alimentação humana (NADEEM et al., 2015).

1.3.1 Frutooligossacarídeos (FOS)

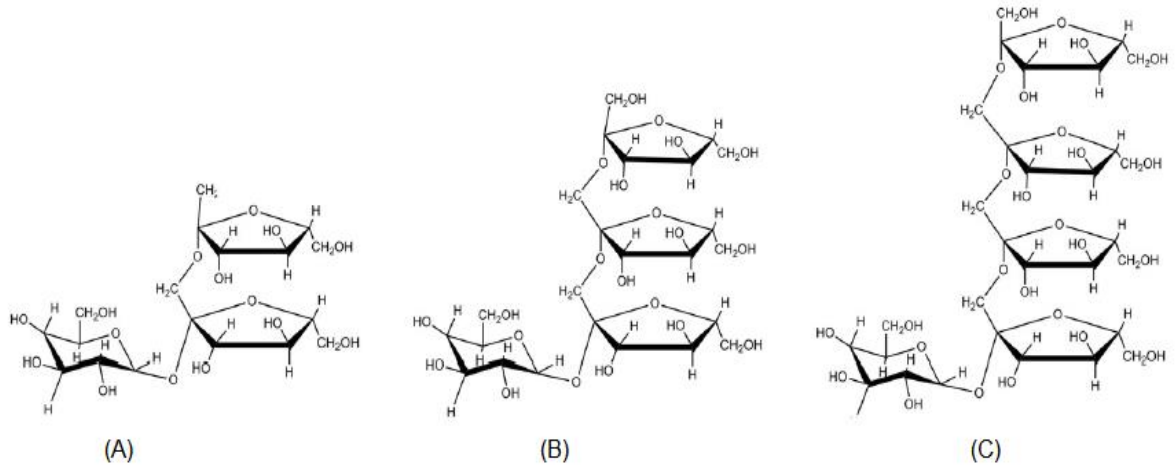
Os frutooligossacarídeos são sacarídeos bifidogênicos (estimulam a proliferação das bifidobactérias do colón), com estrutura química formada por unidades de frutose ligadas entre si, originando uma cadeia de frutose que, por sua vez, se liga a uma glicose terminal por ligação glicosídica β, com fórmula geral GF_n. Por possuírem essa ligação, estes carboidratos não são hidrolisados pelas enzimas digestivas humanas, pois elas são específicas para ligações glicosídicas do tipo α (SABATER-MOLINA et al., 2009; YUN, 1996; BÚRIGO et al., 2007).

De acordo com suas diferenças estruturais, os frutooligossacarídeos podem ser separados em diferentes grupos, como aqueles provenientes da quebra da inulina, os

levanos, a mistura de levanos e os neo-fOS (neo-levanos e neo-inulina) (FLORES-MALTOS et al., 2014; VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009).

A inulina é um polímero linear de frutose com ligação β-(1-2), obtida de algumas famílias de plantas, que ao ser hidrolisada pode gerar os FOS de cadeia curta (scFOS), com um grau de polimerização de 2 a 10 resíduos de frutose, sendo mais comuns os de 2 a 4 resíduos (FLORES-MALTOS et al., 2014; SANGEETHA, RAMESH e PRAPULLA, 2005). Os frutooligossacarídeos de cadeia curta (Figura 2) são representados principalmente pela kestose (GF_2), nistose (GF_3) e 1-β-frutofuranosilnistose (GF_4) (FLORES-MALTOS et al., 2014; YUN, 1996). A mistura destes oligossacarídeos já é comercializada por algumas empresas da Bélgica e da Holanda, sendo conhecida como “Raftilose” (PASSOS e PARK, 2003). Estes FOS são encontrados em uma grande variedade de plantas, principalmente em beterraba, cebola, trigo e tomate, entre outros, e também no mel (PASSOS e PARK, 2003; YUN, 1996).

Figura 2. Estrutura química dos frutooligossacarídeos 1-kestose (A), nistose (B) e 1-frutofuranosilnistose (C).

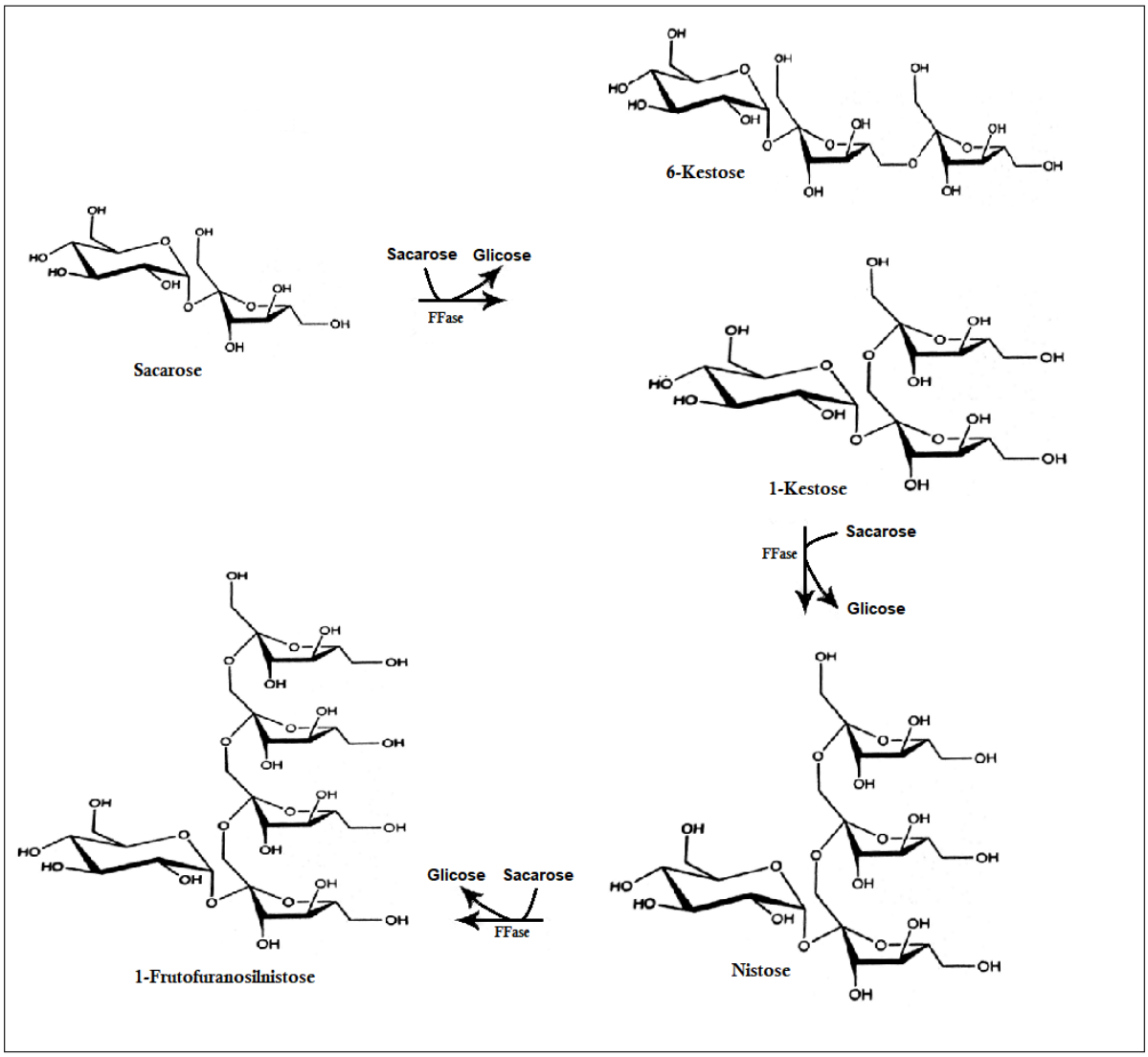


Fonte: FLORES-MALTOS (2014).

Outra forma de obtenção dos frutooligossacarídeos é a transfrutosilação enzimática da sacarose. A transfrutosilação gera FOS com um grau de polimerização de 1 a 5 unidades de frutosil. A formação de FOS a partir da sacarose pode ocorrer pela transfrutosilação do resíduo frutosil advindo tanto da sacarose, quanto dos FOS produzidos na reação. Simultaneamente, tanto a sacarose quanto os FOS podem ser os aceptores da unidade de frutose transfrutosilada (SANTOS, 1998; LEE, CHIANG e

TSAI, 1999). A Figura 3 mostra o esquema da produção enzimática de frutooligossacarídeos, a partir da ação da β-D-frutofuranosidase, onde a enzima transfere o resíduo frutosil da molécula de sacarose doadora para a molécula de sacarose aceptora.

Figura 3. Esquema de produção dos frutooligossacarídeos 1-kestose, 6-kestose, nistose e frutofuranosilnistose.

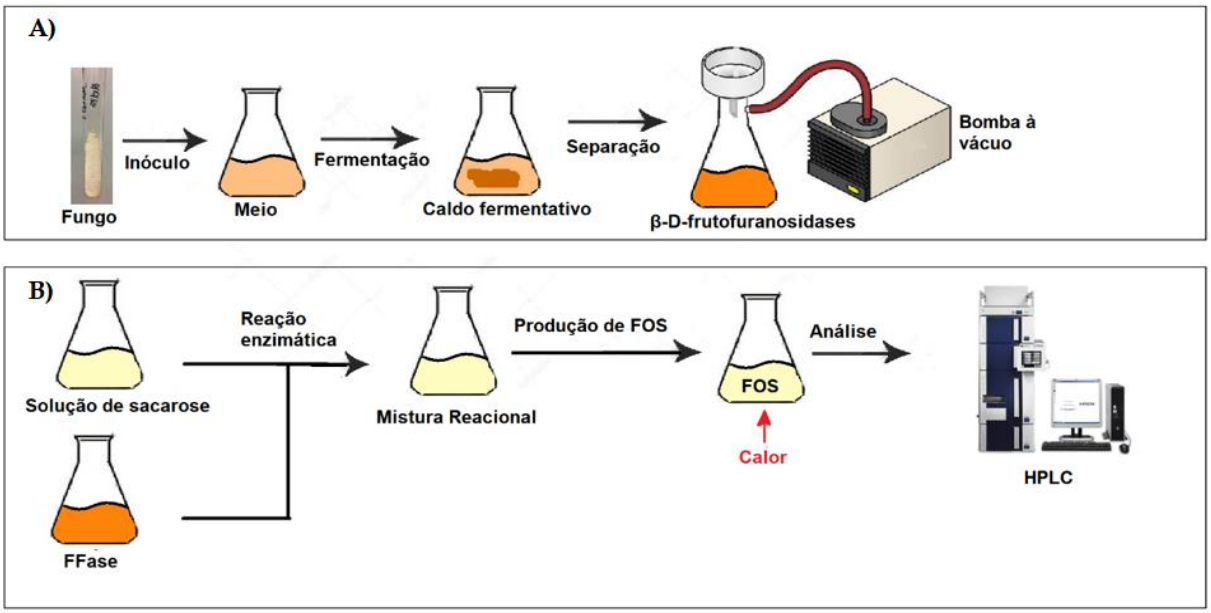


Fonte: Autora.

De acordo com Passos e Park (2003) os FOS advindos da transfrutosilação da sacarose já vêm sendo produzidos e comercializados em países como o Japão e também na Europa. A obtenção de FOS por duas etapas é a mais encontrada na literatura e na indústria. A primeira etapa compreende a produção da enzima (neste caso por FSbm). Na Figura 4, é apresentado esse esquema, onde no primeiro estágio

é produzida a enzima e no segundo estágio, a enzima é adicionada no substrato sacarose, ocorrendo a transfrutosilação e, consequentemente, a produção de FOS. A quantificação dos FOS formados é feita por HPLC, confirmando assim, a produção destes açúcares (DOMINGUEZ et al., 2014).

Figura 4. Representação esquemática da fermentação submersa para produção de β-D-frutofuranosidase (A) e para a produção enzimática de FOS (B).



Fonte: Modificado de Sangeetha, Ramesh e Prapulla (2005)

Os FOS desempenham um papel importante na melhoria da microbiota intestinal, e também são adotados como substituto da sacarose quando utilizados em alimentos em que o uso da sacarose é restringido pela sua elevada doçura (FLORES-MALTOS et al., 2014). Os frutooligossacarídeos também são livres de calorias e podem ser utilizados por diabéticos, uma vez que são dificilmente hidrolisados pelas enzimas humanas por causa da ligação glicosídica β, não sendo absorvidos pelo organismo humano. Desta forma são fermentados no intestino grosso, estimulando as bactérias probióticas do trato intestinal (DOMINGUEZ et al., 2014; FLORES-MALTOS et al., 2014). Além disso, os FOS já demonstraram diversos outros benefícios para a saúde humana, como a ajuda na produção de ácidos graxos de cadeia curta pelas bactérias do cólon que geram, entre outros benefícios, o alívio da constipação e a diminuição do risco de câncer de cólon. O aumento da absorção de minerais como o cálcio, magnésio, ferro e zinco também tem sido atribuído ao uso dos FOS na alimentação. Neste caso, estes minerais se ligam ao FOS e passam pelo trato

gastrointestinal superior, chegando ao colón onde estes íons ficam mais disponíveis para a absorção. Além disso, esses sacarídeos ainda reduzem o rico de obesidade e diabetes (MUSSATTO e MANCILHA, 2007; SABATER-MOLINA et al., 2009; DE PRETER et al., 2011; SANGUEETA et al., 2005).

Por este motivo a utilização de FOS como ingredientes alimentares tem aumentado rapidamente, apresentando um crescimento significativo no mercado de alimentos no mundo todo (DOMINGUEZ et al., 2014; SANGHEETA et al., 2005). Já próximo ao ano 2000 foi estimado que a Holanda consumia cerca de 2 a 12 g de FOS por dia por pessoa enquanto o Japão já havia sido estabelecido como consumo aceitável diário cerca de 0,8 g/kg de peso corpóreo por dia (PASSOS e PARK, 2003; HARTEMINK et al., 1997).

Estudos já demonstraram a utilização da β-D-frutofuranosidase de fungos filamentosos com sucesso na produção de FOS. Chen e Liu (1996) reportaram a produção de FFase por *A. japonicus* com atividade de transfrutosilação de 660 U m/L. Hidaka e colaboradores (1988) reportaram a atividade de transfrutosilação para a produção de frutooligossacarídeos por diferentes linhagens de fungos como *A. niger*, *A. pullulans* e *A. oryzae*, entre outros, destacando a enzima da linhagem *A. niger* ATCC 20611 como a mais eficiente para a produção de frutooligossacarídeos. Além disso, estudos atuais também têm procurado microrganismos capazes de produzir enzimas mais estáveis e mais ativas. Mussatto e colaboradores (2013) obtiveram a produção de uma β-D-frutofuranosidase com atividade de transfrutosilação quando o fungo *Aspergillus japonicus* foi cultivado em fermentação em estado sólido. Aziani e colaboradores (2012) também obtiveram uma enzima capaz de produzir frutooligossacarídeos quando utilizaram biofilme do fungo *A. phoenicis* com uma produção de 122 mg/L de FOS após 48 horas de reação.

Tendo em vista a grande procura de FOS, existe então a oportunidade de triagem e identificação de novas linhagens fúngicas capazes de produzir enzimas com atividade melhorada de transfrutosilação e uma produção de FOS com alto rendimento e menos dispendiosa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi a produção da β-D-frutofuranosidases pelo fungo filamentoso *Aspergillus thermomutatus* em fermentação submersa (FSbm) e produção de frutooligossacarídeos (FOS) por via enzimática.

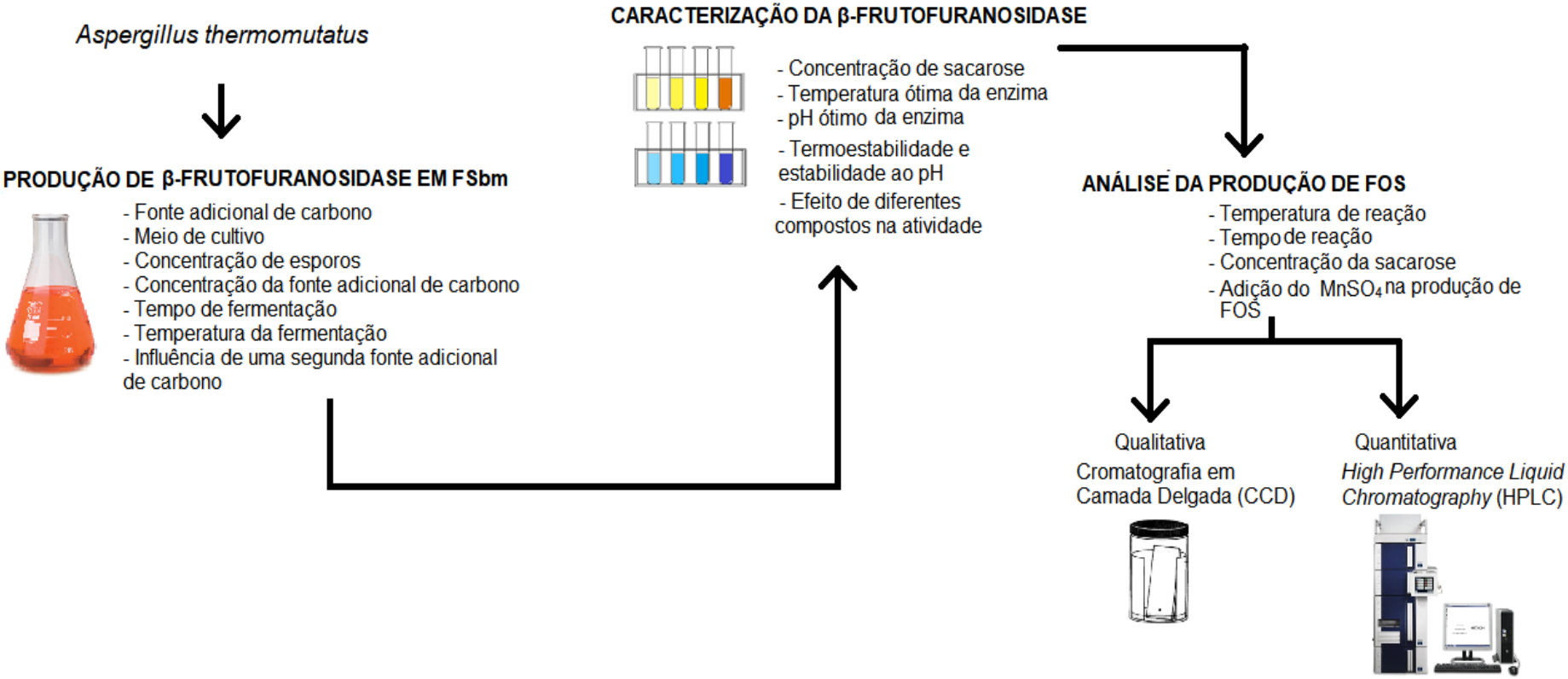
2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar as melhores condições de cultivo para a produção da β-D-frutofuranosidase pelo fungo *Aspergillus thermomutatus* em Fermentação Submersa;
- Determinar temperatura e pH ótimos de atividade, estabilidade térmica e ao pH da enzima extracelular;
- Determinar a influência de diferentes compostos na atividade de hidrólise da β-D-frutofuranosidase extracelular;
- Verificar o potencial enzimático para a produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase bruta utilizando TLC e HPLC.
- Padronizar os parâmetros da reação (temperatura, tempo e concentração de sacarose) para a alta produção de FOS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Na Figura 5 é apresentado o fluxograma simplificado dos procedimentos realizados no presente trabalho.

Figura 5. Fluxograma simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.



Fonte: Autora.

3.1 Manutenção da linhagem em laboratório

O fungo *Aspergillus thermomutatus*, disponível na coleção de culturas de fungos filamentosos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, foi mantido em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar) inclinado e previamente autoclavados a 121ºC, 1,5 atm por 20 minutos. Os meios foram inoculados retirando-se, com o auxílio de uma alça de platina, uma pequena quantidade de esporos de um cultivo estoque do fungo. Os cultivos foram mantidos em estufa a 30ºC por um período de 5 dias, sendo em seguida utilizados ou então, armazenados a 4ºC até o momento do uso. Repiques periódicos foram realizados a cada 30 dias.

3.2 Preparo da suspensão de esporos

A partir das culturas armazenadas, a suspensão de esporos foi obtida através da raspagem da superfície do meio BDA contendo o fungo filamentoso, com o auxílio de uma alça de platina. Após a raspagem foram adicionados 10 mL de água destilada estéril a cada tubo, sendo submetido manualmente a agitação. A quantidade de esporos por mL da suspensão foi padronizada com a utilização do contador automático de células TC 20 (BIO-RAD), sendo a concentração final de 10^8 esporos/mL inicialmente utilizada para o inóculo.

3.3 Produção de β-D-frutofuranosidase em fermentação submersa (FSbm)

As FSbm foram inicialmente conduzidas em frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio Khanna (KHANNA et al., 1995) com pH ajustado para 6,0, adicionados de uma das diferentes fontes de carbono, como descrito no item 3.7.1. Os meios foram previamente autoclavados a 121°C, 1,5 atm por 20 minutos e depois inoculados com suspensão de esporos (10^5 esporos/mL de meio), sendo incubados inicialmente a 30°C sob agitação orbital de 100 rpm por 72 horas. Todos os experimentos foram feitos em duplicata biológica, ou seja, repetição dos experimentos utilizando diferentes repiques da mesma linhagem.

3.4 Obtenção das enzimas intracelulares e extracelulares

Após o período de incubação, os cultivos foram filtrados sob vácuo em funil Büchner, com papel de filtro Whatman nº1, obtendo-se o caldo de cultura livre de células, denominado de filtrado extracelular. O micélio foi macerado com areia, previamente tratada com ácido clorídrico puro por 24 horas, em graal de porcelana mantido em banho de gelo e, posteriormente, ressuspenso em água destilada gelada, e centrifugado a 23000 *g*, durante 10 minutos, a 4ºC. Foi coletado o sobrenadante, o qual foi denominado extrato bruto intracelular. O extrato bruto intracelular e o filtrado extracelular foram dialisados contra água destilada por 24 horas a 4°C e utilizados para determinação da atividade β-D-frutofuranosidásica.

3.5 Determinação das atividades de hidrólise e de transfrutosilação da β-D-frutofuranosidase

A atividade β-D-frutofuranosidásica foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores formados pela ação da enzima sobre a sacarose (2%, m/v) em tampão acetato de sódio 100 mmol/L, pH 5,0, utilizando o reagente ácido 3',5'-dinitrosalícilico (DNS) como descrito por Miller (1959). O método foi previamente padronizado por uma curva analítica de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL). A mistura de reação foi composta de 500 µL do substrato e 500 µL de amostra enzimática, sendo conduzida a 40°C por 10 e 20 minutos de tempo reacional. Após esses tempos foi adicionado 1 mL de DNS e, o volume obtido, fervido por 5 minutos. Após resfriamento, o volume obtido foi adicionado de 5 mL de água destilada. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína. Todas as dosagens de atividade foram realizadas em triplicata para o cálculo do desvio padrão.

A atividade de transfrutosilação (U_T) da β-D-frutofuranosidase foi determinada considerando-se as concentrações de glicose (G) e de frutose (F) presentes no meio reacional, após catálise enzimática, determinadas por HPLC, como descrito no item 3.9.4. De acordo com Fernández et al. (2004), a concentração de frutose transferida na mistura reacional pode ser calculada como:

$$F_T = G - F$$

Sendo assim, uma unidade de atividade de transfrutosilação (Ut) foi definida como a quantidade de enzima necessária para transferir 1 µmol de frutose por minuto nas condições de ensaio.

A taxa de transferência da frutose e de hidrólise também foi obtida de acordo com o descrito por Kurakake et al. (2010):

$$\text{Taxa de transferência } (T_t)\ (\%): \frac{(G-F)}{G}\ x\ 100$$

$$\text{Taxa de hidrólise } (T_h)\ (\%): \frac{F}{G}\ x\ 100$$

3.6 Quantificação de proteínas

Para a quantificação de proteínas totais do extrato intracelular e do filtrado extracelular foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). O método foi padronizado com uma curva analítica de albumina de soro bovino - BSA (0 – 0,025 mg/mL). A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 595 nm. A concentração proteica foi expressa em mg de proteína por mL de amostra. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata para o cálculo do desvio padrão.

3.7 Influência de diferentes parâmetros sobre a produção de β-D-frutofuranosidase em FSbm

3.7.1 Influência de diferentes fontes adicionais de carbono

Foram avaliadas as influências de diferentes fontes adicionais de carbono sobre a produção enzimática, sendo 20 (g/L) para monossacarídeos (frutose e glicose) e 10 (g/L) para as demais fontes (sacarose, inulina, farinha de centeio, farinha de aveia, amido de milho, bagaço de cana-de-açúcar, coroa de abacaxi e casca e entrecasca de mandioca), além de um cultivo sem adição de fonte de carbono (controle), todos os cultivos foram feitos utilizando inicialmente o meio Khanna. Também foi avaliado o efeito da concentração (0 a 25; (g/L) da fonte de carbono adicional que mais induziu a produção da β-D-frutofuranosidase.

3.7.2 Influência de diferentes meios de cultivo na produção enzimática

Com o objetivo de melhorar a produção da β-D-frutofuranosidase foram observados os efeitos de cinco diferentes meios de cultivo, os quais estão descritos a seguir:

Meio Khanna (KHANNA et al., 1995)

- Solução de sais de Khanna [20x].....5,0 mL
  - NH_4NO_3.....2,0g
  - KH_2PO_4.....1,3g
  - $MgSO_4.7H_2O$.....0,362g
  - KCl.....0,098g
  - $ZnSO_4.H_2O$.....0,007g
  - $MnSO_4.H_2O$.....0,0138g
  - $Fe_2(SO_4).6H_2O$.....0,0066g
  - $CuSO_4.5H_2O$.....0,0062g
  - Água destilada q.s.p.....100mL
- Extrato de levedura.....0,1g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Meio SR (RIZZATI et al., 2001)

- Solução de sais SR [20x].....5,0mL
  - $MgSO_4.7H_2O$.....0,24g
  - KH_2PO_4.....0,3g
  - $NH_4H_2PO_4$.....1,0g
  - Água destilada q.s.p.....100mL
- Peptona.....0,02g
- Extrato de levedura.....0,45g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Meio Vogel (VOGEL, 1964)

- Solução de sais de Vogel [50x].....2,0mL

- Citrato de sódio pentahidratado.....15g
- KH_2PO_4.....25g
- NH_4NO_3.....10g
- $MgSO_4.7H_2O$.....1,0g
- $CaCl_2.2H_2O$.....0,5g
- Água destilada q.s.p.....100mL

- Solução de traços de elementos.....0,5mL
  - Ácido cítrico H_2O.....0,5mL
  - $ZnSO_4.7H_2O$.....5,0g
  - $Fe_2(NH_4)_2.(SO_4)_2.6H_2O$.....5,0g
  - $CuSO_4.5H_2O$.....0,25g
  - H_3BO_3.....0,05g
  - $MnSO_4.2H_2O$.....0,05g
  - $Na_2MoO_4.2H_2O$.....0,05g
  - Clorofórmio 1,0mL
  - Água destilada q.s.p.....100mL
- Solução de biotina.....20µL
  - Biotina.....0,05g
  - Etanol 50%.....100mL
- Água destilada q.s.p.....100mL

Meio YPD (yeast extract-peptone-dextrose)

- Peptona…….....2g
- Extrato de levedura.....1g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Meio Adams (ADAMS, 1990)

- $MgSO_4.7H_2O$.....0,05g
- KH_2PO_4.....0,1g
- Extrato de levedura.....0,2g
- Água destilada.....100mL

3.7.3 Efeito da concentração de esporos do inóculo na produção enzimática

Posteriormente, a produção enzimática foi analisada em função da concentração de esporos (10^4 a 10^7 esporos por mL) utilizada para inocular os meios de cultivo que possibilitaram a maior produção da β-D-frutofuranosidase por *A. thermomutatus*.

3.7.4 Efeito do tempo e da temperatura de fermentação na produção β-D-frutofuranosidásica

Foi avaliada a produção enzimática em função do tempo de cultivo (24-168 horas) em fermentação submersa utilizando o meio que propiciou a maior produção enzimática, assim como o efeito da temperatura de cultivo (25, 30, 35 e 40°C).

3.7.5 Influência da adição de uma segunda fonte adicional de carbono na FSbm

Foi avaliado o efeito do uso de uma segunda fonte adicional de carbono (frutose ou glicose) no meio do cultivo, em diferentes concentrações (0,25 a 2,0% (m/v)), sobre a produção da β-D-frutofuranosidase. Como controle foi utilizado o cultivo sem adição da segunda fonte de carbono.

3.8 Caracterização da β-D-frutofuranosidase extracelular de *A. thermomutatus*

3.8.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na atividade enzimática

Foi observado o efeito de diferentes concentrações de sacarose (20, 200 e 500; g/L) como substrato, preparado em tampão acetato de sódio 100 mmol/L, pH 5,0, na atividade β-D-frutofuranosidásicas, como descrito no item 3.5.

3.8.2 Determinação da temperatura e pH ótimos para a atividade β-D-frutofuranosidásica

A temperatura ótima aparente de atividade da enzima contida no filtrado extracelular foi determinada como descrito no item 3.5, utilizando temperaturas de reação variando de 30°C a 80°C, com intervalos de 5°C. Já para a determinação do pH ótimo aparente foram utilizadas as seguintes soluções: tampão acetato de sódio 100 mmol.L^{-1} (pH 3,5 a 6,0) e tampão Tris-HCl 100 mmol.L^{-1} (pH 6,5 a 10,0), com variação de pH de 0,5 na faixa analisada.

3.8.3 Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH da β-D-frutofuranosidase extracelular

Para a determinação da termoestabilidade, a enzima contida no filtrado extracelular foi incubada em diferentes temperaturas (40, 50 e 60°C) por diferentes períodos (5-2880 minutos), sendo a amostra sem incubação utilizada como controle. Após cada período de tempo, alíquotas foram retiradas e mantidas em banho de gelo, sendo posteriormente utilizadas na reação enzimática, como descrito no item 3.5.

Para a determinação da estabilidade ao pH a enzima foi incubada em tampão acetato de sódio (25 mmol/L) com diferentes valores de pH (4,0, 4,5 e 5,0) por diferentes períodos de tempo (10-2880 minutos) em banho de gelo, sendo a amostra sem incubação utilizada como controle. Após cada tempo de incubação as amostras foram imediatamente utilizadas na reação enzimática para se avaliar a estabilidade ao pH.

3.8.4 Efeito de diferentes compostos na atividade β-D-frutofuranosidásica extracelular

Os efeitos de diversos compostos químicos sobre a atividade enzimática foram determinados adicionando-se sais (1 mmol/L) (NH_4Cl, $CuSO_4.5H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, $CuCl_2$, HgCl, $MnSO_4$, KCl, $ZnSO_4$, $BaCl_2$, NaBR, NaH_2PO_4, NaF, KH_2PO_4, $FeCl_3$, $CaCl_2$, $MgSO_4$, NH_4F, NH_4NO_3, KI, $CaCl_2$, $AgNO_3$, $MgCl_2$ e $NaNO_3$), ureia (1 mmol/L), β-mercaptoetanol (1 mmol/L), EDTA (1 mmol/L), detergentes (0,01%; v/v para Tween 20 e Triton X-100, e 1 mmol/L para SDS) e solventes (1%; v/v) (etanol, n-butanol, acetonitrila, isopropanol, acetona e metanol).

3.9 Produção de frutooligossacarídeos pela β-D-frutofuranosidase extracelular de *A. thermomutatus*

3.9.1 Reação de produção de FOS

A produção de frutooligossacarídeos foi obtida inicialmente utilizando como substrato a sacarose (200 g/L) em tampão acetato de sódio 100 mmol/L, pH 5,0. Para a reação foi utilizado 500 µL do filtrado extracelular e 500 µL do substrato, em diferentes tempos e temperaturas, como definidos para cada experimento. Os tubos de ensaio foram vedados com plástico filme e após o tempo reacional a reação foi parada em banho maria com água fervente por 5 minutos.

3.9.2 Determinação dos melhores parâmetros de reação para a produção de FOS

Para se obter a melhor produção de frutooligossacarídeos pela β-D-frutofuranosidase extracelular de *A. thermomutatus* foram avaliados os efeitos de alguns parâmetros reacionais, tais como a temperatura de reação (30°C a 60°C), o tempo de reação (24h a 96h), a concentração de sacarose como substrato (2 a 50%; m/v) e a adição de3 mmol/L de $MnSO_4$.

3.9.3 Análise qualitativa da produção de FOS por TLC

A análise qualitativa da presença de FOS foi feita por cromatografia de camada delgada (*Thin Layer Chromatography*, TLC), utilizando como fase móvel uma solução constituída por butanol:etanol:água destilada (5:3:2; v/v/v). Após corrida cromatográfica por 8 horas, a placa foi seca a temperatura ambiente e posteriormente revelada com uma solução de orcinol 0,2% em ácido sulfúrico: metanol (1:9 v/v) em estufa a 100ºC. Os padrões utilizados foram sacarose (10 $g.L^{-1}$), frutose (10 $g.L^{-1}$), 1-kestose (16,6 $g.L^{-1}$) e nistose (16,6 $g.L^{-1}$). As reações foram feitas como descrito no item 3.9.1 em variados tempos de reação (2, 3, 5, 7 e 24 horas) a 40°C, sendo aplicados 5 µL de cada amostra na placa.

3.9.4 Análise quantitativa da produção de FOS por HPLC

Os FOS obtidos foram também analisados por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). O experimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Um cromatógrafo, equipado com um detector de índice de refração e uma coluna Supelcogel C-611 (30 cm x 7.8 mm) mantida a 60°C, foi utilizado. Uma solução de hidróxido de sódio 0,4 mmol/L foi empregada como fase móvel e um fluxo de 0,3 mL/minuto. Para as análises por HPLC foram utilizadas curvas padrões de glicose e frutose (0,1 a 1 g/L). Também foi feita uma curva padrão utilizando um mix dos FOS 1-kestose e nistose (0,1 a 1 g/L).

3.10 Análises estatísticas

Os experimentos foram analisados com base na média e no desvio padrão. Para análise dos dados obtidos e representações gráficas foram utilizados os programas Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft) e OriginPro 8 (OriginLab Corporation). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BioEstat versão 5.3, considerando-se três repetições. Foram realizados testes de normalidade de erros, análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias com intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de β-D-frutofuranosidase por *A. thermomutatus* em FSbm

A determinação dos melhores parâmetros fermentativos para a produção da β-D-frutofuranosidase é importante para se obter o maior nível enzimático possível. Vários estudos demonstram que há uma influência de diversos fatores na produção da β-D-frutofuranosidase por fungos filamentosos. Dentre estes fatores pode-se destacar a fonte de carbono e sua concentração, a composição de sais do meio de cultura, a concentração de esporos utilizada no inóculo, o tempo e a temperatura de fermentação (ALEGRE et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2007;2009; MUSSATTO et al., 2013; VAINSTEIN e PEBERDY, 1991). Assim alguns destes fatores foram avaliados na produção β-D-frutofuranosidásica pelo fungo *A. thermomutatus*.

4.1.1 Efeito de diferentes fontes adicionais de carbono sobre a produção β-D-frutofuranosidásica

Na Tabela 2 observa-se que a maior atividade enzimática extracelular (0,29 U/mL) foi obtida quando a sacarose foi utilizada como fonte de carbono adicional. Nesta condição, a atividade específica da enzima extracelular foi cerca de 9,5 vezes maior quando comparada ao valor obtido com o controle (sem adição de fonte de carbono). A coroa de abacaxi foi a segunda fonte que mais induziu a produção da enzima extracelular (0,12 U/mL), seguida pelo bagaço de cana de açúcar (0,11 U/mL). Neste caso a produção da enzima pode ter ocorrido devido a sacarose residual contida no bagaço. Já a coroa de abacaxi não possui em sua composição concentrações consideráveis de açúcar, mas sim celulose, hemicelulose, proteínas e lignina (UPADHYAY; LAMA e TAWATA, 2010). Uma possível explicação para a produção enzimática encontrada seria a hidrólise destes polímeros levando a produção de açúcares e aminoácidos (OGEDA e PETRI, 2010) que favoreçam o desenvolvimento fúngico e, consequentemente, a produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo *A. thermomutatus*. Quando utilizados os monossacarídeos, frutose e glicose, e na ausência de fonte de carbono (controle), a produção da β-D- frutofuranosidase foi reduzida, o que indica que a produção da enzima extracelular por *A. thermomutatus*

pode ser induzida em função da fonte de carbono empregada. A atividade específica obtida com a farinha de centeio (3,08 U/mg de prot.) foi menor do que a obtida com adição da sacarose (6,52 U/mg de prot.). No entanto, foi superior ao obtido para as demais fontes de carbono utilizadas, e cerca de 3,5 vezes maior que a obtida na ausência de fonte de carbono.

Já para a enzima intracelular obteve-se uma atividade específica de 5,08 U/mg de proteína quando o meio foi suplementado com inulina como fonte de carbono, sendo 2,5 vezes maior do que a produção obtida com coroa de abacaxi, segunda melhor fonte adicional de carbono para a produção enzimática. A produção intracelular, quando utilizada a inulina como fonte adicional de carbono, foi 6 vezes maior do que a enzima intracelular produzida com o meio adicionado de sacarose. Considerando o uso da sacarose como fonte de carbono, a produção da β-D-frutofuranosidase intracelular foi 6 vezes menor que a produção extracelular. Para as demais fontes usadas a produção da enzima intracelular foi reduzida ou inexistente. O fungo apresentou maior crescimento na presença de inulina, com massa micelial de 4,29 g, seguido pela frutose (2,09 g). Já quando não foi utilizada fonte adicional de carbono, foi observada a menor massa do micélio (0,98 g).

Ao contrário do encontrado neste estudo, outros microrganismos preferem fontes de carbono complexas para a produção da β-D-frutofuranosidase, como é o caso do *Aspergillus caespitosus*, que produziu 32 vezes mais invertase extracelular quando o farelo de trigo foi adicionado ao meio de cultura, comparando-se com a sacarose (ALEGRE et al., 2009). Gonçalves e colaboradores (2013) descreveram a maior produção da β-D-frutofuranosidase extracelular (6,26 U/mL) por *Fusarium graminearum,* quando utilizado o farelo de trigo como fonte de carbono. Giraldo e colaboradores (2012) obtiveram para o fungo *Paecilomyces variotti*, na presença de farelo de soja como fonte de carbono, produção de β-D-frutofuranosidase 7 vezes maior que a obtida com a sacarose nas mesmas condições. Já para o fungo *A. phoenicis* foi observado que a produção da enzima extracelular foi máxima utilizando o farelo de trigo como fonte de carbono adicional (195 U totais) (RUSTIGUEL et al., 2010).

Tabela 2. Produção de β-D-frutofuranosidase em FSbm pelo fungo *A. thermomutatus* em função de diferentes fontes adicionais de carbono.

Fonte adicional de carbono	Atividade extracelular		Atividade intracelular		Massa Micelial (g)
	(U/mL)	(U/mg prot.)	(U/mL)	(U/mg prot.)	
Sacarose	$0,29^{A} \pm 0,01$	$6,52^{A} \pm 0,39$	$0,05^{A} \pm 0,01$	$0,55^{A} \pm 0,07$	1,49
Glicose	$0,02^{BF} \pm 0,01$	$0,15^{B} \pm 0,02$	0	0	2,09
Inulina	$0,03^{BDF} \pm 0,01$	$1,03^{CE} \pm 0,2$	$0,29^{B} \pm 0,02$	$5,08^{B} \pm 0,84$	4,29
Farinha de Centeio	$0,08^{C} \pm 0,02$	$3,08^{D} \pm 0,25$	0	0	1,25
Farinha de Aveia	$0,04^{D} \pm 0,01$	$0,48^{BC} \pm 0,12$	0	0	1,22
Amido de milho	$0,03^{BD} \pm 0,02$	$0,23^{B} \pm 0,15$	$0,03^{A} \pm 0,02$	$0,18^{A} \pm 0,05$	1,77
Bagaço de cana de açúcar	$0,11^{E} \pm 0,04$	$1,6^{EF} \pm 0,37$	$0,02^{A} \pm 0,01$	$0,09^{A} \pm 0,87$	1,20
Frutose	$0,02^{F} \pm 0,1$	$0,12^{B} \pm 0,1$	$0,02^{A} \pm 0,01$	$0,15^{A} \pm 0,05$	1,60
Casca e entrecasca de mandioca	$0,03^{DF} \pm 0,01$	$0,190^{B} \pm 0,04$	0	0	1,38
Coroa de abacaxi	$0,12^{E} \pm 0,01$	$1,87^{F} \pm 0,06$	$0,14^{C} \pm 0,02$	$2^{C} \pm 0,19$	1,35
Sem carbono (controle)	$0,03^{DF} \pm 0,01$	$0,87^{C} \pm 0,67$	0	0	0,98

Os cultivos foram realizados em FSbm em meio Khanna, por 72 horas, a 30°C e 100 rpm. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A produção de enzima extracelular possui um maior interesse econômico, já que possui maior facilidade de manipulação que a intracelular, pois não é necessária sua extração do interior da célula, podendo diminuir os custos de produção. Assim, para o estudo da influência da composição do meio de cultura na produção β-D-frutofuranosidásica foi selecionada a sacarose como fonte de carbono adicional, considerando-se a maior atividade enzimática extracelular.

4.1.2 Influência da composição do meio de cultura

Em todos os meios de cultivo usados o fungo *A. thermomutatus* foi capaz de produzir a β-D-frutofuranosidase. As maiores atividades específicas extracelulares foram encontradas quando utilizados os meios Khanna (7,18 U/mg de proteína) e Vogel (2,54 U/mg de proteína), respectivamente (Tabela 3), sendo a produção

enzimática com o meio Khanna significativamente maior que a observada com outros meios de cultivo. Quando utilizados os meios YPD, Adams e SR, a produção enzimática extracelular foi reduzida. Dois sais são encontrados somente na composição do meio Khanna, o cloreto de potássio e o sulfato de zinco, os quais podem ter induzido de maneira positiva a produção enzimática. A grande diferença entre os meios Adams e SR e o meio Khanna são os tipos de sais na sua composição e a concentração destes, o que pode indicar que, possivelmente, alguns sais encontrados na composição do meio Khanna influenciaram positivamente a produção da β-D-frutofuranosidase. Quando comparado ao meio YPD, o composto encontrado em ambos é o extrato de levedura, no entanto, em uma concentração 10 vezes maior que a observada para o meio Khanna, possivelmente, influenciando de forma negativa a secreção enzimática. Foi relatado em outro estudo que a adição de extrato de levedura ao meio de cultivo, levou a uma queda na produção extracelular da β-D-frutofuranosidase pelo fungo *A. nidulans*, mas não para a produção intracelular (ALVES, JORGE e GUIMARÃES, 2013). Já quando comparadas as composições dos meios de cultivo Khanna e Vogel, nota-se que alguns sais estão presentes em ambos, indicando que estes sais, possivelmente, atuam de forma positiva na produção enzimática extracelular. Já para a produção intracelular a maior atividade específica foi proporcionada quando o fungo foi cultivado no meio SR (2,65 U/mg de proteína). Neste caso, os diferentes compostos encontrados nesse meio são a peptona em uma baixa concentração (0,2 g/L) e o di-hidrogenofosfato de amônio (H_6NO_4P), sendo este último encontrado apenas na formulação do meio SR. Assim, é provável que tais compostos tenham favorecido a produção da β-D-frutofuranosidase intracelular. Observa-se também que a maior produção intracelular, quando observada a atividade enzimática, foi com o meio YPD (0,48 U/mL). Em ambos os meios, SR e YPD, há uma concentração de extrato de levedura pelo menos 2 vezes maior que a observada para os outros três meios. Na literatura foi observado que a maior concentração de extrato de levedura atua de forma positiva na produção da β-D-frutofuranosidase (DRIOUCH et al., 2010, CHEN e LIU, 1996). No entanto, como somente é observado o aumento da produção intracelular, a ideia anteriormente apresentada, que o extrato de levedura pode ter influenciado de forma negativa a secreção enzimática é reforçada.

Ao se observar a produção enzimática extracelular obtida com os meios Vogel (0,13 U/mL) e Khanna (0,25 U/mL), não houve diferença estatística, porém quando

considerada a atividade específica a diferença foi significativa. Sendo assim, para continuidade dos estudos, foram escolhidos os meios Vogel e Khanna.

O uso do meio Khanna para produção de β-D-frutofuranosidase por diversas espécies de *Aspergillus* já vem sendo descrito como, por exemplo, por Alegre e colaboradores (2009) que obtiveram a máxima produção de β-D-frutofuranosidase intracelular pelo fungo *A. caespitosus* neste meio. O mesmo foi observado para a produção da enzima extracelular pelo fungo *A. phoenicis* (RUSTIGUEL et al., 2010). Também foi obtida a maior produção enzimática para o fungo *A. nidulans* quando utilizado o meio Khanna suplementado com sacarose. No entanto, os mesmo autores observaram que para *E. nidulans* o melhor meio foi o M5 contendo como fonte de carbono a inulina (ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013).

Tabela 3. Produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo *A. thermomutatus* em diferentes meios de cultura.

Meios de Cultura	Atividade Extracelular		Atividade Intracelular	
	(U/mL)	(U/mg prot.)	(U/mL)	(U/mg prot.)
YPD	$0,05^{A} \pm 0,01$	$0,62^{A} \pm 0,16$	$0,48^{A} \pm 0,03$	$1,79^{A} \pm 0,08$
Adams	$0,02^{A} \pm 0,01$	$0,21^{B} \pm 0,01$	$0,04^{B} \pm 0,01$	$0,35^{B} \pm 0,11$
SR	$0,04^{A} \pm 0,02$	$0,20^{B} \pm 0,09$	$0,22^{C} \pm 0,01$	$2,65^{C} \pm 0,42$
Vogel	$0,13^{B} \pm 0,08$	$2,54^{C} \pm 0,16$	$0,23^{C} \pm 0,05$	$1,02^{D} \pm 0,15$
Khanna	$0,25^{B} \pm 0,07$	$7,18^{D} \pm 0,34$	$0,09^{B} \pm 0,02$	$0,70^{BD} \pm 0,05$

Os cultivos foram realizados nos diferentes meios de cultivo suplementados com 10 (g/L) de sacarose, por 72 horas, a 30°C e 100 rpm. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.1.3 Efeito da concentração de esporos na produção enzimática

A Figura 6 apresenta a produção da β-D-frutofuranosidase nos meios Khanna e Vogel em função da concentração de esporos inoculados. Pode se observar que no meio Khanna, a produção β-D-frutofuranosidásica extracelular foi aumentando de acordo com o aumento da concentração de esporos inoculados, sendo obtida a maior produção enzimática quando inoculado 10^6 esporos/mL de meio (0,44 U/mL), seguida pelo inoculo de 10^7 esporos/mL de meio (0,35 U/mL). É importante ressaltar que a produção da enzima extracelular com 10^6 esporos/mL de meio foi cerca de 2 vezes maior que a obtida com a concentração de 10^5 esporos/mL de meio (0,21 U/mL). Já

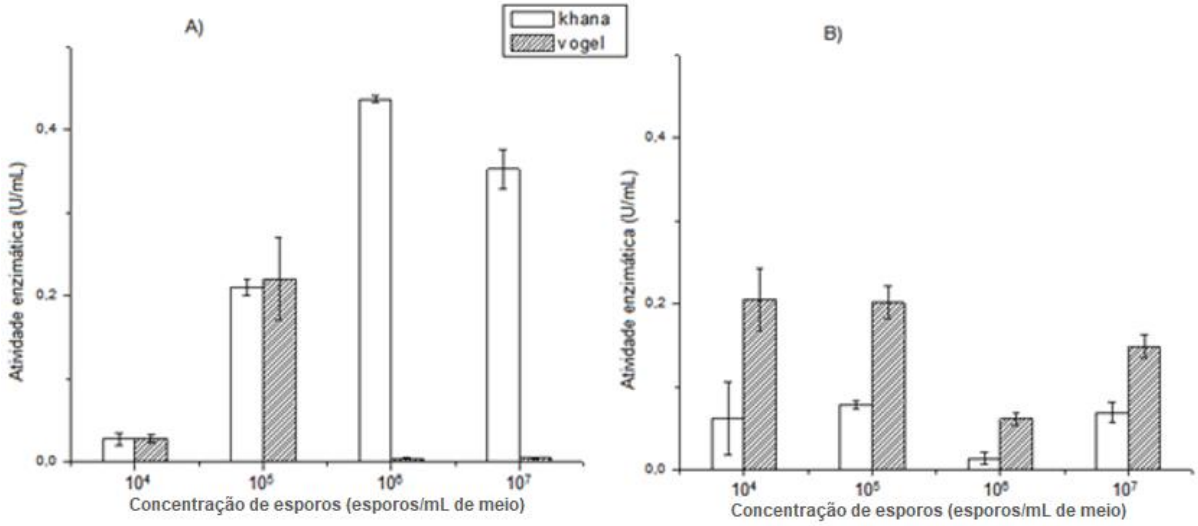
para a enzima intracelular, a menor produção foi obtida quando utilizado 10^6 esporos/mL de meio, sendo que para as outras três concentrações de esporos (10^4,10^5 e 10^7 esporos/mL de meio), os valores obtidos ficaram muito próximos.

Para o meio Vogel a maior produção da enzima extracelular foi obtida quando utilizada a concentração de 10^5 esporos/mL de meio (0,22 U/mL). Para as outras concentrações de esporos a produção extracelular foi bastante reduzida. Tal fato pode ser devido ao aumento da concentração de esporos gerando o acréscimo de massa fúngica no meio, aumentando a produção enzimática, até uma determinada concentração, onde os nutrientes passam a ser insuficientes e a produção enzimática diminui. É importante notar que o meio Vogel não possui em sua composição o extrato de levedura, já o meio Khanna sim, isso pode ter favorecido a produção da β-D-frutofuranosidase nas concentrações superiores de esporos. As maiores produções enzimáticas intracelulares foram observadas quando utilizados 10^4 e 10^5 esporos/mL, respectivamente.

Outros estudos utilizaram uma suspensão de esporos de 10^5 esporos/mL para a produção da β-D-frutofuranosidase por diferentes fungos como, por exemplo, para os fungos *A. phoenicis* (RUSTIGUEL et al., 2010; RUSTIGUEL; JORGE; GUIMARÃES, 2015), *P. variotti* (GIRALDO et al., 2012), *A. niveus* (GUIMARÃES et al., 2009), *A. ochraceus* (GUIMARÃES et al., 2007) e *A. caespitosus* (ALEGRE et al., 2009). Mussatto e colaboradores (2013) obtiveram a maior produção de invertase com o fungo *A. japonicus* quando utilizado 10^7 esporos/g de material seco.

Como a produção extracelular obtida com o meio Khanna inoculado com 10^6 esporos/mL de meio foi 2 vezes maior que a maior produção extracelular encontrada para o meio Vogel, este foi selecionado para a continuidade dos estudos.

Figura 6. Influência da concentração de esporos de *A. thermomutatus* inoculados em meio Khanna e em meio Vogel suplementado com 10 (g/L) de sacarose, a 30°C por 72 horas de cultivo a 100 rpm, sobre a produção enzimática extracelular (A) e intracelular (B).



Fonte: Autora.

4.1.4 Influência da concentração de sacarose no meio de cultivo

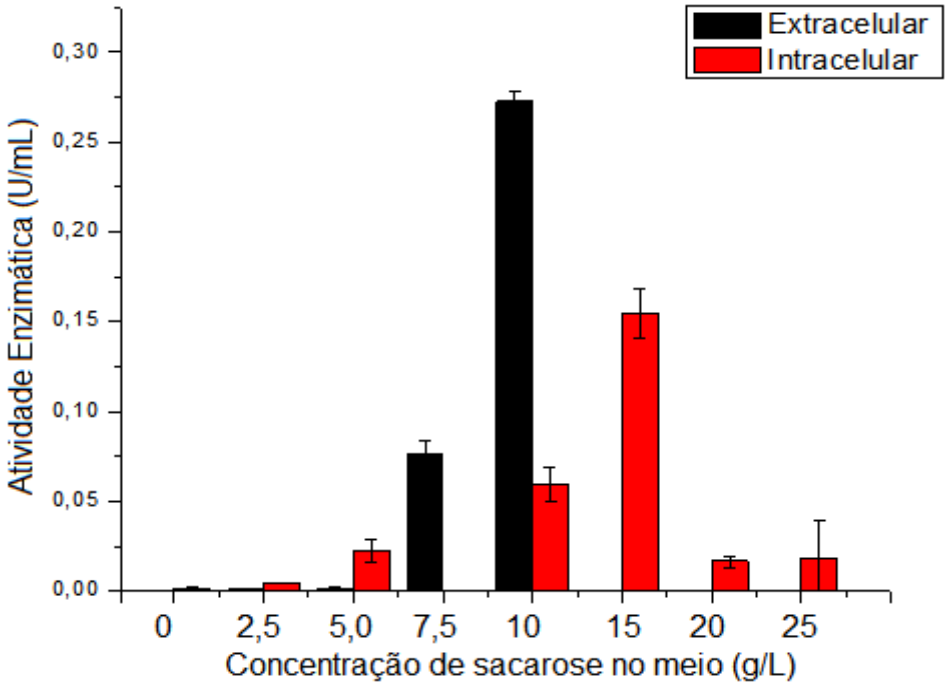
A Figura 7 apresenta a produção da β-D-frutofuranosidase por *A. thermomutatus* em diferentes concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultivo. Observa-se que ocorreu aumento na produção da β-D-frutofuranosidase extracelular, chegando ao seu máximo, quando o fungo foi cultivado no meio contendo 10 (g/L) de sacarose (0,27 U/mL). Em concentrações superiores, percebe-se redução e ausência da atividade β-D-frutofuranosidásica extracelular. Contudo, para a forma intracelular verifica-se que ainda há uma pequena produção da enzima na presença de concentrações maiores que 15 (g/L) de sacarose. Esses resultados podem ser explicados devido à repressão catabólica sofrida pelo fungo quando em altas concentrações de fontes de carbono. Conforme ocorre aumento da concentração de sacarose no meio de cultura há também o aumento da concentração de glicose e frutose devido a hidrólise da sacarose pela ação da β-D-frutofuranosidase produzida por *A. thermomutatus*. Diversos fatores podem afetar a produção de invertase em diferentes microrganismos. Entre eles, a glicose possui um papel importante como repressor da síntese da enzima (Vainstein e Peberdy, 1991). O aumento da fonte de carbono pode ter influenciado também a produção de protease, degradando assim a β-D-frutofuranosidase produzida. Além disso, já são conhecidos transportadores de membrana de sacarose para microrganismos eucariotos, como o AGT1, da levedura

Saccharomyces cerevisiae (STAMBUK, BATISTA e DE ARAUJO, 2000). Quando a concentração de sacarose foi aumentada, esses transportadores possivelmente possibilitaram uma maior entrada do açúcar para o meio intracelular, o que pode explicar a falta de produção/secreção da β-D-frutofuranosidase extracelular e o aumento da produção enzimática intracelular.

Os fungos do gênero *Aspergillus* também possuem um regulador que para ou diminui a transcrição de genes que estão sujeitos a repressão catabólica pelas fontes de carbono (Alegre *et al*., 2009; Vainstein e Peberdy, 1991). Vainstein e Peberdy (1991) observaram que a adição de glicose em concentrações crescentes ao meio contendo sacarose, levou a redução da produção da invertase extracelular por *A. niger* e *A. nidulans*. Para os próximos testes foi então selecionada a concentração de fonte de carbono de 10 (g/L) de sacarose no meio de cultivo.

Nota-se também que com a ausência de fonte adicional de sacarose não houve a produção da β-D-frutofuranosidase extracelular, corroborando com a ideia de que a enzima é produzida em resposta a fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Vainstein e Peberdy (1991) também observaram que o fungo *A. nidulans* não produzia a enzima em baixas concentrações de sacarose e rafinose.

Figura 7. Produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo *A. thermomutatus* em função da concentração de sacarose adicionada ao meio Khanna, a 30°C e 100 rpm, por 72 horas.

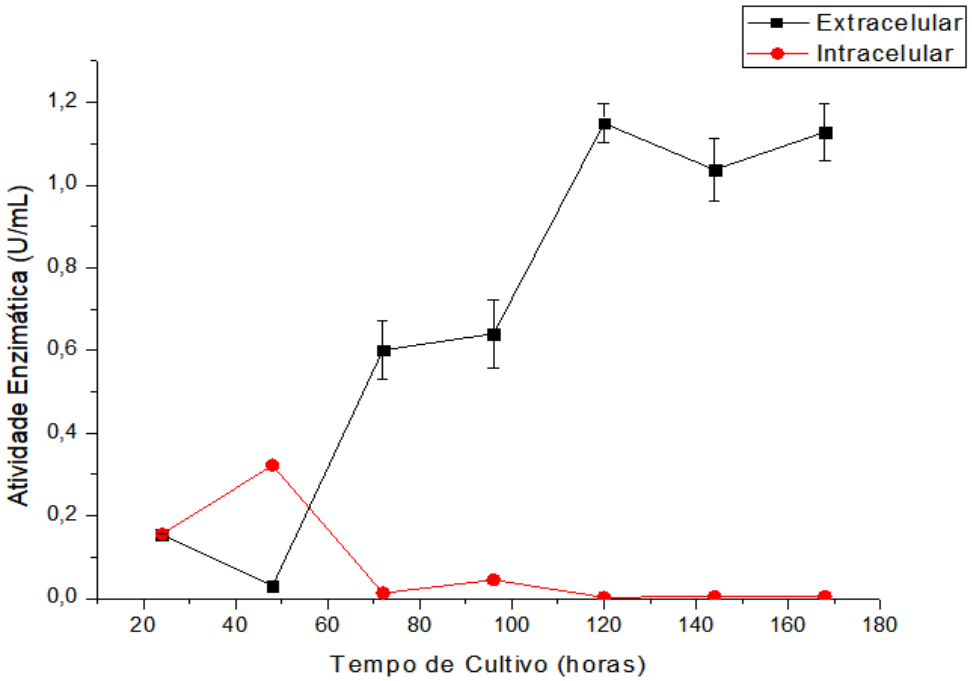


Fonte: Autora.

4.1.5 Influência do tempo de fermentação na produção enzimática

Na Figura 8 é apresentada a produção enzimática extracelular e intracelular em função do tempo de cultivo. Observa-se que a produção da enzima extracelular já ocorre nas primeiras 24 horas, sendo obtida uma atividade enzimática de 0,15 U/mL, decaindo em 48 horas, e aumentando novamente nos outros tempos. A atividade enzimática extracelular foi superior no tempo de 120 horas (1,15 U/mL), cerca de 2 vezes maior que a atividade obtida com o tempo de 72 horas de fermentação (0,60 U/mL), tempo usado até então neste trabalho. Nos tempos superiores (144 a 168 horas) foi mantida, sem grandes oscilações, a produção da β-D-frutofuranosidase. Para a forma intracelular a maior atividade enzimática foi encontrada no tempo de 48 horas de cultivo (0,32 U/mL). Alguns estudos feitos com fungos do gênero *Aspergillus* em fermentação submersa utilizaram o tempo de 72 horas para a produção de β-D-frutofuranosidase (ALEGRE et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009). Hidaka e colaboradores (1988) observaram a produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo *A. niger* ATCC 20611 e obtiveram a maior atividade específica extracelular no tempo de 72 horas. Guimarães e colaboradores (2007) também utilizaram vários períodos de fermentação (24-96 horas) para o fungo *A. ochraceus* e chegaram à máxima produção da enzima extracelular utilizando o bagaço de cana-de-açúcar (108 U totais) e sacarose (83 U totais), com 96 horas de cultivo.

Figura 8. Influência do tempo de cultivo na produção de β-D-frutofuranosidase extracelular (—■—) e intracelular (—●—) pelo fungo *A. thermomutatus* em meio Khanna com 10 (g/L) de sacarose, a 30°C, 100 rpm.



Fonte: Autora.

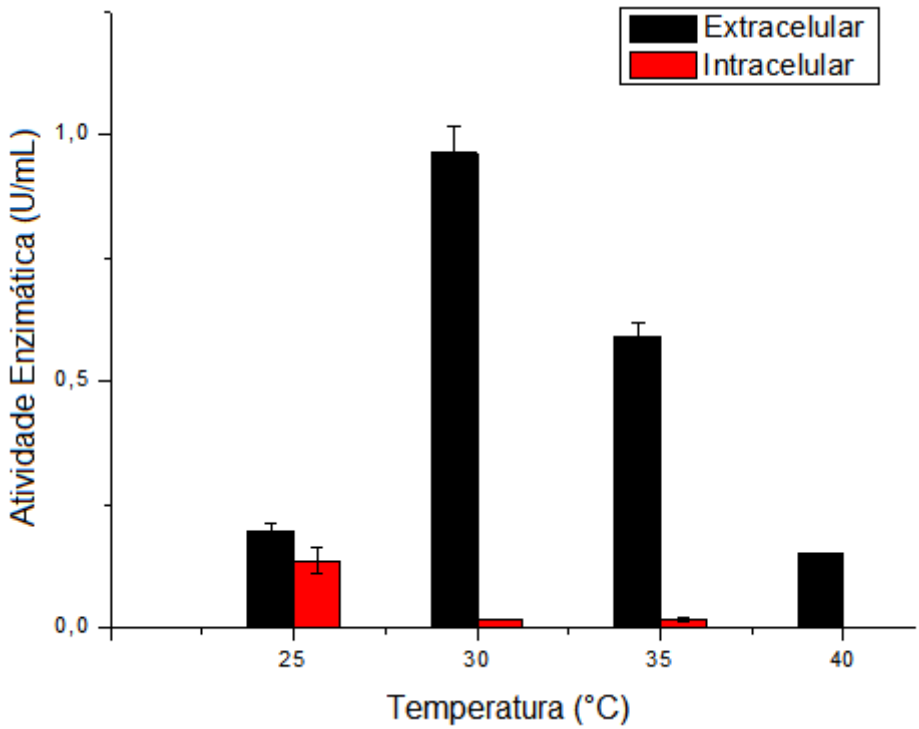
Os resultados obtidos demonstram que o fungo produz e secreta β-D-frutofuranosidase já no início do cultivo como mecanismo para hidrolisar a sacarose e consumi-la como fonte de carbono. Além disso, é possível observar que a produção da enzima extracelular em 120 horas é cerca de 4 vezes maior quando comparada aos valores obtidos para a enzima intracelular no tempo de 48 horas. Assim o tempo de 120 horas foi escolhido como tempo padrão de cultivo para a produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo *A. thermomutatus*.

4.1.6 Influência da temperatura na produção da β-D-frutofuranosidase

Outro fator importante na produção enzimática é a temperatura do cultivo. Como pode ser observado na Figura 9, a maior produção de β-D-frutofuranosidase intracelular foi obtida na temperatura de 25°C (0,14 U/mL), seguida de redução em temperaturas superiores. Já para a forma extracelular, a maior produção foi obtida em 30°C, cerca de 7 vezes maior do que a observada para a forma intracelular. A maioria dos fungos é mesófila, apresentando temperatura ótima de crescimento de 20 a 30°C (TORTORA, CASE e FUNKE, 2012). No entanto, o fungo *A. thermomutatus*, é um

termotolerante, tendo seu melhor crescimento em temperaturas de 40-45°C (BENASSI et al., 2014). No entanto a melhor temperatura de crescimento pode não ser a melhor temperatura para a produção da enzima alvo, como Benassi e colaboradores (2014) que obtiveram a melhor produção de arabinase por *A. thermomutatus* na temperatura de 30°C, quando comparado a temperatura de 40°C, mesmo comportamento encontrado neste estudo para a produção da β-D-frutofuranosidase. Mussatto e colaboradores (2013) relataram que a maior produção da β-D-frutofuranosidase pelo fungo *A. japonicus* foi obtida quando utilizada a temperatura de 30°C. A temperatura de fermentação de 30°C foi também empregada para a máxima produção de invertase por *Saccharomyces cerevisiae* (BHALLA et al., 2017), *Aspergillus oryzae* e *Aureobasidium pullulans* (SANGEETHA, RAMESH e PRAPULA, 2004A).

Figura 9. Efeito da temperatura de cultivo na produção de β-D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo *A. thermomutatus* em meio Khanna com 1% (m/v) de sacarose,100 rpm por 120 horas.



Fonte: Autora.

4.1.7 Influência de diferentes concentrações de glicose e frutose na produção enzimática

Selecionadas as melhores condições de cultivo, foram adicionadas diferentes concentrações de glicose ou frutose ao cultivo, a fim de observar se a produção da β-D-frutofuranosidase seria alterada pela presença de um dos produtos da hidrólise da sacarose. Anteriormente já foi observado que a glicose, adicionada como fonte secundária de carbono ao cultivo, influenciou a produção β-D-frutofuranosidásica em fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (ALEGRE et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009).

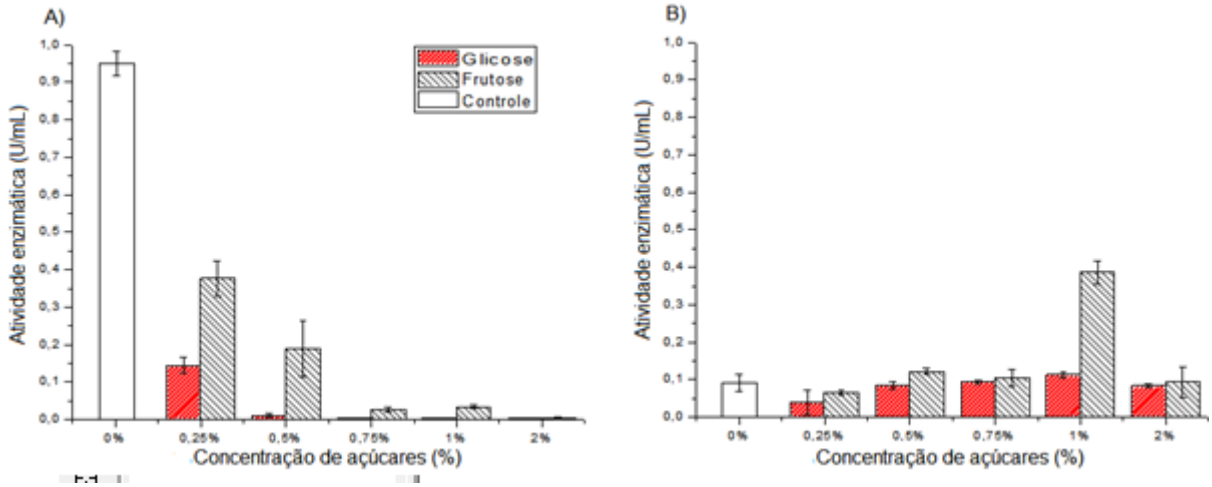
A influência da glicose na produção β-D-frutofuranosidásica pelo fungo *A. thermomutatus* pode ser observada na Figura 10. É possível verificar que conforme ocorre o aumento da concentração de glicose adicionada ao meio de cultivo, ocorre a diminuição da produção da enzima extracelular (Figura 10A), chegando a valores próximos a zero quando adicionado 2% (m/v) de glicose no meio de cultivo. Já para a produção da enzima intracelular (Figura 10B) ocorreu um pequeno aumento na produção conforme se aumenta a concentração do açúcar, sendo a melhor produção intracelular encontrada quando o meio foi adicionado de 1,0% (m/v) de glicose (0,11 U/mL). A glicose tem um papel importante na regulação da expressão de genes envolvidos em diferentes vias metabólicas, assim como na produção de enzimas para utilização de fontes de carbono alternativas e de transportadores de glicose, entre outros (ROLLAND, WINDERICKX e THEVELEIN, 2001). A glicose pode ser detectada por receptores ligados à membrana, o que gera sinais na célula para a modulação do gene e/ou das atividades enzimáticas ligadas a glicose, ocorrendo muitas vezes a repressão catabólica (KIG, TURKEL e TEMIZKAN, 2005). Sendo assim, conforme o aumento da concentração de glicose no meio de cultura, a expressão de genes que codificam enzimas para a utilização de fontes de carbono alternativas tais como a sacarose, podem ser reprimidos através destes mecanismos de controle (KIG, TURKEL e TEMIZKAN, 2005).

Os fungos do gênero *Aspergillus* possuem um regulador que para ou diminui a transcrição de genes que estão sujeitos a repressão catabólica pelas fontes de carbono (ALEGRE *et al*., 2009; VAINSTEIN e PEBERDY, 1991). Vainstein e Peberdy (1991) observaram que o aumento da concentração de glicose no meio de cultivo levava a queda da produção de invertase extracelular pelos fungos *A. niger* e *A.*

nidulans. Alegre e colaboradores (2009) também observaram o mesmo comportamento para a enzima extracelular do fungo *A. caespitosus* quando cultivado com diferentes concentrações de glicose.

Na Figura 10 pode ser observado também que, quando o meio foi suplementado com a frutose, a maior produção da enzima extracelular (Figura 10A) também foi encontrada no controle (sem adição da segunda fonte de carbono). No entanto é possível observar que a queda da produção é menos acentuada se comparada com a queda obtida com adição da glicose, indicando que a produção da enzima extracelular sofre menos repressão pela frutose do que pela glicose. Já para a forma intracelular (Figura 10B), a melhor produção ocorreu quando o cultivo foi suplementado com 1% (m/v) de frutose. O mesmo comportamento foi encontrado para o fungo *A. nidulans* com a maior produção da β-D-frutofuranosidase intracelular obtida na concentração de 1% (m/v) de frutose como fonte adicional de carbono (ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013).Glicose

Figura 10. Influência da concentração de glicose ou frutose na produção de β-D-frutofuranosidase extracelular (A) e intracelular (B) pelo fungo *A. thermomutatus* em meio Khanna com 10 (g/L) de sacarose, a 30°C,100 rpm por 120 horas



Fonte: Autora.

Além disso, a ausência de atividade enzimática extracelular e a presença de atividade intracelular em diferentes concentrações de glicose e frutose no meio, assim como obtido neste trabalho, foi também observada por outros autores. Alegre e colaboradores (2009) observaram este fenômeno para o fungo *A. caespitosus* e chegaram a duas possibilidades: i) A síntese de uma β-D-frutofuranosidase que não é regulada negativamente pela glicose e sim, a sua secreção que sofre inibição por este

açúcar; ou ii) A produção de duas isoformas da β-D-frutofuranosidase, sendo que a retida no interior da célula não sofre repressão catabólica pela glicose e a outra isoforma, secretada no meio de cultivo, é reprimida pelo açúcar. Alves, Jorge e Guimarães (2013), que observaram o mesmo comportamento para o fungo *A. nidulans*, chegaram à conclusão de que esses monossacarídeos estão relacionados com a regulação da secreção enzimática nas faixas de 0,5 a 1,0%, já que foi observado o aumento da produção enzimática intracelular e diminuição da extracelular.

Como a maior produção enzimática foi obtida para a forma extracelular e considerando-se as vantagens de se trabalhar com a enzima secretada, optou-se por continuar somente com a β-D-frutofuranosidase extracelular produzida pelo fungo *A. thermomutatus.*

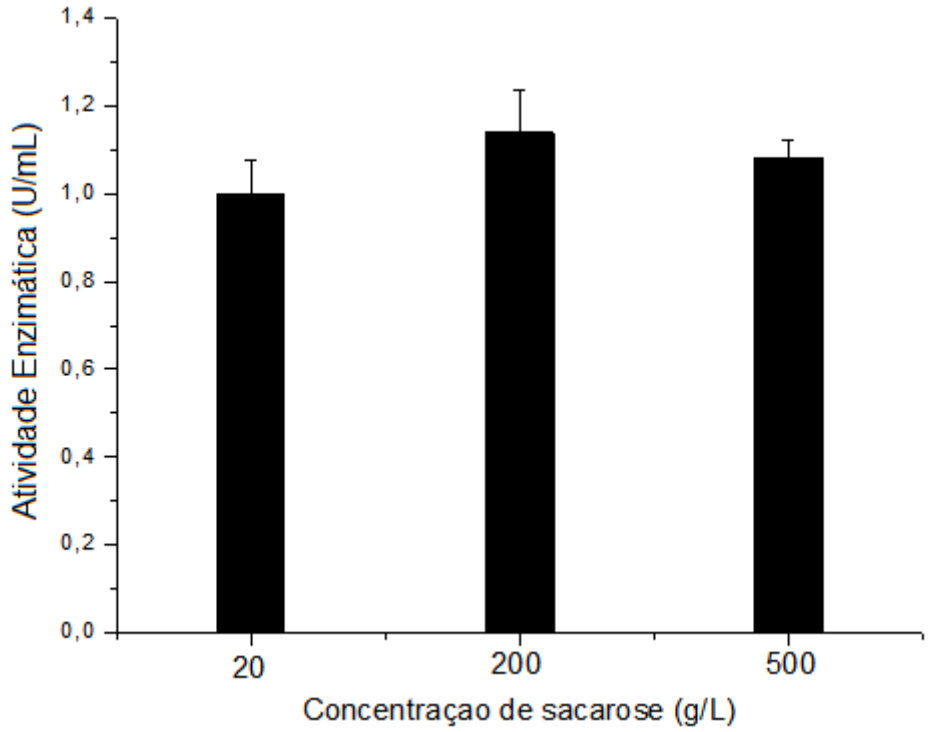
4.2 Caracterização da β-D-frutofuranosidase extracelular

4.2.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na atividade β-D-frutofuranosidásica

A produção de frutooligossacarídeos por β-D-frutofuranosidases fúngicas é descrita na literatura com o uso de sacarose em concentrações acima de 200 (g/L) (HIDAKA et al., 1988; SANGEETHA, RAMESH e PRAPULLA, 2004b). Desta forma a análise da atividade enzimática em diferentes concentrações de sacarose foi efetuada.

Como pode ser observado na Figura 11, não houve variações na atividade enzimática nas concentrações de sacarose empregadas, evidenciando que a enzima não sofreu inibição pelo substrato mesmo em alta concentração, habilitando-a para a investigação da produção de frutooligossacarídeos.

Figura 11. Influência da concentração de sacarose na atividade enzimática. Reação feita conforme descrito no item 3.5.



Fonte: Autora.

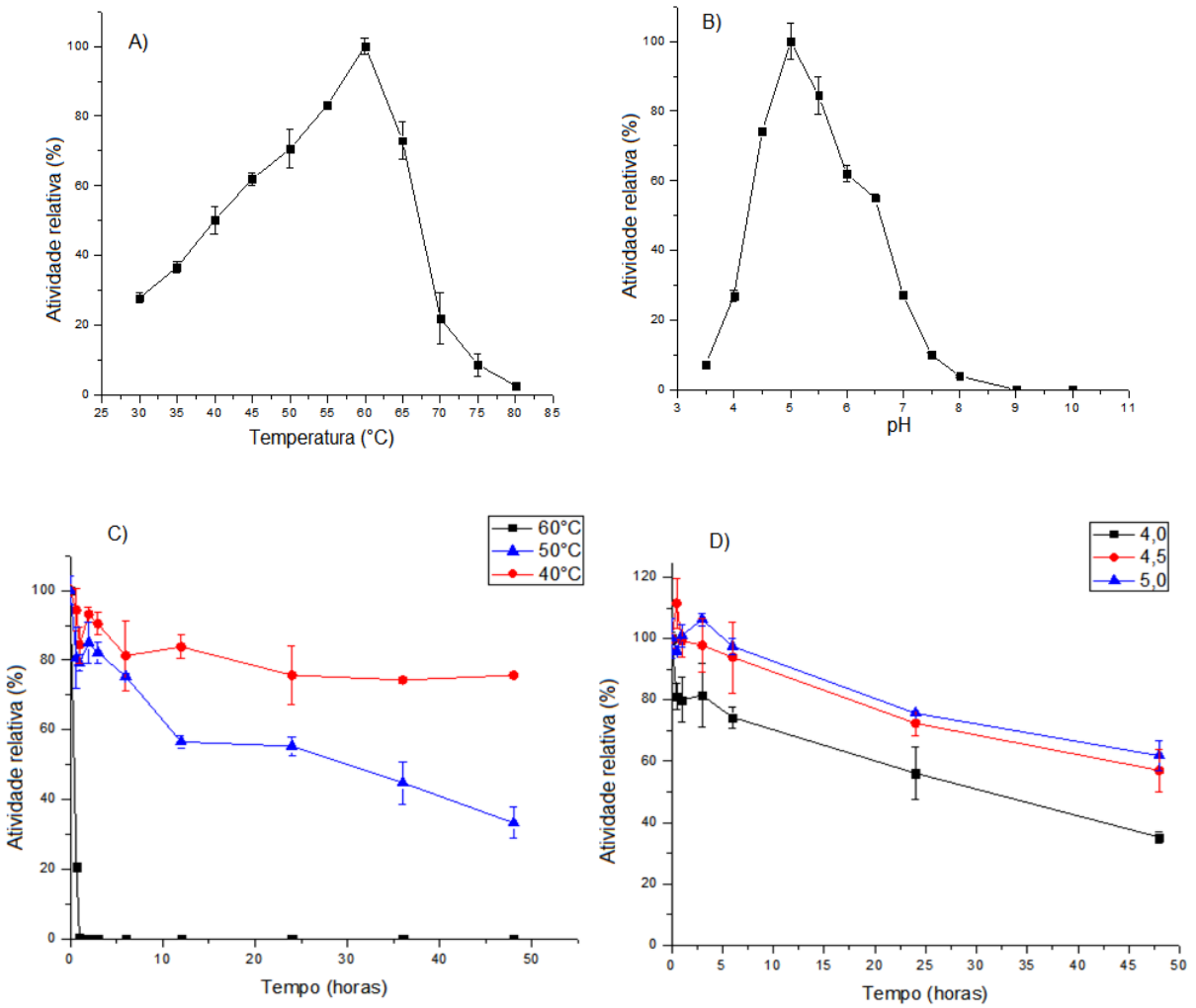
4.2.2 Influência da temperatura e do pH na atividade β-D-frutofuranosidásica

Na Figura 12 são apresentados temperatura e o pH ótimos aparentes de atividade, a termoestabilidade e a estabilidade ao pH da β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. thermomutatus*. A β-D-frutofuranosidase produzida por este fungo apresentou temperatura ótima de atividade de 60°C. Diversos autores estudando a atividade da β-D-frutofuranosidase de diferentes fungos filamentosos, também encontraram a temperatura de 60°C como ótima como, por exemplo, para as enzimas dos fungos *A. caespitosus* (ALEGRE et al., 2009), *A. niveus* (GUIMARÃES et al., 2009) e *A. phoenicis* (RUSTIGUEL; JORGE; GUIMARÃES, 2015). Já para *S. cerevisiae* SAA-612 a temperatura ótima encontrada para a atividade enzimática foi de 40°C (BHALLA et al., 2017).

O pH ótimo de reação da atividade da β-D-frutofuranosidase extracelular foi de 5,0, com redução da atividade em valores superiores de pH (Figura 12B). O mesmo valor de pH ótimo obtido nesse trabalho foi observado para a β-D-frutofuranosidase extracelular produzida por *A. caespitosus* em FSbm (Alegre et al., 2009). Rustiguel,

Jorge e Guimarães (2015) encontraram para a atividade invertásica do fungo filamentoso *A. phoenicis* o pH ótimo de 4,5, o mesmo encontrado por Guimarães e colaboradores (2009) para a enzima do fungo *A. niveus*.

Figura 12. Temperatura (A) e pH (B) ótimos aparentes, termoestabilidade (C) e estabilidade ao pH (D) da β-D-frutofuranosidase extracelular presente no extrato bruto do fungo *A. thermomutatus*. Em (A), 100% corresponde a 1,65 U/mL; Em (B), 100% corresponde a 1,78 U/mL; Em (C) e (D), 100% corresponde a 1,58 U/mL.



Fonte: Autora.

Em relação a estabilidade térmica, a β-D-frutofuranosidase apresentou em 50°C atividade de 30% após 48 horas de incubação, sendo o tempo de meia vida (T_{50}) próximo a 30 horas. Na temperatura de 40°C a enzima manteve 75% da atividade inicial com 48 horas de incubação. A estabilidade foi menor em 60°C, sendo a atividade reduzida a 20% com 40 minutos de incubação. Como a produção dos frutooligossacarídeos pode variar de algumas horas para mais de 96 horas

(DOMINGUEZ et al., 2014), é importante que a enzima permaneça estável em sua temperatura ótima de atuação, o que não foi observado para a β-D-frutofuranosidase extracelular presente no filtrado bruto produzido pelo fungo *A. thermomutatus*. Contudo a enzima é capaz de atuar em temperaturas mais amenas, nas quais observou-se boa estabilidade, mostrando potencial para uso na produção de FOS. Bhalla e colaboradores (2017) observaram a estabilidade térmica da β-D-frutofuranosidase produzida por *S. cerevisiae*, a qual apresentou tempo de meia vida de 65 horas a 30°C e de 30 minutos a 60°C. Já a β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. phoenicis* manteve 85% e 60% da sua atividade inicial após uma hora de incubação nas temperaturas de 50ºC e 60°C, respectivamente (RUSTIGUEL et al., 2015). Guimarães e colaboradores (2007) encontraram para a β-D-frutofuranosidase extracelular produzida pelo fungo *A. ochraceus*, tempo de meia vida de 60 minutos quando a enzima foi incubada a 60°C. Já a β-D-frutofuranosidase do fungo *A. nidulans*, se manteve estável por 60 minutos nas temperaturas de 40ºC e 50°C (ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013).

A estabilidade em diferentes valores de pH pode ser visualizada na Figura 11D. Observa-se que a β-D-frutofuranosidase manteve atividade de 62% quando mantida por 48 horas em pH 5,0, muito próximo do encontrado para o pH 4,5 (cerca de 57%). Já para o pH 4,0 a atividade residual após 48 horas de incubação foi de 35%. Analisando outros estudos, a β-D-frutofuranosidase produzida pelo fungo *A. niger* IMI 303386, apresentou atividade residual maior que 80% quando incubada nos valores de pH 4,0 a 6,0 por 5 horas (NGUYEN et al., 2004). Já a enzima extracelular produzida por *A. nidulans* foi estável no pH 3,0 e 7,0 a 10 por uma hora, divergindo da enzima extracelular produzida por *E. nidulans*, que foi estável na faixa de pH de 3,7 a 10,0 (ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013). O mesmo foi observado por Giraldo e colaboradores (2014) para a β-D-frutofuranosidase do fungo *A. terreus* quando mantida no intervalo de pH 3,0 a 10,0 por uma hora.

4.2.3 Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade enzimática

Algumas enzimas precisam de cofatores para alcançarem a sua atividade catalítica completa. Sendo assim, foi analisada a influência de diversos compostos na atividade enzimática da β-D-frutofuranosidase extracelular e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4. No presente estudo a enzima foi ativada quando

adicionado 1 mmol/L de $MnSO_4$ à reação (+ 88,07%), sendo seguida por KH_2PO_4 (+ 35,56%), NaF (+ 35,32%) e $FeSO_4.7H_2O$ (+ 35,44%). Na presença de $HgCl_2$ a atividade da enzima sofreu queda de quase 50%. Para os demais compostos não foram observadas alterações significativas na atividade.

Tabela 4. Efeito de diferentes sais na atividade β-D-frutofuranosidásica extracelular do fungo *A. thermomutatus* em FSbm.

Sais (1 mmol/L)	Atividade relativa (%)
Controle	100 ± 6,90
$AgNO_3$	72,67 ± 4,70
$BaCl_2$	112,23 ± 6,83
$CaCl_2$	126,01 ± 6,02
$CoCl_2$	121,72 ± 0,51
$CuCl_2$	122,79 ± 6,91
$CuSO_4.5H_2O$	102,63 ± 4,67
$FeCl_3$	130,85 ± 1,77
$FeSO_4.7H_2O$	135,44 ± 6,46
$HgCl_2$	55,13 ± 9,98
KCl	104,06 ± 13,85
KH_2PO_4	135,56 ± 5,37
KI	113,13 ± 2,70
$MgCl_2$	101,90 ± 3,25
$MgSO_4$	118,14 ± 6,80
$MnSO_4$	188,07 ± 4,15
NaBR	122,43 ± 12,12
NaF	135,32 ± 15,24
NaH_2PO_4	133,77 ± 8,17
$NaNO_3$	115,75 ± 4,02
NH_4Cl	129,95 ± 11,14
NH_4F	109,07 ± 7,45
NH_4NO_3	117,78 ± 6,97
$ZnSO_4$	81,03 ± 0,75

O fungo foi crescido em meio Khanna, contendo sacarose 1% (m/v) como fonte de carbono, a 30°C, por 120 horas a 100 rpm. Controle: 100% = 1,57 U/mL. Fonte: Autora.

Os cátions Hg^{2+}, Ag^{+}, Ca^{2+} e Cu^{2+} podem agir de maneira a inibir a atividade enzimática (KULSHRESTHA et al., 2013). A interação destes íons com a enzima pode modificar a sua conformação, fazendo com que ela perca a sua atividade catalítica.

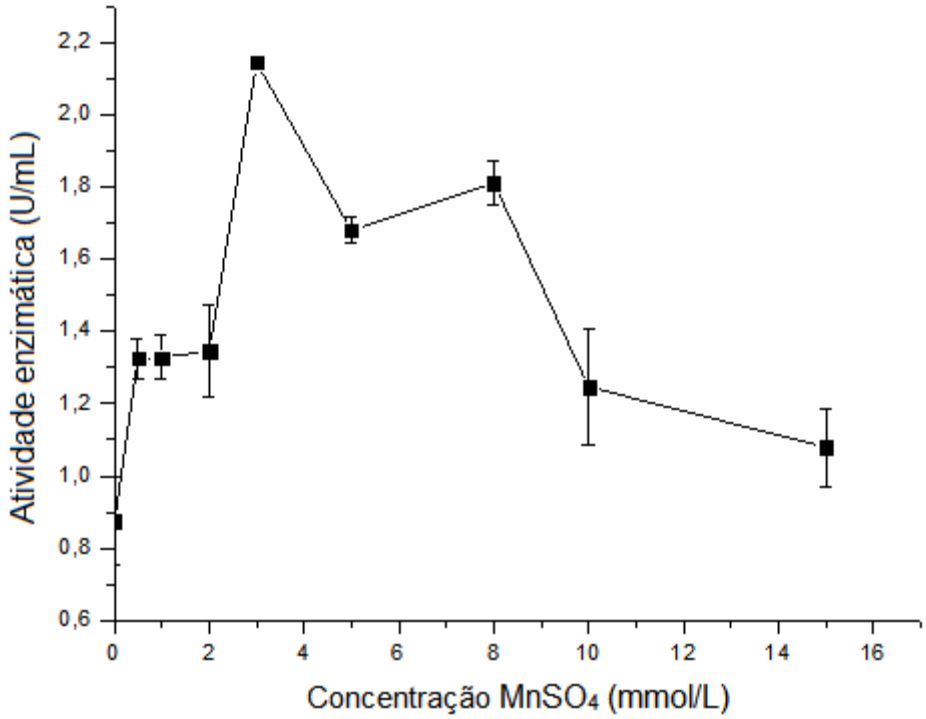
Outra possibilidade é a ligação ao sítio ativo da enzima, impedindo que haja a interação com o substrato. Os íons metálicos podem interagir com os resíduos de aminoácidos e induzir modificações na carga fazendo com que as atividades enzimáticas sejam ativadas ou inibidas; também podem interferir no pH da solução proteica de forma variada (KUNZ, 2006; ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013). Além disso, íons como Hg^{2+} e Ag^{2+} são amplamente conhecidos pela reatividade com grupos tiol das proteínas levando a modificações conformacionais que, além de afetarem a atividade enzimática, podem promover também a agregação e precipitação destas proteínas (GIRALDO et al., 2014). A inibição pelo íon Hg^{2+} pode sugerir que grupos tiol possivelmente participam da formação do sítio catalítico da β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. thermomutatus*. O mesmo comportamento foi observado para a enzima produzida pelo fungo *A. niveus* (GUIMARÃES et al., 2009).

As β-D-frutofuranosidases extracelulares dos fungos *E. nidulans* e *A. nidulans* foram ativadas na presença de $MnCl_2$. Por outro lado, o íon NH^{4+} inibiu drasticamente a atividade da enzima produzida por *E. nidulans*, enquanto que a enzima produzida por *A. nidulans* foi inibida pelos íons Hg^{2+} e Pb^{2+} (ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013). Giraldo e colaboradores (2014) também obtiveram a ativação da enzima com cátions divalentes como Mn^{2+} e Mg^{2+} para a invertase extracelular do fungo *A. terreus*. Quando a enzima foi adicionada do íon Hg^{2+}, houve a inibição da atividade. Os íons Mn^{2+} e Mg^{2+} também ativaram as β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. ochraceus* (GUIMARÃES et al., 2007). O sal que mais ativou a invertase intracelular do fungo *A. phoenicis* na concentração de 1 mmol/L foi o KCl (140,6%), seguido pelo $AgNO_3$ (118,7%). Já para a β-D-frutofuranosidase encontrada neste estudo, o $AgNO_3$ inibiu em 28% a atividade enzimática. Nguyen e colaboradores (2005) obtiveram para o fungo *A. niger* IMI303386 a maior atividade intracelular quando o íon Mg^{2+} estava presente (115%), já quando a reação foi adicionada dos íons Hg^{2+}, Zn^{2+}, Ag^{2+} e Ni^{2+} a atividade foi fortemente inibida.

Considerando que a maior ativação enzimática foi obtida com a adição de $MnSO_4$, a influência de diferentes concentrações deste sal sobre a atividade enzimática foi avaliada, como apresentado na Figura 13. Observa-se que a concentração de 3 mmol/L foi a que mais favoreceu a atividade enzimática (2,14 U/mL), cerca de 2,5 vezes maior que a obtida sem a adição do sal. Acima dessa concentração a atividade enzimática diminuiu. No entanto, até 15 mmol/L as

atividades ainda foram maiores que a obtida sem a adição de sal. Guimarães e colaboradores (2009) observaram o mesmo comportamento para a enzima intracelular do fungo *A. niveus*, a qual também não sofreu inibição em altas concentrações do íon Mn^{2+}. Já a β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. ochraceus* sofreu inibição quando em contato com 10 mmol/L dos íons Ba^{2+}, Cu^{2+}, NH^{4+} e Zn^{2+}, e uma leve ativação (10%) quando em contato com o íon Mn^{2+} (GUIMARÃES et al., 2007). Giraldo e colaboradores (2014) obtiveram a maior atividade da β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. terreus* quando adicionado 12,5 mmol/L de $MnCl_2$ na mistura de reação.

Figura 13. Influência de diferentes concentrações de $MnSO_4$ na atividade β-D-frutofuranosidásica.



Fonte: Autora

Outros compostos químicos que podem influenciar a atividade β-D-frutofuranosidásica são os quelantes, surfactantes, desnaturantes, solventes orgânicos e inibidores. Na presença do β-mercaptoetanol, acetonitrila, EDTA e ureia as atividades enzimáticas foram elevadas (Tabela 5). Os agentes surfactantes e os solventes orgânicos não alteraram a atividade enzimática.

A ação desnaturante da ureia ainda é controversa, mas acredita-se que é decorrente do aumento da solubilidade dos grupos apolares da proteína na solução

do desnaturante e da desestabilização das estruturas secundárias das enzimas (FONSECA et al., 2006; CAMILLONI et al., 2008). No entanto, para a β-D-frutofuranosidase produzida por *A. thermomutatus*, obteve-se um aumento de 14% na atividade na presença da ureia. Ao contrário do encontrado neste estudo, a enzima β-D-frutofuranosidase do fungo *A. niger* AS0023 sofreu inibição de 30% quando foram adicionados 500 mmol/L de ureia na reação (L'HOCINE et al., 2000).

O β-mercaptoetanol age reduzindo as pontes dissulfeto da proteína. Essa ação faz com que os resíduos de cisteínas que se ligaram desta maneira sejam separados, o que pode causar queda na atividade enzimática (RIUL et al., 2013). No entanto, a atividade da β-D-frutofuranosidase do fungo *A. thermomutatus* teve aumento de cerca de 50%. Isso pode indicar que, possivelmente, estas interações não fazem parte do sítio ativo da enzima, já que não houve inibição da atividade enzimática. Como houve um aumento na atividade enzimática, pode-se supor que estas ligações estão presentes fora do sítio ativo e que, ao serem reduzidas, facilitam o contato entre enzima e substrato. Em outros estudos o β-mercaptoetanol também favoreceu a atividade β-D-frutofuranosidásica das enzimas dos fungos *E. nidulans* (ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013) e *A. terreus* (GIRALDO et al., 2014).

O EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é um agente quelante, ou seja, ele é capaz de formar complexos estáveis com íons metálicos e pode acabar afetando negativamente a atividade catalítica de algumas enzimas. Porém, a enzima de *A. thermomutatus* não foi inibida por EDTA, o que demonstra que esta enzima não depende de um íon metálico divalente específico para sua atuação.

O surfactante aniônico (SDS) e os não-iônicos (Triton-X e Tween 20) podem induzir modificações estruturais na enzima e diminuir a sua capacidade catalítica. Já os solventes orgânicos atuam nas regiões hidrofóbicas internas das proteínas, fazendo com que estas interajam com outras proteínas, promovendo agregação e precipitação (RIUL et al., 2013). A β-D-frutofuranosidase de *A. thermomutatus* não foi inibida por estes compostos, já que a enzima manteve a sua atividade acima de 95% em todos os surfactantes analisados. A resistência da enzima aos detergentes e solventes é muito interessante para a sua aplicação industrial, principalmente os solventes, que oferecem várias vantagens nos processos enzimáticos industriais como, por exemplo, aumento da solubilidade de substratos não polares, aumento da estabilidade térmica das enzimas, diminuição das reações secundárias e eliminação de contaminações microbianas (CHHOKAR et al., 2010; RIUL et al., 2013).

Tabela 5. Efeitos de diferentes compostos químicos na atividade β-D-frutofuranosidásica extracelular do fungo *A. thermomutatus.*

Compostos	Atividade relativa (%)
Controle	100,0 ± 6,90
Acetona (1%)	103,82 ± 8,94
Acetonitrila (1%)	141,41 ± 3,54
Butanol (1%)	98,45 ± 3,53
EDTA (1 mmol/L)	112,53 ± 5,19
Etanol (1%)	97,73 ± 1,64
Isopropanol (1%)	95,58 ± 10,63
Metanol (1%)	100,72 ± 5,39
SDS (1 mmol/L)	102,75 ± 4,97
Triton X (0,01%)	109,43 ± 1,15
Tween 20 (0,01%)	105,97 ± 5,16
Ureia (1 mmol/L)	114,20 ± 3,79
β-Mercaptoetanol (1 mmol/L)	152,51 ± 2,35

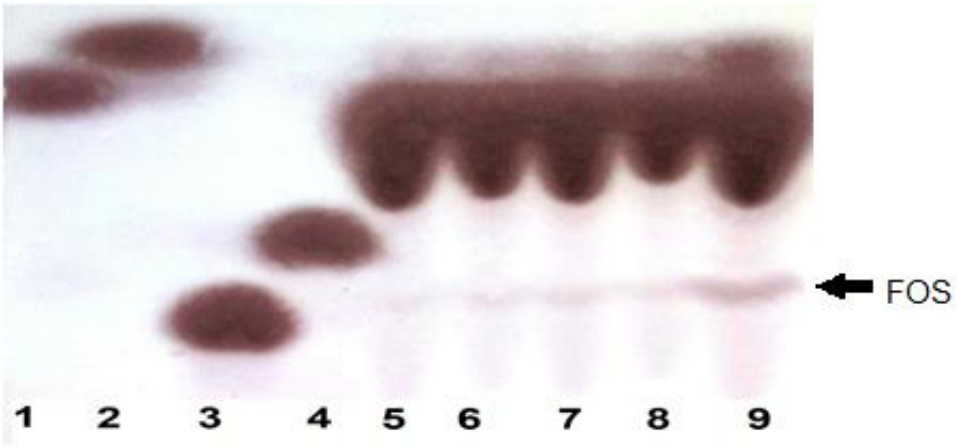
O fungo foi crescido em meio Khanna, contendo a sacarose (1%, m/v) como fonte de carbono, a 30°C, por 120 horas a 100 rpm. Controle: 100% = 1,57 U/mL. Fonte: Autora.

4.3 Análise da produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase produzida pelo fungo *A. thermomutatus.*

4.3.1 Análise qualitativa pela *Thyn Layer Chromatography* (TLC)

A TLC (do inglês, *Thin Layer Chromatography*) é uma forma de análise rápida e fácil para conseguir observar a formação de FOS pela ação da β-D-frutofuranosidase. Nota-se que a produção de FOS foi aumentando conforme o aumento do tempo de reação. Vários autores já descreveram diversos microrganismos produtores de β-D-frutofuranosidase com atividade de transfrutosilação (DOMINGUEZ et al., 2014; 2006; FERNÁNDEZ et al., 2004; MUSSATTO et al., 2013). Um exemplo é a β-D-frutofuranosidase do fungo *Fusarium graminearum*, que produziu os FOS 1-kestose e nistose utilizando a sacarose 20% (m/v) como substrato (GONÇALVES; JORGE e GUIMARÃES, 2015). Xie e colaboradores (2017) observaram que a produção dos frutooligossacarídeos por *Aspergillus tubingensis* aumentava paralelamente com o tempo de reação.

Figura 14. Perfil cromatográfico em *Thyn Layer Chromatography* (TLC) para os produtos obtidos pela ação da β-D-frutofuranosidase de *A. thermomutatus* em diferentes tempos de reação sobre sacarose 20% (m/v) como substrato. Sendo: (1) sacarose 1% (m/v), (2) frutose 1% (m/v), (3) Nistose 1% (m/v), (4) 1-Kestose 1% (m/v). Tempo de reação: (5) 2h, (6) 3h, (7) 5h, (8) 7h, e (9) 24 h. Temperatura da reação: 40°C.



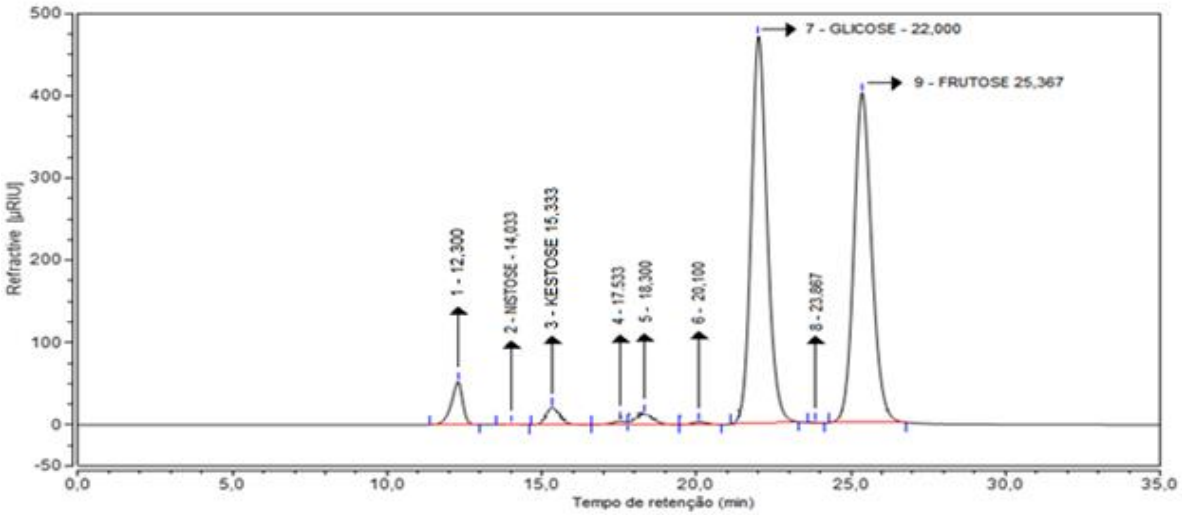
Fonte: Autora.

4.3.2 Análise quantitativa da produção de FOS por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Como foi possível observar a formação de frutooligossacarídeos de forma qualitativa na TLC, foi feita então, uma análise inicial em HPLC, de modo a confirmar a formação destes açúcares.

Na Figura 15 é apresentado o cromatograma para a produção de frutooligossacarídeos utilizando a β-D-frutofuranosidase do fungo filamentoso *A. thermomutatus* na presença da sacarose (200 g/L). Pode se observar a produção dos frutooligossacarídeos nistose e kestose (picos 2 e 3, respectivamente), em 48 horas de reação, totalizando 9,13 g de FOS/L dos quais 7,84 g/L correspondem a kestose e 1,29 g/L a nistose (Tabela 6). Observa-se também uma menor concentração de frutose se comparada à glicose, o que comprova a produção de FOS na reação, visto que são necessárias 2 ou 3 moléculas de frutose enquanto somente uma glicose terminal.

Figura 15. Perfil cromatográfico em High Perfomance Liquid Chromatography (HPLC) dos produtos obtidos pela ação da β-D-frutofuranosidase extracelular de *A. thermomutatus* contida no filtrado bruto sobre a sacarose. A reação foi conduzida a 40°C.



Fonte: autora.

Tabela 6. Concentração de sacarídeos obtidos a partir das reações de hidrólise e de transfrutosilação da sacarose conduzidas por em 48 horas, a 40°C.

Açúcares	Concentração (g/L)
Glicose	54,18
Frutose	47,40
1-Kestose	7,84
Nistose	1,29
Total	110,71

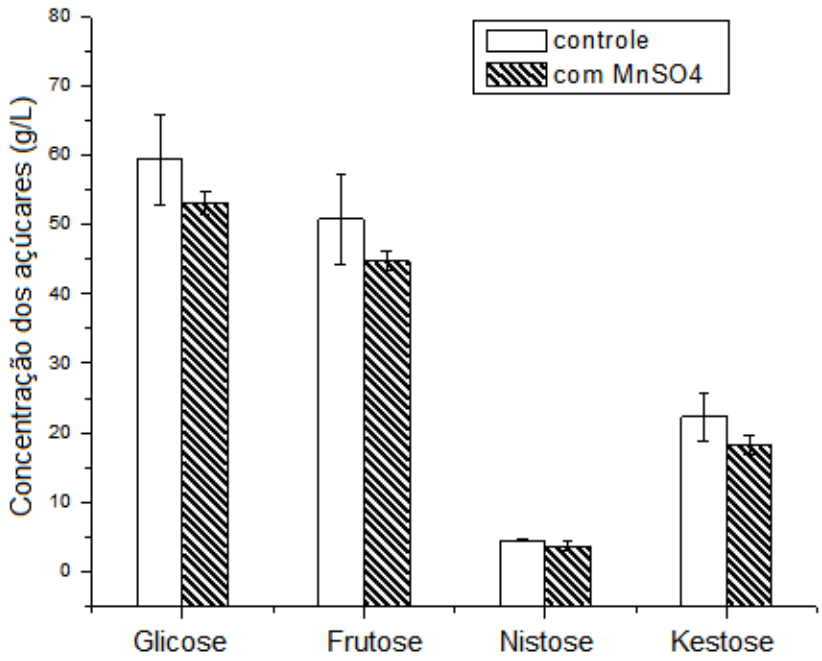
Fonte: Autora.

Para conseguir a máxima produção dos frutooligossacarídeos pela β-D-frutofuranosidase do fungo *A. thermomutatus*, é importante considerar a influência de diferentes fatores , como a temperatura e o tempo de reação, e a concentração de sacarose como substrato (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005; DOMINGUEZ et al., 2014).

4.3.2.1 Produção de FOS utilizando $MnSO_4$ na reação

Como apresentado anteriormente, a atividade hidrolítica da β-D-frutofuranosidase do fungo *A. thermomutatus* foi ativada na presença de $MnSO_4$. Sendo assim, avaliou-se também a influência de $MnSO_4$ na produção de FOS (Figura 16). Ao contrário do observado para a atividade hidrolítica, a produção de FOS não foi afetada com a adição do sal. O efeito de diferentes íons também foi observado por Hernalsteens e Maugeri (2010) na atividade hidrolítica e transfrutosilativa da β-D-frutofuranosidase de *Candida* sp., onde a enzima sofreu inibição da atividade de transfrutosilação quando adicionado de todos os íons testados, destacando os íons Cu^{2+} e Mn^{2+}.

Figura 16. Concentração de sacarídeos obtidos na reação de produção de FOS com adição de 3 mmol/L de $MnSO_4$ em 48 horas de reação a 60°C. Reação: substrato sacarose (200 g/L). Controle: sem adição de $MnSO_4$.

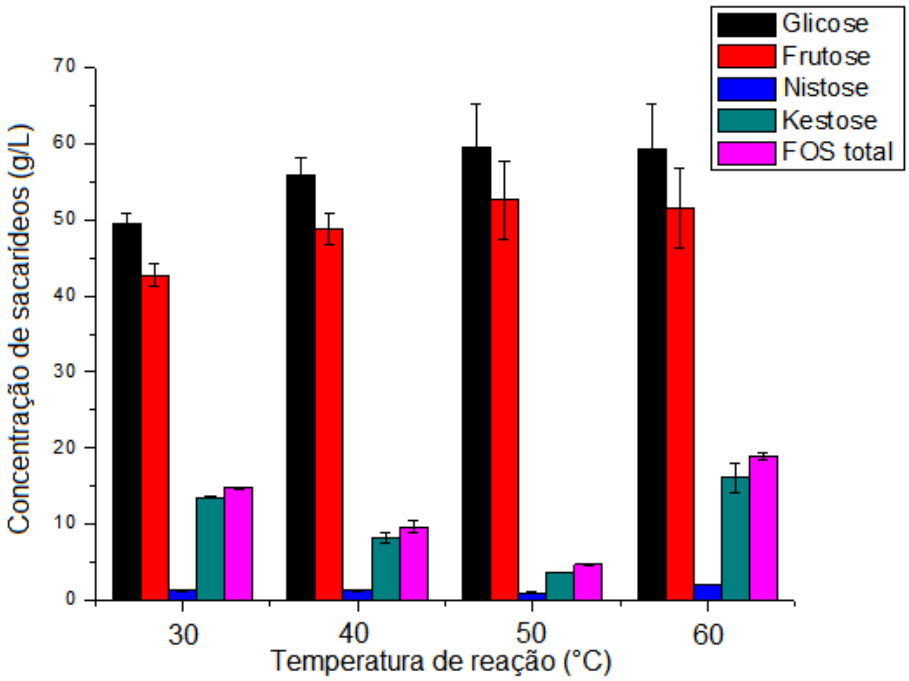


Fonte: Autora.

4.3.2.2 Produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *Aspergillus thermomutatus* em função da temperatura de reação

Como visto, a temperatura de reação é um fator importante na atividade hidrolítica da enzima. Desta forma, também foi analisada a influência da temperatura na atividade de transfrutosilação visando a maior produção de FOS. Como pode ser observado na Figura 17, a formação dos produtos da hidrólise da sacarose (glicose e frutose) tem um pequeno aumento da temperatura de 30ºC para 50°C, aproximadamente, 10 (g/L) de cada monossacarídeo. Na temperatura de 60°C não se observa grande diferença na obtenção destes açúcares. Quando observado a formação da nistose (GF_3), a maior concentração foi obtida com a reação a 60°C (2,02 g/L), cerca de 1,5 vez maior que a concentração encontrada quando a reação foi conduzida nas temperaturas de 30 a 50°C (1,2 g/L). Já a concentração de kestose (GF_2), as temperaturas de reação 30 e 60°C foram as que mais favoreceram a produção deste sacarídeo, sendo, 13,46 g/L e 16,15 g/L, respectivamente. A concentração máxima de FOS foi observada na temperatura de 60°C (18,17 g/L). Yoshikawa e colaboradores (2008) obtiveram uma alta produção de FOS na temperatura de 30°C quando utilizada a β-D-frutofuranosidase de *Aureobasidium pullulans*. A maior produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi obtida na temperatura de reação de 70°C (LINDE et al., 2012).

Figura 17. Influência da temperatura de reação na produção de FOS pela enzima β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. thermomutatus*. Reação: 200 g/L de sacarose por 48 horas.



Fonte: Autora.

Outro fato curioso encontrado neste estudo foi a maior produção de FOS nas temperaturas de 30ºC e 60°C, enquanto que nas temperaturas intermediárias a produção foi menor. Uma possibilidade que pode explicar esse comportamento de produção, seria a produção de duas β-D-frutofuranosidases, uma atuando melhor a 30°C e outra a 60°C, considerando ainda que foi utilizado o filtrado bruto. Outros estudos já mostraram a produção de duas β-D-frutofuranosidases quando os fungos *Aspergillus niger* (WALLIS; HEMMING e PEBERDY, 1997) e *Aspergillus oryzae* KB (KURAKAKE et al., 2008;2010) foram cultivados em meios contendo a sacarose como fonte de carbono.

Considerando ainda a influência da temperatura na produção de FOS, as taxas de transferência (T_t), de hidrólise (T_h) e a atividade de transfrutosilação (U_T) foram calculadas (Tabela 7) como descrito no item 3.5. Quando analisada a atividade de transfrutosilação (U_T), a maior atividade foi obtida na temperatura de 60°C (0,015 U/mL), enquanto as demais temperaturas foram obtidas atividades iguais (0,013 U/mL). Na literatura foi encontrada, para a β-D-frutofuranosidase do fungo *A. japonicus*, a maior atividade de transfrutosilação na temperatura de 55 a 65°C (CHEN e LIU, 1996). Fernández e colaboradores (2004) também obtiveram a maior atividade

de transfrutosilação na temperatura de 60°C para a β-D-frutofuranosidase do fungo *Aspergillus* sp. 27H.

A taxa de transferência é definida como a quantidade de frutose transferida sobre a quantidade de glicose liberada (FUJITA et al., 1990; KURAKAKE et al., 2008). Quanto maior a taxa de transferência obtida, maior a quantidade de frutose transferida e consequentemente, maior a produção de FOS por essa enzima. A taxa de hidrólise é complementar a T_t, ou seja, quanto maior a taxa de transfrutosilação menor a taxa de hidrólise. Observando os valore de T_t, observa-se que as maiores taxas obtidas foram nas temperaturas de 30ºC e 60°C sendo, respectivamente, 13,58% e 13,15%. Kurakake e colaboradores (2010) observaram para o fungo *Aspergillus oryzae* KB duas β-D-frutofuranosidases, sendo a F1 uma enzima com alto poder de transfrutosilação (cerca de 85% de T_t) e F2 com baixo poder de transfrutosilação e alto poder de hidrólise (T_t = 20% e T_h = 80%).

Além disso, foi observado a porcentagem de sacarose convertida, sendo calculada pela soma dos produtos obtidos (glicose + frutose + FOS) pela concentração inicial de sacarose utilizada na reação. A maior conversão da sacarose foi obtida na temperatura de 60°C, onde 62,5% da sacarose inicial foi convertida nos produtos. Linde e colaboradores (2012) obtiveram a conversão de 58% (m/m) da sacarose ao utilizar a β-D-frutofuranosidase da levedura *X. dendrorhous* na temperatura de 60°C e 420 g/L de sacarose.

Tabela 7. Conversão da sacarose (%, m/m), atividade de transfrutosilação (U_T), taxa de transferência (T_t) e de hidrólise (T_h) para a β-D-frutofuranosidase do fungo *A. thermomutatus* diferentes temperaturas de reação.

	Temperatura (°C)			
	30	**40**	**50**	**60**
Conversão da sacarose (%)	53,44	57,17	58,33	62,5
U_T (U/mL)	0,013*	0,013*	0,013*	0,015*
T_t (%)	13,58	12,54	11,52	13,15
T_h (%)	86,42	87,46	88,48	86,85

Reação conduzida com 200 g/L de sacarose por 48 horas. U_T: atividade de transfrutosilação; T_t: Taxa de transferência; T_h: Taxa de hidrólise. * valores de desvio muito baixo

Para a análise do efeito do tempo de reação na produção de FOS foram selecionadas as temperaturas de 30ºC e 60°C, nas quais foram obtidas as maiores produções destes açúcares.

4.3.2.3 Produção de FOS em função do tempo de reação nas temperaturas de 30°C e 60°C

Outro fator importante para a produção de FOS é o tempo de reação, que pode variar de poucas horas para mais de dias (DOMINGUEZ et al., 2014). Logo, analisou-se a produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. thermomutatus* em função do tempo de reação para as temperaturas de 30ºC e 60°C (Figura 18). Para a temperatura de 30°C a maiores concentrações de FOS foram obtidas nos tempos de 48 e 72 horas de reação, sendo o tempo de 48 horas o melhor para a produção de kestose (14,13 g/L). No entanto, ao ser avaliada a produção de nistose, tem se que a melhor produção (5,67 g/L) foi obtida em 72 horas de reação. Já quando a reação foi conduzida na temperatura de 60°C por 72 horas, houve a maior produção destes sacarídeos (FOS total = 30,02 g/L), sendo, 6,62 g/L de nistose e 23,40 de kestose. A produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase de *A. thermomutatus* obtida na temperatura de 60°C no melhor tempo (72 horas) foi cerca de 1,7 vezes maior que a melhor produção alcançada na temperatura de 30°C. Linde e colaboradores (2012) analisaram a produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase extracelular da levedura *X. dendrorhous* em diferentes períodos (0 – 120 horas), e observaram que na temperatura de 60°C, a maior produção foi obtida nos tempos de 2 a 3 horas (cerca de 127 g/L de FOS). Em tempos superiores a concentração dos açúcares foi diminuindo. A frutosiltransferase extracelular do fungo *A. oryzae* produziu a máxima concentração de FOS em 12 horas de reação com a utilização de 55% de sacarose como substrato. Foi também observado que, após esse tempo, ocorria queda da concentração de FOS (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2004a).

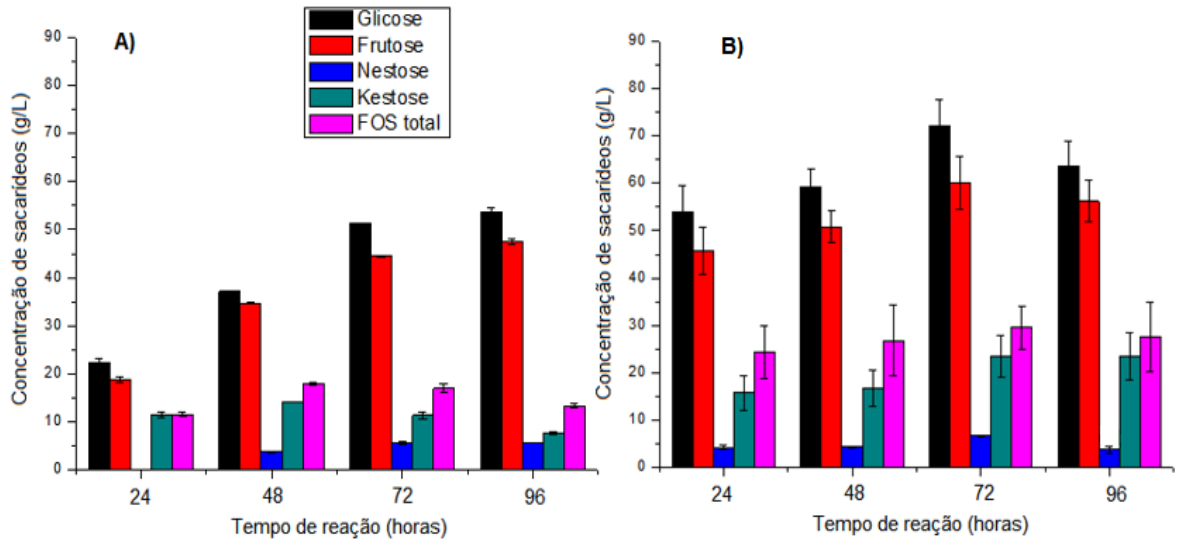
Observa-se também, neste estudo, que na temperatura de 30°C a concentração de kestose diminuiu, enquanto aumentou a concentração de nistose com o passar do tempo. Tal fato pode ser explicado pela utilização não somente da sacarose, mas também da kestose como doadora do grupamento frutosil para uma outra molécula de kestose produzindo a nistose (SANTOS, 1998; LEE, CHIANG e TSAI, 1999). O mesmo comportamento foi encontrado por Sangeetha, Ramesh e Prapulla (2004a) onde, após 12 horas de reação, o consumo da sacarose pareceu parar e a concentração de kestose diminuiu gradativamente, sendo acompanhada pelo aumento das concentrações de nistose e de frutofuranosilnistose. Também foi observada a redução

da produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase de *Schwanniomyces occidentalis* após o tempo ótimo de 24 horas (ÁLVARO-BENITO et al., 2007).

A maior atividade transfrutosilativa foi observada nas primeiras 24 horas (Tabela 8) para as duas temperaturas analisadas, sendo 0,014 U/mL e 0,032 U/mL para 30ºC e 60°C, respectivamente, reduzindo nos demais períodos. O mesmo foi observado por Hidaka e colaboradores (1988) para a atividade de transfrutosilação da enzima do fungo *Aspergillus awamori* (K6611 7004). Linde e colaboradores (2012) observaram a maior atividade transfrutosilativa na temperatura de 70°C para a β-D-frutofuranosidase extracelular da levedura *X. dendrorhous*. No entanto, com o uso da enzima de *A. thermomutatus*, a maior conversão da sacarose foi observada na temperatura de 60°C com o tempo de 72 horas, em que aproximadamente 81% da sacarose inicial foi convertida, sendo que, somente 15% correspondiam aos FOS. Álvaro-Benito e colaboradores (2007) obtiveram no tempo de 24 horas a máxima conversão de sacarose (aproximadamente 68%) sendo apenas 16,9% dessa concentração correspondente aos frutooligossacarídeos.

Como a maior produção de FOS e a maior conversão da sacarose foi obtida no tempo de 72 horas de reação a 60°C pela β-D-frutofuranosidase de *A. thermomutatus*, estes parâmetros foram selecionados para continuidade do estudo.

Figura 18. Influência do tempo na produção dos FOS pela enzima β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. thermomutatus* nas temperaturas de 30°C (A) e 60°C (B). Reação: 200 g/L de sacarose.



Fonte: Autora

Tabela 8. Conversão da sacarose (%, m/m), atividade de transfrutosilação (U_T), taxa de transferência (T_t) e de hidrólise (T_h) pela ação da β-D-frutofuranosidase de *A. thermomutatus* em diferentes tempos de reação nas temperaturas de 30ºC e 60°C.

Tempo (horas)	**24**		**48**		**72**		**96**	
Temperatura (°C)	**30**	**60**	**30**	**60**	**30**	**60**	**30**	**60**
Conv. sac.* (%) (m/m)	26,34	62,03	44,84	68,51	56,35	80,88	57,28	75,91
U_T (U/mL)	0,014	0,032	0,005	0,017	0,009	0,015	0,006	0,007
T_t (%)	16,17	17,46	6,49	14,57	13,41	16,62	11,54	11,74
T_h (%)	83,83	82,54	93,51	85,43	86,59	83,38	88,46	88,26

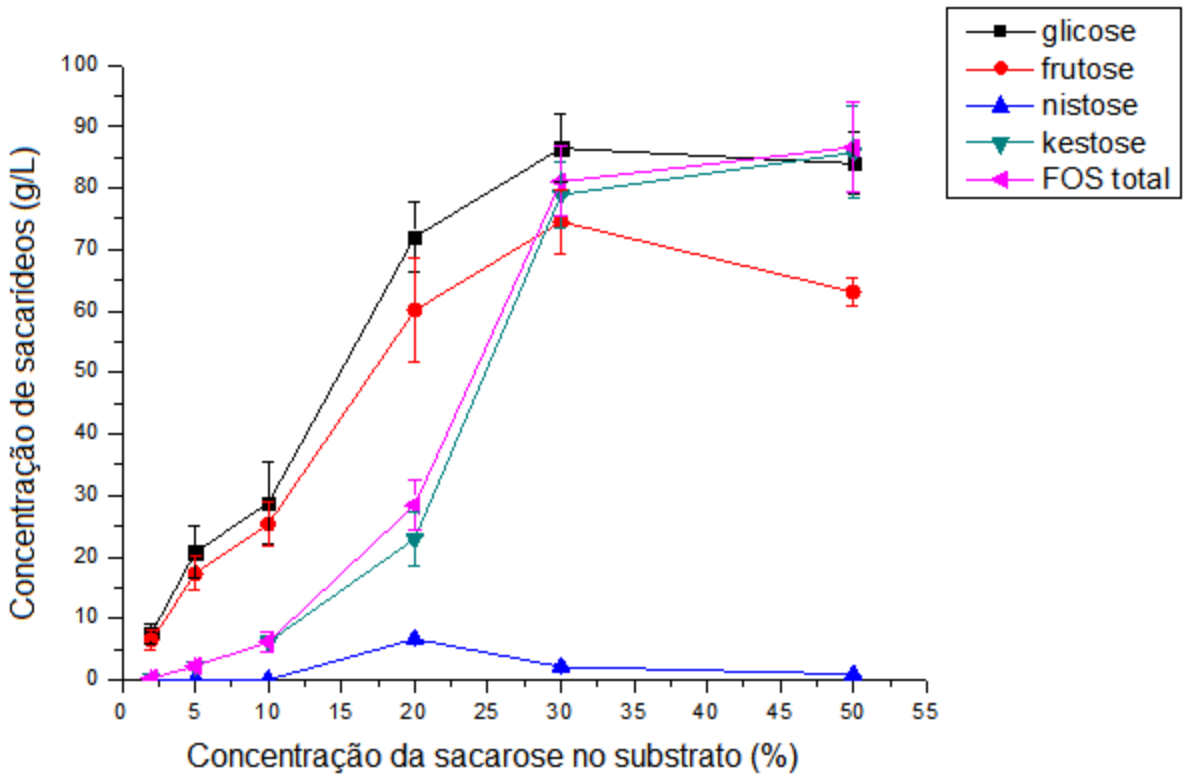
Fonte: Autora. Reação: 200 g/L de sacarose.

4.3.2.4 Influência da concentração de sacarose na reação de produção de FOS

Altas concentrações iniciais de substrato são necessárias para que a β-D-frutofuranosidase catalise a reação de transfrutosilação de modo eficiente. Além disso, industrialmente a sacarose é o principal substrato utilizado para a produção de FOS (LINDE et al., 2012; DOMINGUEZ et al., 2014).

Ao ser analisada a influência da concentração de sacarose na reação (Figura 19), foi observado que o aumento da concentração deste substrato leva ao aumento da produção de glicose, frutose e FOS. A máxima produção de FOS (86,67 g de FOS/L) foi atingida na concentração de 50% (m/v), sendo apenas cerca de 1 g correspondente a nistose. É interessante observar que há uma acentuada queda da frutose quando ocorre o aumento da concentração inicial de 30 para 50% de sacarose, com correspondente aumento da kestose um pouco menos acentuado, indicando a utilização da frutose para produção de FOS. Já maior produção de nistose foi obtida na concentração inicial de 20% de sacarose (6,62 g/L). Linde e colaboradores (2012), utilizando a β-D-frutofuranosidase extracelular da levedura *X. dendrorhous* em diferentes concentrações de sacarose (420, 600 e 700 g/L), obtiveram a maior produção de FOS, quando a concentração de 600 g/L foi utilizada. Já Sangeetha, Ramesh e Prapulla (2004a) obtiveram a melhor produção de FOS na concentração de 55% de sacarose para a enzima do fungo *A. oryzae* e de 80% de sacarose para a de *Aureobasidium pullulans*.

Figura 19. Produção de FOS pela β-D-frutofuranosidase extracelular do fungo *A. thermomutatus* em função da concentração de sacarose. Reação: 60°C por 72 horas.



Fonte: Autora.

Na Tabela 9, é possível observar que a maior conversão da sacarose foi obtida nas concentrações de 20 e 30%. Mesmo a maior produção dos FOS sendo obtida na concentração de 50%, a conversão da sacarose foi menor que as demais, visto que foi utilizado uma concentração inicial alta (500 g/L), o que fez com que a relação da concentração dos produtos pelo açúcar inicial caísse. Já a maior taxa de transferência da frutose e a maior atividade de transfrutosilação foram obtidas na concentração de 50% de sacarose inicial sendo, respectivamente, 24,88% e 0,03 U/mL. É importante notar que a atividade transfrutosilativa vai aumentando conforme o aumento da concentração inicial da sacarose, um fenômeno comum para as β-D-frutofuranosidases que possuem baixa atividade transfrutosilativa (podendo ser até nula) em baixas concentrações de sacarose. Quando se aumenta a concentração de sacarose no meio reacional, a enzima tende a aumentar a sua atividade de transfrutosilação (KULSHRESTHA et al., 2013; DOMINGUEZ et al., 2014).

Tabela 9. Conversão da sacarose (%, m/m), atividade de transfrutosilação (U_T), taxa de transferência (T_t) e de hidrólise (T_h) para a β-D-frutofuranosidase de *A. thermomutatus* em diferentes concentrações de sacarose no substrato.

	Concentração sacarose (%)					
	2	**5**	**10**	**20**	**30**	**50**
Conversão da sacarose (%)	70,84	80,61	60,27	80,92	80,73	46,82
U_T (U/mL)	0,001	0,004	0,004	0,02	0,02	0,03
T_t (%)	13,73	16,77	11,88	16,62	13,83	24,88
T_h (%)	86,27	83,23	88,12	83,38	86,17	75,12

Fonte: Autora. Reação: a 60°C por 72 horas.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial da β-D-frutofuranosidase produzida pelo fungo filamentoso *A. thermomutatus* para a produção de FOS.

5 CONCLUSÕES

O fungo *A. thermomutatus* foi um bom produtor de β-D-frutofuranosidase extracelular em Fermentação Submersa (FSbm), utilizando sacarose como fonte de carbono. Após a padronização das melhores condições de cultivo, a produção enzimática foi aumentada 5 vezes se comparado com a produção inicial obtida.

A β-D-frutofuranosidase extracelular produzida por FSbm encontrada no filtrado bruto apresentou elevada temperatura de atividade hidrolítica, que corresponde também a melhor temperatura para a produção de FOS. Além disso, foi estável na temperatura de 40°C e nos pH testados. A enzima exibiu maior atividade hidrolítica presença de Mn^{+2}. No entanto, não houve aumento da produção de FOS quando esse íon foi adicionado à reação. Após a caracterização do extrato bruto a atividade enzimática obtida foi 11 vezes maior que a encontrada no início do estudo.

A β-D-frutofuranosidase de *A. thermomutatus* foi capaz de realizar a transfrutosilação, obtendo os FOS kestose e nistose, principalmente em concentrações de sacarose mais elevadas, com consequente aumento da concentração destes FOS. Além disso, foi observado uma possível produção de duas β-D-frutofuranosidases com atividade transfrutosilativa em temperaturas diferentes. Considerando os resultados obtidos, este trabalho gerou conhecimentos sobre a produção de β-D-frutofuranosidase pelo fungo filamentoso *A. thermomutatus*, que apresentou potencial biotecnológico para a produção e aplicação desta enzima na indústria, destacando-se o uso para a produção de FOS.

REFERÊNCIAS

ADAMS, P. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor, Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathologia**, v. 112, n. 1, p. 35-37, 1990.

ALEGRE, A. C. P.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENZI, 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.

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

ALVES, J. N. O.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of invertases by anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and teleomorphic (*Emericela nidulans*) fungi under submerged fermentation using rye flour as carbon source. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 421–429, 2013.

AZIANI, G.; TERENZI, 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, p. 40-45, 2012.

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

BENASSI, V. M.; LUCAS, R. C.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of thermotolerant and thermophilic fungi aiming β-xylosidase and arabinanase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1459-1467, 2014.

BHALLA, T. C.; BANSULI; THAKUR, N.; SAVITRI; THAKUR, N. Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: production, characterization and application in synthesis of fructooligosaccharides. **Food Science and Technology**, v. 77, p. 178-185, 2017.

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, v. 1, cap. 5, p. 95-120, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BURIGO, T.; FAGUNDES, R. L. M.; TRINDADE, E. B. S. M.; VASCONCELOS, H. C. F. F. Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista de Nutrição**, vol.20, n.5, p.491-497, 2007.

CAMILLONI, C.; ROCCO, A. G.; EBERINI, I.; GIANAZZA, E.; BROGLIA, R. A.; TIANA, G. Urea and guanidinium chloride denature protein L in different ways in molecular dynamics simulations. **Biophysical Journal**, v. 94, p. 4654-4661, 2008.

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

CHHOKAR, V.; SANGWAN, M.; BENIWAL, V.; NEHRA, K.; NEHRA, K. S. Effect of additives on the activity of tannase from *Aspergillus awamori* MTCC9299. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2256–2264, 2010.

CLYDESDALE, F. Functional foods: opportunities & challenges. **Food Technology**, v. 58, p. 35–40, 2004.

DE PRETER, V.; HAMER, H. M.; WINDEY, K.; VERBEKE, K. The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: does it affect human health? **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 46–57, 2011.

DOMINGUEZ, A. L.; RODRIGUES, L. R.; LIMA, N. M.; TEIXEIRA, J. A. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 324-337, 2014.

DOMINGUEZ, A.; SANTOS, I. M.; TEIXEIRA, J. A.; LIMA, N. New and simple plate test for screening relative transfrustosylation activity of fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, p.189–191, 2006.

DRIOUCG, H.; ROTCH, A.; DERSCH, P.; WITTMANN, C. Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. **Biotechnological Products and Process Engineering**, v. 87, p. 2011-2024, 2010.

FERNANDES, M. L. P.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of an extracellular β- -fructofuranosidase produced by during solid-state fermentation (SSF) of cassava husk. **Journal of Food Biochemistry**, v. 1, p. 1-10, 2017.

FERNÁNDEZ, R. C.; MARESMA, B. G.; JUÁREZ, A.; MARTÍNEZ, J. Production of fructooligosaccharides by β-fructofuranosidase from *Aspergillus* sp. 24H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 268-272, 2004.

FLORES-MALTOS, D. A.; MUSSATTO, S. I.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; TEIXEIRA, J. A.; AGUILAR, C. N. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 259-267, 2014.

FONSECA, L. C.; RESENDE CORRÊA, N. C.; GARROTE-fILHO, M. D. S.; DA CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Quimica Nova**, v. 29, n. 3, p. 543–

548, 2006.

FUJITA, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; KITAHATA, S. Transfructosylation catalyzed by β-fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 10, p. 2655–2661, 1990.

GALAGAN, J. E.; HENN, M. R.; MA, L.-J.; CUOMO, C. A.; BIRREN, B. Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. **Genome Research**, v. 15, n. 12, p. 1620-1631, 2005.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259–275, 2004.

GIRALDO, M. A.; SILVA, T. M. da.; SALVATO, F.; TERENZI, 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, n. 2, p. 463-472, 2012.

GIRALDO, M. A.; GONÇALVES, H. B.; FURRIEL, R. P. M.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of the co-purified invertase and β-glucosidase of a multifunctional extract from *Aspergillus terreus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 1501–1510, 2014.

GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R. F.; GUIMARAES, L. H. S. Extracellular β-fructofuranosidase from *Fusarium graminearum*: stability of the spray-dried enzyme in the presence of different carbohydrates. **Journal of Microencapsulation**, v. 1, p. 1-8, 2013.

GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Immobilization of *Fusarium graminearum* β-D-fructofuranosidase using alternative cellulosic supports: stabilization and production of fructooligosaccharides. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, p. 1429-1435, 2015.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOMERA, A. F.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T; JORGE, J. A. Production of β-fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 237-241, 2009.

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

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

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Partial purification and characterization of extracellular fructofuranosidase with transfructosylating activity from *Candida* sp. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 568-576 2010.

HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A Fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1181-1187, 1988.

HOFFMEISTER, D.; KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 393-416, 2007.

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.

KIG, C.; TURKEL, S.; TEMIZKAN, G. Isolation and characterization of glucose derepressed invertase mutants from *Schizosaccharomyces pombe*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2475-2478, 2005.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, v. 48, n. 2, p. 71-80, 2007.

KULSHRESTHA, S.; TYAGI, P.; SINDHI, V.; YADAVILLI, K. S. Invertase and its applications – A brief review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 792–797, 2013.

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.; MASUMOTO, R.; MAGUMA, K.; KAMATA, A.; SAITO, E.; UKITA, N.; KOMAKI, T. Production of fructooligosaccharides by beta-fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 488–492, 2010.

KURAKAKE, M.; OGAWA, K.; SUGIE, M.; TAKEMURA, A.; SUGIURA, K.; KOMAKI, T. Two types of beta-fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 591–6, 2008.

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, n. 1, p. 73–84, 2000.

LEE, W. C.; CHIANG, C. J.; TSAI, P. Y. Kinetic modeling of fructo-oligosaccharide production catalyzed by immobilized β-fructofuranosidase. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 7, p. 2564-2570, 1999.

LINDE, D.; RODRÍGUEZ-COLINAS, B.; ESTÉVEZ, M.; POVEDA, A.; PLOU, F. J.; FERNÁNDEZ LOBATO, M. Analysis of neofructooligosaccharides production mediated by the extracellular β-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces*

dendrorhous. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 123–130, 2012.

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

LUCCA, A. L.; JORGE, A. J.; GUIMARÃES, L. H. S. Extracellular β-D-fructofuranosidase from *Aspergillus parasiticus*: optimization of the production under submerged fermentation and biochemical characterization. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 38, p. 5678-5687, 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. São Paulo: Artmed. 2016. Cap. 17, p. 555-561.

MAIORANO, A. E.; PICCOLI, R. M.; SILVA, E. S.; FILOMENA, M.; RODRIGUES, A. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1867-1877, 2008.

MENRAD, K. Market and marketing of functional foods in Europe. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 181–188, 2003.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi — progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 177-185, 2008.

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

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333-369, 1913.

MUSSATTO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S.; MALTOS, D. A. F.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Maximization of fructooligosaccharides and β-fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* under solid-state fermentation conditions. **Food and Bioprocess Technology,** v. 6, n. 8, p.2128-2134, 2013.

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

NADEEM, H.; RASHID, M. H.; RIAZ, M.; ASMA, B.; JAVED, M. R.; PERVEEN, R. Invertase from hyper producer strain of *Aspergillus niger*: physiochemical properties, thermodynamics and active site residues heat of ionization. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 9, p. 1098-1105, 2009.

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

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

NOVAKI, L.; HASAN, S. D. M.; KADOWAKU, M. K.; ANDRADE, D. Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. **Engevista**, v. 12, n. 2, p. 131-140, 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

O'SULLIVAN, C.; TOMPSON, F. W. LX.—Invertase: a contribution to the history of an enzyme or unorganised ferment. **Journal of the Chemical Society**, **Transactions**, v. 57, p. 834-931, 1890.

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.

PETERSON, S. W. *Neosartorya pseudofischeri* sp. nov. and its relationship to other species in *Aspergillus* section *Fumigati*. **Mycological Research**, v. 96, n. 7, p. 547-554, 1992.

QUINTANILLA, D.; HAGEMANN, T.; HANSEN, K.; GERNAEY, K. V. Fungal morphology in industrial enzyme production—modelling and monitoring. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 149, p. 29-54, 2015.

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.; TERENZI, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L.T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular β-D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 156-160, 2001.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 310-317, 2001.

ROMERO-GÓMEZ, S.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 15, p. 1255-1258, 2000.

RUSTIGUEL, C. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermo-tolerant mycelial β-fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis* under

submerged fermentation using wheat bran as carbon source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 362-369, 2015.

RUSTIGUEL, C. B.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. A novel silver-activated extracellular β-D-fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1–2, p. 10–15, 2010.

SABATER-MOLINA M.; LARQUE E.; TORRELLA F.; ZAMORA S. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 65, p. 315-328, 2009.

SAMSON, R. A.; HONG, S.; PETERSON, S.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Neosartorya*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 147-203, 2007.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Production of fructo-oligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 753-758, 2004A.

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, 2004B.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 442–457, 2005.

SANTOS, A. P. M. **Síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*.** 1998. 98 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Caderno da graduação: Ciências biológicas e da saúde**, v. 2, n. 3, p. 49-66, 2016.

SILVA, T. M. da. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. 215 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SLAVIN J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, p. 1417–1435, 2013.

STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active sucrose transport by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, p. 212-214, 2000.

TIMERMAN, A. P. The isolation of invertase from baker's yeast – an introduction to protein purification strategies. **Protein Purification**, p. 29-30, 2012.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. Microbiologia. 10ª Ed. – São Paulo: Editora Artmed, 2012.

UMA, C.; GOMATHI, D.; MUTHULAKSHMI, C.; GOPALAKRISHNAN, V. Production, purification and characterization of invertase by *Aspergillus flavus* using fruit peel waste as substrate. **Advances in Biological Research**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2010.

UPADHYAY, A.; LAMA, J. P.; TAWATA, S. Utilization of pineapple waste: A review. **Journal of Food Science and Technology Nepal**, v. 6, p. 10-18, 2010.

VAINSTEIN, M. H.; PEBERDY, J. F. Regulation of invertase in *Aspergillus nidulans*: effect of different carbon sources. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 315-321, 1991.

VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M. L.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; BRAVO-PATIÑO, 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.

VOGEL, H. J. Distribution of lysine pathways among fungi evolutionary implications. **American Naturalist**, v. 98, n. 903, p. 435-446, 1964.

WAINWRIGHT, M. Introducción a la biotecnología de los hongos. In_____ Zaragoza: Acribia. Cap. 9, p. 173-204, 1995.

WALLIS, G. L. F.; HEMMING, F. W.; PEBERDY, J. F. Secretion of two β-fructofuranosidase by *Aspergillus niger* growing in sucrose. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 345, n. 2, p. 214-222, 1997.

XIE, Y.; ZHOU, H.; LIU, C.; ZHANG, J.; LI, N.; ZHAO, Z.; SUN, G.; ZHONG, Y. A molasses habitat-derived fungus *Aspergillus tubingensis* XG21 with high β-fructofuranosidase activity and its potential use for fructooligosaccharides production. **AMB Express**, v.7, 1-9, 2017.

YOSHIKAWA, J.; AMACHI, S. SHINOYAMA, H.; FUJII, T. Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of β-fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 535-539, 2008.

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