

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/01/2020.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**LARISSA MIDIANE TODERO**

Produção de  $\beta$ -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  $\beta$ -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

T637p Todero, Larissa Midiane  
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.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção de -D-frutofuranosidase pelo fungo filamentosso *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 Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. DANIELLE BISCARO PEDROLLI

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Profa. Dra. CAREM GLEDES VARGAS RECHIA

Departamento 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  $\beta$ -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  $\beta$ -D-fructofuranosidase 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**

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

2º 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 Cavalcanti, 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 auxílio 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 auxílio 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  $\beta$ -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 transfrutossilacção, 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  $\beta$  (1-2), com fórmula geral  $GF_n$ . Devido a sua ligação  $\beta$ , 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  $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo *Aspergillus thermomutatus* em Fermentação Submersa (FSbm) e investigar a atividade de transfrutossilacção 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  $\beta$ -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 transfrutossilacção, 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  $\beta$ -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;  $\beta$ -D-frutofuranosidase.

## ABSTRACT

The  $\beta$ -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  $\beta$ (1-2) glycosidic bond, with general form of  $GF_n$ . FOS are not metabolized by the human body due to its  $\beta$  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  $\beta$ -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.  $\beta$ -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  $\beta$ -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;  $\beta$ -D-fructofuranosidase.

## ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius	T <sub>50</sub> – Tempo de meia vida
Atm – Atmosfera (unidade de pressão)	v/v – Volume por volume
BDA – Batata Dextrose Ágar	YPD – Yeast Peptone Dextrose
BSA – Albumina de Soro Bovina	HPLC – <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
cm – Centímetros	
DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico	
EC – <i>Enzyme Commission</i>	
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético	
FAO – <i>Food and Agriculture Organization of USA</i>	
FDA – <i>Food and Drug Administration</i>	
FES – Fermentação em Estado Sólido	
FFase – β-D-frutofuranosidase	
FSbm – Fermentação Submersa	
FOS - Frutooligossacarídeos	
FTase – Frutossiltransferase	
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	

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reação de hidrólise da sacarose catalisada pela $\beta$ -D-frutofuranosidase ..	27
<b>Figura 2.</b> Estrutura química dos frutooligossacarídeos 1-kestose, nistose e 1-frutofuranosilnistose .	32
<b>Figura 3.</b> Esquema de produção dos frutooligossacarídeos 1-kestose, 6-kestose, nistose e frutofuranosilnistose ..	33
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da fermentação submersa e da produção enzimática de FOS.....	34
<b>Figura 5.</b> Fluxograma simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.....	36
<b>Figura 6.</b> Influência da concentração de esporos de <i>A. thermomutatus</i> 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
<b>Figura 7.</b> Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase pelo fungo <i>A. thermomutatus</i> em função da concentração de sacarose adicionada ao meio Khanna, a 30°C e 100 rpm, por 72 horas. ....	55
<b>Figura 8.</b> Influência do tempo de cultivo na produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular e intracelular pelo fungo <i>A. thermomutatus</i> em meio Khanna com 10 (g/L) de sacarose, a 30°C, 100 rpm.....	57
<b>Figura 9.</b> Efeito da temperatura de cultivo na produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo <i>A. thermomutatus</i> em meio Khanna com 1% (m/v) de sacarose, 100 rpm por 120 horas.....	58
<b>Figura 10.</b> Influência da concentração de glicose ou frutose na produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular e intracelular pelo fungo <i>A. thermomutatus</i> em meio Khanna com 10 (g/L) de sacarose, a 30°C, 100 rpm por 120 horas .....	60
<b>Figura 11.</b> Influência da concentração de sacarose na atividade enzimática .....	62
<b>Figura 12.</b> Temperatura e pH ótimos aparente, termoestabilidade e estabilidade ao pH da $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular presente no filtrado obtido do cultivo do fungo <i>A. thermomutatus</i> .....	63
<b>Figura 13.</b> Influência de diferentes concentrações de $MnSO_4$ na atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica. ....	67

<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico em Thin Layer Chromatography (TLC) para os produtos obtidos pela ação da $\beta$ -D-frutofuranosidase de <i>A. thermomutatus</i> , em diferentes tempos de reação, sobre sacarose 20% (m/v) como substrato.....	70
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico em High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dos produtos de hidrólise da sacarose pela $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular de <i>A. thermomutatus</i> contida no filtrado ..	71
<b>Figura 16.</b> Concentração de sacarídeos obtidos na reação de produção de FOS ...	72
<b>Figura 17.</b> Influência da temperatura na produção de FOS pela enzima $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular do fungo <i>A. thermomutatus</i> .....	74
<b>Figura 18.</b> Influência do tempo de reação na produção de FOS pela enzima $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular do fungo <i>A. thermomutatus</i> nas temperaturas de 30°C e 60°C. ....	77
<b>Figura 19.</b> Produção de FOS pela $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular do fungo <i>A. thermomutatus</i> em função da concentração de sacarose.....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Literatura encontrada de produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase por diferentes <i>Aspergillus</i> spp. ....	29
<b>Tabela 2.</b> Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase em FSbm pelo fungo <i>A. thermomutatus</i> em função de diferentes fontes adicionais de carbono.....	50
<b>Tabela 3.</b> Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase pelo fungo <i>A. thermomutatus</i> em diferentes meios de cultura. ....	52
<b>Tabela 4.</b> Efeito de diferentes sais na atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica extracelular do fungo <i>A. thermomutatus</i> em FSbm.....	65
<b>Tabela 5.</b> Efeitos de diferentes compostos químicos na atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica extracelular do fungo <i>A. thermomutatus</i> .....	69
<b>Tabela 6.</b> Concentração de sacarídeos obtidos a partir da hidrólise da sacarose e da transfrutossilacção em 48 horas de reacção a 40°C. ....	71
<b>Tabela 7.</b> Conversão da sacarose (% m/m), atividade de transfrutossilacção ( $U_T$ ), taxas de transferência ( $T_t$ ) e de hidrólise ( $T_h$ ) da enzima em diferentes temperaturas. ....	75
<b>Tabela 8.</b> Conversão da sacarose (% m/m), atividade de transfrutossilacção ( $U_T$ ), taxa de transferência ( $T_t$ ) e de hidrólise ( $T_h$ ) da enzima em diferentes tempos nas temperaturas de 30 e 60°C.....	78
<b>Tabela 9.</b> Conversão da sacarose (% m/m), atividade de transfrutossilacção ( $U_T$ ), taxas de transferência ( $T_t$ ) e de hidrólise ( $T_h$ ) da enzima em diferentes concentrações de sacarose como substrato. ....	80

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1	Fungos Filamentosos.....	25
1.1.1	O Gênero <i>Aspergillus</i> .....	25
1.2	Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidases por fungos filamentosos .....	27
1.3	Aplicação das $\beta$ -D-frutofuranosidases .....	31
1.3.1	Frutooligossacarídeos (FOS) .....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.1	Objetivo Geral .....	36
2.2	Objetivos Específicos .....	36
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1	Manutenção da linhagem em laboratório .....	39
3.2	Preparo da suspensão de esporos .....	39
3.3	Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidase em fermentação submersa (FSbm).....	39
3.4	Obtenção das enzimas intracelulares e extracelulares.....	40
3.5	Determinação da atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica .....	40
3.6	Quantificação de proteínas.....	41
3.7	Influência de diferentes parâmetros sobre a produção de $\beta$ -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 $\beta$ -D-frutofuranosidásica .....	44
3.7.5	Influência da adição de uma segunda fonte adicional de carbono na FSbm.....	44

<b>3.8</b>	<b>Caracterização da <math>\beta</math>-D-frutofuranosidase extracelular de <i>A. thermomutatus</i>.....</b>	<b>44</b>
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 $\beta$ -D-frutofuranosidásica .....	44
3.8.3	Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH da $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular .....	45
3.8.4	Efeito de diferentes compostos na atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica extracelular.....	45
<b>3.9</b>	<b>Produção de frutooligossacarídeos pela <math>\beta</math>-D-frutofuranosidase extracelular de <i>A. thermomutatus</i>.....</b>	<b>46</b>
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
<b>3.10</b>	<b>Análises dos experimentos e análises estatísticas.....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Produção de <math>\beta</math>-D-frutofuranosidase por <i>A. thermomutatus</i> em FSbm ..</b>	<b>48</b>
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 $\beta$ -D-frutofuranosidase.....	57
4.1.7	Influência de diferentes concentrações de glicose e frutose na produção enzimática .....	59
<b>4.2</b>	<b>Caracterização da <math>\beta</math>-D-frutofuranosidase extracelular.....</b>	<b>61</b>

4.2.1	Efeito de diferentes concentrações de sacarose na atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica .....	61
4.2.2	Influência da temperatura e do pH na atividade $\beta$ -D-frutofuranosidásica	62
4.2.3	Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade enzimática...	64
<b>4.3</b>	<b>Análise da produção de FOS pela <math>\beta</math>-D-frutofuranosidase produzida pelo fungo <i>A. thermomutatus</i>.</b> .....	<b>69</b>
4.3.1	Análise qualitativa pela <i>Thin Layer Chromatography</i> (TLC) .....	69
4.3.2	Análise quantitativa da produção de FOS por <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	70
4.3.2.1	Produção de FOS utilizando $MnSO_4$ na reação.....	72
4.3.2.2	Produção de FOS pela $\beta$ -D-frutofuranosidase extracelular do fungo <i>A. thermomutatus</i> 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
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>

## 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, conseqüentemente, 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 isomaltoligossacarídeos 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 transfrutossilacção da sacarose. A produção de FOS por transfrutossilacção da sacarose acontece pelas ações das  $\beta$ -D-frutofuranosidasas (FFase, EC 3.2.1.26), também conhecidas como invertases e das frutossiltransferases (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 transfrutossilacção. Já as FTases têm somente ação de transfrutossilacção (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 transfrutossilacção (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 transfrutossilacção 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 assexuada, caracterizada pela produção de fiáldes 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 terpenóides, 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

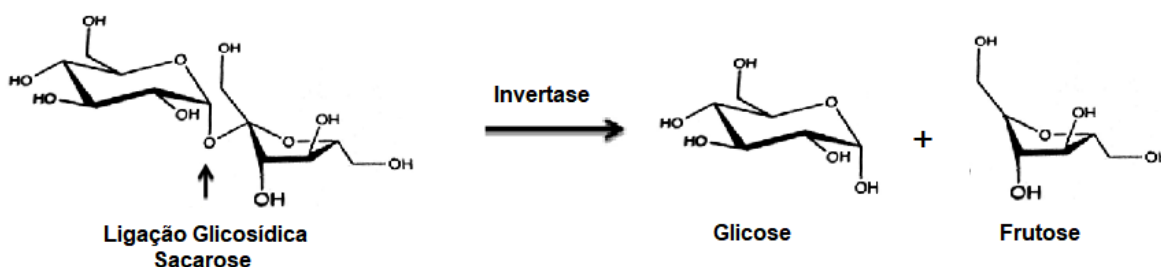
Dentre as enzimas produzidas por fungos filamentosos, as  $\beta$ -D-frutofuranosidases (EC 3.2.1.26) merecem destaque. Estas hidrolases pertencem à família GH32 (glicosídeo hidrolase) que abriga também as levanases (EC 3.2.1.65) e endo-inulinases (EC 3.2.1.7).

## 1.2 Produção de $\beta$ -D-frutofuranosidas por fungos filamentosos

As  $\beta$ -D-frutofuranosidas (FFase) (EC 3.2.1.26), também conhecidas como invertases, são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação glicosídica (tipo  $\alpha$ - $\beta$ ) 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  $\beta$ -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  $\beta$ -D-frutofuranosidase



**Fonte:** Autora.

As  $\beta$ -D-frutofuranosidas 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -D-frutofuranosidase por diferentes *Aspergillus* spp.

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

**Fonte:** Autora.

### 1.3 Aplicação das $\beta$ -D-frutofuranosidases

As  $\beta$ -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 láctico, 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  $\beta$ -D-frutofuranosidases têm, além do poder de hidrólise, a capacidade de catalisar reação de transfrutossilacção. A transferência de um resíduo frutossil para um acceptor 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)

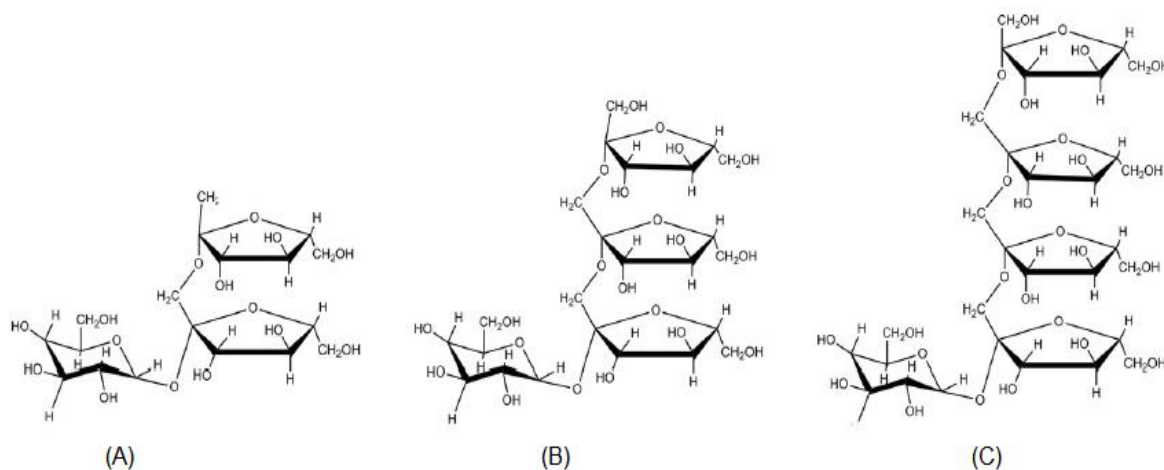
Os frutooligossacarídeos são sacarídeos bifidogênicos (estimulam a proliferação das bifidobactérias do colón), com estrutura química formada por unidades de frutose ligadas entre si, originando uma cadeia de frutose que, por sua vez, se liga a uma glicose terminal por ligação glicosídica  $\beta$ , com 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  $\alpha$  (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  $\beta$ -(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<sub>2</sub>), nistose (GF<sub>3</sub>) e 1- $\beta$ -frutofuranosilnistose (GF<sub>4</sub>) (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).

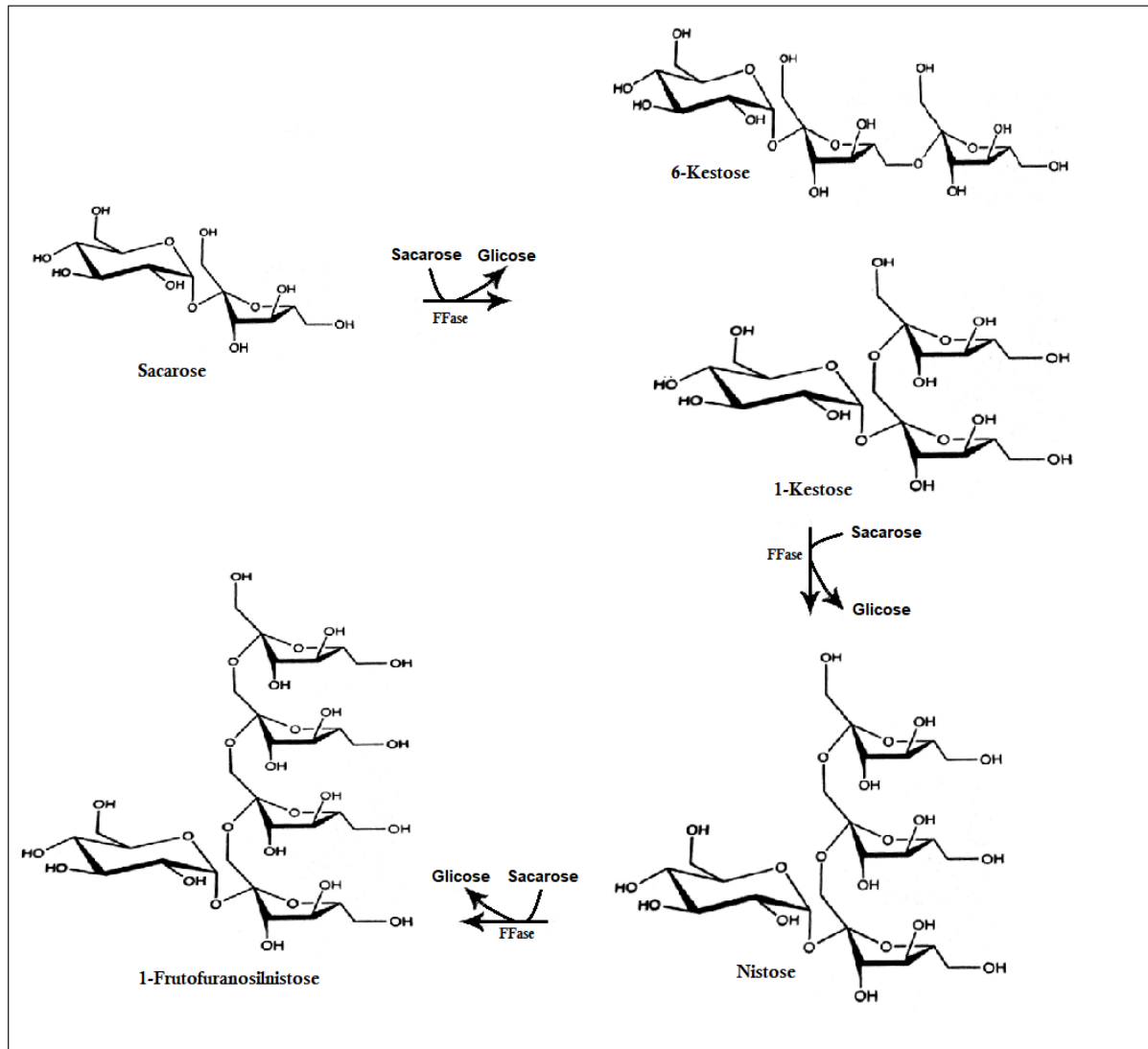


**Fonte:** FLORES-MALTOS (2014).

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 frutossil. A formação de FOS a partir da sacarose pode ocorrer pela transfrutosilação do resíduo frutossil 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 transfrutossilada (SANTOS, 1998; LEE, CHIANG e

TSAI, 1999). A Figura 3 mostra o esquema da produção enzimática de frutooligossacarídeos, a partir da ação da  $\beta$ -D-frutofuranosidase, onde a enzima transfere o resíduo frutossil 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.

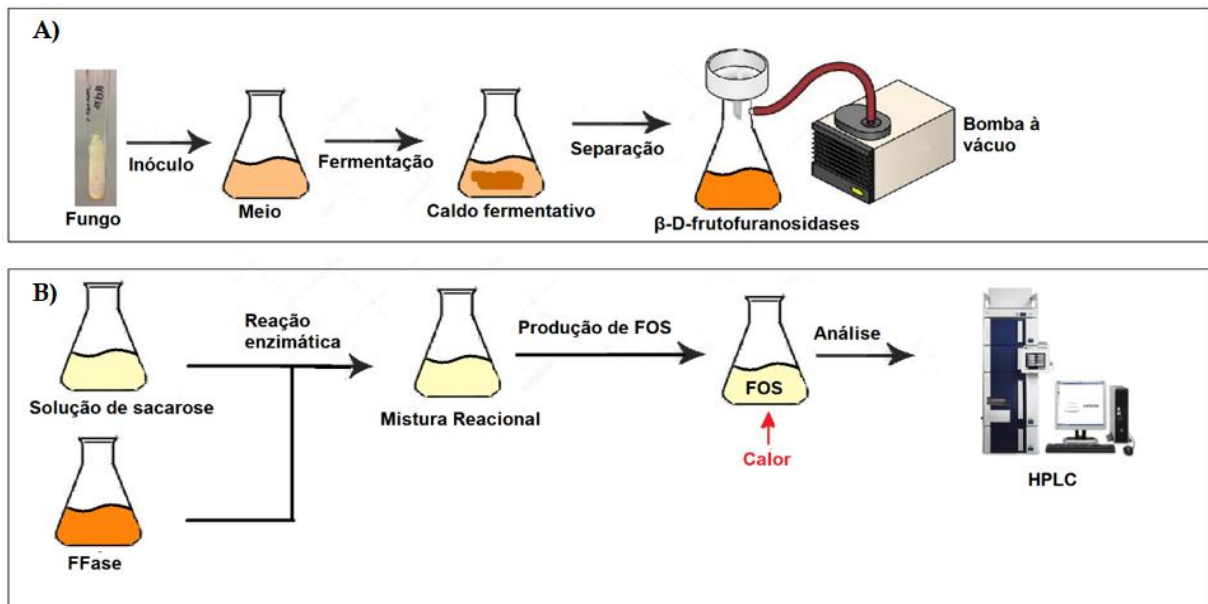


Fonte: Autora.

De acordo com Passos e Park (2003) os FOS advindos da transfrutossilação 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 transfrutossilacção e, conseqüentemente, 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  $\beta$ -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  $\beta$ , 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 risco de obesidade e diabetes (MUSSATTO e MANCILHA, 2007; SABATER-MOLINA et al., 2009; DE PRETER et al., 2011; SANGHEETA 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  $\beta$ -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 transfrutossilacção de 660 U mL. Hidaka e colaboradores (1988) reportaram a atividade de transfrutossilacção 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  $\beta$ -D-frutofuranosidase com atividade de transfrutossilacção 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 reacção.

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 transfrutossilacção e uma produção de FOS com alto rendimento e menos dispendiosa.

## 5 CONCLUSÕES

O fungo *A. thermomutatus* foi um bom produtor de  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -D-frutofuranosidase de *A. thermomutatus* foi capaz de realizar a transfrutossilação, obtendo os FOS kestose e nistose, principalmente em concentrações de sacarose mais elevadas, com conseqüente aumento da concentração destes FOS. Além disso, foi observado uma possível produção de duas  $\beta$ -D-frutofuranosidasas com atividade transfrutossilativa em temperaturas diferentes. Considerando os resultados obtidos, este trabalho gerou conhecimentos sobre a produção de  $\beta$ -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.; TEREZI, 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  $\beta$ -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.; TEREZI, 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-farmacêutico) –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  $\beta$ -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 fructooligossacarídeo 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  $\beta$ -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 transfructosylation 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 543–

548, 2006.

FUJITA, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; KITAHATA, S. Transfructosylation catalyzed by  $\beta$ -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.; TERENCEI, 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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*  $\beta$ -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.; TERENCEI, H. F.; POLIZELI, M. L. T.; JORGE, J. A. Production of  $\beta$ -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.; TERENCEI, H. F.; POLIZELI, M. L. T.; JORGE, J. A. Production and characterization of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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. **Analytical 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L.T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 156-160, 2001.

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  $\beta$ -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.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. A novel silver-activated extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Molecular Catalysis B: 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 fructooligosaccharides 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.