

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MAYSA LIMA PARENTE FERNANDES

Produção de β -D-frutofuranosidases pelo fungo filamentoso *Aspergillus niveus*
através de fermentação em estado sólido, purificação e caracterização bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

ARARAQUARA/SP

2016

MAYSA LIMA PARENTE FERNANDES

Produção de β -D-frutofuranosidases pelo fungo filamentoso *Aspergillus niveus* através de fermentação em estado sólido, purificação e caracterização bioquímica

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

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

F363p Fernandes, Maysa Lima Parente
 Produção de β -D-frutofuranosidases pelo fungo
 filamentoso *Aspergillus niveus* através de fermentação em
 estado sólido, purificação e caracterização bioquímica /
 Maysa Lima Parente Fernandes. – Araraquara : [s.n.], 2016
 85 f. : il.

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

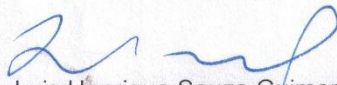
 1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Invertase. 4. Fungos
 filamentosos. 5. Fermentação. I. Título.

MAYSA LIMA PARENTE FERNANDES

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestra em
Biotecnologia.

Araraquara, 26 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães (Orientador)
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto - SP



Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Hamilton Cabral
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Maysa Lima Parente Fernandes

Nome em citações bibliográficas: FERNANDES, M. L. P.

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

2013 – Curso de Inglês. (Carga horária: 320h). Centro de Cultura Anglo Americana., CCAA, Brasil.

2014 – Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 5). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Título: Produção de β -D-frutofuranosidases pelo fungo filamentoso *Aspergillus niveus* através de fermentação em estado sólido, purificação e caracterização bioquímica. Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2009 – 2014 – Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Fundação Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2015 – Planejamento Experimental e Otimização de processo. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2014 – Web of Science, EndNote e ResearcherID, (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2011 – Processamento de Frutas. (Carga horária: 40h). Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

2010 – Extensão universitária em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. (Carga horária: 288h). Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

FERNANDES, M. L. P.; NUNES, E. E.; LIMA, J. P. ; ELIAS, H. H. S. ; SILVA, E. M. . PERFIL ENZIMÁTICO E RENDIMENTO BIOLÓGICO DE *Agaricus blazei* E *Pleurotus ostreatus* CULTIVADOS EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS. Magistra, v. 25, p. Complemento, 2013.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

FERNANDES, M. L. P.; SILVA, E. M. Prospecção de bactérias e leveduras lipolíticas do Estado do Tocantins promissoras em aplicações industriais. In: IX Seminário de Iniciação Científica da UFT, 2013, Palmas. IX Seminário de Iniciação Científica da UFT, 2013.

FERNANDES, M. L. P.; SILVA, E. M. Produção de Enzimas Extracelulares por *Agaricus blazei* e *Pleurotus ostreatus* cultivados em casca de arroz suplementado com farelo de milho. In: VIII Seminário de Iniciação Científica da UFT, 2012, Palmas - TO. VIII Seminário de Iniciação Científica da UFT, 2012.

FERNANDES, M. L. P.; SCHEIDT, G. N. Comparação de diferentes sistemas de cultivo in vitro de *Melaleuca alternifolia cheel*. In: I Seminário Integrado Universidade Federal do Tocantins, 2011, Palmas - TO. I Seminário Integrado Universidade Federal do Tocantins, 2011.

Resumos publicados em anais de congressos

FERNANDES, M. L. P.; SILVA, E. M. Extracellular enzymes production by *Agaricus blazei* and *Pleurotus ostreatus* cultivated on rice husk supplemented whit corn bran. In: 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios, 2012, Guarujá - SP. Brasil Biotec, 2012.

CARDON, C. H.; FERNANDES, M. L. P. Influence of *Trichoderma* sp. in *Sclerotium rolfsii* trough volatile metabolites. In: 4 Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios, 2012, Guarujá-SP. Brasil Biotec, 2012. In: Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios, 2012, Guarujá-SP. Brasil Biotec, 2012.

Apresentações de Trabalho

FERNANDES, M. L. P.; SATO, V. S.; ALVES, T. B.; JORGE, J. A. ; GUIMARAES, L. H. S. . Produção de β -Frutofuranosidases do fungo filamentoso *Aspergillus niveus*. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial. Produção de β -Frutofuranosidases do fungo filamentoso *Aspergillus niveus*. 2015. (Encontro).

Mulheres na Ciência 2015: Desafios e Atalhos para o sucesso. 2015. (Seminário).

Workshop Materials for Life. Produção e caracterização de β -frutofuranosidases do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*. 2015. (Exposição).

IX Seminário de Iniciação Científica da UFT. Prospeção de bactérias e leveduras lipolíticas do Estado do Tocantins promissoras em aplicações industriais. 2013. (Seminário).

4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios. Extracellular enzymes production by *Agaricus blazei* and *Pleurotus ostreatus* cultivated on rice husk supplemented with corn bran. 2012. (Congresso).

VIII Seminário de Iniciação Científica da UFT. Produção de Enzimas Extracelulares por *Agaricus blazei* e *Pleurotus ostreatus* cultivados em casca de arroz suplementado com farelo de milho. 2012. (Seminário).

I Seminário Integrado Universidade Federal do Tocantins. Comparação de diferentes sistemas de cultivo in vitro de *Melaleuca alternifolia* cheel. 2011. (Seminário).

3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia. 2010. (Congresso).

Calouros em Ação. 2009. (Oficina).

I Ciclo de Palestras dos Cursos de Q. A. e Engenharia Biotecnológica. 2009. (Encontro).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu Senhor e Salvador, pela sua misericórdia divina, por me fornecer saúde e ânimo todos os dias da minha vida para a conclusão desse projeto.

Agradeço a minha Nossa Senhora de Fátima, minha intercessora, que roga por mim, cuida do meu ser, em toda sua compaixão.

Aos meus pais Elmícia e Geraldo, não cabe no meu peito todo o amor que sinto por vocês, obrigada pela educação, vocês são meus exemplos de seres humanos e de um casamento respaldado no carinho e respeito mútuo. Obrigada por todo o apoio, sem vocês nada disso seria possível. Aos meus irmãos Matheus e Lukas, por todas as conversas e por me amarem incondicionalmente.

A minha avó materna Maria Mirtes, por todas as orações, por todo amor depositado em mim desde meu nascimento.

Ao meu namorado Carlos Henrique Cardon, que é um presente abençoado de Deus. Obrigada por se fazer presente apesar da distância. Você é essencial na minha vida.

À Márcia Silvana, com quem dividi moradia nesse período em Ribeirão Preto, obrigada pela amizade sincera, por todos os conselhos, você tem um lugar especial no meu coração.

À Thaís Barboni Alves, minha grande amiga que me acolheu de forma muito generosa no laboratório de microbiologia, facilitando meu processo de adaptação. Obrigada por sempre estar disposta a me ajudar, pelas inúmeras sugestões e discussões de resultados. Sorte de quem convive com você.

Agradeço ao Professor Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, a oportunidade, paciência e orientação.

Aos professores, João Atílio Jorge e Maria de Lourdes Polizeli, pela atenção dispensada e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Agradeço ao Professor Dr. Alex Fernando de Almeida, pelo incentivo a vida acadêmica e por acreditar no meu potencial.

Aos técnicos Maurício, Ricardo e Mariana pela amizade, auxílio laboratorial e apoio.

Ao Terreno Comunitário de Plantio de Hortaliças de Ribeirão Preto pela doação das raízes e resíduos da mandioca empregadas neste estudo.

Aos amigos Vanessa Sato, Gabriela de Sá, Larissa Valera, Rayza Cavalcanti, Pedro Ornela, Josana Messias, Paula, Paulo Ricardo, Marita Gimenez, Lummy Monteiro, Enrico Spiropulos, Juliana Infante, Luciana, Rosy, Ana e Otávio, por todos os momentos compartilhados e por não deixarem eu me sentir sozinha.

Às secretárias da Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, pela atenção e cuidado, muito obrigada.

A Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela estrutura disponibilizada para a realização desse trabalho.

A Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara.

A Capes e FAPESP pelo auxílio financeiro.

“O dia em que eu entendi que a vida acadêmica é composta por trabalho duro e não genialidade, eu tirei um peso imenso de mim. Aprendi a me levar menos a sério.”

Rosana Pinheiro Machado

RESUMO

As invertases ou β -D-frutofuranosidases (EC 3.2.1.26) são responsáveis pela produção da mistura equimolar de glicose e frutose, conhecida como açúcar invertido, através da hidrólise da ligação β 2-1 da molécula de sacarose. Essa mistura apresenta sabor mais doce que a sacarose e é destinada à diversos fins na indústria alimentícia (doces, xaropes, leite condensado e bebidas). É importante destacar que o produto obtido por hidrólise enzimática é bastante superior ao obtido por hidrólise ácida. A hidrólise catalisada pela enzima β -D-frutofuranosidase produz um xarope de alta qualidade com ausência de hidroximetilfurfural e sem desenvolvimento de cor. Diante do interesse industrial e biotecnológico, e das diversas aplicações dessa enzima, o objetivo deste trabalho foi investigar a produção de β -D-frutofuranosidase extracelular pelo fungo filamentoso *Aspergillus niveus* através de Fermentação em Estado Sólido (FES) purificando-a e caracterizando-a bioquimicamente. Entre os substratos testados em FES, a maior produção β -D-frutofuranosidásica foi obtida em casca de mandioca, com granulometria de 10 mesh, umidificada na proporção de 1:1 com água de torneira, a uma temperatura de 30°C com umidade relativa de 30%, por um período de 9 dias de incubação. A β -D-frutofuranosidase extracelular obtida em FES foi purificada 6,53 vezes com recuperação de 5,27%, obtendo-se em SDS-PAGE 8% uma única banda protéica (37 kDa), e massa molecular nativa de 91,2 kDa estimada por Sepharose CL-6B. A temperatura e pH ótimos de atividade foram 55°C e 4,5, respectivamente. A enzima apresentou boa estabilidade em 50°C e 60°C por uma hora, e em ampla faixa de pH com atividade residual de 80% em pH 8,0 por uma hora. A atividade β -D-frutofuranosidásica foi ativada principalmente na presença de Mn^{2+} . A enzima foi resistente a maioria dos sais e solventes testados. Os valores de K_m e V_{max} utilizando a sacarose como substrato foram 22,98 mM e 120,48 U/mg de proteína, respectivamente. Na presença de Mn^{2+} os valores foram 16,31 mM e 0,30 U/mg de proteína, respectivamente. A enzima não foi capaz de hidrolisar a inulina, caracterizando uma β -D-frutofuranosidase verdadeira, e apenas glicose e frutose foram observadas como produtos de hidrólise da sacarose em alta concentração; não foi observada a produção de frutooligossacarídeos (FOS).

Palavras – chave: β -D-frutofuranosidases; *Aspergillus niveus*; Fermentação em Estado Sólido.

ABSTRACT

The invertases or β -D-fructofuranosidases (EC 3.2.1.26) are responsible for the production of an equimolar mixture of glucose and fructose, known as invert sugar, by hydrolysis of β 2-1 bond of the sucrose molecule. This mixture is sweeter than sucrose and is intended for various purposes in the food industry (sweets, syrup, condensed milk and drinks). It is important to note that the product obtained by enzymatic hydrolysis is much higher than that obtained by acid hydrolysis. The hydrolysis catalyzed by β -D-fructofuranosidase enzyme produces a high-quality syrup without hydroxymethylfurfural and color development. Before the industrial and biotechnological interest, and the various applications of this enzyme, the aim of this study was to investigate the production of the extracellular β -D-fructofuranosidase by filamentous fungus *Aspergillus niveus* under Solid Fermentation State (SSF) purifying it and characterizing it biochemically. Among the substrates tested in the SSF, the highest yield of β -D-fructofuranosidase was obtained in cassava hulls with a particle size of 10 mesh, humidified in the ratio 1:1 with tap water and maintained at 30°C with a relative humidity of 30%, for 9 days of incubation. The extracellular β -D-fructofuranosidase obtained in SSF was purified 6.53-folds with a recovery of 5.27%. A single protein band (37 kDa) was obtained in 8% SDS-PAGE and the native molecular mass was estimated as 91.2 kDa by Sepharose CL-6B. The optimum temperature and pH for activity was 55°C and 4.5, respectively. The enzyme showed good stability at 50°C and 60°C for one hour and 80% of activity was maintained at pH 8.0 for one hour. The β -D-fructofuranosidase activity was primarily activated by Mn^{2+} . In addition, the enzyme was resistant to most solvents and salts tested. The K_m and V_{max} values using sucrose as substrate were 22.98 mM and 120.48 U/mg, respectively. In the presence of Mn^{2+} the values were 16.31 mM and 0.30 U/mg respectively. The enzyme was not able to hydrolyze inulin, characterizing a true invertase, and only glucose and fructose were observed as hydrolysis products at high sucrose concentration; production of fructooligosaccharides (FOS) was not observed.

Keywords: β -D-fructofuranosidase; *Aspergillus niveus*; Solid-State Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Aspergillus niveus</i> microscopia de luz.....	21
Figura 2. Reação de hidrólise da sacarose catalisada pela β -D-frutofuranosidase.....	22
Figura 3. Mecanismo sugerido de ação da β -D-frutofuranosidase.....	24
Figura 4. Granulometria da casca da mandioca.....	38
Figura 5. Produção de invertase extracelular pelo fungo <i>A. niveus</i> em FES em função do tempo de cultivo.....	46
Figura 6. Perfil cromatográfico em DEAE-Celulose para a β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por <i>A. niveus</i>	55
Figura 7. Perfil cromatográfico em Sepharose CL-6B para β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por <i>A. niveus</i>	55
Figura 8. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 8% para a β -D-frutofuranosidase extracelular de <i>A. niveus</i>	56
Figura 9. Determinação da massa molecular nativa produzida por <i>A. niveus</i>	58
Figura 10. Determinação da temperatura ótima de ensaio (A) e pH ótimo de ensaio (B) para a β -D-frutofuranosidase.....	60
Figura 11. Estabilidade térmica (A) e ao pH (B) para a β -D-frutofuranosidase.....	61
Figura 12. Influência de diferentes concentrações de MnCl_2^{2+} na atividade frutofuranosidásica.....	65
Figura 13. Perfil cromatográfico em HPLC dos produtos de hidrólise da sacarose pela ação da β -D-frutofuranosidase.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos produtores de β -D-frutofuranosidases.....	26
Tabela 2. Fontes de carbono utilizados para produção de β -D frutofuranosidases por <i>Aspergillus niveus</i> em FES.....	44
Tabela 3. Camadas da raiz da mandioca.....	47
Tabela 4. Efeito da granulometria da casca da mandioca.....	49
Tabela 5. Influência de diferentes soluções de sais, água destilada e água de torneira.....	51
Tabela 6. Influência de diferentes concentrações de água de torneira.....	52
Tabela 7. Purificação da β -D-Frutofuranosidase.....	55
Tabela 8. Influência de diferentes sais na atividade β -D frutofuranosidásica.....	64
Tabela 9 - Influência de diferentes compostos na atividade β -D-frutofuranosidásica .	66
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos da β -D-Frutofuranosidase extracelular produzida por <i>A. niveus</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

BDA – Batata dextrose ágar

°C – Graus Celsius

DEAE – Diethylaminoethyl

EC – Enzyme Commission

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FOS - Frutooligossacarídeos

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

FSbm – Fermentação Submersa

FES – Fermentação em Estado Sólido

g – aceleração da gravidade

kDa – mil Daltons

K_m – constante de Michaelis-Menten

m/v – massa por volume

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

rpm – rotações por minuto

SDS – duodecil sulfato de sódio

V – volts

$V_{m\acute{a}x}$ – velocidade máxima

U - unidade de atividade

λ – comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Gênero <i>Aspergillus</i>	19
1.2	<i>Aspergillus niveus</i>	20
1.3	β -D-frutofuranosidases	22
1.4	Fermentação em Estado Sólido	27
1.5	Casca da mandioca como substrato para FES	28
1.6	Aplicações das β -D-frutofuranosidases	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Microrganismo e manutenção da linhagem em laboratório	34
3.2	Obtenção de culturas em Fermentação em Estado Sólido	34
3.2.1	Composição das soluções salinas	35
3.3	Estudo do uso da casca da mandioca como substrato/fonte de carbono	37
3.4	Obtenção das enzimas	39
3.5	Determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas	39
3.6	Purificação da β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por <i>Aspergillus niveus</i>	40
3.7	Determinação da massa molecular	40
3.8	Determinação da temperatura e do pH ótimos de atividade, termoestabilidade e estabilidade ao pH	41
3.9	Efeito de diferentes compostos na atividade β -D-frutofuranosidásica	41
3.10	Análise dos produtos de hidrólise por HPLC	42
3.11	Determinação das constantes cinéticas	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Efeito de diferentes fontes de carbono	43

4.2 Cinética de produção de β-D-frutofuranosidases em FES.....	45
4.3 Influência de diferentes camadas que compõem a raiz da mandioca na produção de β-D-frutofuranosidases.....	46
4.4 Efeito da granulometria da casca da mandioca na produção de β-D-frutofuranosidases.....	48
4.5 Efeito de diferentes soluções umidificantes na FES sobre a produção de β-D-frutofuranosidases.....	50
4.6 Purificação e caracterização da β-D-frutofuranosidase extracelular produzida por <i>A. niveus</i> em casca de mandioca.....	53
4.6.1 Purificação da β -D-frutofuranosidase extracelular.....	53
4.6.2 Determinação da massa molecular nativa da β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por <i>A. niveus</i>	57
4.6.3 Influência da temperatura e do pH na atividade frutofuranosidásica.....	58
4.6.4 Influência de diferentes compostos na atividade β -D-frutofuranosidásica.....	63
4.6.5 Análise dos produtos de hidrólise.....	67
4.6.6 Determinação das constantes cinéticas.....	68
5 CONCLUSÕES.....	70
6 REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores de reações que ocorrem nos sistemas biológicos, e são utilizadas para uma variedade de aplicações industriais. O mercado industrial de enzimas continua crescendo devido à implantação de novas tecnologias de produção, bem como ao uso da engenharia genética e ao surgimento de novos campos de aplicação. A função de um catalisador é acelerar a velocidade de uma reação, tendo alto grau de especificidade por seus substratos. Adicionalmente, as velocidades das reações enzimáticas são alteradas de acordo com diversos fatores como concentração de enzima ou substrato, temperatura e pH (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008; COLLA; REINEHR; COSTA, 2013). Estes catalisadores constituem um dos grupos mais importantes de produtos biológicos de necessidade humana. Vários processos industriais, nas áreas de biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos utilizam as enzimas em suas etapas. Além disso novas tecnologias possibilitaram o uso na produção de medicamentos, vitaminas e aromas (PANDEY et al., 1999; BORNSCHEUER et al., 2012).

É interessante evidenciar que os biocatalisadores, ou enzimas, não são tóxicos, são obtidos de fontes renováveis e são facilmente biodegradáveis. Além disso, os processos enzimáticos são seguros consumindo pouca energia (WOHLGEMUTH, 2010). As pesquisas para a obtenção de enzimas envolvem a otimização do processo e a produção com potencial industrial visando à diversificação do comércio mundial, tendo movimentado aproximadamente US\$ 7 bilhões em 2013 (MENDES et al., 2011). Outro fator importante é que 62% das enzimas produzidas são utilizadas por indústrias alimentícias, sendo empregadas basicamente na produção de xarope de açúcar invertido e de compostos aromatizantes. O uso controlado desses biocatalisadores pode levar ao aprimoramento do sabor, cor, textura, aparência e valor nutricional dos alimentos (BON et al., 2008; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

Dentre as diversas enzimas conhecidas, tais como, lipases, tanases, fitases, trealases, xilanases, pectinases, amilases e celulasas, as β -D-frutofuranosidases merecem atenção pelo seu potencial e uso industrial. Invertases ou β -D-frutofuranosidases (EC 3.2.1.26) são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de

ligações β 2-1 da molécula de sacarose produzindo uma mistura equimolar de D-glicose e D-frutose. Trata-se de uma das mais simples carboidrases comerciais e é muito utilizada em função disso. O primeiro estudo sobre a atividade invertásica foi realizado em 1828 utilizando células de levedura, mas somente na década de 60 é que se conheceu de fato a sua natureza química. As β -D-frutofuranosidases podem ser encontradas em diferentes isoformas de acordo com o pH ótimo de atuação. Estão incluídas na família GH32 das glicosidases, onde são encontradas 370 membros de origem vegetal, fúngica e bacteriana (ALBERTO et al., 2004). Diversos estudos mostram a produção, caracterização e aplicação destas enzimas em vários âmbitos industriais (KOTWAL; SHANKAR, 2009; CABAJ et al., 2012; ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013).

As principais aplicações industriais das β -D-frutofuranosidases estão relacionadas com a utilização do açúcar no estado dissolvido, tais como bebidas carbonatadas, sucos concentrados, xaropes medicinais, doces e molhos (TOMOTANI; VITOLO, 2006). É importante ressaltar que o açúcar invertido, é uma solução mais densa comparada à sacarose, capaz de minimizar a cristalização e o crescimento de microrganismos. Corresponde a uma mistura de açúcares em solução, constituída principalmente de glicose, frutose e sacarose residual, sendo 20% mais doce que a sacarose além de diminuir a temperatura de congelamento devido a sua afinidade com água (CADENA et al., 2010).

As enzimas são fundamentais para o funcionamento biológico das células, sendo que os microrganismos são os principais produtores devido à grande diversidade de atividades catalíticas que exercem, e também ao fato da simplicidade dos requerimentos nutricionais para o seu desenvolvimento (BON et al., 2008). Os fungos são essenciais em grande parte dos processos biotecnológicos e os produtos obtidos estão presentes na panificação, fabricação da cerveja e do álcool, produção de antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, produtos farmacêuticos, processamento de frutas e legumes, clarificação de sucos de frutas, extração de cafés e na produção de adoçantes (GONÇALVES, 2013).

Nas últimas décadas, um grande número de microrganismos não patogênicos, capazes de produzir invertases, tem atraído atenção da indústria. Os fungos filamentosos são microrganismos que se destacam devido à sua grande facilidade de

cultivo, além de secretarem suas enzimas diretamente no meio de produção, não sendo necessária, assim, a ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com grande potencial para inúmeras aplicações industriais. Os fungos filamentosos de maior interesse no contexto biotecnológico incluem os gêneros *Aspergillus*, *Mucor* e *Trichoderma*, entre eles as espécies, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *M. michie* e *T. reesei* (VAN DEN HOMBERGH et al., 1997; BENNETT, 1998; POLIZELI et al., 2005; STROPARO et al., 2012).

1.1 Gênero *Aspergillus*

Entre os fungos empregados na produção de enzimas destaca-se o gênero *Aspergillus* que apresenta um enorme potencial. É importante evidenciar que existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares, sendo diversas aplicadas em âmbitos industriais e biotecnológicos. Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e *A. versicolor*. Os *Aspergillus* spp. são anamórficos, pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes família Trichocomaceae. Pertencem também ao grupo dos “hyalhyphomyces”, os quais formam esporos (WAINWRIGHT, 1995; KLICH, 2007; SILVA, T. M., 2009).

Sua reprodução é assexuada e caracteriza-se pela produção de fiálides e conídios em cadeia. O conidióforo de *Aspergillus* é simples, usualmente asseptado e termina numa vesícula, onde ficam inseridas as fiálides. Algumas espécies podem produzir células Hülle ou esclerócios. Muitas espécies de *Aspergillus* apresentam telemorfos e se reproduzem sexuadamente (KLICH, 2007).

É fundamental ressaltar, que além de caracteres morfológicos, isolados de *Aspergillus* podem também ser caracterizados por seus perfis de metabólitos secundários, por sua taxa de crescimento em determinada temperatura e atividade de água, por seu crescimento em ágar sacarose-creatina e pela cor dos conídios. Em geral todas as espécies de *Aspergillus* fornecem uma combinação única de diferentes

tipos de compostos orgânicos pequenos como policetídeos, peptídeos não-ribossomais, terpenoides, assim como diversos compostos de origem biossintética mista. Alguns destes compostos estão presentes em uma única espécie (GALAGAN et al., 2005; SAMSON et al., 2007). Suas colônias podem apresentar coloração branca, rosada, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada ou verde. A taxa de crescimento destes fungos varia de rápida a moderadamente rápida. Por ser um modelo biológico clássico, o gênero *Aspergillus* possui grande relevância industrial e farmacêutica por produzir diversos produtos de interesse comercial (WAINWRIGHT, 1995; SILVA, T. M., 2009). A produção de β -D-frutofuranosidases foi descrita em diversas espécies de *Aspergillus*: *Aspergillus casingii* (NOVAKI et al., 2010), *Aspergillus phoenicis* (RUSTIGUEL et al., 2010), *Aspergillus caespitosus* (ALEGRE et al., 2009), *Aspergillus terreus* (GIRALDO et al., 2014) e *Aspergillus niger* (GUIMARÃES et al., 2009), entre outros.

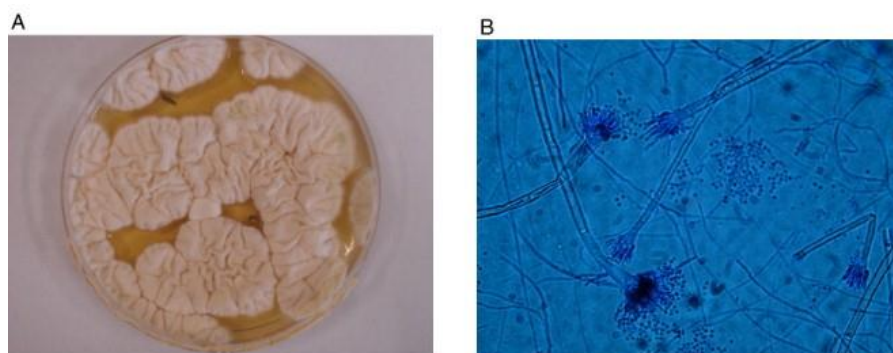
1.2 *Aspergillus niger*

A escolha da linhagem de interesse é etapa fundamental para o sucesso do processo de produção de enzimas microbianas. O microrganismo deve apresentar as seguintes características: ser seguro sob ponto de vista biológico, apresentar elevada capacidade de síntese e secreção da enzima, suportar condições ambientais adversas (pressão osmótica, temperatura, força iônica) e ser tolerante à presença de substâncias tóxicas (BON et al., 2008). Avaliando estas exigências, o microrganismo selecionado para o estudo foi o fungo filamentoso *Aspergillus niger* (figura 1).

A linhagem fúngica de *A. niger* já foi descrita como boa produtora de β -D-frutofuranosidases em fermentação submersa, onde a maior produção foi obtida em meio Khanna suplementado com bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono (GUIMARÃES et al., 2009), mas não em Fermentação em Estado Sólido (FES) como está apresentado nesse trabalho. Dados da literatura tem mostrado que além de β -D-frutofuranosidases, *A. niger* apresenta potencial para produção de outras enzimas de interesse industrial, tais como amilases, xilanases, inulinases, poligalacturonases, pectinases, β -glicosidases e lacases (SOUZA-MOTTA et al., 2005; SUDAN; BAJAJ, 2007; SILVA, T. M. et al., 2009a; MALLER et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2015). *A.*

niveus produziu lacase em farelo de trigo como fonte de carbono para clareamento de polpa de celulose. A enzima apresentou pH e temperatura ótimos de atividade de 5,0 e 55°C, respectivamente (NOGUEIRA et al., 2015).

Figura 1 - *Aspergillus niveus* (A) microscopia de luz (após 4 dias de incubação a 37°C em meio Sabouraud). (B) ampliação de 1000x.



Fonte: Auberger et al. (2008).

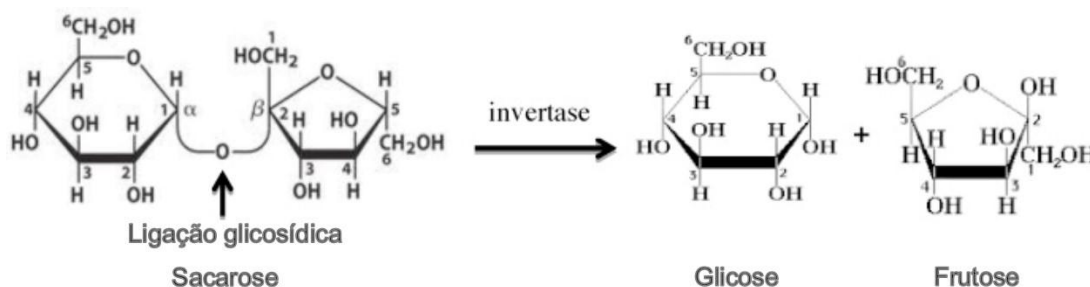
A produção de inulinases por *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128 URM foi avaliada em meio líquido contendo inulina como substrato nas concentrações de 10, 15 e 20g L⁻¹. As enzimas apresentaram pH ótimo de 4,0 e 4,8 e temperatura ótima de atividade de 45°C, respectivamente (SOUZA-MOTTA et al., 2005). O fungo *Aspergillus niveus* RS2 foi cultivado em diferentes subprodutos agrícolas para produção de xilanase, a casca de arroz foi a fonte de carbono que propiciou as maiores atividades enzimáticas. A xilanase produzida apresentou pH e temperatura ótimos de atividade 7,0 e 50°C, respectivamente (SUDAN; BAJAJ, 2007). Uma poligalacturonase também foi produzida por *A. niveus*, em fermentação submersa e fermentação em estado sólido. A casca de laranja como indutor em meio líquido favoreceu a produção da enzima. Já na fermentação sólida a casca de limão foi o melhor indutor. As enzimas apresentaram temperatura e pH ótimos de atividade de 55°C e 4,0, respectivamente (MALLER et al., 2011). A produção de uma glucoamilase em fermentação submersa em meio Khanna por *A. niveus* foi avaliada e a enzima obtida apresentou pH ótimo em 5,0 e 5,5 e temperatura ótima de atividade de 65°C, respectivamente (SILVA et al., 2009a).

1.3 β -D-frutofuranosidases

As β -D-frutofuranosidases (EC 3.2.1.26), também conhecidas como invertases, hidrolisam a ligação osídica (tipo α - β) de carboidratos possuidores de um radical β -frutofuranosil não substituído, sendo a sacarose o substrato preferencial (figura 2). Esta reação catalítica geralmente ocorre em pH entre 4,5 e 5,0, e temperatura entre 35°C e 50°C. A mistura de açúcares obtida após a inversão é denominada de açúcar líquido invertido, pois ocorre uma inversão do poder óptico rotatório da solução. Um feixe de luz polarizada ao atravessar uma solução de sacarose pura desvia o feixe de luz para a direita. Após a hidrólise a solução equimolar de glicose e frutose obtida passa a desviar o feixe de luz para a esquerda (SAID; PIETRO, 2004; CABRAL, 2012).

A β -D-frutofuranosidase foi uma das primeiras enzimas estudadas na história. Foi publicado em 1890 um artigo de revisão sobre esta enzima. Naquele momento o grau de hidrólise da sacarose era medido pela rotação específica. Esse acontecimento foi observado pela primeira vez por Biot em 1836 que chamou a substância de açúcar invertido. É importante salientar que a β -D-frutofuranosidase foi utilizada no estudo que determinou o modelo cinético de Michaelis-Menten, usado atualmente para maior parte das enzimas. Somente em 1935 um método alternativo ao polarimétrico foi apresentado para a realização das análises de hidrólise, utilizando o ácido dinitrosalicílico, propondo então diminuir o tempo de ensaio que durava até 2 horas. Este método foi melhorado por Miller e é empregado até hoje (O'SULLIVAN; TOMPSON, 1890; MICHAELIS; MENTEN, 1913; JORDAN, 1924; SUMNER; HOWELL, 1935; MILLER, 1959).

Figura 2 - Reação de hidrólise da sacarose catalisada pela β -D-frutofuranosidase.



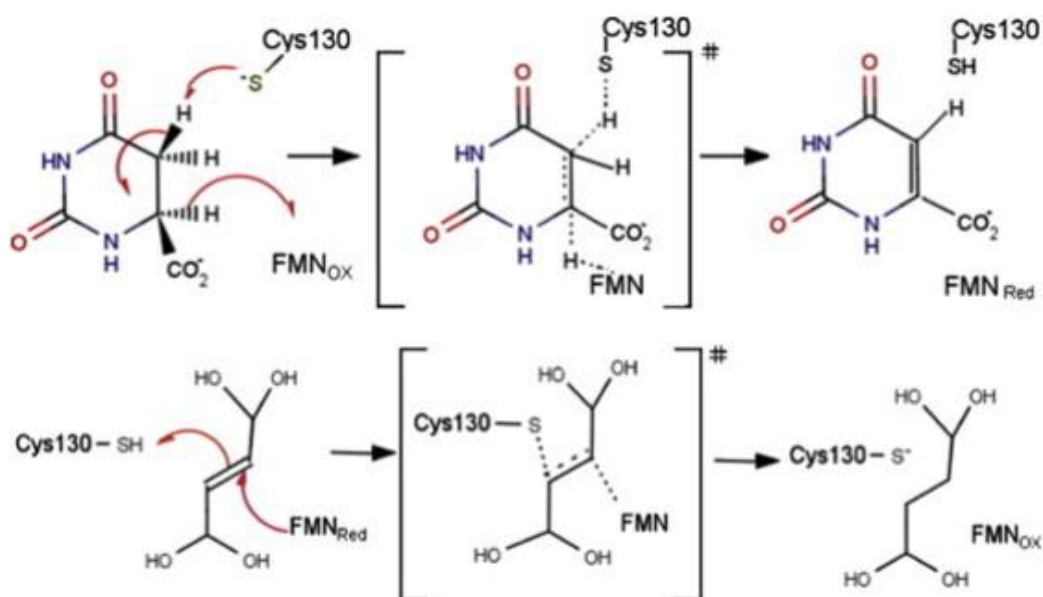
Fonte: Modificado de NADEEM et al. (2015).

O mecanismo de ação da β -D-frutofuranosidase não é totalmente elucidado, mas estudos com a enzima tem sugerido o envolvimento de um ânion carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica (WISEMAN; WOODWARD, 1975). Na figura 3 pode-se observar que um cátion de imidazólio protona o átomo de oxigênio glicosídico. A partida do grupo álcool vai deixar para trás um íon carbônico intermediário instável onde a deficiência de elétrons é espalhada sobre o átomo de C-2, bem como o átomo de oxigênio do anel. O ânion carboxilato ativo funcionará durante esta fase e a anterior para estabilizar as espécies elétron-deficientes. A próxima etapa é o ataque sobre o cátion C-2 por um átomo de oxigênio nucleofílico de um álcool ou água para produzir um frutósídeo ou frutose (SHALL; WAHEED, 1971; KULSHRESTHA et al., 2013).

As β -D-frutofuranosidases são amplamente distribuídas na biosfera. Estão presentes principalmente em plantas e microrganismos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal estirpe utilizada para a produção de β -D-frutofuranosidase comercial. Essas leveduras são encontradas em cascas de uvas e de outras frutas. A presença dessa enzima pode ser verificada na pera japonesa (*Pyrus pyrifolia*), ervilha (*Pisum sativum* L.) e aveia (*Avena sativa*), entretanto os microrganismos como *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, *A. niger* são considerados ideais para o seu estudo (ROMERO-GÓMEZ et al., 2000; UMA et al., 2010).

Diferentes isoformas de β -D-frutofuranosidases podem ser encontradas. Com base na solubilidade, pH ótimo, ponto isoelétrico e localização subcelular, as β -D-frutofuranosidases nas plantas podem ser classificados em três subgrupos bioquímicos: vacuolar (ácido solúvel), citoplasmática (alcalino solúvel) e parede celular (ácido insolúvel). É interessante observar que a presença de múltiplas isoformas de β -D-frutofuranosidases na natureza têm funcionalidades benéficas para as plantas, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento dos vegetais, as isoformas atuam na sustentação de reações bioquímicas durante a fase de crescimento, sugerindo que existe uma estreita relação entre a taxa de crescimento e o nível de atividade de β -D-frutofuranosidase (BRANDÃO et al., 2002; HASHIZUME et al., 2003; KIM et al., 2011).

Figura 3 - Mecanismo sugerido de ação da β -D-frutofuranosidase.



Fonte: KULSHRESTHA et al. (2013).

Ao contrário da maioria das enzimas as β -D-frutofuranosidases apresentam alta atividade em uma ampla faixa de pH, com pH ótimo próximo de 4,5. A atividade enzimática atinge um máximo a 55°C. A enzima é uma glicoproteína, estável a 50°C (VU; LE, 2008). Diversos microrganismos produzem diferentes tipos de β -D-frutofuranosidases, porém os fungos têm se destacado como fontes importantes dessas enzimas para a biotecnologia como mostrado na tabela 1. É interessante evidenciar que a temperatura ótima depende do grau de purificação da enzima e da concentração do substrato, sendo que os valores relatados na literatura variam de 23°C a 60°C. Outra característica relevante da maioria das β -D-frutofuranosidases é a estabilidade térmica devido a estrutura terciária da proteína, que contém interações carboidrato-proteína, com ligações cruzadas na cadeia polipeptídica (WISEMAN; WOODWARD, 1975).

As β -D-frutofuranosidases são de grande importância para a indústria de alimentos, a mesma possui excelentes propriedades com potencial de aplicação em vários âmbitos industriais. Na produção de açúcar invertido, utilizando a β -D-frutofuranosidase, elimina-se a necessidade de aquecimento da mistura a altas temperaturas, além disso o produto não precisará passar por neutralização com o uso de bases, o que resulta na economia de energia e de material. Isso demonstra a

importância da investigação de novas fontes e substratos/fontes de carbono para a produção dessa enzima que é uma das mais comercializadas industrialmente (GONÇALVES, 2013). É importante salientar que em pesquisas na área de produção, purificação e caracterização de enzimas, métodos que sejam rápidos, eficientes e pouco onerosos são de grande importância para o desenvolvimento desta área, principalmente para obter um produto capaz de ser disponibilizado ao mercado como alternativa de economia, geração de emprego e sustentabilidade.

Tabela 1 - Fungos produtores de β -D-frutofuranosidases.

Fungos	Referências	Fungos	Referências
<i>Aspergillus caespitosus</i>	(ALEGRE <i>et al.</i> , 2009)	<i>Emericela nidulans</i>	(JORGE E GUIMARÃES, 2013)
<i>Aspergillus casiellus</i>	(NOVAKI <i>et al.</i> , 2010)	<i>Fusarium oxysporum</i>	(WOLSKA-MITASZKO <i>et al.</i> , 2007)
<i>Aspergillus flavus</i>	(MATRAI <i>et al.</i> , 2000)	<i>Neurospora</i> sp.	(ARANDA <i>et al.</i> , 2006)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(MATRAI <i>et al.</i> , 2000; FLORES-GALLEGOS <i>et al.</i> , 2012)	<i>Paecylomyces variotii</i>	(GIRALDO <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aspergillus japonicus</i>	(MUSSATTO <i>et al.</i> , 2009)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	(NUERO E REYES, 2002)
<i>Aspergillus nidulans</i>	(MATRAI <i>et al.</i> , 2000; SHANKAR <i>et al.</i> , 2013)	<i>Penicillium citrinum</i>	(FLORES-GALLEGOS <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aspergillus niger</i>	(MATRAI <i>et al.</i> , 2000; NADEEM <i>et al.</i> , 2009; FLORES-GALLEGOS <i>et al.</i> , 2012; ESAWY <i>et al.</i> , 2014)	<i>Penicillium pinophilum</i>	(FLORES-GALLEGOS <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	(GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2007)	<i>Penicillium purpurogenum</i>	(FLORES-GALLEGOS <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aspergillus oryzae</i>	(KURAKAKE <i>et al.</i> , 2009)	<i>Rhizopus</i> sp.	(GOULART <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	(LUCCA <i>et al.</i> , 2013)	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	(GUTIÉRREZ-ALONSO <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus phoenicis</i>	(RUSTIGUEL <i>et al.</i> , 2010)	<i>Rhodotorula glutinis</i>	(CANLI <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aspergillus terreus</i>	(GIRALDO <i>et al.</i> , 2014)	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	(MOUELHI <i>et al.</i> , 2014)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	(UMA <i>et al.</i> , 2012)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	(CHAUDHURI E MAHESHWARI, 1996)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	(YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 2007)	<i>Fusarium solani</i>	(BHATTI <i>et al.</i> , 2006)

Fonte: Nadeem *et al.* (2015).

1.4 Fermentação em Estado Sólido

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é um processo biotecnológico frequentemente empregado em países orientais visando a elaboração de diversos alimentos como tempeh, shoyu e koji. Essa fermentação é definida como um processo onde há uma cultura de microrganismos sobre ou dentro da matriz sólida (substrato ou material inerte), em que o substrato atua como fonte de carbono onde o conteúdo líquido ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida. O substrato deve apresentar características que favoreçam o maior rendimento do processo. O principal aspecto está relacionado a acessibilidade do microrganismo a todo o meio, por esse motivo as características mais importantes da fermentação em estado sólido são: porosidade, o tamanho e o formato das partículas. É importante ressaltar que como essa fermentação é realizada na ausência de água livre, a recuperação de seus produtos requer a extração do sólido do meio fermentado. Um extrator muito utilizado é a água destilada ou deionizada (PANDEY et al., 2000; SCHMIDELL et al., 2001).

A FES apresenta algumas vantagens que não são possíveis na Fermentação Submersa (FSbm), sobretudo pela simplicidade na composição dos meios de cultura, alta produtividade, concentração elevada do produto de interesse e dificuldade de contaminação, o que gera grande interesse para esse tipo de fermentação. Entretanto a FES possui algumas desvantagens como: problemas de transferência de calor, difícil regulação de pH e umidade do meio de cultura e pré-tratamento dos suportes (ASHOKKUMAR et al., 2001).

Os microrganismos mais promissores, se tratando de FES são os fungos, principalmente pela variedade de produtos de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento das hifas que permitem maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre as partículas da matéria-prima (CORREA; ROCHA, 2009).

A FES é muito utilizada para produção de β -D-frutofuranosidases por microrganismos. A sua facilidade de operação e possibilidade de aproximação do crescimento natural de diversos microrganismos, têm atraído bastante atenção. Outro aspecto considerável e vantajoso que implica na utilização da FES para produção de

β -D-frutofuranosidases, é que este método permite a utilização de substratos provenientes da agricultura ou subprodutos da agroindústria. Em um país como o Brasil, onde a agricultura é a principal atividade econômica, os resíduos e subprodutos agrícolas, agroindustriais e florestais são extremamente abundantes. A matéria prima deve apresentar peculiaridades específicas como, composição adequada para o crescimento do microrganismo e formação do produto de interesse, baixo custo de obtenção, beneficiamento, transporte e estocagem, apresentar elevada disponibilidade e facilidade de padronização dos componentes e não contribuir para dificultar os processos de separação do produto (SCHMIDELL et al., 2001; BON et al., 2008).

A utilização desses resíduos como substrato é importante do ponto de vista industrial e ambiental, pois contribui para a redução de custos de produção e para o aproveitamento de resíduos cujo descarte no ambiente representa grande impacto negativo (SCHMIDELL et al., 2001; PIROTA et al., 2015). Como exemplos de linhagens fúngicas produtoras de β -D-frutofuranosidases em FES pode-se citar *Aspergillus casingii* cultivado em FES contendo farelo de soja (NOVAKI et al., 2010) e *Rhizopus* sp. em FES contendo farelo de trigo (GOULART et al., 2009). Rustiguel et al. (2010) purificaram e caracterizaram a β -D-frutofuranosidase produzida por *Aspergillus phoenicis*, utilizando farelo de soja como fonte de carbono. Já Alegre et al. (2009) utilizaram farelo de trigo para cultivo em FES de *Aspergillus caespitosus* para produção de β -D-frutofuranosidases.

Observa-se que os meios de cultura utilizados no processo, em sua maioria, são meios complexos advindos do setor agrícola. A utilização desses resíduos representa uma forma de agregar valor, pois a matéria-prima é um dos componentes mais relevantes nos custos de produção de uma enzima, representando cerca de 75% do custo total, sendo esta uma das razões para a aquisição de resíduos agroindustriais na formulação de meios de cultura (BON et al., 2008).

1.5 Casca da mandioca como substrato para FES

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma raiz rica em diversas substâncias nutritivas, originária do Brasil e presente na maioria dos países tropicais (PIGATTO et

al., 2015). O que a torna a terceira maior fonte de alimento nessas regiões, atrás do arroz e milho. É importante destacar que o Brasil é o quarto maior produtor mundial, atrás da Nigéria, Tailândia e Indonésia (FAOSTAT, 2014). Dados da safra brasileira de 2014 mostram que foram colhidos 23.142.091 ton. de raízes numa área de 2.345.797 ha, com uma produtividade média de 14,735 Kg/m² (IBGE, 2014). A parte mais importante da planta é a raiz, rica em fécula, utilizada tanto na alimentação humana e animal quanto como matéria-prima para diversas indústrias (TIRONI et al., 2015). A mandioca é uma planta resistente nas mais adversas condições de cultivo do solo e condições climáticas. Apenas no Brasil, existem mais de oitenta espécies, as quais são divididas em duas grandes classes: a amarga ou brava (tóxica), de uso apropriado para industrialização e a doce ou mansa (atóxica), também chamada de aipim ou macaxeira, de uso mais frequente na culinária. O que realmente as diferencia é o teor de Ácido Cianídrico (HCN). Ambos os grupos podem ser utilizados pela indústria de mandioca, sem haver diferença significativa no rendimento (SALOMAO et al., 1994).

A mandioca é uma raiz extremamente calórica, sendo o amido o principal carboidrato, é composta basicamente de película parda, entrecasca e polpa. As raízes da mandioca apresentam em média 62% de umidade, 1,3 % de fibras, 34% de carboidratos e 1,1% de cinzas. A casca de mandioca é um resíduo da indústria de farinha, resultante da pré-limpeza da mandioca na indústria. É constituída da ponta da raiz, casca (pele gretada) e entrecasca (situada entre a película corticácea e o cilindro central), e representa 5,1% da raiz com umidade de 83,1%. A casca de mandioca desidratada apresenta 58,1% de amido, 3,4% de proteína e 28,6% de fibra em detergente neutro (PRADO et al., 2000).

As indústrias de farinha utilizam mais de 80% da mandioca brasileira, sendo seus resíduos encontrados em grande quantidade. Embora não existam dados absolutos a respeito da quantidade total de resíduos produzidos, sabe-se que cerca de 10% da mandioca total utilizada na fabricação de farinha é eliminada na forma de casca e aproximadamente 3% a 5% na forma de farinha de varredura (ZEOULA et al., 2002). Os valores da composição química da raiz da mandioca e seus resíduos não são homogêneos e padronizados, isso ocorre devido às diferenças tecnológicas das

indústrias, qualidade da mão-de-obra, a metodologia de análise e principalmente as variedades da mandioca (CEREDA, 1994; PRADO, 2006).

Neste cenário, a destacada posição do Brasil na produção de mandioca, onde grande parte é voltada para a produção de farinha e fécula, traduz também a elevada produção de resíduos gerados diariamente pelas indústrias. Na área do cultivo e processamento de mandioca, há muitos anos foi identificada uma forte demanda para transformação dos resíduos, subprodutos ou co-produtos, capazes de, ao mesmo tempo, reduzir impacto ambiental e gerar recursos. Além disso a literatura é escassa a respeito da utilização deste resíduo, cascas de mandioca, como matéria-prima para obtenção de produtos com maior valor agregado (CEREDA, 2001; TIRONI et al., 2015).

1.6 Aplicações das β -D-frutofuranosidases

As β -D-frutofuranosidases apresentam um grande número de aplicações nas indústrias alimentícias e de produtos químicos. O principal emprego é na produção de açúcar invertido que é uma mistura de açúcares em solução, constituída principalmente de glicose, frutose e sacarose residual, obtida pela reação de hidrólise ou inversão da sacarose, utilizado em confecções de balas, compotas, doces, chocolates, biscoitos e refrigerantes, este açúcar não cristaliza, mesmo em altas concentrações. A utilização do açúcar invertido evita uma textura desagradável com característica arenosa ao produto e indesejável ao consumidor, além disso esse produto possui maior capacidade edulcorante, alta higroscopicidade, maior possibilidade de concentração, ponto de ebulição mais alto e ponto de congelamento mais baixo (KOBLITZ, 2008; BELCARZ et al., 2002; TALEKAR et al., 2010; NADEEM et al., 2015).

Quando o açúcar invertido é comparado com o açúcar cristal, percebem-se as diversas vantagens do primeiro em relação ao segundo (MARQUEZ et al., 2008):

- Melhoria do controle do processo de fabricação e da manutenção de condições higiênicas nas indústrias alimentícias;
- Alta pureza química evitando a geração de precipitados indesejáveis em função de elevados teores de ferro, cobre ou cálcio;

- Alto controle microbiológico, devido à menor atividade de água, dispensando a necessidade de pasteurização;
- Elimina a necessidade de investimentos em equipamentos para a dissolução e filtração do açúcar;
- Maior solubilidade, evitando a cristalização e reduzindo custos com frete;
- Reduz o ponto de congelamento, propriedade útil em produtos que são conservados em congeladores;
- Em produtos com baixo teor de gordura, evita que esses comecem a quebrar e secar;
- Possui viscosidade baixa, conferindo plasticidade a sorvetes, cremes e *fondants*;
- Maior doçura relativa do que a sacarose.

O açúcar invertido tem sido preferencialmente utilizado pela sua estabilidade em altas concentrações, e pela sua alta solubilidade, permitindo maior tempo de vida de prateleira se comparado com soluções de sacarose. É importante salientar que as qualidades do produto obtido por hidrólise enzimática são bastante superiores, quando comparadas àquelas do produto da hidrólise ácida. A hidrólise catalisada pela enzima β -D-frutofuranosidase produz um xarope de alta qualidade com ausência de hidroximetilfurfural e sem desenvolvimento de cor. Em contrapartida na hidrólise ácida o produto resultante é altamente colorido (de qualidade inferior) e a utilização de agentes corrosivos e altas temperaturas são grandes inconvenientes que comprometem a segurança e manutenção dos equipamentos em geral (AKGÖL et al., 2001; SANTANA DE ALMEIDA et al., 2005; TOMOTANI; VITOLO, 2006).

Além disso, as β -D-frutofuranosidases podem ser empregadas na produção de frutooligossacarídeos (FOS), importantes principalmente por suas propriedades funcionais, mais do que pela sua doçura. Os de origem microbiana obtidos por fermentação da sacarose têm atraído atenção especial. Atribuem-se diversos efeitos benéficos à saúde a sua ingestão como, por exemplo, prevenção de cáries dentárias, redução nos níveis séricos de colesterol total e lipídeos, além de estímulo do crescimento de bifidobactérias no trato digestório (PASSOS; PARK, 2003).

A indústria farmacêutica utiliza as β -D-frutofuranosidases na fabricação de medicamentos e agentes plastificantes para a elaboração de cosméticos. Essas

enzimas podem ser aplicadas para a remoção da sacarose de resíduos líquidos, como em melaço de cana-de-açúcar ou beterrada, evitando que o melaço cristalize durante seu armazenamento. As β -D-frutofuranosidases podem ser utilizadas no processo de produção de etanol, ampliando a concentração de açúcares redutores na fermentação, fazendo proliferar microrganismos que não fermentam a sacarose (SAID; PIETRO, 2004; KULSHRESTHA et al., 2013).

Pode-se concluir que as β -D-frutofuranosidases são enzimas necessárias em diversos âmbitos industriais, o que consolida a importância deste estudo. É uma das hidrolases mais vendidas, por esta razão é fundamental a busca por novas matérias-primas, utilização de engenharia genética e outras ferramentas que buscam otimizar o processo (NADEEM et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi o estudo da β -D-frutofuranosidase extracelular produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus niveus* cultivado em casca de mandioca em FES, investigando as melhores condições de fermentação, purificando-a e caracterizando-a bioquimicamente.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar as melhores condições de cultivo em fermentação sólida para a produção de β -D-frutofuranosidases;
- Purificar a β -D-frutofuranosidase extracelular;
- Determinar temperatura e pH ótimos de atividade, estabilidade térmica e ao pH.
- Determinar a influência de diferentes compostos na atividade enzimática da β -D-frutofuranosidase extracelular;
- Determinar os parâmetros cinéticos, como K_m e V_{max} ;
- Analisar os produtos de hidrólise da sacarose por HPLC;
- Verificar o potencial enzimático para a produção de frutooligossacarídeos (FOS).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo e manutenção da linhagem em laboratório

O fungo filamentoso *Aspergillus niveus* está depositado no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. A linhagem de *A. niveus* passou por repiques em 10 mL de meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar) contido em tubos de ensaio inclinados, previamente autoclavados (121°C; 1,5 atm, 20 minutos), e incubadas em estufa a 30°C por um período de 3 dias, sendo em seguida utilizadas ou então, armazenadas a 4°C por até 30 dias.

3.2 Obtenção de culturas em Fermentação em Estado Sólido (FES)

A partir das culturas armazenadas, a suspensão de esporos foi obtida através da raspagem da superfície do meio 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 de uma câmara de Neubauer, sendo a concentração final de 10^5 esporos por mL.

As FES foram preparadas com diferentes substratos/fontes de carbono (bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de cevada, casca da mandioca, farinha de centeio, farelo de aveia, farelo de trigo e sabugo de milho). A fermentação foi conduzida utilizando-se a razão 1:1 (m/v) de substrato/água torneira em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 10 gramas do substrato sólido e 10 mL de água torneira como agente umidificante. Foram avaliadas diferentes soluções salinas: Soluções de sais de Khanna (KHANNA et al., 1995), SR (RIZZATTI et al., 2001), YG (YANG; LIN, 1998), Vogel (VOGEL, 1964), elementos traços YG (YANG; LIN, 1998) e Elementos traços Vogel (VOGEL, 1964) e proporções (m/v) desses agentes umidificantes (1:0; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4). Prontamente os meios foram autoclavados a 120°C a 1,5 atm por 20 minutos. Após esterilização, adicionou-se 1 mL da suspensão de esporos (10^5 esporos/mL) a

cada frasco contendo meio de cultura. As culturas foram incubadas em estufa a 30°C de 1 a 18 dias com umidade relativa exterior mantida ao redor de 30%, verificada por termohigrômetro.

3.2.1 Composição das soluções salinas

Solução de sais Khanna (KHANNA et al., 1995)

• NH_4NO_3	2g
• KH_2PO_4	1,3g
• KCl	0,098g
• $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0138g
• $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,007g
• $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0066g
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0062g
• H_2O destilada	100mL

Solução de sais de Vogel [50x] (VOGEL, 1964)

• $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	150g
• KH_2PO_4	250g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10g
• NH_4NO_3	100g
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5g
• Solução (traços elementos)	5mL
• Clorofórmio	2mL
• H_2O destilada	100mL

Solução dos traços elementos Vogel

• $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5g
--	----

• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
• $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot (6\text{H}_2\text{O})$	1g
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25g
• $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05g
• $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05g
• Clorofórmio	1mL
• Água destilada	100mL

Solução de sais SR [20x] (RIZZATTI et al., 2001)

• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,24g
• KH_2PO_4	0,3g
• $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1g
• Água destilada	100mL

Solução de sais YG [20x] (YANG; LIN, 1998)

• NaNO_3	12g
• KCL	1,09g
• KH_2PO_4	3,04g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,04g
• Água destilada	100mL

Solução dos traços elementos YG

• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,2g
• H_3BO_3	1,1g
• $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5g
• $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g
• $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,16g
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,16g

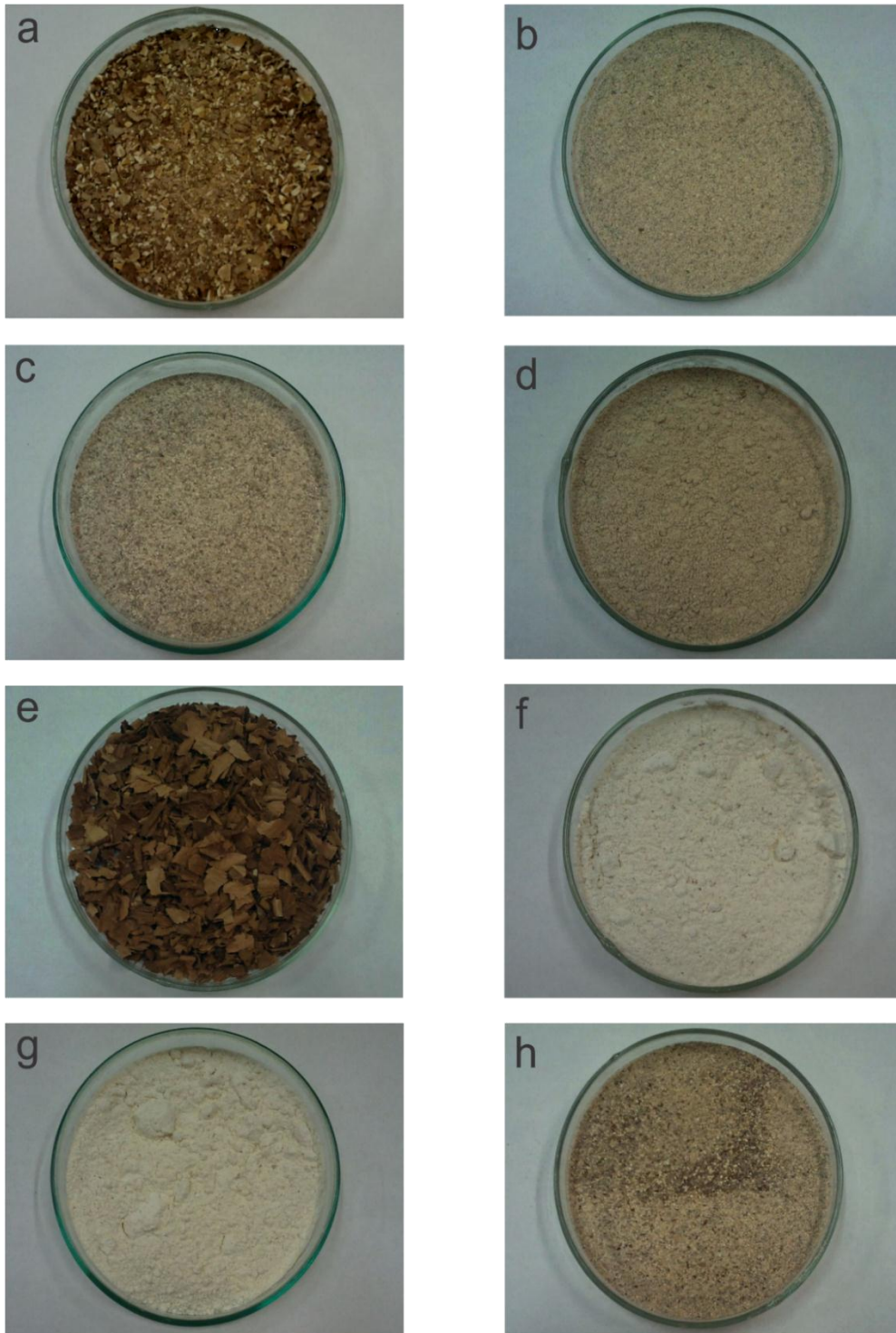
• $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,11g
• EDTA	5g
• Água destilada	100mL

3.3 Estudo do uso da casca da mandioca como substrato/fonte de carbono

As raízes e cascas da mandioca empregadas neste estudo foram doadas pelo Terreno Comunitário de Plantio de Hortaliças de Ribeirão Preto. Para uma melhor investigação da produção enzimática, os principais componentes da raiz foram separados manualmente, e identificados como película marrom (pele gretada), polpa e entrecasca, polpa, casca de mandioca (ponta da raiz, película marrom e entrecasca) (figura 4). Os raízes foram lavadas em água corrente e a secagem foi realizada na temperatura de 60 °C por 48h em estufa convencional. A secagem apresenta-se como alternativa na armazenagem segura e livre do desenvolvimento de microrganismos (VILHALVA et al., 2012).

Os produtos secos foram moídos em moinho de facas SL31, tipo Willey, com peneiras de aço inox com mesh de 10, 20, 25 e 30, correspondendo as aberturas de 2mm, 0,841mm, 0,707mm e 0,595mm de malha, respectivamente. As quatro granulometrias foram utilizadas de modo a identificar a que permitiria o melhor crescimento do microrganismo e produção de β -D-Fructofuranosidases.

Figura 4 - Granulometria da casca da mandioca: (a) 10 mesh, (b) 20 mesh, (c) 25 mesh, (d) 30 mesh. Componentes da raiz da mandioca: (e) película marrom (pele gretada), (f) polpa e entrecasca, (g) polpa, (h) casca da mandioca (ponta da raiz, película marrom e entrecasca).



Fonte: Autora.

3.4 Obtenção das Enzimas

Após o período de incubação as culturas foram quebradas com auxílio de uma espátula, em seguida adicionadas de 50mL de água destilada estéril a 4°C e agitadas com auxílio de uma barra magnética em um agitador ajustado para 140 rpm em câmara fria (4°C) por 30 min para extração e homogeneização do meio. Posteriormente os conteúdos foram filtrados a vácuo com gaze em um funil Büchner e os resíduos retidos foram descartados. Os filtrados obtidos contendo as enzimas extracelulares foram dialisados em 4 litros de água destilada, durante 24 horas, a 4°C, sendo feitas 3 trocas de água.

3.5 Determinação da Atividade Enzimática e Quantificação de Proteína

A determinação da atividade enzimática foi realizada pela quantificação dos açúcares redutores formados pela ação da invertase sobre o substrato sacarose (1%, m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, utilizando o reagente DNS (ácido 3', 5' – dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). O método foi previamente padronizado por uma curva analítica de glicose com concentração de 0,1 a 1,0 mg/mL. A mistura de reação foi constituída de 250µL do substrato e 250µL do tampão acetato de sódio 50 mM e 500µL da amostra enzimática. Após a incubação em diferentes temperaturas conforme determinado para cada experimento, alíquotas de 200µL foram retiradas em períodos apropriados e adicionadas em tubos contendo 200µL de DNS. Posteriormente os tubos foram aquecidos em banho maria fervente por 5 minutos e, após o resfriamento, adicionados 2mL de água destilada por tubo. O tubo branco consistiu de uma alíquota de 200µL da mistura de reação adicionada imediatamente a 200µL de DNS. As leituras foram realizadas em 540 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto nas condições de ensaio. Todas as dosagens de atividades foram realizadas em triplicata para o cálculo do desvio padrão.

A quantificação de proteínas foi realizada como descrito por Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão e

expressa como mg de proteína por mL de amostra. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata para o cálculo do erro padrão.

3.6 Purificação da β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *Aspergillus niveus*

O extrato bruto extracelular produzido em FES utilizando casca de mandioca como fonte de carbono/substrato, após ser dialisado *overnight* contra água destilada, foi submetido ao processo de purificação em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose (1 X 11,5 cm) previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 7,0, e mantida em temperatura ambiente. A atividade invertásica foi eluída através de um gradiente linear de NaCl (0 - 1M). Foram coletadas frações de 2,0 mL e a vazão foi mantida em 1,0 mL/min.

As frações coletadas foram monitoradas a 280nm e submetidas a avaliação de atividade enzimática como descrito no item 3.4. As frações do pico II que apresentaram atividade invertásica foram reunidas em um único “pool”, o qual foi dialisado em água destilada, a 4°C, por 24 h, posteriormente liofilizada, ressuspensa em solução tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 + KCl 10 mM e então aplicada em uma coluna cromatográfica de exclusão molecular Sepharose CL-6B (1 X 90 cm) equilibrada e eluída com este mesmo tampão. Foram coletadas frações de 1,0 mL e a vazão foi mantida 0,33 mL/min. As frações que apresentaram atividade foram reunidas em um único “pool”, o qual foi dialisado “overnight”, a 4°C contra água destilada e liofilizado para aplicação em eletroforese.

Após liofilizada, a amostra purificada foi aplicada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 8%) (LAEMMLI, 1970), utilizando-se uma fonte ajustada para 120 V e 40 mA, corados com Blue Silver (CANDIANO et al., 2004) .

3.7 Determinação da massa molecular

A massa molecular nativa para a β -D-frutofuranosidase extracelular foi determinada por filtração em coluna cromatográfica Sepharose CL-6B (1 X 90 cm). Foram utilizados como padrões de massas moleculares β -amilase (200 kDa), ácool

desidrogenase (150 kDa) e albumina de soro bovino (66 kDa). O volume livre da coluna (V_0) foi de 53 mL, determinado com Comassie Blue Dextran 2000.

A amostra purificada da β -D-frutofuranosidase foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8%) para a determinação da massa molecular desnaturada, como marcador de massa molecular foi utilizado o *Precision Plus Protein Standards, "Kaleidoscope"* da BIO-RAD (250 kDa; 150 kDa; 100 kDa; 75 kDa; 50 kDa; 37 kDa; 25 kDa; 20 kDa; 15 kDa; 10 kDa). Após a corrida eletroforética o gel foi retirado das placas e colocado para revelação com corante Blue Silver (CANDIANO et al., 2004).

3.8 Determinação da temperatura e do pH ótimos de atividade, termoestabilidade e estabilidade ao pH

Foram realizados ensaios, assim como descritos no item 3.5, em diferentes temperaturas (30°C a 90°C) e diferentes valores de pH (tampão McIlvaine 2,0 a 8,0) para definição do melhor pH para a atividade invertásica. Amostras enzimáticas também foram incubadas em diferentes temperaturas (50°C a 80°C) e diferentes valores de pH (tampão McIlvaine 2,0, 4,5, 7,0 e 8,0), em banho de gelo por uma hora e em seguida utilizadas na reação enzimática para avaliação da estabilidade térmica e ao pH, respectivamente.

3.9 Efeito de diferentes compostos na atividade β -D-frutofuranosidásica

Algumas enzimas necessitam de cofatores para alcançarem a total eficiência catalítica. Sendo assim, a influência de diferentes compostos na atividade enzimática, após procedimentos de purificação foi realizada. Os compostos (AgNO_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$, FeCl_3 , HgCl_2 , KCl , MgCl_2 , MnCl_2 , MgSO_4 , NH_4PO_4 , NH_4F , NaH_2PO_4 , NaBr , NaCl , NH_4Cl , NaF , NaNO_3 , EDTA, β -Mercaptoetanol, Ureia, Acetona, Etanol, Twenn 20 e Triton X-100) foram adicionados a mistura reacional em concentrações finais de 1mM e 5mM. Após o tempo reacional, alíquotas foram retiradas e utilizadas no ensaio para a atividade enzimática.

3.10 Análise dos produtos de Hidrólise por HPLC

A β -D-Fructofuranosidase purificada foi utilizada para análise de produção de FOS em meio reacional contendo alta concentração de sacarose ($> 20\%$ m/v) e os produtos de hidrólise da sacarose foram submetidos a análise em HPLC Varian 385-LC com detector light scattering equipado com uma coluna PL Hi-Plex Ca $8\mu\text{m}$ (300 x 77mm) mantida a 60°C e água mili-Q como fase móvel. Soluções de sacarose, glicose, frutose e kestose, foram empregadas como padrões, na concentração de 1% (m/v).

3.11 Determinação das constantes cinéticas

As constantes cinéticas Michaelis-Menten (K_m), velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e a relação $V_{\text{máx}}/K_m$ para a β -D-fructofuranosidase purificada sobre o substrato sacarose (0,1mM-20mM) foram determinadas pela representação gráfica do duplo recíproco (LINEWEAVER; BURK, 1934).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de β -D-frutofuranosidases em FES

No presente trabalho, diferentes fontes de carbono foram avaliadas quanto à influência sobre a produção de β -D-frutofuranosidases extracelulares por *A. niveus* em FES. A definição do substrato apropriado é muito importante para a produção da enzima de interesse, pois este além de ser fonte de carbono e energia, fornece compostos necessários para a indução da produção.

Como se pode observar na tabela 2, a maior produção de β -D-frutofuranosidases foi obtida utilizando-se casca de mandioca como substrato (2,52 U/g de substrato), seguida de bagaço de cevada (1,56 U/g de substrato) e farinha de centeio (0,89 U/g de substrato), respectivamente. O uso da casca da mandioca favoreceu a produção da enzima obtendo-se a maior atividade específica (2,91 U/mg de proteína), fator interessante para o uso desse substrato para produção seguida de purificação das β -D-frutofuranosidases. O segundo maior valor de atividade específica foi obtido com o uso do bagaço da cana-de-açúcar (1,66 U/mg de proteína), seguido do sabugo de milho (1,07 U/mg de proteína).

A produção de β -D-frutofuranosidases por fungos filamentosos, em substratos naturais e resíduos agroindustriais, têm sido bastante investigadas. O fungo *Fusarium graminearum* foi recentemente relatado como produtor de β -D-frutofuranosidases em níveis elevados quando cultivado em FES utilizando farelo de trigo como fonte de carbono (GONÇALVES et al., 2016). O fungo filamentoso *Paecylomyces variotii* foi capaz de produzir β -D-frutofuranosidases em FES e Fermentação Submersa (FSbm) empregando farelo de trigo e farelo de soja, respectivamente como fonte de carbono (GIRALDO et al., 2012). *Fusarium* sp. apresentou maior produção de β -D-frutofuranosidases quando cultivado em FES contendo farelo de trigo como substrato/fonte de carbono (SHAHEEN et al., 2008).

A utilização da casca da mandioca e dos resíduos da indústria da farinha como fonte de carbono para produção de enzimas foram relatados em alguns trabalhos. Uma α -amilase de *Aspergillus niger* foi produzida em FES com resíduo do

descascamento da mandioca com umidade de 45% (CRUZ et al., 2015). A avaliação da produção de xilanase por *Aspergillus casielus* utilizando casca da mandioca em FES também foi realizada (KRONBAUERK et al., 2007). A produção de frutossiltransferase (FTase), a enzima responsável pela conversão de sacarose em frutooligossacarídeos (FOS), por *Rhizopus stolonifer* LAU 07 foi estudada em FES com casca da mandioca e em FSbm utilizando água da maceração da mandioca (LATEEF; KANA, 2012). Uma inulinase de *Aspergillus japonicus* URM5633 foi produzida em FES utilizando casca da mandioca, sendo a enzima caracterizada bioquimicamente (SILVA et al., 2012). O fungo *Aspergillus niveus* produziu altos níveis de α -amilase e glucoamilase em FSbm utilizando casca da mandioca como fonte de carbono (SILVA et al., 2009b).

Tabela 2 - Substratos/Fontes de carbono utilizados para produção de β -D-frutofuranosidases por *Aspergillus niveus* em FES.

Fontes de carbono	Atividade (U/g de substrato)	Proteína (mg/g de substrato)	Atividade específica (U/mg)
Bagaço da cana-de-açúcar	0,35 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,06	1,66 $\pm$ 0,03
Bagaço de cevada	1,56 $\pm$ 0,06	2,61 $\pm$ 0,25	0,59 $\pm$ 0,15
Casca da mandioca	2,52 $\pm$ 0,22	0,86 $\pm$ 0,03	2,91 $\pm$ 0,13
Farinha de centeio	0,89 $\pm$ 0,05	1,53 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,05
Farelo de aveia	0,49 $\pm$ 0	1,28 $\pm$ 0,06	0,38 $\pm$ 0,03
Farelo de trigo	0,32 $\pm$ 0	0,88 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,03
Sabugo de milho	0,33 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,05	1,07 $\pm$ 0,04

Substrato umidificado com água de torneira (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 120 h em atmosfera úmida (30%).

Fonte: Autora.

Para prosseguimento da pesquisa a casca da mandioca foi selecionada como substrato sólido para cultivo de *Aspergillus niveus* em FES. A eficiência como suporte e fonte de nutrientes para a propagação do fungo foram destaque em relação aos demais resíduos, além disso proporcionou as condições necessárias para produção

de β -D-frutofuranosidase. O fungo cresceu de forma constante formando uma rede de micélio e em um curto espaço de tempo (5 dias). Este resíduo geralmente é descartado na maioria das indústrias causando grandes prejuízos ao meio ambiente, o que é um fator importante que deve ser considerado para a produção de enzimas e desenvolvimento sustentável.

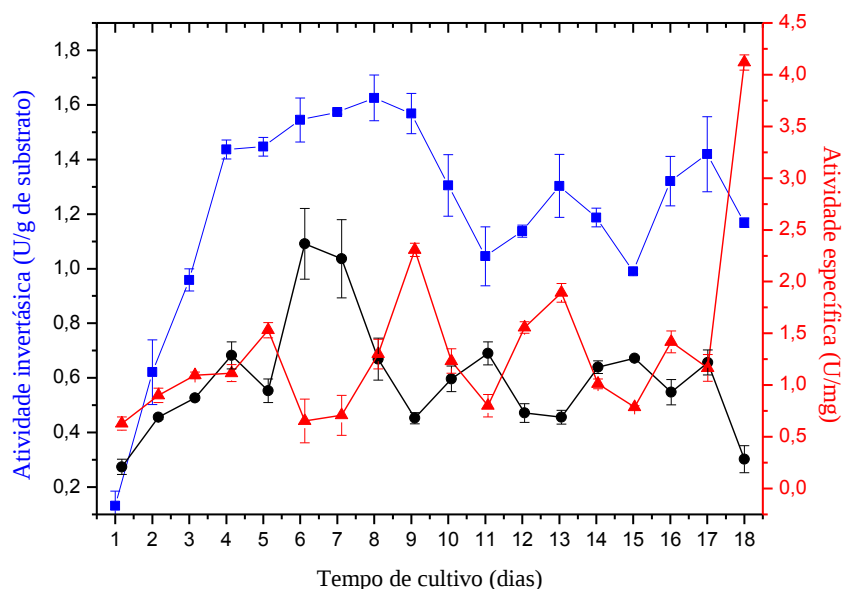
4.2 Cinética de produção de β -D-frutofuranosidase em FES

Os microrganismos apresentam características intrínsecas como o tempo e a forma de desenvolvimento que possibilita condições ótimas para a obtenção de enzimas. A melhor condição para a produção de β -D-frutofuranosidase em casca de mandioca foi avaliada pelo estudo cinético da fermentação sólida. Foram analisados o crescimento e a atividade β -D-frutofuranosidásica nessas condições e os resultados podem ser visualizados na figura 5.

A fermentação sólida foi realizada por até 18 dias, e a produção de β -D-frutofuranosidase manteve-se constante e maior do 4º ao 9º dia de cultivo. Considerando a manutenção da produção β -D-frutofuranosidásica no período de 4 a 9 dias, optou-se em trabalhar com cultivos de cinco dias onde foi obtida atividade enzimática de 1,44 U/g de substrato, sendo a específica de 1,53 U/mg de proteína, apesar da maior atividade específica no 9º dia de cultivo. Entretanto, para a etapa de purificação em coluna cromatográfica foi empregado o período de 9 dias de cultivo em razão do melhor valor de atividade específica obtido (2,30 U/mg).

Em estudos semelhantes, para a produção β -D-frutofuranosidásica pelo fungo *A. ochraceus* foi observado o tempo de 96 h de cultivo (GUIMARÃES et al., 2007). O mesmo período foi verificado para a produção enzimática pelo fungo *Fusarium* sp. (SHAHEEN et al., 2008). O período de 72 h de incubação foi utilizado para a produção de β -D-frutofuranosidases pelos fungos *A. caespitosus* (ALEGRE et al., 2009) e *A. phoenicis* (RUSTIGUEL et al., 2010). O pico de produção de β -D-frutofuranosidases por *Fusarium graminearum* foi obtido com 7 dias de cultivo (GONÇALVES et al., 2016), resultado próximo ao obtido neste trabalho com o fungo filamentoso *A. niveus* cultivado em casca de mandioca.

Figura 5. Produção de invertase extracelular pelo fungo *A. niveus* em FES utilizando casca de mandioca como substrato/fonte de carbono em função do tempo de cultivo. (■) Atividade invertásica (U/g de substrato), (●) Proteína (mg/g de substrato), (▲) atividade específica de invertase (U/mg).



Fonte: Autora.

4.3 Influência de diferentes partes que compõem a raiz da mandioca na produção de β -D-frutofuranosidases

Os componentes da casca da mandioca foram comparados separadamente quanto a produção de β -D-frutofuranosidases. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 3. Avaliando-se os valores obtidos, pode-se observar que o fungo *A. niveus* foi um bom produtor de β -D-frutofuranosidases extracelulares quando cultivado em FES utilizando o principal resíduo da industrialização da mandioca para produção de farinha, a casca da mandioca (entrecasca, película marrom e ponta da raiz), com atividade enzimática de 2,29 U/g de substrato e atividade específica de 1,44 U/mg de proteína. O uso da polpa da raiz também possibilitou valores significativos de produção da enzima (1,80 U/g de substrato) e atividade específica de 2,89 U/mg de proteína. Contudo, o foco do trabalho é o aproveitamento de resíduos agroindustriais, o que não justifica a utilização da polpa que é consumida diretamente como alimento.

A película marron (pele gretada) isoladamente não propiciou produção significativa da enzima (0,75 U/g de substrato), resultado similar foi obtido com a polpa e entrecasca (0,96 U/g de substrato). A casca da mandioca apresenta valores de matéria seca em torno de 32,45%, proteína bruta 4,51%, fibra em detergente neutro 20,51%, carboidratos totais 86,21%, lignina 5,83%, carboidratos não estruturais 66,26%, cálcio 1,13% e fósforo 0,02% (FERREIRA et al., 2008).

É interessante ressaltar que as regiões próximas às farinheiras e fecularias apresentam cenários preocupantes em relação ao impacto dos resíduos ao meio ambiente. As cascas e fibras consomem parte razoável da área física ocupada pela indústria, resultado da falta de um tratamento adequado (WOSIACKI; CEREDA, 2002).

Diversos trabalhos relatam a separação dos componentes da raiz da mandioca, porém para outras finalidades como, por exemplo, na alimentação de bovinos (PRADO, 2006), para obtenção de aguardente (OLIVEIRA et al., 2008) e na avaliação nutritiva dos co-produtos da mandioca (FERREIRA et al., 2008). Porém existe escassez de dados na literatura em relação a produção de enzimas.

Tabela 3 - Camadas da raiz da mandioca. Substratos utilizados para produção de β -D-frutofuranosidases por *A. niveus* em FES.

Fontes de carbono	Atividade (U/g de substrato)	Proteína (mg/g de substrato)	Atividade específica (U/mg)
Película marrom	0,75 $\pm$ 0,05	1,50 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,04
Polpa e entrecasca	0,96 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,02	1,79 $\pm$ 0,03
Polpa	1,80 $\pm$ 0,10	0,62 $\pm$ 0,07	2,89 $\pm$ 0,09
Casca da mandioca	2,29 $\pm$ 0,07	1,58 $\pm$ 0,11	1,44 $\pm$ 0,09

Substrato umidificado com água de torneira (1:1, m/v), granulometria do substrato de 10 mesh, sendo o cultivo realizado por 120 h em atmosfera úmida (30%).

Fonte: Autora.

4.4 Efeito da granulometria da casca da mandioca na produção de β -D-frutofuranosidases

A estrutura do substrato, tamanho e porosidade determinam a área superficial acessível ao microrganismo e à enzima. Esses fatores afetam o desenvolvimento do microrganismo e o rendimento na produção enzimática, pois interferem na acessibilidade aos nutrientes, na disposição e aderência das hifas ao substrato, nos níveis de expressão da enzima e na liberação de metabólitos para o meio extracelular. É importante salientar que a fragmentação do substrato torna possível a homogeneização do resíduo agroindustrial, que na sua grande maioria encontra-se heterogêneo (KULKARNI et al., 1999; CORREIA, 2004; RAGHAVENDRA et al., 2004).

O efeito da granulometria da casca da mandioca sobre a produção de β -D-frutofuranosidases está apresentado na tabela 4. Observando todas as granulometrias testadas, pode-se verificar que o tamanho da partícula influenciou a produção enzimática. Porém, considerando-se as granulometrias de 2 mm (10 mesh), 0,841 mm (20 mesh) e 0,707mm (25 mesh) não houve diferença significativa, diferindo do observado para a granulometria de 0,595 mm (30 mesh), para a qual foi verificada atividade enzimática inferior as demais (1,33 U/g de substrato e 1,68 U/mg de proteína). Devido aos valores obtidos a granulometria de 10 mesh da casca da mandioca foi estabelecida para a FES.

O tamanho da partícula encontra-se associado à troca de gases, que por consequência afeta o crescimento do microrganismo. Comumente, substratos com menor tamanho de partícula fornecem maior área de contato, favorecendo o crescimento do microrganismo. Entretanto, partículas muito pequenas podem resultar em aglomeração do meio fermentativo, o que pode afetar a condição respiração/aeração, resultando em um baixo crescimento microbiano e consequentemente redução na produção enzimática. De modo geral, partículas maiores de substrato fornecem melhores condições de respiração/aeração, mas oferecem também superfície limitada para o crescimento do microrganismo. Por isso há necessidade de determinação do tamanho adequado da partícula para satisfazer as condições de respiração/aeração e de crescimento do microrganismo, melhorando a produção enzimática (HASAN, 2002).

Alguns trabalhos referentes à influência da granulometria sobre a produção de enzimas e crescimento microbiano têm sido relatados. Um deles verificou a influência da composição granulométrica da casca de coco verde sobre a produção de xilanases, carboximetilcelulases, proteases e poligalacturonases por *Aspergillus niger* (COELHO et al., 2001). Como resultado, foi observado que a granulometria influenciou a produção de proteases e xilanases, sendo que a maior produção de xilanases ocorreu com fibras de coco de tamanho igual ou inferior a 1,19 mm. Em outro estudo foi verificado que o fator mais importante para a indução da produção de lacase por *Pleorotus ostreatus*, em sabugo de milho e farelo de trigo, foi a redução do tamanho da partícula para menos de 1,7 mm, aumentando a área de contato entre o micélio e o substrato (MANTOVANI et al., 2012). Já para a produção de proteases e lipases pela levedura *Candida utilis* foi verificado que quanto maior o tamanho da partícula, melhor o rendimento e a atividade enzimática mais elevada foi obtida utilizando partículas maiores do que 0,8 mm tendo como fonte de carbono resíduos do processamento do azeite de oliva (MOFTAH et al., 2012). Para continuidade do estudo, a granulometria de 10 mesh foi selecionada.

Tabela 4 - Efeito da granulometria da casca da mandioca para produção de β -D-frutofuranosidases por *A. niveus* em FES.

Granulometria	Atividade (U/g de substrato)	Proteína (mg/g de substrato)	Atividade específica (U/mg)
10 mesh	2,17 $\pm$ 0,31	1,17 $\pm$ 0,15	1,85 $\pm$ 0,23
20 mesh	2 $\pm$ 0,22	1,16 $\pm$ 0,16	1,71 $\pm$ 0,19
25 mesh	2,12 $\pm$ 0,35	1,23 $\pm$ 0,22	1,72 $\pm$ 0,28
30 mesh	1,33 $\pm$ 0,09	0,79 $\pm$ 0,02	1,68 $\pm$ 0,06

Substrato umidificado com água de torneira (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 120 h em atmosfera úmida (30%).

Fonte: Autora.

4.5 Efeito de diferentes soluções umidificantes na FES sobre a produção de β -D-frutofuranosidases

O crescimento dos microrganismos depende da umidade no meio de cultivo, em razão da influência da pressão osmótica sobre as trocas através das membranas. A atividade de água influencia no desenvolvimento, processos biológicos e enzimáticos. Cada microrganismo possui um limite mínimo de atividade de água para realizar suas atividades metabólicas, esse fator é fundamental para a produção da enzima de interesse pelo fungo (PELIZER et al., 2003).

Planejando melhorar a produção de β -D-frutofuranosidases por *A. niveus* em FES, utilizando casca da mandioca (10 mesh) foram testadas diferentes soluções salinas, água de torneira e água destilada, na proporção de 1:1 (m/v), como agentes umidificantes. Desta forma, verificou-se que os maiores valores para produção β -D-frutofuranosidásica (tabela 5) foram obtidos utilizando água destilada (2,25 U/ g de substrato), seguido por água de torneira (2,19 U/ g de substrato) e sais de Khanna (1,44 U/ g de substrato) como agentes umidificantes. A atividade específica utilizando água de torneira como umidificante foi de 1,93 U/mg de proteína, semelhante ao valor obtido de 1,92 U/mg empregando água destilada.

Observando a composição dos sais de Khanna, SR, YG e Vogel, constata-se que estas soluções possuem dois componentes similares, sendo eles $MgSO_4$ e o KH_2PO_4 , sendo que possivelmente esses elementos podem ter influenciado na inibição do desenvolvimento do microrganismo e consequentemente na produção enzimática. No caso dos elementos traços de Vogel e YG, verifica-se a presença de $MgSO_4$ apenas na primeira composição. Em relação aos elementos traços YG, outro elemento pode ter prejudicado o crescimento do microrganismo quando utilizado como agente umidificante.

É interessante salientar que a água de torneira é uma solução composta por sais e íons em pequenas concentrações, como ppm (partes por milhão) e pode ter compostos que beneficiem o desenvolvimento do microrganismo, e, por conseguinte, a produção da enzima. Aproximadamente a composição da água da torneira utilizada para este estudo foi de alumínio 0,009 mg/L, ferro 0,008 mg/L, fluoreto de 0,2 mg/L, 0,019 nitrogênio mg/L, cloro 1,15 mg/L. Portanto, mesmo que a água de torneira

apresente diferenças regionais, ainda assim, deve possuir semelhanças consideráveis em sua composição (GONÇALVES, 2013). Por não apresentar diferenças significativas em relação a água destilada, água de torneira foi selecionada como umidificante para continuidade do estudo.

Tabela 5 - Influência de diferentes soluções de sais, água destilada e água de torneira adicionadas a FES com casca de mandioca sobre a produção de β -D-frutofuranosidase por *A. niveus*.

Soluções de sais 1:1 (m/v)	Atividade (U/g de substrato)	Proteína (mg/g de substrato)	Atividade específica (U/mg)
Água destilada	2,25 $\pm$ 0,23	1,17 $\pm$ 0,10	1,92 $\pm$ 0,16
Água torneira	2,19 $\pm$ 0,16	1,13 $\pm$ 0,06	1,93 $\pm$ 0,11
Khanna	1,44 $\pm$ 0,14	1,71 $\pm$ 0,22	0,84 $\pm$ 0,18
SR	0,79 $\pm$ 0,07	0,70 $\pm$ 0,10	1,12 $\pm$ 0,09
YG	0,12 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,03
Vogel	0,07 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,09	0,14 $\pm$ 0,07
Elementos traços YG	0,08 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,03
Elementos traços Vogel	0,03 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,06

O cultivo foi realizado por 120 h, granulometria do substrato de 10 mesh, em atmosfera úmida (30%).

Fonte: Autora.

Alguns trabalhos relatam a utilização da água de torneira como agente umidificante em FES. Para a produção de β -D-frutofuranosidases pelo fungo *F. graminearum* foi utilizado água de torneira como umidificante (GONÇALVES et al., 2016). O fungo *Aspergillus phoenicis* também produziu β -D-frutofuranosidases utilizando água de torneira como umidificante (RUSTIGUEL et al., 2010). Uma co-cultura de *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum* produziu altos níveis enzimáticos de celulase e xilanase utilizando resíduos florestais umidificados com água de torneira (KAUSHAL et al., 2012). Resíduos florestais umidificados com água de torneira também foram empregados na produção de tanases por *Aspergillus fumigatus* MA

(MANJIT et al., 2008). A enzima xilanase foi produzida em farelo de trigo umidificado com água de torneira por *Bacillus pumilus* SV-85S (NAGAR et al., 2011).

Estabelecida a água de torneira como umidificante para a FES utilizando como substrato/fonte de carbono casca da mandioca (10 mesh), foi verificada a influência de diferentes proporções deste umidificante na produção de β -D-frutofuranosidase por *A. niveus* (tabela 6). A umidade em FES afeta a biossíntese e consequentemente a secreção de enzimas, pois esse fator pode causar interferência nas propriedades físicas das partículas sólidas utilizadas como fonte de carbono. Portanto, um substrato com excesso de umidade resulta em diminuição da porosidade, o que provoca dificuldade de penetração do oxigênio, sendo dessa forma prejudicial para o crescimento do microrganismo (RAMESH; LONSANE, 1990).

A proporção que mais favoreceu a produção enzimática foi 1:1 (m/v) com (1,76 U/g substrato e 1,49 U/mg de proteína), sendo que as demais proporções levaram a redução da produção da enzima. É importante destacar que as proporções de 1:3 (m/v) e 1:4 (m/v) apesar de apresentarem atividade específica de 2,81 U/mg de proteína e 0,88 U/mg de proteína, respectivamente, levaram presença de água livre não caracterizando assim FES, pois a mesma deve ocorrer na ausência de água livre.

Tabela 6 - Influência de diferentes concentrações de água de torneira na produção de β -D-Frutofuranosidases por *A. niveus* em FES.

Água torneira (m/v)	Atividade (U/g de substrato)	Proteína (mg/g de substrato)	Atividade específica (U/mg)
1:0	0	0,89 $\pm$ 0,27	0 $\pm$ 0
1:1	1,76 $\pm$ 0,14	1,18 $\pm$ 0,53	1,49 $\pm$ 0,34
1:2	1,49 $\pm$ 0,25	1,19 $\pm$ 0,17	1,25 $\pm$ 0,21
1:3	1,23 $\pm$ 0,32	0,43 $\pm$ 0,28	2,81 $\pm$ 0,30
1:4	0,64 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,37	0,88 $\pm$ 0,24

O fungo foi crescido em meio tendo casca de mandioca como fonte de carbono/substrato, sendo o cultivo realizado por 120 h a 30°C e granulometria do substrato de 10 mesh.

Fonte: Autora.

Analisando estudos semelhantes, pode-se observar a utilização da proporção de 1:2 (m/v) de água destilada para umidificar o meio de cultivo constituído de farelo de trigo para produção de β -D-frutofuranosidases pelo fungo *Rhizopus* sp. (GOULART et al., 2009). Diferentemente, foi obtida maior produção β -D-frutofuranosidásica quando farelo de trigo foi umidificado na proporção de 1:1,4 (m/v) com solução de sais minerais para cultivo de *Fusarium* sp. (SHAHEEN et al., 2008). Já para produção de β -D-frutofuranosidases em FES pelo fungo *Aspergillus phoenicis* utilizando farelo de soja como fonte de carbono a proporção da água de torneira foi de 1:0,5 (m/v) (RUSTIGUEL et al., 2010). A proporção que mais favoreceu a produção enzimática de β -D-frutofuranosidases utilizando como fonte de carbono farelo de trigo e água de torneira para o cultivo de *F. graminearum* foi de 1:1 (m/v) (GONÇALVES et al., 2016), valor similar ao encontrado neste estudo com casca de mandioca. Considerando os resultados obtidos, para prosseguimento do estudo, padronizou-se o uso de água de torneira para a umidificação da casca da mandioca na proporção de 1:1 (m/v). Esta solução foi escolhida por favorecer a produção da enzima além de ser de fácil acesso e baixo custo.

4.6 Purificação e caracterização da β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *A. niveus* em casca de mandioca

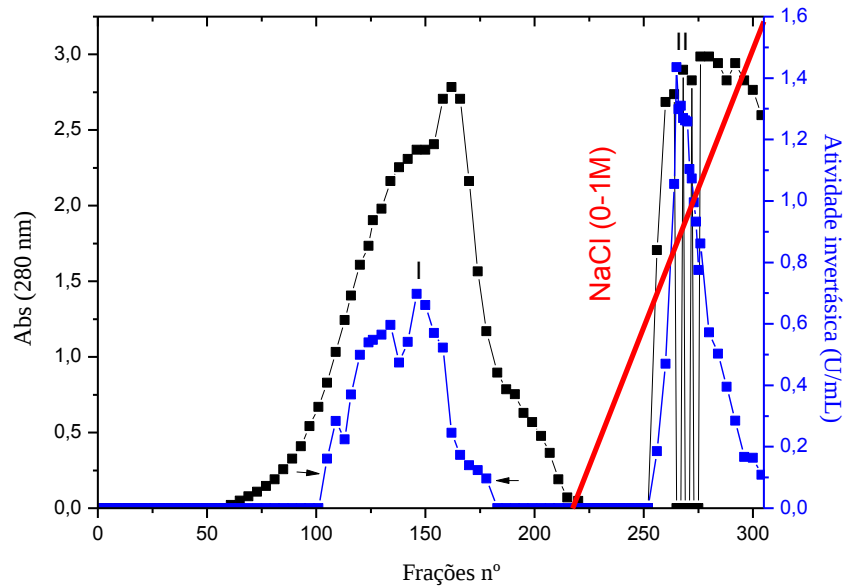
4.6.1 Purificação da β -D-Frutofuranosidase extracelular

O filtrado bruto extracelular produzido em FES contendo casca da mandioca (10 mesh) como fonte de carbono/substrato, após ser dialisado “overnight” por 24 h contra água destilada a 4°C, foi submetido ao processo de purificação em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose, previamente equilibrada em tampão Acetato de sódio 10 mM, pH 7,0, e mantida em temperatura ambiente. O pico II da atividade invertásica foi eluído com 0,25 M de NaCl através de um gradiente linear de NaCl (0 - 1M), ao passo que o pico I não interagiu com a resina (figura 6). As frações do pico II que apresentaram atividade invertásica foram reunidas em um único “pool”, e após diálise liofilizado e ressuspenso em solução tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 + KCl 10 mM e então aplicado em uma coluna cromatográfica de exclusão molecular

Sepharose CL-6B equilibrada e eluída com este mesmo tampão (figura 7) a β -D-Fructofuranosidase foi então eluída como única forma. Por meio destes procedimentos, a enzima extracelular foi purificada 6,53 vezes com recuperação de 5,27% (tabela 7). A efetividade da purificação foi confirmada por SDS-PAGE 8% corado com Comassie Blue Silver, revelou-se uma única banda proteica de 37 kDa (Figura 8).

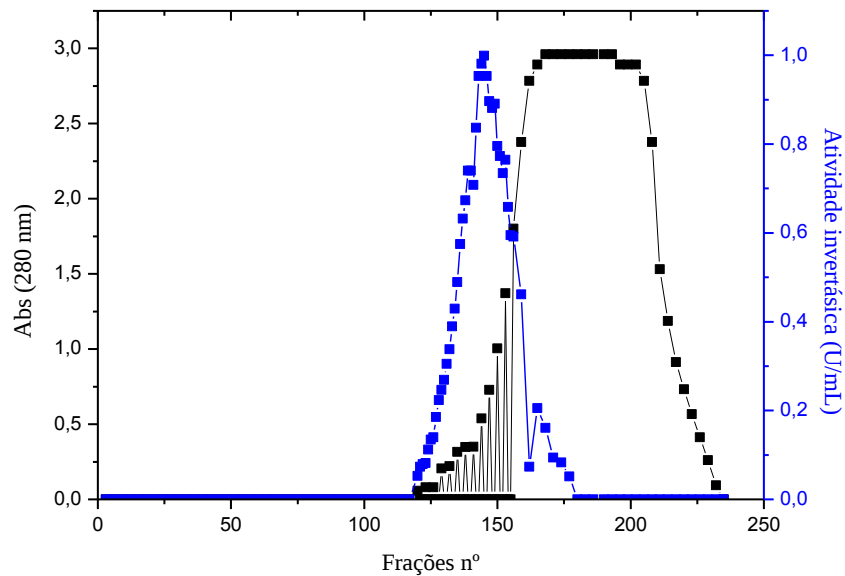
Na purificação da β -D-Fructofuranosidase intracelular produzida por *A. niveus* em fermentação submersa (GUIMARÃES et al., 2009) foi obtida recuperação de 9,8% e fator de purificação de 8,1 vezes, sendo verificado uma banda proteica de 57kDa por SDS-PAGE. Já para a β -D-Fructofuranosidase extracelular produzida por *F. graminearum* em FES o fator de purificação foi de 8 vezes com recuperação de 14%, foram obtidas duas bandas proteicas de 94 kDa e 66 kDa em SDS-PAGE (GONÇALVES et al., 2016). Para a β -D-Fructofuranosidase extracelular produzida pelo fungo *Aspergillus terreus* o fator de purificação obtido foi de 139 vezes com recuperação de 11%, duas bandas foram observadas em SDS-PAGE 6%, sendo 46,77 kDa e 26,92 kDa (GIRALDO et al., 2014). Desta forma, verifica-se que para a β -D-Fructofuranosidase em estudo foram obtidos fatores de purificação e recuperação compatíveis com os encontrados na literatura, sendo então um processo bem sucedido e viável.

Figura 6 - Perfil cromatográfico em DEAE-Celulose para a β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *A. niveus* em FES contendo casca de mandioca como substrato/fonte de carbono. Símbolos: (■) Abs 280 nm, (■) Atividade invertásica (U/mL).



Fonte: Autora.

Figura 7 - Perfil cromatográfico em Sepharose CL-6B para β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *A. niveus* em FES contendo casca de mandioca como substrato/fonte de carbono. Símbolos: (■) Abs 280 nm, (■) Atividade invertásica (U/mL).



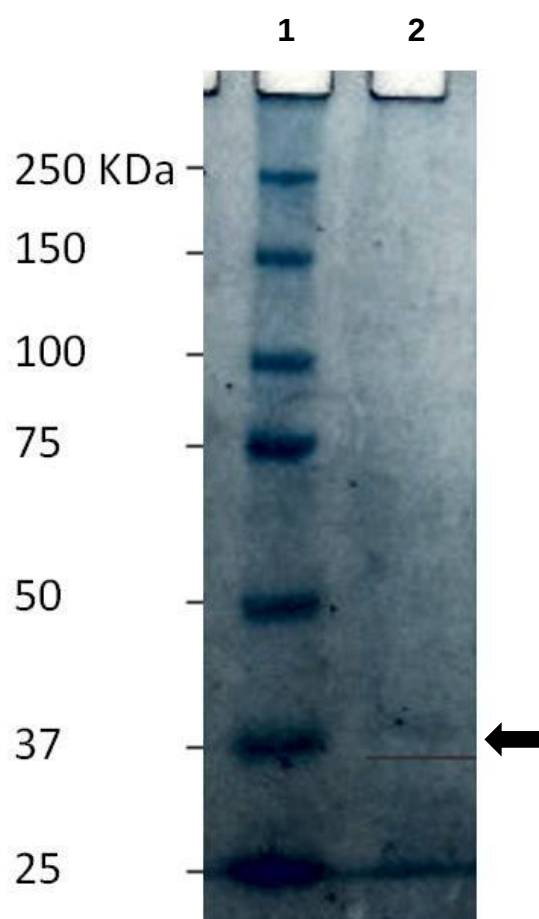
Fonte: Autora.

Tabela 7 - Purificação da β -D-Fructofuranosidase extracelular produzida por *A. niveus* em FES.

Passo	Volume (mL)	Atividade total (U totais)	Proteína total (mg totais)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato bruto	250	208	243	0,85	1	100
DEAE- pico I	30	18	42	0,43	0,5	8,6
DEAE-pico II	55	30	30	1	1,17	14,4
Sepharose CL-6B	15	10,96	1,6	5,59	6,53	5,27

Fonte: Autora.

Figura 8. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 8% para a β -D-fructofuranosidase extracelular de *A. niveus* corado com Blue Silver. Em (1) marcadores de massa molecular; em (2) β -D-fructofuranosidase purificada.



Fonte: Autora.

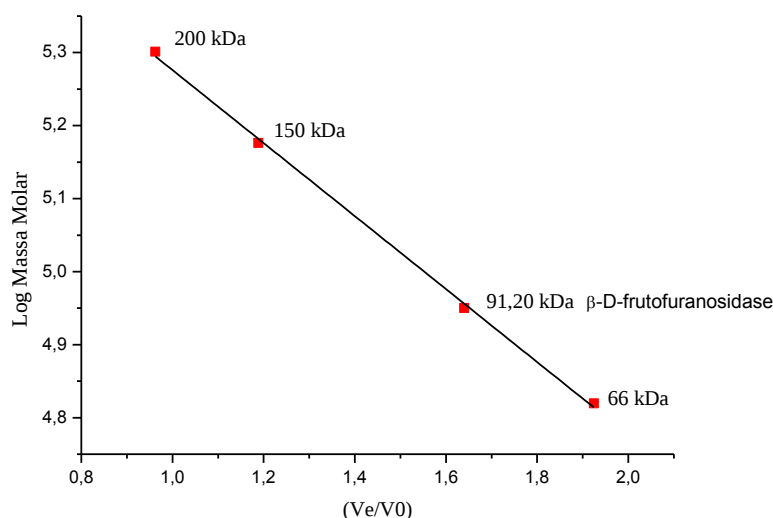
4.6.2 Determinação da Massa Molecular nativa da β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *A. niveus*

A massa molecular nativa da β -D-frutofuranosidase extracelular produzida em FES por *A. niveus* foi de 91,20 kDa determinada por coluna de filtração Sepharose CL-6B (figura 9). Encontra-se na literatura uma extensa faixa de valores para a massa molecular de β -D-frutofuranosidases. Neste âmbito, a massa molecular da β -D-frutofuranosidase intracelular produzida por *A. niveus* em fermentação submersa foi estimada em 141 kDa por Sephacryl S200 (GUIMARÃES et al., 2009). Para a β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *F. graminearum* em FES foi obtida massa molecular nativa de 159 kDa, estimada através da coluna Sephacryl S200 (GONÇALVES et al., 2016). A massa molecular nativa da β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *Aspergillus terreus* foi estimada em 74,76 kDa por Sephacryl S200 (GIRALDO et al., 2014).

Foi encontrada para a β -D-frutofuranosidase produzida por *Penicillium oxalicum* massa molecular nativa de 111 kDa (Xu et al., 2015). Já para a β -D-frutofuranosidase intracelular de *Aspergillus phoenicis* a massa molecular nativa obtida foi de 131 kDa, também estimada por Sephacryl S200 (RUSTIGUEL et al., 2015). Em outro estudo foi estimada a massa molecular nativa para a β -D-frutofuranosidase extracelular de *Saccharomyces cerevisiae* EMS-42, uma estirpe mutante, através de Sephadex G-50, obtendo-se um valor de 55 kDa (ASLAM; IKRAM-UL-HAQ; ALI, 2013). O fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* foi capaz de produzir uma β -D-frutofuranosidase extracelular com massa molecular nativa de 99,6 kDa, estimada por Sephacryl S200 (GIRALDO et al., 2012).

A partir desses valores, verifica-se que o resultado obtido para a massa molecular nativa da β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *A. niveus* está em conformidade com a literatura.

Figura 9. Determinação da massa molecular nativa produzida por *A. niveus*.



Fonte: Autora.

4.6.3 Influência da temperatura e do pH na atividade frutofuranosidásica

Variando-se a temperatura no meio reacional, foi verificada a maior atividade da enzima purificada, a 55°C. Em temperaturas superiores houve redução na atividade enzimática ficando em torno de 3 % a 70°C (figura 10A). Analisando estudos semelhantes, a β -D-frutofuranosidase de *Candida guilliermondii* MplIIa apresentou temperatura ótima de atividade igual 65 °C (PLASCENCIA-ESPINOSA et al., 2014). A β -D-frutofuranosidase produzida em fermentação em estado sólido por *Aspergillus caespitosus* exibiu temperatura ótima de atividade de 50°C, enquanto as enzimas extracelulares e intracelulares produzidas em fermentação submersa exibiram as maiores atividades a 60°C (ALEGRE et al., 2009). Os valores ótimos obtidos nesse estudo se aproximam com os dados já descritos para a β -D-frutofuranosidase intracelular produzida por *A. niveus* em fermentação submersa, ou seja temperatura ótima de 60°C (GUIMARÃES et al., 2009). Já para as β -D-frutofuranosidasas extracelulares produzidas por *F. graminearum*, as temperaturas que proporcionaram a maior atividade enzimática foram 55°C e 60°C, (GONÇALVES et al., 2016).

O pH ótimo de reação da atividade β -D-frutofuranosidásica extracelular foi de 4,5 decrescendo em valores superiores (figura 10B). O mesmo valor de pH ótimo

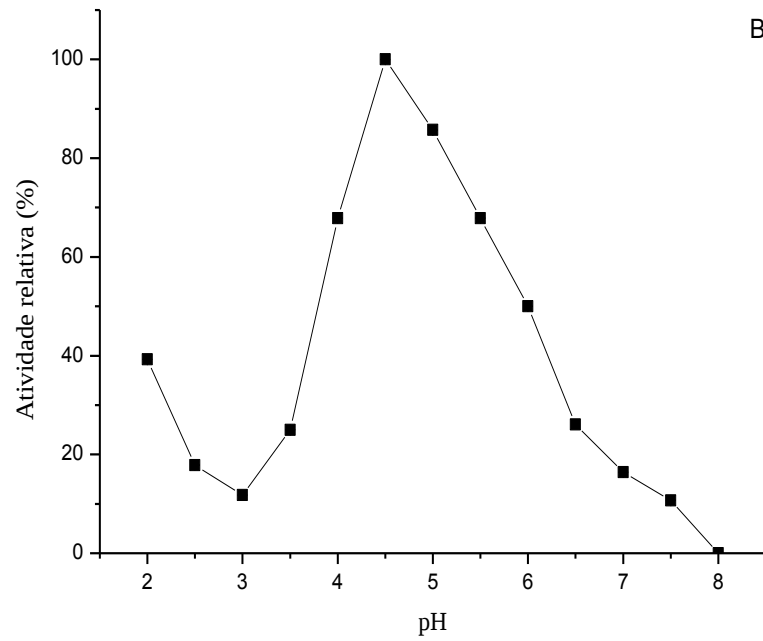
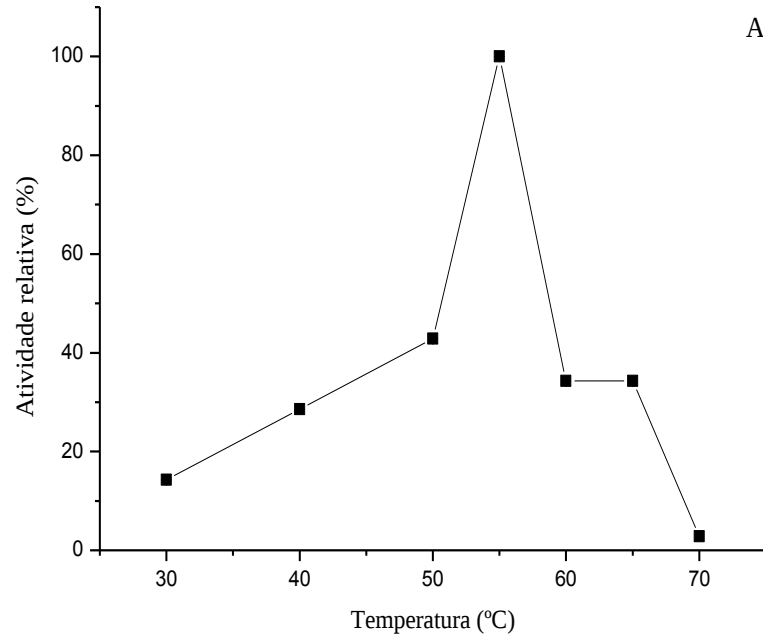
obtido nesse estudo, foi observado para a β -D-frutofuranosidase intracelular produzida por *A. niveus* (GUIMARÃES et al., 2009). A β -D-frutofuranosidase produzida por *Candida guilliermondii* MplIIa exibiu pH ótimo de atividade de 5,0 (PLASCENCIA-ESPINOSA et al., 2014). O fungo filamentoso *Aspergillus phoenicis* produziu uma β -D-frutofuranosidase com pH ótimo de atividade de 4,5 (RUSTIGUEL et al., 2015). O pH ótimo igual a 4,5 também foi obtido para as β -D-frutofuranosidases extracelulares produzidas por *F. graminearum* (GONÇALVES et al., 2016).

Em relação a estabilidade térmica, a β -D-frutofuranosidase apresentou em 60°C atividade de 80% por 60 minutos de incubação (figura 11A). Na temperatura de 50°C a enzima manteve atividade de 92,46% com 60 minutos de incubação. A estabilidade foi menor em 70°C, sendo a atividade reduzida a 9% com 5 minutos de incubação. Boa parte das β -D-frutofuranosidases encontradas na literatura são estáveis em temperaturas entre 30°C e 50°C, por um período de 30 minutos (SAID; PIETRO, 2004), o que demonstra um diferencial para possível aplicação biotecnológica da β -D-frutofuranosidase obtida de *A. niveus*. Em outro estudo, valor próximo de estabilidade térmica foi observado para as duas β -D-frutofuranosidases produzidas pelo fungo *Paecylomices variotii*; ambas foram estáveis por uma hora a 60°C (GIRALDO et al., 2012). Já o fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus* produziu uma β -D-frutofuranosidase com meia vida (T_{50}) de 60 minutos a 60°C (GUIMARÃES et al., 2007). As β -D-frutofuranosidases produzidas por *Fusarium graminearum* foram estáveis de 30°C a 50°C durante uma hora (GONÇALVES et al., 2016). Para a β -D-frutofuranosidase produzida por *Aspergillus terreus* a estabilidade térmica foi mantida por uma hora a 55°C (GIRALDO et al., 2014).

A estabilidade em diferentes valores de pH pode ser visualizada na figura 11B. Verifica-se que a β -D-frutofuranosidase manteve 50% de atividade quando incubada no pH 2,0 por 60 minutos, de 63% para o pH de 4,5 após incubação de uma hora. Já no pH 7,0 a enzima apresentou atividade de 66% no mesmo período e de 80% no pH 8,0. Analisando outros estudos, as β -D-frutofuranosidases produzidas por *Fusarium graminearum* apresentaram atividade residual acima de 80% entre o pH 3,0 e 8,0 por 30 minutos, e entre os pH 3,0 e 10,0, atividade acima de 75% por 10 minutos (GONÇALVES, 2013). Já Rustiguel et al. (2010), estudando β -D-frutofuranosidases obtidas por *A. phoenicis*, verificaram que a enzima intracelular foi estável durante uma

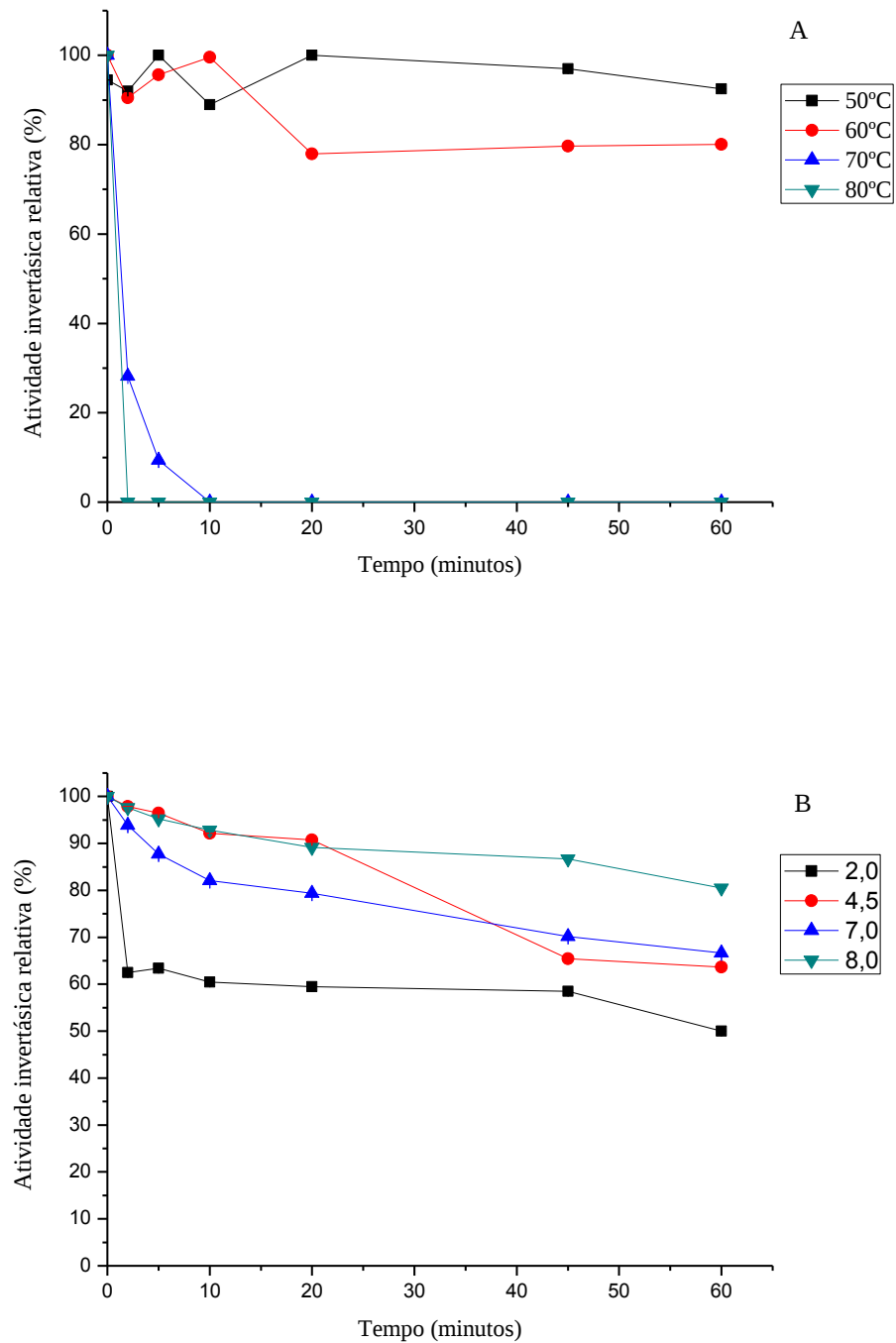
hora na faixa de pH de 3,5 a 7,0 e a extracelular quando mantida na faixa de pH de 4,5 a 8,0. Nos valores de pH de 3,7 a 10,0 a β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *E. nidulans* foi estável por uma hora, diferindo da enzima extracelular de *A. nidulans* que apresentou estabilidade em pH 3,0 e de pH 7,0 a 10,0 (ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013). Para a β -D-frutofuranosidase extracelular produzida por *A. terreus* foi observado estabilidade de uma hora, no intervalo de pH de 3,0 a 10,0 (GIRALDO et al., 2014).

Figura 10. Determinação da temperatura ótima de ensaio (A) e pH ótimo de ensaio (B) para a β -D-frutofuranosidase extracelular produzida pelo fungo *A. niveus* (0,35 U/mL=100%).



Fonte: Autora.

Figura 11. Estabilidade térmica (A) e ao Ph (B) para a β -D-frutofuranosidase extracelular produzida pelo fungo *A. niveus* (100%= 0,20 U/mL).



Fonte: Autora.

4.6.4 Influência de diferentes compostos na atividade β -D-frutofuranosidásica

Algumas enzimas necessitam de cofatores para alcançarem a total eficiência catalítica. Sendo assim, a influência de diferentes compostos na atividade enzimática, após procedimentos de purificação, foi analisada e os resultados obtidos são apresentados na tabela 8. Observa-se que a atividade invertásica extracelular foi aumentada mediante adição principalmente de 1 mM de Mn^{2+} (159,21%), sendo seguido por Fe_2SO_4 (115, 78%) e β -mercaptoetanol (111,84%). Na concentração de 5mM os mesmos compostos favoreceram a atividade enzimática 184,21%, 131,57%, e 142,10%, respectivamente. A enzima foi drasticamente inibida por $CuSO_4$. A presença desses compostos adicionais em solução pode modificar a estrutura conformacional da enzima, ou ainda, o íon pode agir diretamente no sítio ativo, afetando a interação com o substrato. O β -mercaptoetanol atua perturbando as pontes dissulfeto da enzima, o que pode causar a diminuição da atividade catalítica da enzima. Porém, o contrário foi observado no presente estudo, indicando que tais interações não são essenciais para a atividade enzimática. O composto quelante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é capaz de formar complexos estáveis com vários íons metálicos e na maioria das enzimas afeta a atividade catalítica negativamente. Em contrapartida, para a β -D-frutofuranosidase produzida por *A. niveus* em FES, o EDTA não inibiu de forma significativa a atividade enzimática, demonstrando que esta proteína não é dependente de um íon metálico divalente específico (KUNZ, 2006; RIUL et al., 2013; GONÇALVES et al., 2016).

Da mesma forma, a β -D-frutofuranosidase intracelular produzida por *A. niveus* em fermentação submersa foi ativada por Mn^{2+} , além dos íons Cu^+ , Mg^{2+} e Na^{2+} (GUIMARÃES et al., 2009). A ativação com o mesmo íon também foi demonstrada para a enzima produzida por *A. caespitosus* (ALEGRE et al., 2009). Foi encontrado que na presença de $MgSO_4$, $BaCl_2$ e $NaCl$ a atividade β -D-frutofuranosidásica da enzima produzida por *A. ochraceus* é aumentada. Entretanto na concentração de 10 mM apenas $MnCl_2$ provocou aumento da atividade enzimática (GUIMARÃES et al., 2007). Diferentemente, a β -D-frutofuranosidase produzida por *A. phoenicis* foi inibida na presença do íon Mn^{2+} , mas mostrou aumento de atividade enzimática na presença de K^+ (RUSTIGUEL et al., 2010).

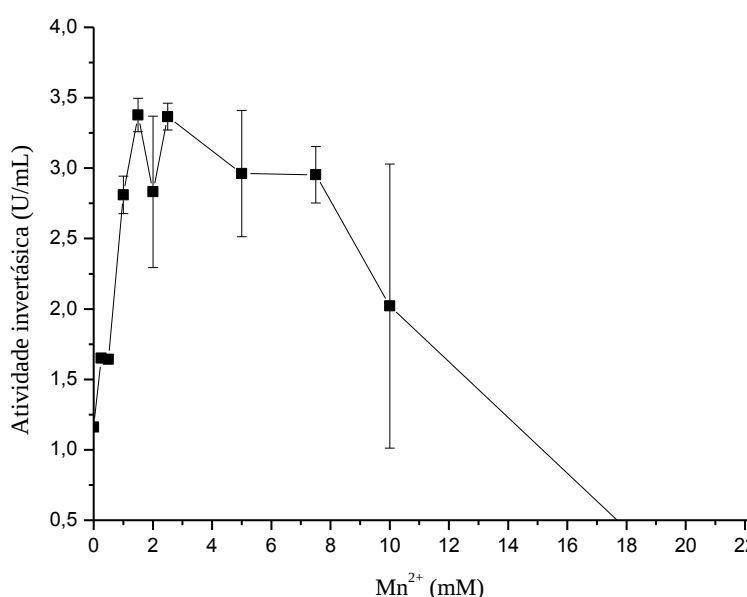
Tabela 8 - Influência de diferentes sais na atividade β -D-frutofuranosidásica extracelular do fungo *A. niveus* cultivado em FES.

Sal	Atividade relativa (%)	
	1mM	5mM
AgNO₃	105,26 $\pm$ 0,04	106,57 $\pm$ 0,13
BaCl₂	88,15 $\pm$ 0,15	98,68 $\pm$ 0,08
CaCl₂	106,57 $\pm$ 0,05	107,89 $\pm$ 0,04
CoCl₂	102,63 $\pm$ 0,07	122,36 $\pm$ 0,05
CuSO₄	25 $\pm$ 0	13,15 $\pm$ 0,03
Fe₂(SO₄)	115,78 $\pm$ 0,03	131,57 $\pm$ 0,07
FeCl₃	103,94 $\pm$ 0,03	92,10 $\pm$ 0,05
HgCl₂	35,52 $\pm$ 0,03	39,47 $\pm$ 0,02
KCl	92,10 $\pm$ 0,03	78,94 $\pm$ 0,36
MgCl₂	92,10 $\pm$ 0,04	96,05 $\pm$ 0,04
MnCl₂	159,21 $\pm$ 0,03	184,21 $\pm$ 0,05
MgSO₄	101,31 $\pm$ 0,02	107,89 $\pm$ 0,01
NH₄F	103,94 $\pm$ 0,01	113,15 $\pm$ 0,01
NaH₂PO₄	94,73 $\pm$ 0,03	94,73 $\pm$ 0,02
NaBr	98,68 $\pm$ 0,03	96,05 $\pm$ 0,04
NaCl	98,68 $\pm$ 0,06	98,68 $\pm$ 0,04
NH₄Cl	94,73 $\pm$ 0,03	96,05 $\pm$ 0,05
NaF	98,68 $\pm$ 0,06	98,68 $\pm$ 0,04
NaNO₃	105,26 $\pm$ 0	111,84 $\pm$ 0,02

O fungo foi crescido em meio tendo casca de mandioca como fonte de carbono/substrato, mantido a 30°C, por um período de 120 h. Controle: 100% = 0,76 U/mL. Fonte: Autora.

Considerando a ativação por MnCl_2 , a influência de diferentes concentrações de sal sobre a atividade enzimática foi também avaliada. Na figura 12 pode-se observar que as concentrações de 2 mM e 2,5 mM foram as que mais favoreceram a atividade enzimática com 2,83 U/mL e 3,30 U/mL, respectivamente.

Figura 12. Influência de diferentes concentrações de MnCl_2 na atividade frutofuranosidásica.



Fonte: Autora.

A influência de outros compostos sobre a atividade enzimática pode ser observada na tabela 9. A ação desnaturante da ureia ainda gera questionamentos, mas ela pode ser decorrente de elevações na solubilidade de grupos da proteína na solução aquosa do desnaturante (FONSECA et al., 2006). O efeito da ureia na atividade β -D-frutofuranosidásica foi avaliada, e na concentração mínima estudada sua atividade foi mantida em 85% e na concentração máxima em 109%, apresentando assim alta resistência a desnaturação por este agente.

Os efeitos dos solventes acetona e etanol na atividade β -D-frutofuranosidásica também foram avaliados. A acetona é um caotrópico não iônico que não foi capaz de desnaturar a β -D-frutofuranosidase obtida nesse estudo. O etanol é um caotrópico

anfifílico, ele pode se misturar com a água e acomodar melhor no solvente os grupos apolares da proteína, atenuando a força hidrofóbica, de tal forma a desfavorecer o estado nativo em detrimento do estado desnaturado (WANG et al., 1995). O etanol não promoveu queda acentuada na atividade β -D-frutofuranosidásica nas concentrações em que foi usado. Na tabela 8 verifica-se que os surfactantes Twenn 20 e Triton X-100 proporcionaram queda na atividade β -D-frutofuranosidásica; isso se deve a influência desses surfactantes nas interações hidrofóbicas da β -D-frutofuranosidase (SILVA et al., 2011).

Tabela 9 - Influência de diferentes compostos na atividade β -D-frutofuranosidásica extracelular do fungo *A. niveus* cultivado em FES.

Compostos	Atividade Relativa (%)	
	1 mM	5 mM
EDTA	90,78 $\pm$ 0,11	100 $\pm$ 0,04
Mercaptoetanol	111,84 $\pm$ 0,03	142,10 $\pm$ 0,03
Ureia	85,52 $\pm$ 0,02	109,21 $\pm$ 0,03
Acetona	102,88 $\pm$ 0,08	101,76 $\pm$ 0,04
Etanol	96,45 $\pm$ 0,02	94,77 $\pm$ 0,01
Tween 20	78,71 $\pm$ 0,03	67,11 $\pm$ 0,05
Triton X-100	85,14 $\pm$ 0,005	74,56 $\pm$ 0,02
Controle	100	100

O fungo foi crescido em meio tendo casca de mandioca como fonte de carbono/substrato, mantido a 30°C, por um período de 120 h. Controle: 100% = 0,76 U/mL.

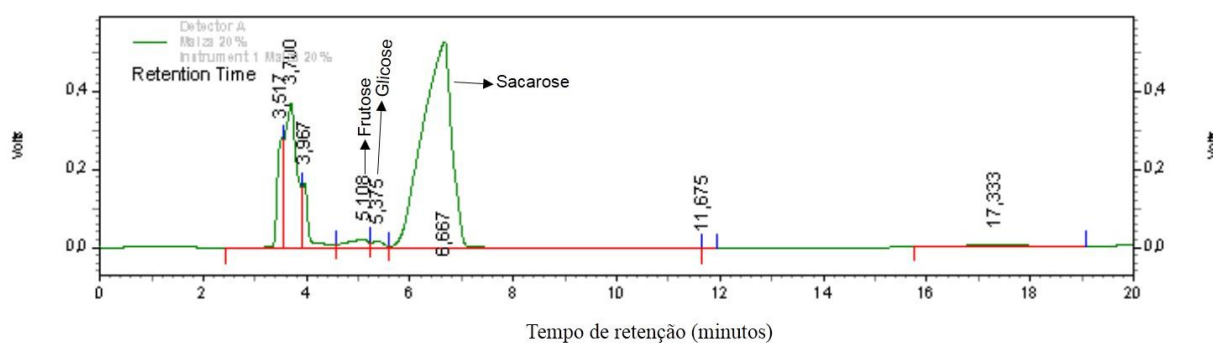
Fonte: Autora.

4.6.5 Análise dos produtos de hidrólise

Foi realizada a análise dos produtos de hidrólise da sacarose pela ação da β -D-frutofuranosidase, assim como a possibilidade de formação de frutooligossacarídeos (FOS) em alta concentração de sacarose. Verifica-se na figura 13 que ocorreu hidrólise da sacarose e formação de glicose e frutose com de 10 minutos de reação, porém nenhum pico além destes foi observado, o que mostra a não formação de frutooligossacarídeos.

Esta mesma técnica de análise foi aplicada para as β -D-frutofuranosidases produzidas por *A. terreus*, sendo encontrado frutooligossacarídeos além dos produtos de hidrólise, frutose e glicose (GIRALDO, 2011). As β -D-frutofuranosidases de *A. phoenicis* também mostraram apenas atividade hidrolítica sobre sacarose, não sendo capazes de produzir frutooligossacarídeos (RUSTIGUEL, 2009). A análise por HPLC, mostrou que a β -D-frutofuranosidase obtida de mutantes de *Yarrowia lipolytica* provocou uma velocidade de hidrólise mais elevada da sacarose, produzindo rapidamente glicose e frutose, em comparação com a β -D-frutofuranosidase de levedura selvagem (ALI; HAYYAT, 2016). Já a β -D-frutofuranosidase produzida por *Bifidobacterium longum* KN29.1 foi capaz de sintetizar frutooligossacarídeos, o que foi confirmado por TLC e HPLC (JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA et al., 2011).

Figura 13. Perfil cromatográfico em HPLC dos produtos de hidrólise da sacarose pela ação da β -D-frutofuranosidase extracelular. A reação foi conduzida por 10 minutos a 60°C. Reação com 20% de sacarose.



Fonte: Autora.

4.6.6 Determinação das constantes cinéticas

São apresentadas na tabela 9 as constantes cinéticas ($V_{\text{máx}}$, K_m , e $V_{\text{máx}}/K_m$) da β -D-frutofuranosidase extracelular purificada de *A.niveus*. A enzima foi capaz de hidrolisar a sacarose, porém não a inulina. É interessante destacar que a inulina é degradada pela inulinase (EC 3.2.1.7) através da liberação de moléculas de frutose a partir do ponto terminal do açúcar não redutor. A inulinase se diferencia da β -D-frutofuranosidase pela alta afinidade com substratos de maior massa molecular, como a inulina. A enzima que não é capaz de hidrolisar inulina, é denominada de β -D-frutofuranosidase verdadeira, como foi observado no presente estudo (VANDAMME; DERYCKE, 1983; SINGH et al., 2016).

Como pode ser observado na tabela 9, a β -D-frutofuranosidase de *A.niveus* apresentou maior afinidade pelo substrato sacarose na presença de Mn^{2+} ($K_m=0,3$ mM). A razão $V_{\text{máx}}/K_m$ foi maior na presença de 2,5 mM de MnCl_2 do que na ausência deste íon ($54,36 \text{ Umg}^{-1}\text{mM}^{-1}$). Para o fungo filamentoso *Aspergillus flavus* o K_m foi de 0,23 mM na presença de sacarose como substrato (UMA et al., 2010). Para as enzimas produzidas por *Aspergillus nidulans* (ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013) e por *Aspergillus niger* (ESAWY et al., 2014) os valores de K_m foram 2,0 mM e 117 mM, respectivamente. Foi testada além da hidrólise da sacarose, rafinose e inulina como substratos para a β -D-frutofuranosidase produzida por *A. ochraceus*, apresentando valores de K_m de 13,40 mM, 7, 37 mM e 2,66 mM, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2007). A β -D-frutofuranosidase intracelular obtida de *A. niveus* foi capaz de hidrolisar sacarose, rafinose e inulina com valores de K_m de 5,78 mM, 5,74 mM e 1,74 mM, nesta ordem (GUIMARÃES et al., 2009). O fungo *Fusarium graminearum* também produziu uma β -D-frutofuranosidase verdadeira, com valores de K_m de 31,6 mM para o substrato sacarose e 24,1 mM para rafinose (GONÇALVES et al., 2016). Desta forma, podemos verificar que a β -D-frutofuranosidase produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus niveus* apresentou boa afinidade pelo substrato sacarose, quando comparada as enzimas apresentadas anteriormente.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos da β -D-Fructofuranosidase produzida por *A. niveus*.

Parâmetros	Sacarose	Sacarose/Mn²⁺
V _{máx} (U/mg)	120,48	16,31
K _m (mM)	22,98	0,30
V _{máx} /K _m (Umg ⁻¹ mM ⁻¹)	5,24	54,36

Fonte: Autora.

5 CONCLUSÕES

O fungo *Aspergillus niveus* mostrou ser um bom produtor de β -D-frutofuranosidases extracelulares em Fermentação Sólida (FES), utilizando somente casca de mandioca como fonte de carbono/substrato.

A temperatura ótima de atividade da β -D-frutofuranosidase purificada foi elevada, com boa estabilidade térmica em 50°C e 60°C. A enzima foi estável em ampla faixa de pH, o que gera interesse industrial. A enzima exibiu maior afinidade para a sacarose na presença de Mn^{2+} do que em sua ausência. A β -D-frutofuranosidase obtida nesse estudo pode ser considerada como verdadeira, pois não foi capaz de hidrolisar a inulina. Adicionalmente a enzima não apresentou capacidade de transfrutossilação em alta concentração de sacarose para a produção de frutooligossacarídeos (FOS).

Considerando os resultados encontrados, o fungo filamentoso *A. niveus* foi uma escolha interessante, apesar de já ser descrito como bom produtor de β -D-frutofuranosidases em Fermentação Submersa, estes dados se somam com os da literatura, agora com a produção através de Fermentação em Estado Sólido utilizando a casca da mandioca, resíduo agroindustrial de baixo custo.

REFERÊNCIAS

- AKGÖL, S.; KACAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. **Food Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 281-288, 2001.
- ALBERTO, F.; BIGNON, C.; SULZENBACHER, G.; HENRISSAT, B.; CZJZEK, M. The three-dimensional structure of invertase (β -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18903-18910, 2004.
- ALEGRE, A. C. P.; POLIZELI, M. D. L. T. D.; 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, n. 3, p. 612-622, 2009.
- ALI, S.; HAYYAT, M. U. Kinetic evidence of a novel invertase in an ethyl methane sulphonate derepressed mutant of *Yarrowia lipolytica*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 48, n. 1, p. 357-362, Feb. 2016.
- ALVES, J. N. O.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of invertases by anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and teleomorphic (*Emmericella nidulans*) fungi under submerged fermentation using rye flour as carbon source. **Advances in Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 421-429, 2013.
- ARANDA, C.; ROBLEDO, A.; LOERA, O.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. Fungal invertase expression in solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 229-233, 2006.
- ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 331-338, 2001.
- ASLAM, A.; IKRAM-UL-HAQ.; ALI, S. Purification and characterization of two invertases from mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 1, p. 285-291, 2013.
- AUBERGER, J.; LASS-FLÖRL, C.; CLAUSEN, J.; BELLMANN, R.; BUZINA, W.; GASTL, G.; NACHBAUR, D. First case of breakthrough pulmonary *Aspergillus niveus* infection in a patient after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, n. 3, p. 336-339, 2008.
- BELCARZ, A.; GINALSKA, G.; LOBARZEWSKI, J. Immobilized, thermostable S-and F-forms of the extracellular invertase from *Candida utilis* can hydrolyse sucrose up to 100 C. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 23, p. 1993-1998, 2002.

BENNETT, J. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 101-107, 1998.

BHATTI, H. N.; ASGHER, M.; ABBAS, A.; NAWAZ, R.; SHEIKH, M. A. Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4617-4623, 2006.

BON, E.; FERRARA, M.; CORVO, M. **Enzimas em biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BORNSCHEUER, U.; HUISMAN, G.; KAZLAUSKAS, R.; LUTZ, S.; MOORE, J.; ROBINS, K. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 185-194, 2012.

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. 12, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, R.; ETCHEBEHERE, L.; QUEIROZ, C.; TROPIA, M.; ERNANDES, J.; GONÇALVES, T.; LOUREIRO-DIAS, M.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.; LEIPER, F. Evidence for involvement of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C in glucose induction of HXT genes and derepression of SUC2. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 2, p. 93-102, 2002.

CABAJ, J.; SOLODUCHO, J.; JĘDRYCHOWSKA, A.; ZAJĄC, D. Biosensing invertase-based Langmuir–Schaefer films: preparation and characteristic. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 166, p. 75-82, 2012.

CABRAL, B. V. **Hidrólise de sacarose por invertase imobilizada em duolite A-568 por adsorção e ligação cruzada**. 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

CADENA, P.; JERONIMO, R.; MELO, J.; SILVA, R.; LIMA FILHO, J.; PIMENTEL, M. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1595-1602, 2010.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CANLI, O.; ERDAL, S.; TASKIN, M.; KURBANOGU, E. B. Effects of extremely low magnetic field on the production of invertase by *Rhodotorula glutinis*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, n. 1, p. 35-39, 2011.

CEREDA, M. P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. In: _____. **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Pauliceia, 1994. Cap. 1, p. 11-50.

CEREDA, M. P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In: _____. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. Cap. 1, p. 1-37. (Culturas de tuberosas amiláceas latinoamericanas, v. 4).

CHAUDHURI, A.; MAHESHWARI, R. A novel invertase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: its requirement of thiol and protein for activation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 327, n. 1, p. 98-106, 1996.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. D. F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 37-42, 2001.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2013.

CORREA, L. S.; ROCHA, C. P. COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V. L. Avaliação do tempo de fermentação para produção de enzimas empregando resíduos agroindustriais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009, Uberlândia. **Anais...** [S.l.:s.n.], 2009. Disponível em: <<http://www.cobeqic2009.feq.ufu.br/uploads/media/96321501.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

CORREIA, R. **Estudo do cultivo semi-sólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduo de abacaxi**. 2004. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

CRUZ, E. A. da.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M. de.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de α -amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 245-249, 2015.

ESAWY, M. A.; KANSOH, A. L.; KHEIRALLA, Z. H.; AHMED, H. E.; KAHIL, T. A.-K.; EL-HAMEED, E. K. Production and immobilization of halophilic invertase produced from honey isolate *Aspergillus niger* EM77 (KF774181). **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 3, n. 2, p. 36-45, 2014.

FERREIRA, G. D. G.; OLIVEIRA, R. L.; CARDOSO, E. D. C.; MAGALHÃES, A. L. R.; BRITO, E. L. Valor nutritivo de co-produtos da mandioca. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, 2008.

FLORES-GALLEGOS, A.; CASTILLO-REYES, F.; LAFUENTE, C.; LOYOLA-LICEA, J.; REYES-VALDÉS, M.; AGUILAR, C.; HERRERA, R. R. Invertase production by *Aspergillus* and *Penicillium* and sequencing of an inv gene fragment. **Micologia Aplicada International**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2012.

FONSECA, L. da C.; CORRÊA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. da S.; CUNHA, C. C da; 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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Food and agricultural commodities production: top production - cassava - 2012**. Rome, 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

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.

GIRALDO, M. A. **Purificação e caracterização bioquímica da invertase extracelular produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus terreus***. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

GIRALDO, M. A.; SILVA, T. M. da.; SALVATO, F.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, L. H. S. Thermostable invertases from *Paecilomyces 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. D. P. M.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, 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. **Beta-D-frutofuranosidases de *Fusarium graminearum*: produção, purificação, imobilização e determinação das propriedades bioquímicas de enzimas solúveis e secas em Spray dryer**. 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production and characterization of an extracellular β -D-fructofuranosidase from *Fusarium graminearum* during solid-state fermentation using wheat bran as a carbon source. **Journal of Food Biochemistry**, 2016. doi:10.1111/jfbc.12253.

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

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCEI, H. F.; MORAES, M. D. L. T. de; 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, n. 1, p. 52-57, 2007.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOMERA, A. F.; TERENCEI, H. F.; MORAES, M. D. L. T. de.; 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, n. 2, p. 237-241, 2009.

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

HASAN, S. D. M. **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtida por fermentação em estado sólido**. 2002. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

HASHIZUME, H.; TANASE, K.; SHIRATAKE, K.; MORI, H.; YAMAKI, S. Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese pear fruit. **Phytochemistry**, v. 63, n. 2, p. 125-129, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Dados de previsão de safra**. 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/>>. Acesso em: 04 nov. 2015.

JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA, M.; TKACZUK, K. L.; BIELECKI, S. Biosynthesis, purification and characterization of beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* KN29.1. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1963-1972, Oct. 2011.

JORDAN, S. Commercial invert sugar. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 307-310, 1924.

KAUSHAL, R.; SHARMA, N.; TANDON, D. Cellulase and xylanase production by co-culture of *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* utilizing forest waste. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 35-41, 2012.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 242-243, 1995.

- KIM, D.; LEE, G.; CHANG, M.; PARK, J.; CHUNG, Y.; LEE, S.; LEE, T.-K. Purification and biochemical characterization of insoluble acid invertase (INAC-INV) from pea seedlings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11228-11233, 2011.
- 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.
- KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KOTWAL, S.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 311-322, 2009.
- KRONBAUER, E. A. W.; PERALTA, R. M.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K. Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 207-216, 2007.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.
- 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 β -fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 488-492, 2009.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LATEEF, A.; KANA, E. B. G. Utilization of cassava wastes in the production of fructosyltransferase by *Rhizopus stolonifer* LAU 07. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 17, n. 3, p. 7309-7316, 2012.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934.

- LUCCA, A. L.; JORGE, J. A.; 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.
- MALLER, A.; DAMÁSIO, A. R. L.; SILVA, T. M. D.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. D. L. T. D. M. Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011. doi:10.4061/2011/289206.
- MANJIT, A. Y.; AGGARWAL, N. K.; KUMAR, K.; KUMAR, A. Tannase production by *Aspergillus fumigatus* MA under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 3023-3030, Dec. 2008.
- MANTOVANI, T.; MEIRELLES, L. D. P.; VALLE, J. S. do.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Substratum formulation for laccase and mycelial biomass production of *Pleurotus ostreatus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1681-1691, 2012.
- MARQUEZ, L.; CABRAL, B.; FREITAS, F.; CARDOSO, V.; RIBEIRO, E. Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3, p. 86-92, 2008.
- MATRAI, T.; MAYER, S.; KÓKAI, S.; SALAMON, I. Invertase production of common storage moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus fumigatus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 187-191, 2000.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P.; CASTRO, H.; GIORDANO, R. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333-369, 1913.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOFTAH, O. A. S.; GRBAVČIĆ, S.; ŽUŽA, M.; LUKOVIĆ, N.; BEZBRADICA, D.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 348-364, 2012.
- MOUELHI, R.; ABIDI, F.; GALAI, S.; MARZOUKI, M. N. Immobilized *Sclerotinia sclerotiorum* invertase to produce invert sugar syrup from industrial beet molasses by product. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 1063-1073, 2014.

MUSSATTO, S. I.; AGUILAR, C. N.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1, p. 76-81, 2009.

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 and Peptide Petters**, 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, n. 8, p. 1202-1210, 2015.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; KUHAD, R. C.; GUPTA, V. K. Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 581-587, Oct. 2011.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th ed. New York: WH Freeman, 2008.

NOGUEIRA, S. D. C. P.; BATINI, J. H. de A.; MICHELIN, M.; JORGE, J. A.; MORAES, M. D. L. T de. Laccase production by *Aspergillus niveus* on SSF using wheat bran as alternative carbon source and its synergistic effect on pulp biobleaching using a mix of laccase/xylanase from the same microorganism. **Journal of Biochemical Technology**, v. 6, n. 2, p. 929-937, 2015.

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

NUERO, O.; REYES, F. Enzymes for animal feeding from *Penicillium chrysogenum* mycelial wastes from penicillin manufacture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 413-416, 2002.

OLIVEIRA, J.; COSTA, M.; ABUD, A. Uso do planejamento experimental para avaliar a produção de enzimas celulolíticas por cultivo em estado sólido. **Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 959-966, 2015.

OLIVEIRA, R. H. A. de; SUDO, J. T. C.; RESENDE, M. de. Estudo dos processos de sacarificação, fermentação e destilação de cascas e pontas de mandioca no processo de obtenção de aguardente. In: ENCONTRO INTERNO, 8; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA, 12., 2008, Uberlândia. **Anais...** [S.l.:s.n.]. Disponível em: <<https://ssl4799.websiteseuro.com/swge5/seg/cd2008/PDF/SA08-10246.PDF>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

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.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Fructooligosaccharides: implications in human health being and use in foods. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. de O.; SASSANO, C. E.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 4, p. 371-375, 2003.

PIGATTO, G. A. S.; QUEIROZ, T. R.; LOURENZANI, A. E. B. S. Social networks of cassava farmers in regions of São Paulo state. **Interações (Campo Grande)**, v. 16, n. 1, p. 75-86, 2015.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. da S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C. S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1606-1612, 2015.

PLASCENCIA-ESPINOSA, M.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, A.; PAVÓN-OROZCO, P.; VALLEJO-BECERRA, V.; TREJO-ESTRADA, S.; SOSA-PEINADO, A.; BENITEZ-CARDOZA, C. G.; HIDALGO-LARA, M. E. Effect of deglycosylation on the properties of thermophilic invertase purified from the yeast *Candida guilliermondii* Mp11la. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1480-1487, 2014.

POLIZELI, M.; RIZZATTI, A.; MONTI, R.; TERENCE, H.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

PRADO, I. N. Avaliação produtiva e econômica da substituição do milho por subprodutos industriais da mandioca na terminação de novilhas. **Campo Digital**, v. 1, n. 1, p. 37-40, 2006.

PRADO, I. N. D.; MARTINS, A. D. S.; ALCALDE, C. R.; ZEOULA, L. M.; MARQUES, J. D. A. Desempenho de novilhas alimentadas com rações contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte protéica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 278-287, 2000.

- RAGHAVENDRA, S.; RASTOGI, N.; RAGHAVARAO, K.; THARANATHAN, R. Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 6, p. 563-567, 2004.
- RAMESH, M.; LONSANE, B. Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid-state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 501-505, 1990.
- RIUL, A. J.; GONCALVES, 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, p. 126-133, 2013.
- RIZZATTI, A.; JORGE, J.; TERENCE, H.; RECHIA, C.; POLIZELI, M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 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. **Produção, purificação e caracterização bioquímica das invertases do fungo filamentoso *Aspergillus phoenicis***. 2009. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- RUSTIGUEL, C. B.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, 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, n. 3, p. 362-369, 2015.
- RUSTIGUEL, C. B.; TERENCE, 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, p. 10-15, 2010.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- SALOMAO, A.; GASI, T. M. T.; PEREIRA, P. C. G. **Caracterização de efluentes de industria de farinha de mandioca**. São Paulo: CETESB, 1994.
- 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.

SANTANA A. C.; COSTA, L.; MENDES, A.; MORAES, C. A.; GOMES, M. A.; PALHA, P. F. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 54-62, 2005.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. (Biotecnologia industrial, v. 2).

SHAHEEN, I.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, T. Production, purification and thermal characterisation of invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. under solid-state fermentation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 7, p. 1152-1158, 2008.

SHALL, S.; WAHEED, A. B. A. The mechanism of action of yeast invertase. **Biochemical Journal**, v. 122, n. 1, p. 19-20, 1971.

SHANKAR, T.; THANGAMATHI, P.; RAMA, R.; SIVAKUMAR, T. Optimization of invertase production using *Saccharomyces cerevisiae* MK under varying cultural conditions. **International Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 1, n. 3, p. 47-56, 2013.

SILVA, A. C. da.; QUEIROZ, E.; PORTO, T. S.; SPIER, M. R.; SOCCOL, C. R.; PORTO, A. L.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MOREIRA, K. A. Partial characterization of an inulinase produced by *Aspergillus japonicus* URM5633. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 671-676, Sept./Oct 2012.

SILVA, T. A. S. e.; KNOB, A.; TREMACOLDI, C. R.; BROCHETTO-BRAGA, M. R.; CARMONA, E. C. Purification and some properties of an extracellular acid protease from *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2491-2497, 2011.

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.

SILVA, T. M. da.; MALLER, A.; DAMÁSIO, A. R. de L.; MICHELIN, M.; WARD, R. J.; HIRATA, I. Y.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. de. Properties of a purified thermostable glucoamylase from *Aspergillus niveus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1439-1446, 2009a.

SILVA, T. M.; ALARCON, R. F.; DAMASIO, A. R. D.; MICHELIN, M.; MALLER, A.; MASUI, D. C.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. Use of cassava peel as carbon source for production of amylolytic enzymes by *Aspergillus niveus*. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, n. 5, 2009b. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/ijfe.2009.5.5/ijfe.2009.5.5.1629/ijfe.2009.5.5.1629>.ml> . Acesso em: 15 abr. 2016.

SINGH, P. K.; JOSEPH, J.; GOYAL, S.; GROVER, A.; SHUKLA, P. Functional analysis of the binding model of microbial inulinases using docking and molecular dynamics simulation. **Journal of Molecular Modeling**, v. 22, n. 4, 2016. doi:10.007/s00894-016-2935-y.

SOUZA-MOTTA, C. M. D.; CAVALCANTI, M. A. D. Q.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A.; LIMA FILHO, J. L. D. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 343-350, 2005.

STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J. T. V.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SUDAN, R.; BAJAJ, B. K. Production and biochemical characterization of xylanase from an alkali-tolerant novel species *Aspergillus niveus* RS2. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 491-500, 2007.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. A method for determination of saccharase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 51-54, 1935.

TALEKAR, S.; GHODAKE, V.; KATE, A.; SAMANT, N.; KUMAR, C.; GADAGKARI, S. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 10, p. 4760-4765, 2010.

TIRONI, L. F.; UHLMANN, L. O.; STRECK, N. A.; SAMBORANHA, F. K.; FREITAS, C. P. D. O. D.; SILVA, M. R. D. Desempenho de cultivares de mandioca em ambiente subtropical. **Bragantia**, v. 74, n. 1, p. 58-66, 2015.

TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1325-1331, 2006.

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.

UMA, C.; GOMATHI, D.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; PALANISWAMY, M. Production and properties of invertase from a *Cladosporium cladosporioides* in SmF using pomegranate peel waste as substrate. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S605-S611, 2012.

VAN DEN HOMBERGH, J. P.; VAN DE VONDERVOORT, P. J.; FRAISSINET-TACHET, L.; VISSER, J. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 7, p. 256-263, 1997.

VANDAMME, E. J.; DERYCKE, D. G. Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 139-176, 1983.

VILHALVA, D. A. A.; SOARES JÚNIOR, M. S.; CALIARI, M.; SILVA, F. A da. Secagem convencional de casca de mandioca proveniente de resíduos de indústria de amido. **Pesquisa Agropecuária**, v. 42, n. 3, p. 331-339, 2012.

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

VU, T.; LE, V. Biochemical studies on the immobilization of the enzyme invertase (EC. 3.2. 1.26) in alginate gel and its kinetics. **ASEAN Food Journal**, v. 15, n. 1, p. 73-78, 2008.

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

WANG, A.; ROBERTSON, A. D.; BOLEN, D. Effects of a naturally occurring compatible osmolyte on the internal dynamics of ribonuclease A. **Biochemistry**, v. 34, n. 46, p. 15096-15104, 1995.

WISEMAN, A.; WOODWARD, J. Industrial yeast invertase stabilization. **Process Biochemistry**, v. 10, p. 24-30, 1975.

WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis—key to sustainable industrial chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 713-724, 2010.

WOLSKA-MITASZKO, B.; JAROSZUK-ŚCISEŁ, J.; PSZENICZNA, K. Isoforms of trehalase and invertase of *Fusarium oxysporum*. **Mycological Research**, v. 111, n. 4, p. 456-465, 2007.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. **Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 8, n. 1, p. 27-43, 2002.

XU, Q. S.; ZHENG, X. Q.; HUANG, M. P.; WU, M.; YAN, Y. S.; PAN, J. M.; YANG, Q.; DUAN, C. J.; LIU, J. L.; FENG, J. X. Purification and biochemical characterization of a novel beta-fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1237-1246, 2015.

YANG, F.-C.; LIN, I.-H. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 6, p. 397-402, 1998.

YOSHIKAWA, J.; AMACHI, S.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. Purification and some properties of β -fructofuranosidase I formed by *Aureobasidium pullulans* DSM 2404. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 5, p. 491-493, 2007.

ZEOULA, L. M.; CALDAS NETO, S. F.; BRANCO, A. F.; PRADO, I. N do.; DALPONTE, A. O.; KASSIES, M.; FREGADOLLI, F. L. Mandioca e resíduos das farinhas na alimentação de ruminantes: pH, concentração de N-NH. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1582-1593, 2002.