

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI - ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SIMONE SALETE SAGGIORATO DAL MASO

**Produção de Frutotransferase e β -Frutofuranosidase por *Aspergillus*
niger ATCC 9642 em Cultivo Submerso**

ERECHIM, RS - BRASIL

Abril de 2019

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI - ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Produção de Frutossiltransferase e β -Frutofuranosidase por *Aspergillus*
niger ATCC 9642 em Cultivo Submerso**

SIMONE SALETE SAGGIORATO DAL MASO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

Abril de 2019

Produção de Frutossiltransferase e β -Frutofuranosidase por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em Cultivo Submerso

Simone Salete Saggiorato Dal Maso

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Prof^a. Dr^a. Jamile Zeni
Orientadora (URI – Erechim)

Prof^a. Dr^a. Geciane Toniazzo Backes
Orientadora (URI – Erechim)

Prof.^a Dr^a. Elisandra Rigo
(UDESC – Pinhalzinho/SC)

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago
(URI – Erechim)

Erechim, Abril de 2019.

D136p Dal Maso, Simone Salete Saggiorato

Produção de frutossiltransferase e β -frutofuranosidase por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em cultivo submerso / Simone Salete Saggiorato Dal Maso. - 2019.

48 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

“Orientação: Dra Jamile Zeni; Dra Geciane Toniazzi Backes”

1. Bioprodução 2. Micro-organismos 3. Frutossiltransferase
4. β - Frutofuranosidase I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela benção de poder viver esta conquista.

Ao meu esposo Dinamar e meus filhos, Luisa e Daniel, por me apoiarem nesta caminhada e serem meu maior incentivo para evoluir. Aos meus pais, por terem me dado a oportunidade do estudo, se privando muitas vezes de seu conforto para satisfazer minha vontade de estudar e crescer, minha eterna gratidão.

Aos amigos e família, que muitas vezes cuidaram e acolheram meus filhos durante minha ausência.

As colegas da salinha, que sempre tinham uma palavra amiga e um sorriso para amenizar os dias mais tensos dessa caminhada.

As queridas colegas, Carolina Oro, Bruna Putton, Diane Rigo, Vanessa Bombana, Verônica Baldon, Patrícia Fonseca e tantas outras que não mediram esforços para ajudar quando se fez necessário.

As professoras e minhas orientadoras Jamile Zeni e Geciane Toniazzi Backes, pelos ensinamentos, orientação, paciência, compreensão e carinho que tiveram comigo durante esse projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-ERECHIM, pelos conhecimentos compartilhados e amizade.

Aos bolsistas de iniciação científica, do laboratório de Biotecnologia de Alimentos, que sempre estiveram dispostos a colaborar com os experimentos propostos e por compartilharem vivências tornando esta jornada mais alegre e gratificante, em especial ao Leonardo, Thais, Marília, Gabriela e Vitória.

As queridas Rosicler Colet e Ilizandra Aparecida Fernandes pelo apoio e colaboração ao projeto.

À URI- ERECHIM, que forneceu todas as ferramentas para a realização deste trabalho. À CAPES pela concessão de bolsa e apoio financeiro. E, por fim, a todos que não citei, mas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

Resumo: Diante do interesse biotecnológico e industrial das enzimas Frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase), o objetivo deste trabalho foi a produção dessas enzimas na forma extracelular por fungo filamentoso em cultivo submerso. Para a bioprodução foram utilizados os fungos filamentosos *Aspergillus niger* ATCC 9642 e *Penicillium brasilianum*, com variação da composição do meio de produção, concentração de esporos, tempo, temperatura e pH. A enzima produzida foi caracterizada parcialmente quanto a temperatura e pH ótimos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Avaliou-se também a estabilidade térmica frente a diferentes valores de pH e de estocagem. O micro-organismo *A. niger* ATCC 9642 apresentou a maior atividade de FTase (8,79 $\mu\text{mol/min.mL}$) e FFase (9,32 $\mu\text{mol/min.mL}$) em meio de produção composto por 20 % sacarose, 0,5% extrato de levedura, NaNO_3 1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KH_2PO_4 0,25 %, NH_4Cl 0,5 %, NaCl 0,25 % a pH 5,5, temperatura de 25 °C, tempo de 48 h e concentração de esporos 5×10^7 esporos/mL. A FTase e FFase apresentaram pH e temperatura ótimos de 2,39 e 60 °C, respectivamente. A estabilidade térmica demonstrou que a enzima FFase é mais estável termicamente quando comparada a FTase. A estabilidade frente a diferentes pHs demonstrou comportamento semelhante para FTase e FFase, sendo o pH ótimo entre 2,0 e 3,0. A FTase e FFase apresentaram estabilidade de estocagem em temperatura de congelamento e refrigeração por aproximadamente 400 hs. Os parâmetros cinéticos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$, para o substrato de sacarose foram de 24,60 $\mu\text{mol/min.mL}$ e 104,16 $\mu\text{mol/min.mL}$ para FTase e 3,91 $\mu\text{mol/min.mL}$ e 20,24 $\mu\text{mol/min.mL}$ para FFase.

Palavras-chave: Bioprodução, micro-organismos, frutossiltransferase, β -frutofuranosidase.

Abstract: Due to the biotechnological and industrial interest of the enzymes Fructosyltransferase (FTase) and β -fructofuranosidase (FFase), the objective of this work was the production of these enzymes in the extracellular form by filamentous fungi in submerged culture. For bioproduction the filamentous fungi *Aspergillus niger* ATCC 9642 and *Penicillium brasilianum* were used, with variation of the composition of the production medium, spore concentration, time, temperature and pH. The enzyme produced was partially characterized as the optimum temperature and pH, K_m and V_{max} . Thermal stability was also evaluated against different pH and storage values. The microorganism *A. niger* ATCC 9642 presented the highest activity of FTase (8.79 $\mu\text{mol} / \text{min.mL}$) and FFase (9.32 $\mu\text{mol} / \text{min.mL}$) in a production medium composed of 20 % sucrose, 0.5 % yeast extract, 1 % NaNO_3 , 0.05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.25 % KH_2PO_4 , 0.5 % NH_4Cl , 0.25 % NaCl at pH 5.5, 25 °C temperature, 48 h concentration of spores 5×10^7 spores/mL. FTase and FFase presented optimum pH and temperature of 2.39 and 60 °C, respectively. Thermal stability has shown that the enzyme FFase is more thermally stable when compared to FTase. Stability against different pHs showed similar behavior for FTase and FFase, the optimum pH being between 2.0 and 3.0. FTase and FFase showed storage stability in freezing and refrigeration temperature for approximately 400 hours. The kinetic parameters, K_m and V_{max} , for the sucrose substrate were 24.60 $\mu\text{mol} / \text{min.mL}$ and 104.16 $\mu\text{mol} / \text{min.mL}$ for FTase and 3.91 $\mu\text{mol} / \text{min.mL}$ and 20.24 $\mu\text{mol} / \text{min.mL}$ for FFase.

Keywords: Bioproduction, microorganisms, fructosyltransferase, β -fructofuranosidase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de Invertases por micro-organismos em Fermentação Submersa.....	17
Tabela 2. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de temperatura e pH ótimos das enzimas frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase).....	23
Tabela 3. Bioprodução de frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase) e com os fungos <i>A. niger</i> e <i>P. brasiliense</i>	27
Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e respostas em atividade de FTase e FFase em função de temperatura e pH ótimos.....	32
Tabela 5. Coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t (2) do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de FTase e FFase em função da temperatura e pH ótimos.	32
Tabela 6. Análise de variância para atividade de FTase e FFase do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos.....	33
Tabela 7. Valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de FTase e FFase.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da formação de FOS pela reação catalisada por FTase e FFase com formação de (a) Kestose (GF2) e Glicose (G) e de (b) Nistose (GF3) e Glicose (G).....	14
Figura 2. Estrutura química da sacarose e dos frutooligossacarídeos: Kestose (GF2); Nistose (GF3) e Frutossilnistose (GF4).....	19
Figura 3. Mecanismo de ação das enzimas na hidrólise da sacarose.....	25
Figura 4. Produção de frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase) em função da concentração de esporos do fungo filamentoso <i>A. niger</i> ATCC 9642.....	29
Figura 5. Produção de FTase e FFase em função do pH do meio de cultivo do fungo filamentoso <i>A. niger</i> ATCC 9642.....	30
Figura 6. Produção de FTase e FFase em função da temperatura de incubação do fungo filamentoso <i>A. niger</i> ATCC 9642.....	31
Figura 7. Curva de contorno para atividade de FTase (a) e de FFase (b) em função da temperatura (°C) e pH ótimos.....	33
Figura 8. Estabilidade térmica das enzimas FTase e FFase produzidas por <i>A. niger</i> ATCC 9642.....	35
Figura 9. Estabilidade das enzimas FTase e FFase frente a diferentes pHs.....	36
Figura 10. Estabilidade de estocagem das enzimas FTase e FFase frente a (a) temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), (b) refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) e (c) temperatura de congelamento ($- 80^{\circ}\text{C}$).....	37
Figura 11. Determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de FTase e FFase por <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642 seguindo modelo de Lineweaver-Burk, sendo (a) resultados para FTase e (b) par FFase.....	48

LISTA DE ABREVIações, SÍMBOLOS E UNIDADES

BDA	Batata Dextrose Ágar
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of USA</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FES	Fermentação em Estado Sólido
FSbm	Fermentação Submersa
FFase	β -frutofuranosidase
FTase	frutosiltransferase
FOS	Frutooligossacarídeos
G	Glicose
GF	Sacarose
GF2	1-Kestose
GF3	Nistose
GF4	1- β frutofuranosil nistose
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
K _m	Constante de Michaelis-Menten
PDA	Potato dextrose ágar
rpm	Rotação por minuto
S	Substrato
T	Temperatura
UF	Unidade de atividade frutofuranosidase
UTF	Unidade de de atividade frutosiltransferase
V _{máx}	Valor máximo
V ₀	Velocidade inicial
YPD	Yeast Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 FRUTOSILTRANSFERASES (FTase) e β -FRUTOFURANOSIDASES (FFase)..	14
2.2 PRODUÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASES E β -FRUTOFURANOSIDASES.....	15
2.2.1 Micro-organismos produtores de frutossiltransferases e β -frutofuranosidases.....	16
2.3 APLICAÇÕES DA FRUTOSILTRANSFERASES E β -FRUTOFURANOSIDASES	17
2.4 ESTADO DE ARTE	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 MICRO-ORGANISMOS	21
3.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE BIOPRODUÇÃO	21
3.2.1 Seleção do meio de cultura e do micro-organismo	21
3.2.2 Avaliação da concentração de esporos.....	22
3.2.3 Avaliação da influência do pH no meio	22
3.2.4 Avaliação da influência da temperatura na produção	22
3.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS.....	23
3.3.1 Temperatura e pH ótimos.....	23
3.3.2 Avaliação da estabilidade térmica.....	23
3.3.3 Avaliação da estabilidade frente a diferentes pHs	23
3.3.4 Avaliação da estabilidade de estocagem	23
3.3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos	24
3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	24
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 BIOPRODUÇÃO DE FTase e FFase.....	27
4.1.1 Seleção do meio de cultura.....	27
4.1.2 Influência da concentração de esporos.....	28
4.1.3 Influência do pH no meio.....	30
4.1.4 Influência da temperatura.....	30
4.5 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS.....	31
4.5.1 Temperatura e pH ótimos.....	31
4.5.2 Estabilidade térmica	35
4.5.3 Estabilidade frente a diferentes pHs.....	35
4.5.4 Estabilidade de estocagem	37
4.5.5 Parâmetros cinéticos (k_m e v_{max}).....	38
5 CONCLUSÕES	39
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
APÊNDICE A	48

1 INTRODUÇÃO

As invertases foram uma das primeiras carboidrases a serem estudadas na história da enzimologia. Em 1928 foi identificada pela primeira vez sua atividade, observando que a levedura de panificação fermentava a sacarose em meio aquoso. A partir desse momento, muitos experimentos foram realizados sobre a invertase, favorecendo assim, seu uso como enzima modelo para estudos de catálise enzimática (VITOLO et al., 2001; CABRAL, 2012).

Duas classes de enzimas são particularmente úteis para a produção de FOS em escala industrial: frutossiltransferases (EC 2.4.1.9) e β -frutofuranosidases (EC 3.2.1.26), também chamadas de invertases (ANTOŠOVÁ & POLAKOVIČ, 2001; GHAZI et al., 2007). Essas enzimas possuem grande importância industrial, como a produção de FOS e fabricação de colutórios para higiene bucal (UMA et al., 2010), também são utilizadas para a hidrólise de açúcares como rafinose, gentianose e inulina (RUBIO et al., 2002), nas indústrias sucroalcooleiras, podem ser utilizadas para remoção da sacarose de resíduos líquidos, como melaço de cana de açúcar ou beterraba, evitando assim a cristalização do açúcar, além de participarem da produção do etanol (VITOLO, 2004). A FTase e FFase geralmente provém de vários micro-organismos, incluindo os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus* e *Aureobasidium pullulans* (HIDAKA et al., 1988; GHAZI et al., 2007; KURAKAKE et al., 2010; ZHANG et al., 2017).

Aspectos importantes na fermentação submersa para a produção das enzimas devem ser estabelecidos para cada cepa, por exemplo, altos teores de sacarose na cultura são preferidos por esses micro-organismos, além de agitação, pH, temperatura e outros nutrientes e requisitos nutricionais, como alguns minerais no meio de cultura, são necessários para a síntese de FOS (WON, 1996; MUÑIZ-MÁRQUEZ et al., 2018).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo produzir frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase) por fungos filamentosos em cultivo submerso. Para atingir esse objetivo foram delineadas as seguintes etapas caracterizando-se como objetivos específicos:

- Selecionar micro-organismos com potencial de produção de frutossiltransferase (FTase) e β -Frutofuranosidase (FFase).
- Avaliar produção de FTase e FFase em diferentes meios de cultivo;
- Avaliar a influência da concentração de esporos do inóculo na produção de FTase e FFase em função do tempo;

- Avaliar a influência do pH inicial do meio na produção de FTase e FFase;
- Avaliar a influência da temperatura de fermentação na produção de FTase e FFase;
- Estudar a influência do pH e temperatura da reação na atividade enzimática;
- Avaliar a estabilidade de estocagem, térmica e a diferentes pHs das enzimas;
- Determinar os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$).

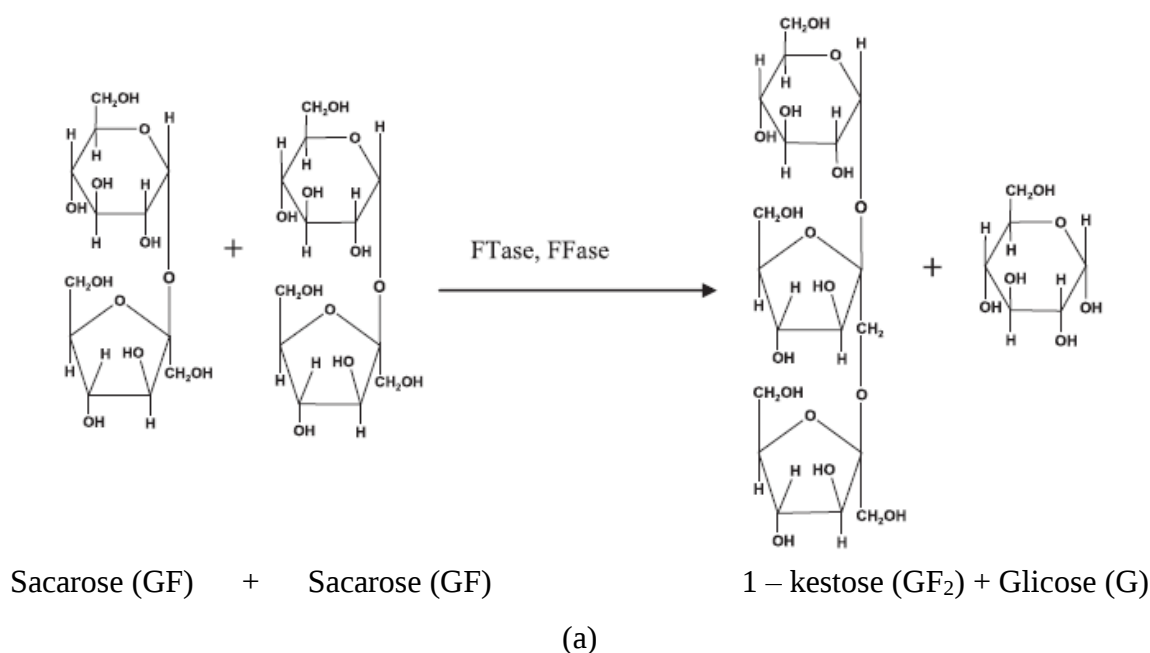
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

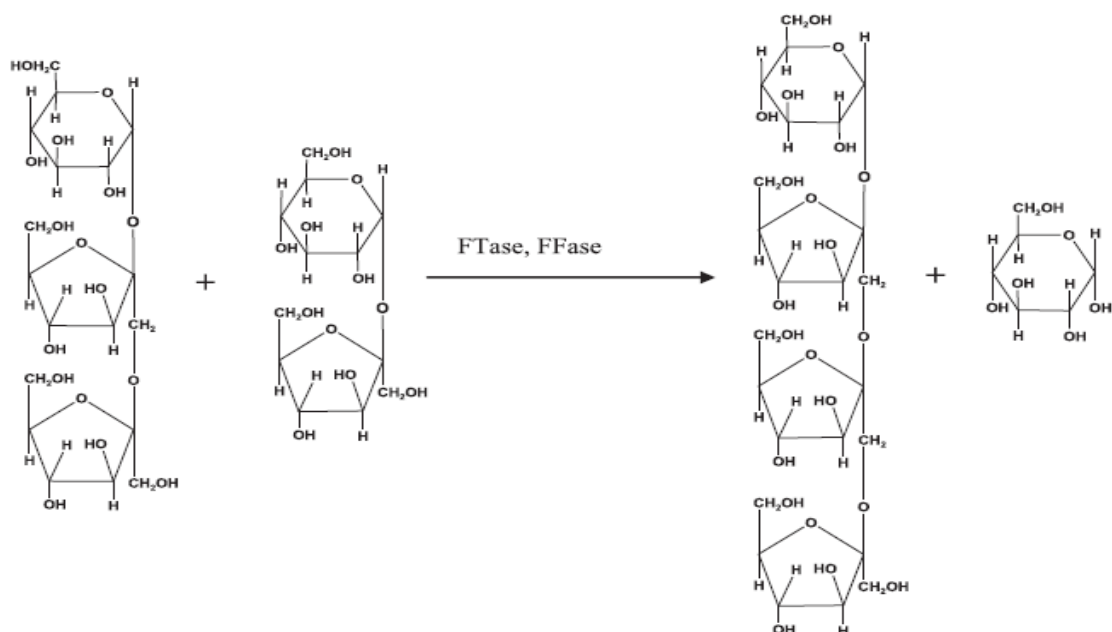
2.1 FRUTOSILTRANSFERASES (FTase) e β -FRUTOFURANOSIDASES (FFase)

As invertases foram uma das primeiras carboidrases a serem estudadas na história da enzimologia. Em 1928 foi identificada pela primeira vez sua atividade, observando que a levedura de panificação fermentava a sacarose em meio aquoso. A partir desse momento, muitos experimentos foram realizados sobre a invertase, favorecendo assim, seu uso como enzima modelo para estudos de catálise enzimática (VITOLO et al., 2001; CABRAL, 2012). As leveduras são a principal fonte de invertase industrial, sendo 80 % proveniente das enzimas extracelulares e os 20 % restantes são intracelulares (CABRAL, 2012).

Conhecidas também como β -frutofuranosidases (FFase) a invertase hidrolisa a ligação glicosídica (tipo α - β) de carboidratos que possuem um radical β -fructofuranosil não substituído, sendo a sacarose o substrato preferencial (RUSTIGUEL et al., 2010). As β -frutofuranosidases ou invertases são enzimas pertencente à família GH32 das glicosil hidrolases, no qual são encontrados 370 membros de origem vegetal, fúngica e bacteriana, estando agrupadas em diferentes isoformas de acordo com o seu pH de acionamento (VARGAS et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2016). A Figura 1 apresenta a reação de formação de FOS a partir das invertases (FFase e FTase).

Figura 1. Representação esquemática da formação de FOS pela reação catalisada por FTase e FFase com formação de (a) kestose (GF₂) e Glicose (G) e de (b) Nistose (GF₃) e Glicose (G).





1 – kestose (GF₂) + Sacarose (GF)

Nistose (GF₃) + Glicose (G)

(b)

Fonte: GANAIE et al. (2013).

A frutossiltransferase (FTase) também é uma enzima utilizada na indústria, sua ação enzimática ocorre através da hidrólise da sacarose na ligação β -1,2 e a transferência do grupo frutossil para uma outra molécula, podendo ser a própria sacarose ou frutooligossacarídeos (FOS), ocorrendo a liberação da glicose, sendo essa reação chamada de transfrutosilação (GANAIE et al., 2017)

A razão entre UTF (unidade de atividade de frutossiltransferase) e UF (unidade de atividade de frutofuranosidase) é importante para indicar a intensidade relativa da atividade transfrutolisante (GANAIE et al., 2013).

2.2 PRODUÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASES E β -FRUTOFURANOSIDASES

Os fungos filamentosos podem produzir β -frutofuranosidas quando inoculados em fermentação submersa (FSbm) (GUIMARÃES et al., 2009) ou também, fermentação em substrato sólido (FSS) (GIRALDO et al., 2012; ALEGRE et al., 2009). A fermentação submersa é o processo de produção de enzimas mais utilizado industrialmente. Neste processo a célula desenvolve-se no meio de cultivo contendo o substrato, geralmente sob agitação (VANDENBERGHE et al., 2000). As fermentações geralmente são realizadas em biorreatores aerados e agitados, e os parâmetros operacionais, tais como pH, temperatura, agitação, consumo de O₂ e formação de CO₂, são controlados rigidamente (BON et al., 2008).

A produção de β -D-frutofuranosidase por microrganismos pode ser influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio e outros componentes minoritários do meio de cultivo, pela temperatura, pH inicial do meio e tempo de crescimento do micro-organismo. A otimização desses parâmetros para se produzir esta enzima pode ser feita testando-se individualmente cada uma das condições ou de maneira conjunta, analisando-se vários parâmetros simultaneamente, através de experimentos de planejamento fatorial (RIUL et al, 2013).

2.2.1 Micro-organismos produtores de frutossiltransferases e β -frutofuranosidases

Os fungos utilizados para produção microbiana em larga escala das enzimas frutossiltransferases (FTases) e β -frutofuranosidases (FFases) são do gênero *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Aerobasidium* sp., *Penicillium* sp. e *Arthrobacter* sp. (MUÑIZ-MARQUÉZ et al., 2018). A Tabela 1 apresenta as principais variáveis de processo e fontes de carbono encontradas na literatura para produção de invertases por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* em fermentação submersa.

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

Segundo Maia e colaboradores (2017), dentre os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, as espécies *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* possuem o *status* de GRAS (*Generally recognize as safe* – geralmente reconhecido como seguro) definido pela FDA – USA (*Food and drug administration*), devido sua baixa toxicidade e seu uso na preparação e produção de alimentos e bebidas. As propriedades das enzimas diferem dependendo de cada micro-organismo, composição do meio de cultura, tipo de fermentação e principalmente fontes de carbono utilizadas (DOMINGUEZ et al., 2014).

Ganaie et al. (2013), ao realizar um screening de micro-organismos para a produção de FOS, concluíram que *Aspergillus flavus* NFCCI 2364, *Aspergillus niger* SI 19 e *Penicillium islandicum* MTCC 4926 apresentam capacidade de sintetizar este composto.

Tabela 1. Produção de invertases por micro-organismos em fermentação submersa

Micro-organismo	Fonte de carbono	Tipo de Fermentação	Condições de Produção	Referência
<i>A. caespitosus</i>	Farelo de trigo	FSbm	1 x 10 ⁵ esporos/mL; pH 6,0; 40 °C; 72 h	ALEGRE et al. (2009)
<i>A. flavus</i>	Sacarose (3%)	FSbm	1 x 10 ⁶ esporos/mL; pH 5,0; 30 °C; 168 h	UMA et al. (2010)
<i>A. nidulans</i>	Sacarose (1%)	FSbm	1 x 10 ⁶ esporos/mL; pH 6,0; 30 °C; 24 h	ALVES et al. (2013)
	Farinha de Centeio (1%)	FSbm		
<i>A. niger</i>	Sacarose (2%)	FSbm	pH 5,0; 30 °C; 48 h	NADEEM et al. (2009)
<i>A. niger</i> IMI 303386	Sacarose (2%)	FSbm	pH 7,4; 28 °C; 48 h	NGUYEN et al. (2004)
<i>A. niger</i>	Sacarose (17,5%)	FSbm	pH 6,0; 30 °C; 24 h	L'HOCINE et al. (2000)
<i>A. niveus</i>	Bagaço de cana de açúcar	FSbm	1 x 10 ⁵ esporos/mL; pH 4,5; 40 °C; 72h	GUIMARÃES et al. (2008)
<i>A. parasiticus</i>	Bagaço de cana de açúcar	FSbm	1 x 10 ⁵ esporos/mL; pH 6,0; 30 °C; 24 h	LUCCA et al. (2013)
<i>Rhodotorula</i> sp LEB-V10	Sacarose	FSbm	pH 4,5; 30 °C; 24 h	HERNALSTEENS et al. (2008)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Sacarose	FSbm	1 x 10 ⁶ esporos/mL; pH 4,0; 28 °C	ALMEIDA et al. (2005)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Sacarose	FSbm	1 x 10 ⁴ esporos/mL; pH 5,5; 28 °C; 48 h	POONAWALLA et al. (1965)
<i>Fusarium solani</i>	Sacarose	FSbm	1 x 10 ⁶ e 1 x 10 ⁷ esporos/mL pH 5,0; 30 °C; 48 h	BHATTI et al. (2006)

Fonte: O autor

2.3 APLICAÇÕES DA FRUTOSILTRANSFERASES E β -FRUTOFURANOSIDASES

As β -D-frutofuranosidases já têm sido utilizadas comercialmente na fabricação de colutórios para a higiene bucal e também na produção do xarope de açúcar invertido, sendo este

muito empregado na confecção de bombons com centro parcial ou totalmente liquefeitos, já que este açúcar não cristaliza, mesmo em altas concentrações (UMA et al., 2010), outra aplicação para esta enzima é a utilização para a hidrólise de açúcares como a rafinose, gentianose e inulina (RUBIO et al., 2002) Nas indústrias sucroalcooleiras, pode ser utilizada para a remoção da sacarose de resíduos líquidos, como em melaço de cana de açúcar ou beterraba, evitando assim a cristalização do açúcar durante o armazenamento do melaço. As β -D-frutofuranosidases também podem participar do processo de produção do etanol, aumentando a concentração de açúcares redutores nos meios de cultura, fazendo propagar micro-organismos que não fermentam a sacarose (VITOLO, 2004). A invertase também é utilizada na produção de bebidas alcoólicas, ácido láctico, glicerol, e outros produtos em que se utiliza a sacarose (KULSHRESTHA et al., 2013; TODERO, 2018). Estas enzimas possuem aplicação nas indústrias farmacêuticas, como agentes plastificantes em cosméticos, e também em eletrodos enzimáticos para a detecção da sacarose. Além disso, podem agir como agente antimicrobiano, visto que possuem poder antioxidante, ajudando na prevenção de infecções microbianas (KULSHRESTHA et al., 2013; TODERO, 2018).

Existe ainda, uma ânsia pelo emprego dessas β -D-frutofuranosidases para a produção dos frutooligossacarídeos, que são açúcares não convencionais, não metabolizados pelo organismo humano e também, com baixas calorias. Apresentam importância na indústria de açúcar devido as suas excelentes características funcionais prebióticas, atraindo maior atenção por esta característica do que pela sua doçura (FERNÁNDEZ et al., 2004).

O desenvolvimento e a procura por alimentos que proporcionam algum tipo de benefício à saúde é uma tendência e constata a aceitação crescente do papel da dieta na prevenção e tratamento de doenças e do bem-estar pessoal. O mercado de alimentos funcionais cresce ano após ano, sendo justificado pela preocupação dos consumidores com a saúde (PANESAR et al., 2016; SANTOS et al., 2018).

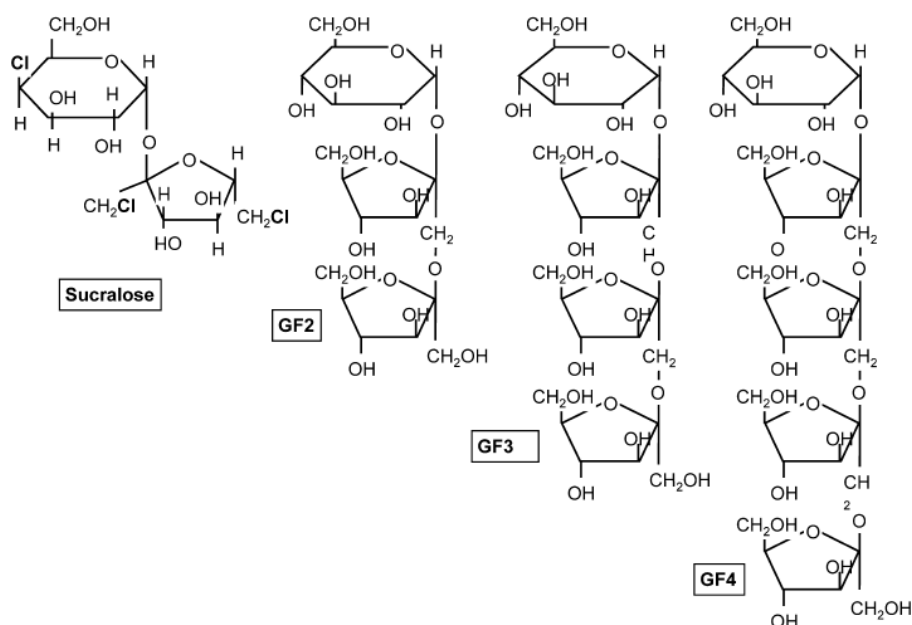
Esta mudança na visão do desenvolvimento de produtos que possam trazer benefícios a saúde, tem forçado as organizações e indústrias de alimentos a desenvolverem formulações que atendam as novas tendências. Dentre os alimentos funcionais, destaca-se grande interesse pelos frutooligossacarídeos (FOS), por apresentarem características funcionais favoráveis, e consequentemente uma importância comercial que vêm de encontro as novas necessidades dos consumidores (PANESAR et al., 2016).

Os FOS apresentam várias características benéficas, dentre elas, pode-se citar as baixas calorias, propriedades não-carcinogênicas, além de estimular o aumento da população de bifidobactérias do cólon, além disso, os FOS não são hidrolisados pelas enzimas do trato digestivo, dessa forma são submetidos à fermentação no cólon, incentivando o crescimento de

bactérias benéficas (BARBOSA, 2007; NOBRE et al., 2015). Segundo Nobre et al. (2015), a ingestão diária de oligossacarídeos específicos, como frutooligossacarídeos (FOS), provou ser eficaz na manipulação da composição e funcionalidade da microbiota intestinal.

Estruturalmente, apresenta-se uma série de oligossacarídeos compostos de 1-Kestose (GF2), nistose (GF3) e 1F- β -frutofuranosil nistose (GF4) (MUÑIZ-MARQUÉZ et al., 2018), conforme observa-se na Figura 2. Os produtos finais da hidrólise da sacarose são os monossacarídeos glicose e frutose, onde possuem aplicações diversas, a frutose pode ser utilizada como adoçante para diabéticos, além de sua constituição líquida não cristalizável ser importante para confeitarias (ROCHA, 2010).

Figura 2. Estrutura química da sacarose e dos frutooligossacarídeos: kestose (GF2); nistose (GF3) e frutossilnistose (GF4).



Fonte: FEIBERG et al. (2009).

Em altas concentrações de sacarose, algumas β -frutofuranosidases são capazes de catalisar reações de transfrutosilação produzindo frutooligossacarídeos (AZIANI et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2016).

2.4 ESTADO DA ARTE

A concorrência econômica torna a inovação de produtos - a qual inclui a pesquisa, desenvolvimento e lançamento de novos produtos - um meio essencial de conservação e

conquista de faixas de mercado. Assim, novos produtos com diferenciais inovadores e de baixo custo tornam-se cada vez mais disputados pelo mercado.

Dentro dessas características, a bioprodução de enzimas FTase e FFase pelo fungo filamentoso *A. niger* mostra caráter inovador. As características enzimáticas e rendimentos podem ser facilmente diferenciados ao trabalhar com distintas concentrações dos componentes do meio de produção do fungo, ou até ao trocar o resíduo agroindustrial (fonte de carbono).

As enzimas produzidas podem ser utilizadas na indústria de alimentos, química, farmacêutica, entre outras. Sendo vasto o campo de aplicação dessas enzimas, justifica-se a produção das mesmas utilizando diferentes meios de produção, assim como caracterizar as melhores condições de pH, temperatura, estabilidade térmica e de estocagem, parâmetros cinéticos, além dos rendimentos de produção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMOS

Os fungos filamentosos *Penicillium brasilianum* e *Aspergillus niger* ATCC 9642 utilizados neste trabalho pertencem ao banco de cepas do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da URI – Erechim.

3.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE BIOPRODUÇÃO

3.2.1 Seleção do meio de cultura e do micro-organismo

Foram testados dois micro-organismos para a bioprodução de frutotransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase) empregando diferentes meios de cultivo.

Inicialmente foi realizada a contagem de esporos do *A. niger* e do *P. brasilianum*, sendo que estes foram cultivados em PDA durante 7 dias a 30 °C. Em seguida, a coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v), e pérolas de vidro estéreis adicionadas ao frasco, para uma melhor remoção dos esporos. A suspensão resultante foi armazenada a 4 °C até sua utilização, o que não ultrapassava um tempo máximo de 15 dias. Para contagem dos esporos, 1 mL da suspensão, retirada assepticamente, foi diluído de 10 a 10³ vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1 % v/v). A suspensão resultante foi transferida para uma câmara de Neubauer (Inlab) para contagem dos esporos (FREIRE, 1996). Para a bioprodução empregou-se uma suspensão de 5 x 10⁶ esporos/mL (para *A. niger* e *P. brasilianum*), a qual foi inoculada a quantidade de 1 mL em Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de produção previamente esterilizado.

Para a bioprodução das enzimas foram estudados 4 meios com composição diferente para os dois micro-organismos, conforme detalhamento que segue:

- Meio 1: 2 % de glicose, 0,5 % de extrato de levedura, 0,5 % de KH₂PO₄, 1 % de peptona a pH 4,5 (DANIEL, PERISSINOTTO & SOARES, 2014)
- Meio 2: 2 % de sacarose, 0,5 % de extrato de levedura, 0,5 % de K₂HPO₄, 1 % de peptona a pH 4,5 (adaptado de DANIEL, PERISSINOTTO & SOARES, 2014).
- Meio 3: 20 % de sacarose, 0,5 % de extrato de levedura, 1 % de NaNO₃, 0,05 % de MgSO₄ .7H₂O, 0,25 % de KH₂PO₄, 0,05 % de NH₄Cl, 0,25 % de NaCl a pH 5,5 (GANAIE et al., 2013).
- Meio 4: 20 % de sacarose, 5 % de extrato de levedura, 5 % de K₂HPO₄, 10 % de peptona a pH 4,5 (reformulado a partir da composição do meio 2).

Após a inoculação dos esporos de cada micro-organismo em cada meio de produção, incubou-se em shaker a 150 rpm e 30 °C e realizou-se a cinética de bioprodução enzimática. A cada intervalo de tempo, foram retiradas alíquotas de 2 mL, as quais foram filtradas em papel filtro e o extrato enzimático obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática (HERNALSTEENS, 2008).

A partir dos resultados desses ensaios fixou-se o meio de cultivo e definiu-se o micro-organismo para a bioprodução.

3.2.2 Avaliação da concentração de esporos

A fim de verificar a influência da concentração de esporos na bioprodução da FTase e FFase foram realizados ensaios com variação da quantidade de esporos (5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 e 5×10^8 esporos/mL) no meio de cultivo em função do tempo. Nesta etapa empregou-se o *A. niger* em meio de produção composto por 20 % sacarose, 0,5 % extrato de levedura, NaNO_3 1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KH_2PO_4 0,25 %, NH_4Cl 0,5 %, NaCl 0,25 % a pH 5,5 e acrescido de 0,5 mL de esporos, na concentração desejada, em 50 mL de meio. O pH inicial de todos os ensaios foi ajustado a 5,5 com adição de soluções NaOH 0,5 M e HCl 0,5 M. As condições de cultivo foram de 30 °C, 150 rpm até 48 h de bioprodução .

3.2.3 Avaliação da influência do pH no meio

Para avaliar a influência do pH no meio de produção utilizou-se o meio composto por 20 % sacarose, 0,5 % extrato de levedura, NaNO_3 1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KH_2PO_4 0,25 %, NH_4Cl 0,5 %, NaCl 0,25 %, variando o pH em 4,5; 5,5 e 6,5; tendo como referência pesquisas realizadas por Ganaie et al. (2013), Ganaie et al. (2017), Hernalsteens et al. (2008). Mantendo-se fixa a temperatura de 30 °C, 150 rpm de agitação, 5×10^7 esporos/mL e 48 h de produção. O pH do meio foi ajustado com solução de NaOH 0,5M e/ou HCl 0,5M.

3.2.4 Avaliação da influência da temperatura na produção

Ao avaliar a influência da temperatura na bioprodução de FTase e FFase realizaram-se ensaios a 25, 30 e 35°C (GANAIE et al., 2013; GANAIE et al., 2017; HERNALSTEENS et al., 2008) utilizando-se meio composto por 20 % sacarose, 0,5 % extrato de levedura, NaNO_3 1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KH_2PO_4 0,25 %, NH_4Cl 0,5 %, NaCl 0,25 %, concentração de esporos em 5×10^7 esporos/mL, agitação em 150 rpm e pH de 5,5 e 48 h de produção.

3.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS

3.3.1 Temperatura e pH ótimos

Para a determinação dos valores ótimos de pH e temperatura para as enzimas FTase e FFase foi realizado um planejamento fatorial completo (DCCR) 2^2 , onde o pH variou de 2,39 a 6,62 e a temperatura de 38,45 a 81,5 °C (Tabela 2). Para o ajuste do pH do extrato, foi utilizado o tampão acetato de potássio 0,05M.

Tabela 2. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de temperatura e pH ótimos das enzimas frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase).

		Níveis				
Variáveis independentes*	Códigos	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	X ₁	2,39	3	4,5	6	6,62
Temperatura (°C)	X ₂	38,45	45	60	75	81,15

Variáveis independentes fixas: meio de bioprodução (20 % sacarose, 0,5 % extrato de levedura, NaNO₃ 1 %, MgSO₄ .7H₂O 0,05 %, KH₂PO₄ 0,25 %, NH₄Cl 0,5 %, NaCl 0,25), 5 x 10⁷ esporos/mL, agitação em 150 rpm, temperatura 25 °C, pH de 5,5 e 48 h de produção.

3.3.2 Avaliação da estabilidade térmica

A estabilidade térmica do extrato enzimático foi realizada incubando-se o mesmo por 1 hora, com pH ajustado para 2,39 com HCL 0,1 M, em estufa (Marca Quimis, Modelo Q819V2) nas temperaturas de 30, 45, 60, 75, 80 e 100 °C. Após o período de incubação foi realizada a determinação da atividade de FTase e FFase nas condições otimizadas de reação (pH 2,39 e temperatura de 60 °C). Os resultados foram expressos em termos de porcentagem residual de atividade enzimática.

3.3.3 Avaliação da estabilidade frente a diferentes pHs

O pH do extrato enzimático foi ajustado com tampão acetato de potássio 0,05 M para os pHs 2; 3; 4,5; 6 e 7, respectivamente. Em seguida, os extratos com pH ajustado foram incubados em estufa a 60 °C por 1 h e realizada determinação da atividade nas condições otimizadas de reação (pH 2,39 e temperatura de 60 °C). Os resultados foram expressos em termos de porcentagem residual de atividade enzimática.

3.3.4 Avaliação da estabilidade de estocagem

A fim de determinar a temperatura de estocagem do extrato enzimático de FTase e FFase, este foi submetido a temperaturas de -80 °C, 4 °C e ambiente ($\pm$ 25 °C). A determinação da

atividade foi realizada periodicamente nas condições otimizadas de reação (pH 2,39 e temperatura de 60 °C). A estabilidade foi expressa em termos de porcentagem residual da atividade enzimática.

3.3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para determinação da velocidade máxima de reação ($V_{\max}$) e a constante cinética de Michaelis-Menten (K_m) das enzimas frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase), foram conduzidos ensaios de atividade enzimática empregando diferentes concentrações de sacarose (20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 %) em tampão de acetato de potássio 0,05 M a pH 4,5 em temperatura 20 °C, levando em consideração que a solubilidade da sacarose é de 1.970 g/L em 20 °C (BROWN et al., 2005). A velocidade inicial de reação (V_0) foi determinada para cada concentração do substrato $[S]$, fixando as variáveis de tempo de reação em 30 min a 60 °C para a FTase e FFase. O cálculo dos parâmetros cinéticos ($V_{\max}$ e K_m) foi realizado conforme o método de Lineweaver-Burk, que consiste em uma linearização (Equação 2) da equação de Michaelis-Menten (Equação 1) (LINEWEAVER & BURK, 1934; MENTEN, 1913).

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

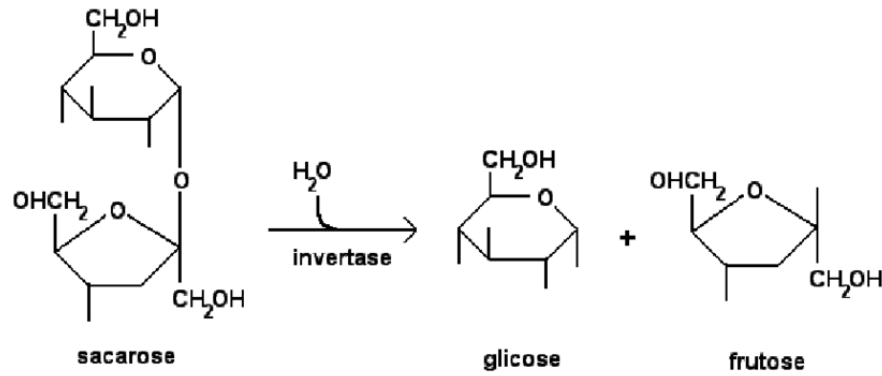
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a determinação da atividade enzimática da frutossiltransferase (FTase) e a frutofuranosidase (FFase), inicialmente adicionou-se 4,5 mL de substrato (solução de sacarose 60 % em tampão de acetato de potássio 0,05 M a pH 4,5), em tubos ensaio, posteriormente 0,5 mL do extrato enzimático bruto foi adicionado e incubou-se a 60 °C por 30 min banho incubador (Nova Ética) a 125 rpm. Um controle reacional foi realizado nas mesmas condições, porém sem sacarose. Após o tempo determinado, alíquotas de 10 μ L do meio reacional foram retiradas para determinar a concentração de glicose empregando o Kit enzimático glicose-oxidase (Glicose WS, Kovalent) e 2 mL para quantificar açúcares redutores pelo Método Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945).

O cálculo de atividade enzimática baseia-se, inicialmente, na reação de hidrólise da sacarose, formando glicose e frutose, segundo a reação apresentada na Figura 3.

Figura 3. Mecanismo de ação das enzimas na hidrólise da sacarose



Fonte: PASCHOALIM (1990) e CABRAL (2012).

Tal reação também pode ser descrita na Equação 3.

$$AR = G + F \quad (3)$$

Onde AR: açúcares redutores/sacarose; G:glicose; F: frutose.

A enzima denominada β -frutofuranosidase (FFase) fornece a atividade conhecida como UF (unidade de frutofuranosidase), representando a quantidade de sacarose hidrolisada por unidade de tempo e volume, sendo expressão em $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ (HERNALTEENS et al., 2008).

Para se ter o valor de UF (unidade atividade de frutofuranosidase) deve-se determinar a quantidade de glicose presente no meio reacional, visto que a glicose é um dos produtos da hidrólise da sacarose. Portanto, tem-se que a atividade de frutofuranosidase (FFase) é determinada segundo a Equação 4.

$$UF = G \quad (4)$$

A enzima chamada frutossiltransferase (FTase) é descrita por UTF (unidade de atividade de frutossiltransferase), que representa a quantidade de frutose transferida por unidade de tempo e volume, sendo expressa em $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$.

Por meio da Equação 3, tem-se que a frutose presente no meio reacional é definida conforme equação 5:

$$F_{\text{meio}} = AR - G \quad (5)$$

Já a frutose transferida é a diferença entre a glicose e a frutose do meio, Equação 6:

$$F_t = G - F_{meio} \quad (6)$$

Ao unir as Equações 4 e 5, tem-se a equação final que representa a quantidade de frutose transferida, equivalendo com a atividade de transfrutossilação (Equação 7).

$$UTF = 2G - AR \quad (7)$$

Onde 2G indica a quantidade teórica de açúcar redutor e AR a quantidade real de açúcar redutor presente no meio, determinada pelo método de Somogyi-Nelson, de modo que a diferença entre ambos indica a frutose que foi transferida.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no planejamento de experimentos foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) com 95 % de confiança, utilizando o software *STATISTIC* versão 5.0 (StatSoft Inc., EUA). Os demais resultados foram tratados pelo teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados e discussões referentes a seleção de micro-organismo e meio de produção de frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase), bem como a avaliação da influência da concentração de esporos, do tempo, da temperatura e do pH na produção destas enzimas. Além disso, a caracterização parcial das enzimas frente a pH e temperatura ótimos, estabilidade de estocagem, estabilidade térmica e diferentes pHs e determinação dos parâmetros cinéticos.

4.1 BIOPRODUÇÃO DE FTase e FFase

4.1.1 Seleção do meio de cultura

A Tabela 3 apresenta os resultados da produção de frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase) empregando os fungos filamentosos *A. niger* e *P. brasilianum* em fermentação submersa em diferentes tempos.

Tabela 3. Bioprodução de frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase) com os fungos *A. niger* e *P. brasilianum*.

Micro-organismos	Enzimas	Tempo (h)						
		12	24	36	48	60	72	124
		Atividade ($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)						
		Meio 1						
<i>A. niger</i>	FFase	1,37 ^{ab} ±0,46	1,06 ^b ±0,26	1,85 ^a ±0,20	0,83 ^{bc} ±0,1	1,11 ^b ±0,0	0,44 ^c ±0,0	0,60 ^c ±0,0
	FTase	2,90 ^{ab} ±0,46	1,68 ^{bc} ±0,66	3,01 ^a ±0,33	0,97 ^d ±0,2	1,00 ^{cd} ±0,8	0	0
<i>P. brasilianum</i>	FFase	0,32 ^b ±0,11	0,18 ^c ±0,05	0,43 ^{ab} ±0,13	0,20 ^c ±0,10	0,21 ^c ±0,0	0,64 ^a ±0,0	0,55 ^a ±0,0
	FTase	0	0	0	0	0	0,82 ^a ±0,0	0,67 ^a ±0,0
Meio 2								
<i>A. niger</i>	FFase	-	1,32 ^b ±0,09	1,76 ^a ±0,23	2,00 ^a ±0,22	-	1,87 ^a ±0,0	-
	FTase	-	1,06 ^c ±0,04	1,86 ^b ±0,08	2,36 ^a ±0,24	-	1,27 ^c ±0,1	-
Meio 3								
<i>A. niger</i>	FFase	-	-	-	6,29±1,45	-	-	-
	FTase	-	-	-	7,01±2,22	-	-	-
Meio 4								
<i>A. niger</i>	FFase	-	-	-	8,86±0,80	-	-	-
	FTase	-	-	-	0	-	-	-

*Médias $\pm$ desvio padrão seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas indicam não haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de produção. (-) corresponde a não realização de ensaios para quantificar a atividade enzimática nestes tempos.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, pode-se observar que quando a produção das enzimas ocorreu no meio 1 (2 % glicose, 0,5 % extrato de levedura, 0,5 % KHPO_4 ,

1 % peptona a pH 4,5), o fungo filmentoso *A. niger*, apresentou a maior atividade, 1,85 e 3,01 $\mu\text{mol/min.mL}$ para FFase e de FTase em 36 horas, respectivamente. Enquanto que ao empregar o micro-organismo *P. brasilianum* a maior atividade foi de 0,64 e 0,84 $\mu\text{mol/min.mL}$ para FFase e de FTase em 72 horas, respectivamente. Nascimento et al. (2016), avaliaram 8 novos fungos isolados do gênero *Penicillium* quanto à produção de β -frutofuranosidase (FFase), destes, o *Penicillium citreonigrum* foi selecionado para produção de FFase.

Com base nestes dados, onde observa-se que o fungo *A. niger* apresentou maior atividade, decidiu-se variar o meio de produção (meio 2) empregando somente este micro-organismo durante 72 horas de bioprodução. Ao analisar os resultados de produção empregando o meio 2 (2 % sacarose, 0,5 % extrato de levedura, 0,5 % K_2HPO_4 , 1 % peptona a pH 4,5) não se obteve incremento na produção enzimática em relação ao meio anterior, porém observou-se a necessidade de aumentar o tempo de produção para 48 horas, sendo este fixado para os próximos ensaios.

Assim, foram testados novos meios de produção, o meio 3 (20 % sacarose, 0,5 % extrato de levedura, NaNO_3 1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KH_2PO_4 0,25 %, NH_4Cl 0,5 %, NaCl 0,25 % a pH 5,5) e o meio 4 (20 % sacarose, 5 % extrato de levedura, 5 % K_2HPO_4 , 10 % peptona a pH 4,5), em 48 horas de bioprodução. Com o meio 3 obteve-se atividade de 6,29 e 7,01 $\mu\text{mol/min.mL}$ para FFase e FTase, respectivamente. A produção com o meio 4 obteve atividade de 8,86 e 0 $\mu\text{mol/min.mL}$ para FFase e de FTase, respectivamente. A partir destes resultados conclui-se que o meio 3 de produção é o mais indicado para a produção de β -frutofuranosidases (FFase) e frutossiltransferase (FTase), em 48 horas.

Ganaie et al. (2013), estudaram 20 micro-organismos para avaliar a produção de frutossiltransferase, durante 120 horas, em meio contendo 20 % (w/v) de sacarose como fonte de carbono e obtiveram atividade entre 31 a 35 U/mL com os fungos filamentosos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* e *Penicillium islandicum*.

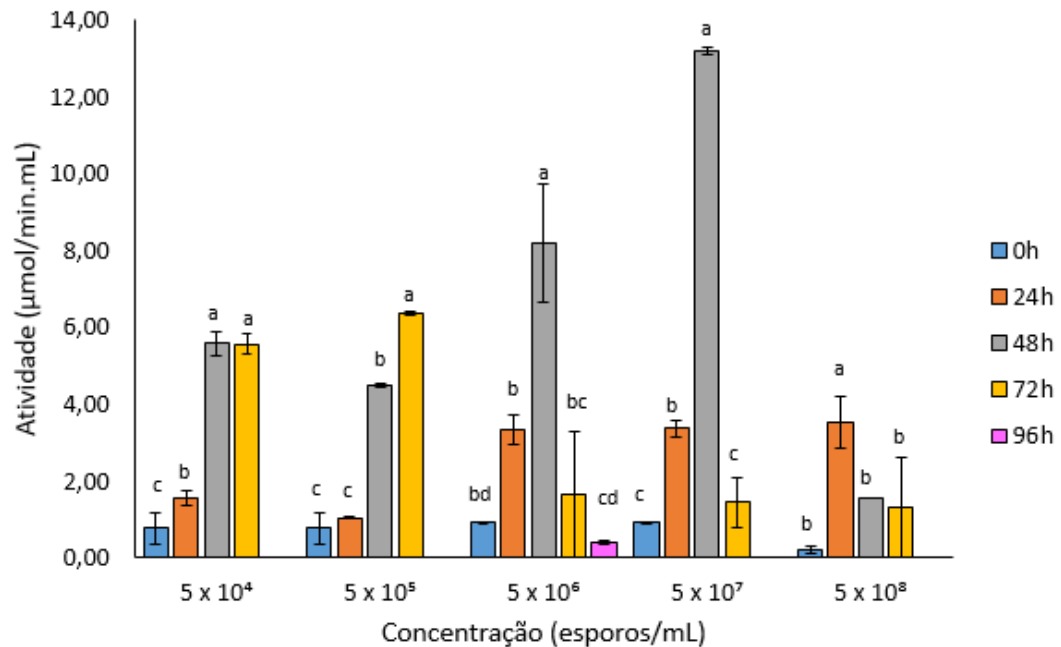
4.1.2 Influência da concentração de esporos

A quantidade de esporos viáveis inoculados é um parâmetro importante, pois poderá influenciar a produção de FTase e FFase. Para comprovar esta hipótese e verificar se há a quantidade ideal de esporos para o inóculo na produção destas enzimas, analisou-se a concentração da solução de esporos de 5×10^4 a 5×10^8 esporos/mL para o fungo filamentoso *A. niger* ATCC 9642 em meio líquido a base de sacarose.

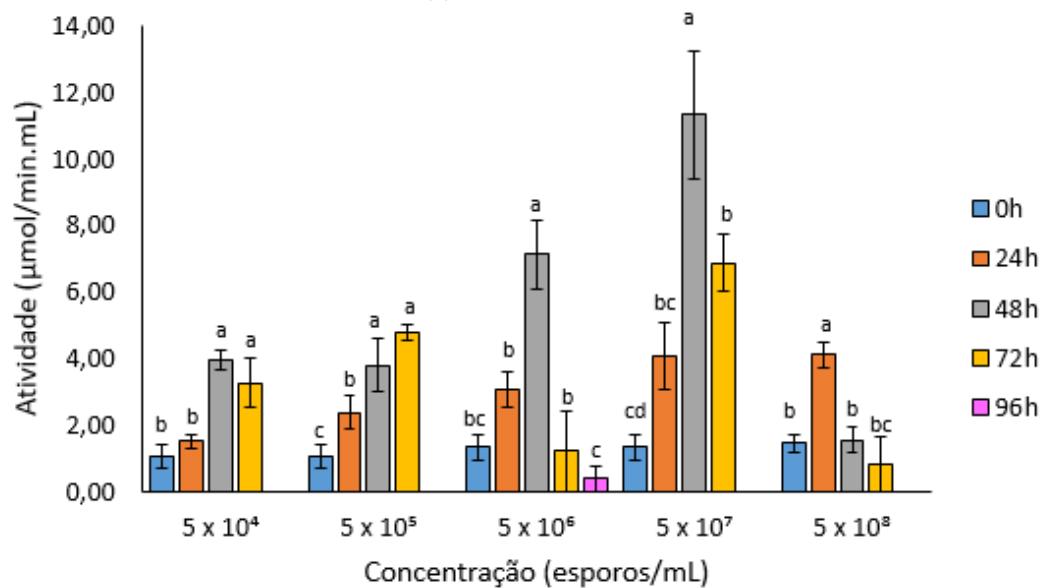
As Figuras 4a e 4b são referentes a produção de FTase e FFase, respectivamente, onde observa-se que a maior atividade de FTase, 11 $\mu\text{mol/min.mL}$, e de FFase, 10 $\mu\text{mol/min.mL}$, foi obtida na concentração de esporos 5×10^7 esporos/mL. Desta forma, definiu-se a concentração

de esporos em 5×10^7 esporos/mL de *A. niger* ATCC 9642 e 48 h para a bioprodução das enzimas.

Figura 4. Produção de frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase) em função da concentração de esporos do fungo filamentoso *A. niger* ATCC 9642.



(a) Atividade de FTase



(b) Atividade de FFase

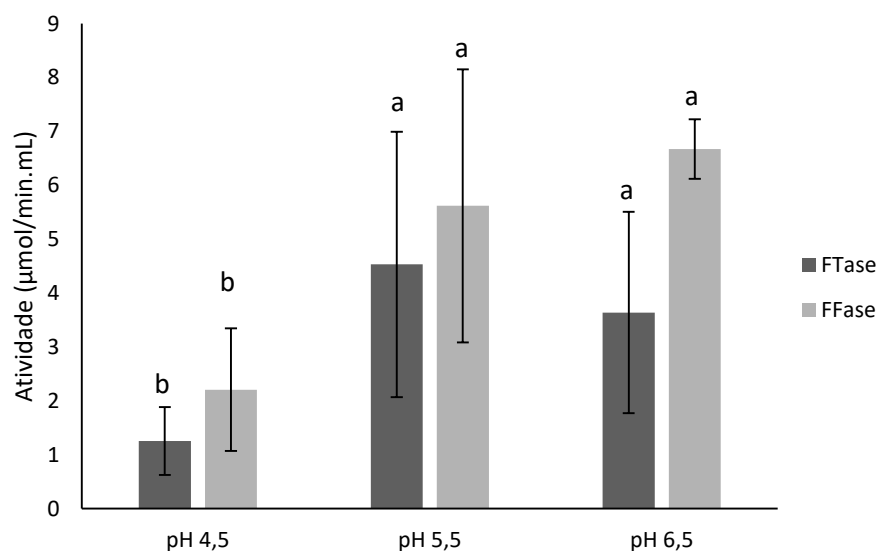
Ganaie et al. (2017), avaliou a concentração de esporos na produção de β -frutofuranosidase a partir do fungo filamentoso *Aspergillus flavus*, e obteve as melhores atividades com concentrações de esporos na faixa de 1×10^6 a 1×10^8 esporos/mL, sendo similar aos resultados encontrados no presente estudo. Segundo este autor, ao trabalhar com uma

concentração elevada de esporos, ocorre uma competição entre as células microbianas, ocasionando a escassez de nutrientes no meio, ocasionando uma queda de atividade enzimática.

4.1.3 Influência do pH no meio

A Figura 5 apresenta os resultados de produção de FTase e FFase em meio composto por 20 % sacarose, 0,5 % extrato de levedura, NaNO_3 1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KH_2PO_4 0,25 %, NH_4Cl 0,5 %, NaCl 0,25 %, com 5×10^7 esporos/mL, 30 °C, 150rpm e 48 horas e com diferentes pHs (4,5; 5,5 e 6,5), onde observa-se que as maiores atividades de FTase foram de 4,53 e 3,64 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ e de FFase de 5,62 e 6,67 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ em pH 5,5 e 6,5, respectivamente, não havendo diferença estatística entre estes. A partir destes resultados, definiu-se, para as etapas posteriores do trabalho, o pH de produção igual a 5,5.

Figura 5. Produção de FTase e FFase em função do pH do meio de cultivo do fungo filamentoso *A. niger* ATCC 9642.

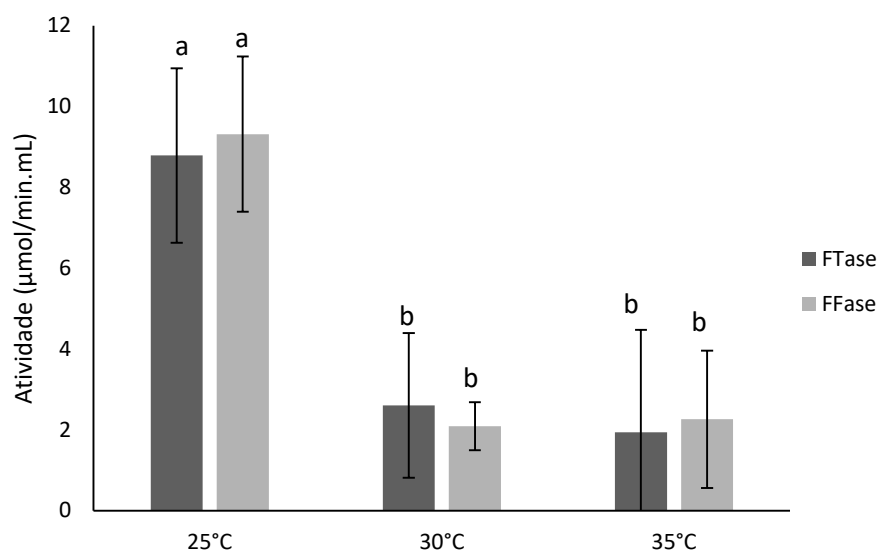


4.1.4 Influência da temperatura

A Figura 6 apresenta os resultados da influência da temperatura de bioprodução de FTase e FFase, onde observa-se que a maior produção de FTase (8,79 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$) e FFase (9,32 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$) foi a 25 °C, diferindo estatisticamente das demais temperaturas estudadas ($p < 0,05$). A temperatura de 25°C foi fixada para os próximos ensaios deste estudo.

Nascimento et al. (2016), ao produzir FFase com *Penicillium citreonigrum* em frascos agitados obtiveram a maximização da produção em pH 6,5, a 25,5°C em 67,8 horas, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Figura 6. Produção de FTase e FFase em função da temperatura de incubação do fungo filamentoso *A. niger* ATCC 9642.



4.5 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS

4.5.1 Temperatura e pH ótimos

Os valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto produzido por *A. niger* ATCC 9642 em cultivo submerso, nas condições maximizadas (20 % sacarose, 0,5 % extrato de levedura, NaNO_3 1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KH_2PO_4 0,25 %, NH_4Cl 0,5 %, NaCl 0,25 % a pH 5,5, temperatura de 25 °C, tempo de 48 h e concentração de esporos 5×10^7 esporos/mL), foram definidos por planejamento fatorial completo 2^2 (3 pontos centrais) e estão descritos na Tabela 4.

As maiores atividades foram de 27,86 $\mu\text{mol/min.mL}$ e 24,86 $\mu\text{mol/min.mL}$ e 27,30 $\mu\text{mol/min.mL}$ e 28,68 $\mu\text{mol/min.mL}$, para FTase e FFase, em pH de 3,0 e 2,39 e temperatura de 75 e 60 °C (ensaios 3 e 5), respectivamente. Analisando as variáveis de forma independente, constata-se que a diminuição de pH favorece o aumento da atividade (ensaios 3 e 4) e de que o aumento da temperatura (ensaios 1 e 3) promove este mesmo efeito, o que pode ser comprovado pela Tabela 5 e 6.

Verificou-se que o ensaio 5 na condição de pH 2,39 e temperatura de 60 °C apresentou maior atividade de FFase (13,86%) em relação ao ensaio 3 na condição de pH 3,0 e temperatura de 75 °C, optou-se por dar continuidade ao estudo com as condições do ensaio 5, levando em consideração também a redução do gasto energético.

Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados (reais) e respostas em atividade de FTase e FFase em função de temperatura e pH ótimos.

Ensaio	*Variáveis independentes		Atividade de FTase ($\mu\text{mol/min.mL}$)	Atividade de FFase ($\mu\text{mol/min.mL}$)
	X ₁ pH	X ₂ Temperatura (°C)		
1	-1 (3,0)	-1 (45)	6,98	4,43
2	1 (6,0)	-1 (45)	3,41	4,63
3	-1 (3,0)	1 (75)	27,86	24,86
4	1 (6,0)	1 (75)	3,22	3,74
5	-1,41 (2,39)	0 (60)	27,30	28,68
6	1,41 (6,62)	0 (60)	6,28	7,33
7	0 (4,5)	-1,41 (38,45)	5,02	6,67
8	0 (4,5)	1,41 (81,15)	3,28	4,59
9	0 (4,5)	0 (60)	10,72	9,32
10	0 (4,5)	0 (60)	12,97	10,55
11	0 (4,5)	0 (60)	11,00	9,41

Variáveis independentes fixas: meio de bioprodução (20 % sacarose, 0,5 % extrato de levedura, NaNO_3 1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KH_2PO_4 0,25 %, NH_4Cl 0,5 %, NaCl 0,25), 5×10^7 esporos/mL, 150 rpm, 25 °C, pH de 5,5 e 48 h.

Os dados da Tabela 4 foram tratados estatisticamente, sendo que a Tabela 5 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t (2), para atividade de FTase e FFase, a um nível de 95 % de confiança, respectivamente.

Tabela 5. Coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t (2) do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de FTase e FFase em função da temperatura e pH ótimos.

FTase				
	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média	11,56	0,71	16,33	0,0037
(1)pH (L)	-7,25	0,43	-16,70	0,0036
Ph	2,60	0,52	5,03	0,0373
(2)Temperatura (°C)(L)	2,29	0,43	5,27	0,0342
Temperatura (°C)(Q)	-3,75	0,52	-7,24	0,0185
1L by 2L	-5,27	0,61	-8,59	0,0133
FFase				
Média	9,77	0,39	24,68	0,0016
(1)pH (L)	-6,39	0,24	-26,35	0,0014
Ph	3,53	0,29	12,20	0,0066
(2)Temperatura (°C)(L)	2,08	0,24	8,58	0,0133
Temperatura (°C)(Q)	-2,69	0,29	-9,28	0,0114
1L by 2L	-5,33	0,34	-15,55	0,0041

As Equações 1 e 2 apresentam os modelos codificados de segunda ordem que descrevem a atividade de FTase e FTase em função das variáveis analisadas (temperatura e pH), dentro das faixas estudadas, respectivamente. Os modelos foram validados pela análise de variância

(Tabela 6) onde obteve-se coeficientes de correlação de 0,95 e 0,94 e F calculado de 2,07 e 1,44 vezes maior que o valor de F tabelado, os quais permitiram a validação dos modelos e a construção das curvas de contorno apresentadas na Figura 7.

Tabela 6. Análise de variância para atividade de FTase e FFase do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos.

FTase				
Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	734,86	5	146,97	10,47
Resíduo	70,18	5	14,04	
Falta de ajuste	67,17	3		
Erro puro	3,00	2		
Total	805,04	10		
FFase				
Regressão	629,30	5	125,86	7,28
Resíduo	86,50	5	17,30	
Falta de ajuste	85,55	3		
Erro puro	0,94	2		
Total	715,79	10		

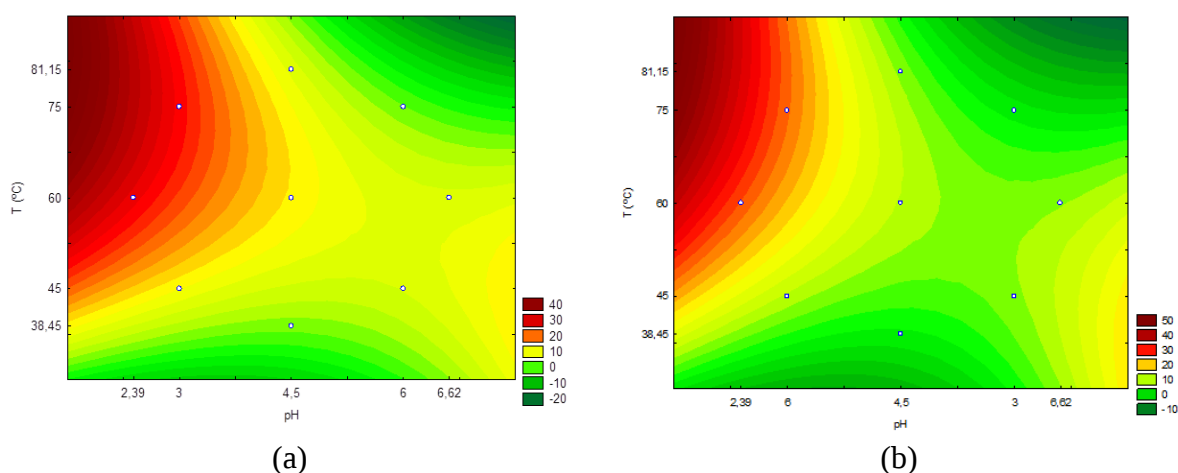
Resíduos=Falta de ajuste + erro puro; F tabelado=5,05

$$\text{FTase} = 11,56 - 7,25 \text{ pH} + 2,60 \text{ pH}^2 + 2,28 \text{ T} - 3,75 \text{ T}^2 - 5,26 \text{ pH.T} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\text{FFase} = 9,77 - 6,40 \text{ pH} + 3,53 \text{ pH}^2 + 2,08 \text{ T} - 2,69 \text{ T}^2 - 5,33 \text{ pH.T} \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde: UTF é a unidade de atividade de frutossiltransferase (FTase), UF é a unidade atividade de β -frutofuranosidase (FFase) e T é igual a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Figura 7. Curva de contorno para atividade de FTase (a) e de FFase (b) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH ótimos.



Com base nos dados obtidos na Figura 7, pode-se observar que o melhor valor de pH para ambas as enzimas é em torno de 2,39 e a temperatura situa-se na faixa de 60 a 81,15 $^{\circ}\text{C}$.

Os resultados de temperatura ótima para as enzimas FFase e FTase obtidos nestes trabalhos diferem dos resultados reportados na literatura. Marquez (2007), apresenta resultados onde as temperaturas acima 70 °C desnaturaram a enzima fazendo com que a atividade enzimática tenha uma queda significativa. Estudos de Madlová et al. (2000) comprovaram que FTases de *Aureobasidium pullulans* foram rapidamente inativadas quando submetidas a temperaturas maiores que 60 °C, mesmo quando em presença de elevadas concentrações de substrato. De acordo com Nelson e Cox (2005) o aumento de temperatura provoca maior agitação das moléculas, melhorando as possibilidades de elas se chocarem para reação. No entanto, se a temperatura continua se elevando, a agitação das moléculas se torna tão intensa que as ligações que estabilizam a estrutura espacial da enzima se rompem causando sua desnaturação. Fato este não observado para as enzimas FTase e FFase produzidas pelo *A. niger* ATCC 9642, as quais apresentaram maiores atividades nas temperaturas acima de 60 °C, como apresentado na Tabela 2, demonstrando serem termicamente estáveis.

De acordo com a Figura 7, o pH ótimo é de 2,39, e está abaixo do reportado na literatura para invertases da levedura *Rhodotorula glutinis* (RUBIO, RUNCO & NAVARRO, 2002) e dos fungos *Aspergillus niger* AS0023 (L'HOCINE et al., 2000) e *Aspergillus ochraceus* (GUIMARÃES et al., 2007), bem como para as enzimas industriais BIOINVERTR da QUEST INTERNA-TIONAL e INVERTINR da MERCKR (SAID & PIETRO, 2004), os quais apresentaram pH ótimo igual a 4,6. Valores de pHs ótimos foram descritos como 3,85 para a invertase de *Pycnoporus sanguineus* (QUIROGA et al., 1995), 5,5 para a invertase produzida pela levedura *Candida utilis* (CHÁVEZ et al., 1997) e 6,0 e 5,5 para invertases da bactéria *Zymomonas mobilis* intracelular e extracelular, respectivamente. Cunha (2017), avaliou a produção e caracterização da enzima frutossiltransferase pelo fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* e observou a formação de uma zona ótima entre as temperaturas de 45 °C e 48 °C e pH entre 6,0 e 7,0

O pH do meio reacional é um dos fatores importantes para a manutenção da estrutura proteica e da atividade das enzimas, por interferir diretamente com o estado de ionização das cadeias laterais de aminoácidos (COLLINS, BRAGA & BONATO, 1990). A mudança no pH afeta a ionização dos resíduos de aminoácidos essenciais do sítio ativo, que estão envolvidos na ligação do substrato e sua transformação em produto. Alguns resíduos ionizáveis podem estar localizados na periferia do sítio ativo, comumente conhecidos como resíduos não-essenciais. A ionização desses resíduos pode causar distorção conformacional do sítio ativo, afetando indiretamente a atividade enzimática (SHAHEEN et al., 2008).

A literatura consultada mostra que para cada micro-organismo a produção enzimática apresenta suas particularidades, com pequenas alterações na temperatura de incubação, pH do

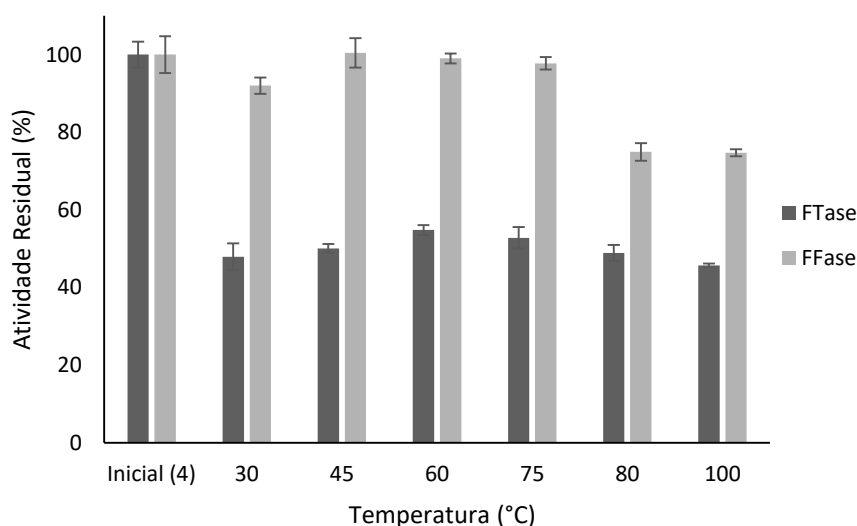
meio de cultivo, fonte de carbono e influência de sais na composição do meio de cultura. De acordo com essas alterações, isoformas de β -D-frutofuranosidases que diferem quanto ao seu pH ótimo de atividade, podendo ser ácidas, neutras e alcalinas podem ser obtidas (WINTER & HUBBER, 2000). As funções específicas das diferentes isoformas de β -D-frutofuranosidases ainda não estão bem esclarecidas, mas parece que elas estão relacionadas à entrada de sacarose em diferentes vias de utilização (STURM, 1999; GONÇALVES, 2013).

4.5.2 Estabilidade térmica

Os resultados da estabilidade térmica para as enzimas FFase e FTase estão apresentados na Figura 8. Verifica-se que a FFase apresenta-se estável nas temperaturas de 45 a 75 °C, com redução aproximadamente de 20 % da atividade residual nas temperaturas de 80 e 100 °C. Já a FTase ao ser incubada nas temperaturas de 30 a 100 °C apresentou queda em torno de 50 % da atividade enzimática residual quando comparada a atividade inicial (4 °C). Com estes resultados fica evidente que a FFase apresenta maior estabilidade térmica em relação a FTase.

Segundo Marquez (2007), a estabilidade térmica da invertase pode ser devido à estrutura terciária da proteína, a qual contém interações carboidrato-proteína, com ligações cruzadas na cadeia polipeptídica.

Figura 8. Estabilidade térmica das enzimas FTase e FFase produzidas por *A. niger* ATCC 9642.

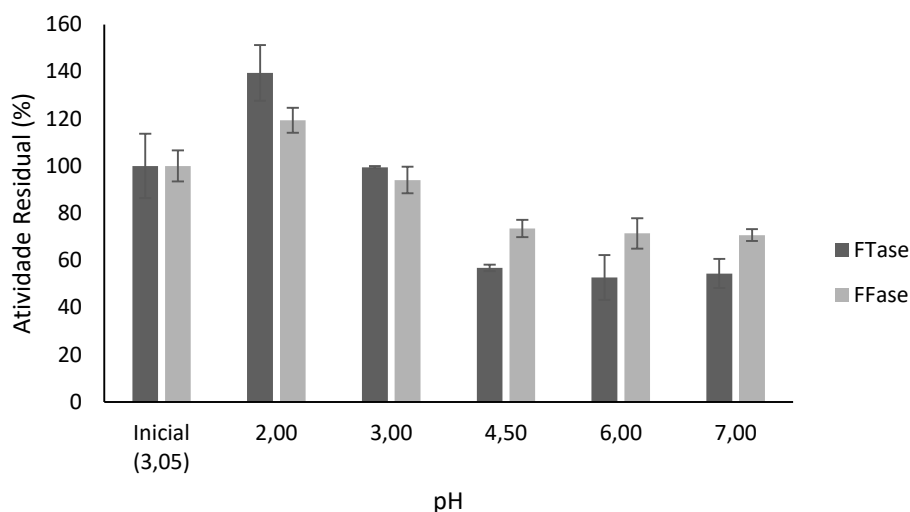


4.5.3 Estabilidade frente a diferentes pHs

A estabilidade frente a diferentes pHs demonstrou comportamento semelhante para FTase e FFase (Figura 9). O melhor pH foi 2,00 com atividade residual de 139,39 e 119,33 %

para FTase e FFase, respectivamente. Em pH 3 as enzimas mantiveram sua atividade residual. Em pHs 4,5, 6 e 7, observa-se uma queda da atividade residual enzimática de aproximadamente 20 e 40 % para FFase e FTase, respectivamente.

Figura 9. Estabilidade das enzimas FTase e FFase frente a diferentes pHs.



Os resultados encontrados neste estudo diferem dos reportados na literatura. Maiorano et al. (2008) que apontam faixa ótima de pH para a FTase oriunda de *Aspergillus oryzae*, entre 5,0 e 7,0. Ganaie et al. (2014) verificam que a enzima, também produzida por *Aspergillus oryzae*, apresentou valores elevados de atividades de transfrutossilação para uma faixa de pH compreendida entre 5,0 a 7,0, com pico de atividade em pH 6,0. Já alguns trabalhos demonstram um potencial mais ácido, pH entre 4,5 e 6,0, das invertases de *Lactobacillus reuteri* (ANWAR et al., 2008; VAN HIJUM et al., 2001). Invertases aplicadas industrialmente como a BIOINVERTER - QUEST INTERNATIONAL - apresentaram estabilidade na faixa de pH de 4,0 a 5,0 (SAID & PIETRO, 2004).

Choukade & Kango (2019), estudaram a caracterização de uma frutossiltransferase micelial de *Aspergillus tamarii* NKRC 1229, e obtiveram atividade ótima em pH 7,0 e 20 °C. Rustiguel et al. (2015) ao estudar a produção de β -D-frutofuranosidase (invertase) por *Aspergillus phoenicis* (*Aspergillus saitoi*) em fermentação submersa observaram temperatura e o pH ótimos para a atividade em 65 °C e 4,5, respectivamente. Almeida et al. (2018) estudaram a produção de 2 invertases intracelulares, onde a invertase 1 apresentou atividade máxima em pH 3,0 e temperatura ótima a 60 °C, enquanto a invertase 2 apresentou atividade máxima em pH 4,6 e temperatura ótima a 55 °C.

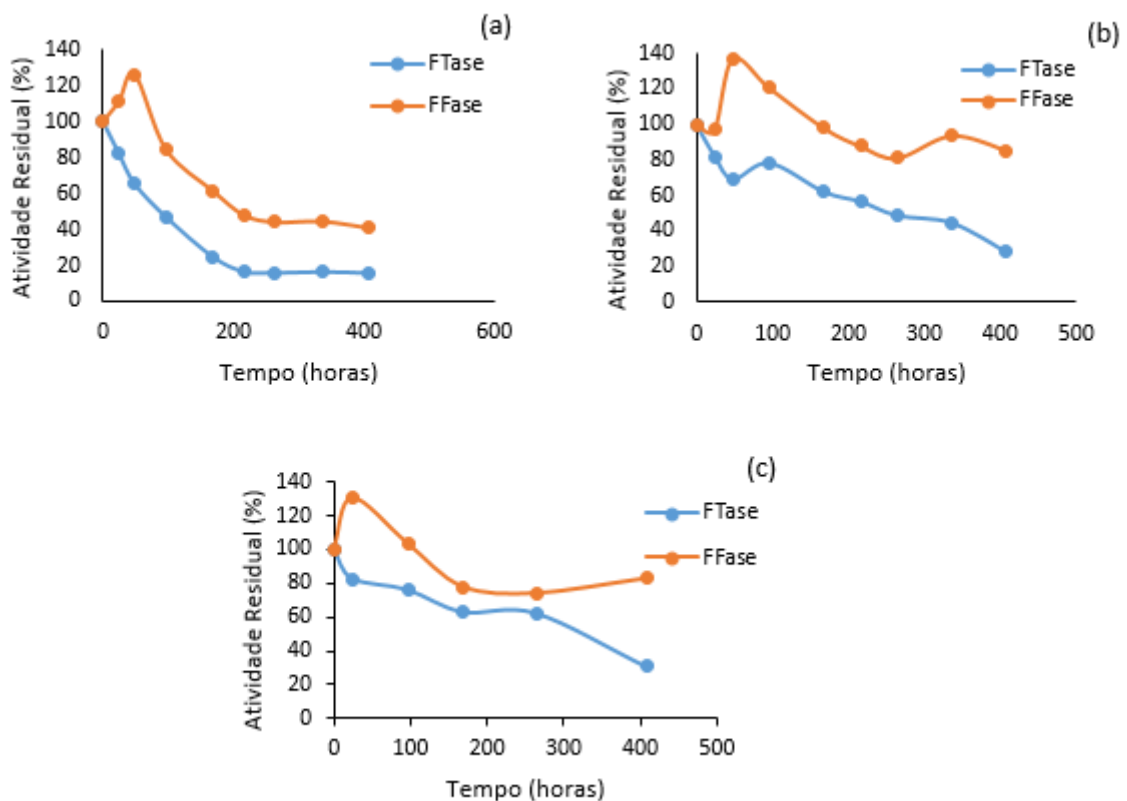
4.5.4 Estabilidade de estocagem

Os resultados da estabilidade de estocagem para FTase e FFase frente a temperatura ambiente, de refrigeração e de congelamento são apresentados nas Figuras 10 a, b e c, respectivamente. Onde observa-se que em temperatura ambiente (Figura 10 a), as enzimas FTase e FFase apresentaram redução de 50 % da atividade residual nos tempos de 95 h (4 dias) e 200 h (8 dias), respectivamente.

A estocagem em temperatura de refrigeração (Figura 10 b), provocou queda de 50 % na atividade residual da FTase em 168 h (7 dias), enquanto que a FFase manteve aproximadamente da 60 % atividade residual durante o mesmo período.

Ao armazenar as enzimas em temperatura de congelamento (Figura 10 c), verifica-se redução de 62 % na atividade residual de FTase e 74 % para FFase, em 264 h (11 dias), mostrando-se mais estável em relação a estocagem em temperatura ambiente e de refrigeração.

Figura 10. Estabilidade de estocagem das enzimas FTase e FFase frente a (a) temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), (b) refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) e (c) temperatura de congelamento (-80°C).



4.5.5 Parâmetros cinéticos (k_m e $v_{m\acute{a}x}$)

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da FTase e FFase apresentados na Tabela 7, para o substrato de sacarose, determinados pelos gráficos de Lineweaver-Burk, apresentados na Figura 11 (Apêndice A), foram de 24,60 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ e 104,16 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ para FTase e 3,91 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ e 20,24 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ para FFase, respectivamente.

Tabela 7. Valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de FTase e FFase.

	Equação da reta	R^2	K_m ($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)
FTase	$y = 0,2362x + 0,0096$	0,9977	24,60	104,16
FFase	$y = 0,1935x + 0,0494$	0,9854	3,91	20,24

Comparando-se os dados de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos neste estudo, com os valores citados na literatura, verifica-se que a FFase e FTase apresentam valores semelhantes. Lee et al. (1992), observaram que a frutossiltransferase intracelular de *Aureobasidium pullulans* apresentou um K_m de 0,43 mM para o substrato sacarose. Segundo Hirayma et al. (1989), Fujita et al. (1990) e Chang et al. (1994), as β -frutofuranosidases extracelulares purificadas de *Aspergillus niger* ATCC 20611, *Arthrobacter sp.* K-1 e *Aspergillus Oryzae* ATCC 76080 apresentaram, respectivamente, os seguintes valores de K_m para sacarose: 0,29 M, 9,1 mM e 0,53 M. Hayashi et al. (1992) relataram que a β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aspergillus japonicus* MU-2, mostrou valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para sacarose, de 210 mM e 0,65 $\mu\text{mol}/\text{ml.min}$, respectivamente, enquanto as β -furanosidases intracelulares purificadas (P-1 e P-2) de *Fusarium oxysporum* apresentaram valores de K_m de 4,4 mM e 2,1 mM, respectivamente, para P-1 e P-2 (Nishizawa et al., 1980). Giraldo (2011), que pesquisou a purificação e caracterização bioquímica da invertase extracelular pelo fungo filamentoso *Aspergillus terreus*, encontrou valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 22,73 mM e 178,57 U/mg, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

Verificou-se que a máxima produção de FTase e FFase foi de 7,01 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ e 6,29 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$, respectivamente, empregando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9642 em cultivo submerso e utilizando meio de produção composto por 20 % sacarose, 0,5 % extrato de levedura, NaNO_3 1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KH_2PO_4 0,25 %, NH_4Cl 0,5 %, NaCl 0,25 % a pH 5,5, temperatura de 25 °C, tempo de 48 h, 125 rpm e concentração de esporos 5×10^7 esporos/mL.

Na caracterização parcial das enzimas, a temperatura e pH ótimos foram de 2,39 e 60 °C obtendo-se atividade de 27,30 e 28,68 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ para FTase e FFase, respectivamente. Em relação a estabilidade térmica verificou-se que a FFase se apresenta mais estável em comparação a FTase, sendo que ambas mostraram-se estáveis a temperatura de congelamento. Para a estabilidade ao pH, o melhor resultado obtido foi em pH 2,0 para as duas enzimas. Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{\text{máx}}$ da FTase e FFase foram de 24,60 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ e 104,16 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ e de 3,91 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ e 20,24 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstram-se positivos em relação a bioprodução extracelular de FTase e FFase pelo fungo *A. niger* por apresentarem características de termoestabilidade e atuação em pHs ácidos, possibilitando a aplicação em processos em escala industrial na área de alimentos, química, farmacêutica, entre outras, que envolvam tais condições.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros:

- Purificar as enzimas FTase e FFase;
- Quantificar o extrato enzimático por cromatografia;
- Imobilizar as enzimas em diferentes suportes e avaliar o potencial de reuso;
- Avaliar o potencial de aplicação das enzimas em produtos alimentícios;
- Realizar a bioprodução das enzimas FTase e FFase utilizando outros micro-organismos e resíduos agroindustriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRE, A. C. P. et al. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 612-622, 2009.
- ALMEIDA, A. C. S. et al. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporoides*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2005.
- ALMEIDA, M. N. de. et al. Purification and characterization of an invertase and a transfructosylase from *Aspergillus terreus*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, p. 1-9, 2018.
- ALVES, J. N. O.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of invertases by anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and teleomorphic (*Emericella nidulans*) fungi under submerged fermentation using rye flour as carbon source. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 421-429, 2013.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: The Enzymes Catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers – Chemické Zvesti**, v. 55, p. 350-358, 2001.
- ANWAR, M. A.; KRALJ, S.; VAN DER MAAREL, M. J. & DIJKHUIZEN, L. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3426-3433, 2008.
- AZIANI, G. et al. Production of fructooligosaccharides by *Aspergillus phoenicis* biofilm on polyethylene as inert support. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, p. 40-45, 2012.
- BARBOSA, G. N. de O. **Produção de frutossiltransferase por *Rhodotorula* sp.** 2007. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- BHATTI, H. N.; MUHAMMAD, A.; ABBAS, A.; NAWAZ, R.; SHEIKH, M. A. Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4617-4623, 2006.
- BON, E. P. S. et al. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S **Enzimas em biotecnologia, produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. v. 1, cap. 5, p. 95-120, 2008.
- BROWN, T. L. et al. **Química: A Ciência Central**. 9 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, p. 952, 2005.
- CABRAL, B. V. **Hidrólise de sacarose por invertase Imobilizada em Duolite A-568 por adsorção e Ligação Cruzada**. 2012. 143f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

- CHANG, C.T. et al. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae* ATCC 76080. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 32, p. 269-277, 1994.
- CHÁVEZ, F. P. et al. Purification and characterization of invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases. **Journal of Biotechnology**, v.53, n.1, p.67-74, 1997.
- CHOUKADE, R.; KANGO, N. Characterization of a mycelial fructosyltransferase from *Aspergillus tamarii* NKRC 1229 for efficient synthesis of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 286, p. 434-440, 2019.
- CHOWDHURY, S. et al. Characterization of a novel low molecular weight sucrase from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1075-1082, 2009.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Ed. da Unicamp, p.279, 1990.
- CUNHA, J. de S. **Produção e Caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de frutooligossacarídeos**. 2017. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Alfenas, Poço de Caldas, 2017.
- DANIEL, I. B.; PERISSINOTTO, A.; SOARES, M. A. **Seleção de Micro-organismos para a produção da enzima frutossiltransferase**. XIX Encontro de Iniciação Científica e XVIII Semanna Acadêmica de Engenharia de Alimentos, URI, Erechim, 2013.
- DOMINGUEZ, A. L. et al. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 324-337, 2014.
- FEINBERG, M.; SAN-REDON, J.; ASSIÉ, A. Determination of complex polysaccharides by HPAE-PAD in foods: Validation using accuracy profile. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2388-2395, 2009.
- FERNÁNDEZ, R. C.; MARESMA, B. G.; JUÁREZ, A.; MARTÍNEZ, J. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp. 27H. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 268-272, 2004.
- FREIRE, D. M. G. **Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. 1996. 174f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro - Departamento de Bioquímica do Instituto de Química (UFRJ), Rio de Janeiro, 1996.
- FUJITA, K. et al. Purification and some properties of β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 913-919, 1990.
- GANAIE, M. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.97, p. 12-17, 2013.

- GANAIÉ, M. A. et al. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for eficiente production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v.49, p. 840-844, 2014.
- GANAIÉ, M. A. et al Screening of low cost agricultural wastes to maximize the fructosyltransferase production and its applicability in generation of fructooligosaccharides by solid state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 118, p. 19 - 26, 2017.
- GHAZI, I. et al. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 204–211, 2007.
- GIRALDO, M. A. **Purificação e Caracterização Bioquímica da Invertase Extracelular Produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus terreus***. 2011. 126f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2011.
- GIRALDO, M. A.; SILVA, T. M.; SALVATO, F.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, 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, p. 463-472, 2012.
- GONÇALVES, H. B. **β -D-fructofuranosidases de *Fusarium graminearum*: produção, purificação, imobilização e determinação das propriedades bioquímicas de enzimas solúveis e secas em Spray dryer**. 2013. 122f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2013.
- GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Immobilization of *Fusarium graminearum* β -D-fructofuranosidase using alternative cellulosic supports: stabilization and production of fructooligosaccharides. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, p. 1429-1435, 2015.
- GUIMARÃES, L. H. S. et al. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 52-57, 2007.
- GUIMARÃES, L. H. S. et al. Production of β -fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 237-241, 2008.
- HAYASHI, S. et al. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p. 276-279, 1992.
- HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.79, p.589-596, 2008.
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, p. 1181–1187, 1988.

- HIRAYMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p. 667-673, 1989.
- KULSHRESTHA, S. et al. Invertase and its applications – A brief review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7 n. 9, p. 792- 797, 2013.
- KURAKAKE, M. et al. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 488–492, 2010.
- LEE, K. J.; CHOL, J. D.; J. Y. Purification and properties of intracellular fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p. 411-415, 1992.
- L'HOCINE, L.; WANG, Z.; JIANG, B.; XU, S. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n.1, p. 73–84, 2000.
- LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.
- LUCCA, A. L.; JORGE, A. J.; GUIMARÃES, L. H. S. Extracellular β -Dfructofuranosidase 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.
- MADLOVÁ, A. et al. Thermal stability of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, v.54, p. 339-344, 2000.
- MAIA, T. F.; FRAGA, M. E. Bioprospecting *Aspergillus section Nigri* in Atlantic Forest soil and plant litter. **Agricultural Microbiology**, v. 84, p. 1-7, 2017.
- MAIORANO, A. E. et al. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1867-1877, 2008.
- MARQUEZ, L. D. S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas**. 2007. 137f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2007.
- MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die Kinetik der Investinwirkung Bioch. Z, v. 49, p. 333, 1913.
- MUÑIZ-MÁRQUEZ, D. B. M. et al. Fructo-oligosaccharides (FOS) production by fungal submerged culture using aguamiel as a low-cost by-product. **Food Science and Technology**, v. 102, p. 75–79, 2018.
- NADEEM, H., et al. Invertase from hyper producer strain of *Aspergillus niger*: physiochemical properties, thermodynamics and active site residues heat of ionization. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 9, p. 1098-1105, 2009.

- NADEEM, H., et al. Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1202-1210, 2015.
- NASCIMENTO, A. K. C. et al. Síntese de Frutooligossacarídeos a partir da β -Frutofuranosidase obtida de *Penicillium citreonigrum* URM 4459. Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), Fortaleza, 2016. Disponível em <https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/papers/sintese-de-frutooligossacarideos-a-partir-da-%CE%B2-frutofuranosidase-obtida-de-penicillium-citreonigrum-urm-4459>, acesso: 23 março de 2019.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzimas. In: **Princípios da Bioquímica de Lehninger: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier. 2005, v. 8, p. 189-224, 2005.
- NELSON, N. Aphotometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal Biological and Chemical**, v.153, p. 375-380, 1944.
- NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, M.; BHAT, M. K.; HOSCHKE, A. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2461-2466, 2005.
- NISHIZAWA, M.; MARUYAMA, Y; NAKAMURA, M. Purification and characterization of invertase isozymes from *Fusarium oxysporum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p. 489-498, 1980.
- NOBRE, C. et al. Production and extraction of polysaccharides and oligosaccharides and their use as new food additives. **Industrial biorefineries & white biotechnology**, v.19, p. 653–679, 2015.
- PANESAR, P. S.; BALI, V. Prebiotics. Reference Module in food Science. **Encyclopedia of Food and Health**, p.464-471, 2016.
- PASCHOALIM, S. A. C. **Contribuição ao estudo da hidrólise enzimática da sacarose por células de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação)**. 1990. 67f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola Politécnica Universidade de São Paulo. São Paulo, 1990.
- POONAWALLA, F. M.; PATEL, K. L.; IYENGAR, M. R. S. Invertase production by *Penicillium chrysogenum* and other fungi in submerged fermentation. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 749-754, 1965.
- QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*. **Biochimica et Biophysica Acta-Protein structure and molecular Enzymology**, n.1251, p.75-80, 1995.
- RIUL, A. J.; GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85/86, p. 126-133, 2013.
- ROCHA, C. P. ***Aspergillus niger* em fermentação em Estado Sólido**. 2010. 161f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

- RUBIO, M. C.; RUNCO, R.; NAVARRO, A. R. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. **Phytochemistry**, v. 61, p.605-609, 2002.
- 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. 1–2, p. 10–15, 2010.
- RUSTIGUEL, C. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermo-tolerant mycelial β -fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis* under 88 submerged fermentation using wheat bran as carbon source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 362-369, 2015.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1ª. Ed. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 416, 2004.
- SANTOS, S. L. **Produção e purificação de frutotransferase por *Aspergillus flavus* utilizando borra de café (*Coffea* sp.) através de fermentação em estado sólido**. 2018. 69f. Dissertação (Mestrado em Biociência animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.
- SHAHEEN, I.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, T. Production, purification and thermal characterization of invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. Under solidstate fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p.1152-1158, 2008.
- STURM, A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiology**, v. 121, p. 1-7, 1999.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for the determination of sugar. **Journal of Biological and Chemical**, v. 160, p. 61-68, 1945.
- TODERO, L. M. **Produção de β -fructofuranosidase pelo fungo filamentoso *Aspergillus thermomutatus* objetivando a produção de frutooligosacarídeos (FOS)**. 2018. 46f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Araraquara, 2018.
- 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.
- VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 175-178, 2000.
- VAN HIJUM, S. A. F. T. et al. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p.323-328, 2001.
- VARGAS, W.; CUMINO, A.; SALERNO, G. L. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol. **Planta**, v. 216, p. 951-960, 2003.

- VITOLO, M. Aplicações de enzimas na Tecnologia de Alimentos. In: AQUARE, E. et al. **Biotechnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. 1. Ed., São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v. 4, cap. 14, p. 387-418, 2001.
- WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants localization and regulation of activity of key enzymes. **Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 1, p. 31-67, 2000.
- WON, J.. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 0229, p. 107–117, 1996.
- ZHANG, J. et al. Enhancing fructooligosaccharides production by genetic improvement of the industrial fungus *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Biotechnology.**, v. 249, p. 25–33, 2017.

APÊNDICE A

Figura 11. Determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de FTase e FFase por *Aspergillus niger* ATCC 9642 seguindo modelo de Lineweaver-Burk, sendo (a) resultados para FTase e (b) par FFase.

