

# Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos

**Alberdan Silva Santos**  
(Organizador)



**Atena**  
Editora

Ano 2018

Alberdan Silva Santos  
(Organizador)

# Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos

Atena Editora  
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Diagramação e Edição de Arte:** Geraldo Alves e Natália Sandrini

**Revisão:** Os autores

#### **Conselho Editorial**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

A946 Avanços científicos e tecnológicos em bioprocessos [recurso eletrônico] / Organizador Alberdan Silva Santos. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-85107-47-5

DOI 10.22533/at.ed.475180110

1. Bioprocessos. 2. Bioquímica. 3. Biotecnologia. I. Santos, Alberdan Silva.

CDD 553.7

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos é uma obra que reúne vinte e três capítulos com temas em pesquisas científicas realizadas no campo da biotecnologia, e que envolve agentes biológicos e bioquímicos na geração de produtos ou processos. Nesta obra se concentram diversos avanços descritos nas metodologias e nos resultados, distribuídos em quatro tópicos principais, envolvendo: processos químicos e biotecnológicos no aproveitamento de resíduos; produção de metabólitos e enzimas; métodos analíticos e de simulação; e biotratamentos envolvidos na geração de energias. Esta obra foi escrita por jovens pesquisadores brasileiros que estão desenvolvendo suas teses e/ou dissertações em instituições nacionais. Por este motivo, os aspectos inovadores e o alcance dos resultados apresentados podem ser um grande estímulo para aqueles que visam conhecer com maior amplitude alguns dos aspectos biotecnológicos estudados em algumas das instituições de nosso país.

Alberdan Silva Santos

## SUMÁRIO

### EIXO 1: PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E PROTEÍNAS

#### **CAPÍTULO 1 ..... 1**

AMYLASES IN PROTEIN SECRETOME PROFILE FROM *Aspergillus sp* WITH POTENTIAL TO DECONSTRUCT INTEGRAL STARCH

Patrícia Suelene Silva Costa Gobira  
Rubens Menezes Gobira  
Ricardo Felipe Alexandre de Mello  
Hellen Kempfer Phillippsen  
Nelson Rosa Ferreira  
Alberdan Silva Santos

#### **CAPÍTULO 2 ..... 7**

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR MICROBIANA PARA A SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM ESCALA LABORATORIAL

Rafael Firmani Perna  
Josivan de Sousa Cunha  
Sergio Andres Villalba Morales  
Michelle da Cunha Abreu Xavier  
Cristiane Angelica Ottoni  
Elda Sabino da Silva  
Alfredo Eduardo Maiorano

#### **CAPÍTULO 3 ..... 23**

ENZYMATIC COCKTAIL PRODUCED BY *Fusarium sp* WITH POTENTIAL TO DECONSTRUCT CRUDE CASSAVA STARCH (*Manihot esculenta Crantz*).

Patrícia Suelene Silva Costa Gobira  
Elaine Cristina Souza Medeiros  
Rubens Menezes Gobira  
Ricardo Felipe Alexandre de Mello  
Alberdan Silva Santos

#### **CAPÍTULO 4 ..... 28**

THE SYSTEMATIC INVESTIGATION OF L-ASPARAGINASE PRODUCED BY FILAMENTOUS FUNGI

Eliane Silva e Silva  
Alberdan Silva Santos  
Márcia Gleice da Silva Souza  
Rubens Menezes Gobira  
Maria Inez de Moura Sarquis

#### **CAPÍTULO 5 ..... 33**

EVALUATION OF METHYLOCYSTIS HIRSUTA GROWTH ON SUPPLEMENTED MINERAL MEDIA USING METHANE AS CARBON SOURCE

Rodrigo Pimentel Fernandes  
Ana Cristina Pantoja Simões  
Manuela Temtemples de Carvalho  
Camila Ruiz Lopes  
Nei Pereira Jr

**CAPÍTULO 6 ..... 37**

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF ENZYMATIC EXTRACT WITH CELULOLYTICAL ACTIVITY FROM AGROINDUSTRY RESIDUES

Ivanilton Almeida Nery  
Karine Belo Rocha de Lima  
Marlon Castro da Silva  
Edmir Fernandes Ferreira

**EIXO 2: APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS E QUÍMICOS**

**CAPÍTULO 7 ..... 41**

VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA PALMA DE ÓLEO (*ELAEIS SP*) PARA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES POR *PLEUROTUS OSTREATUS*

Jhonatas Rodrigues Barbosa  
Maurício Madson dos Santos Freitas  
Marcos Enê Chaves Oliveira

**CAPÍTULO 8 ..... 50**

AVLIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 E DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE UTILIZANDO RESÍDUOS DE FRUTAS COMO SUBSTRATOS

Camylla Carneiro Soares  
Adrielly Silva Albuquerque de Andrade  
Fábio Cirqueira da Silva  
Andréa Farias de Almeida  
Janice Izabel Druzian  
Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato

**CAPÍTULO 9 ..... 65**

ESTUDO DO REAPROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DA INDÚSTRIA CACAUEIRA.

Rhuany de Oliveira Silva  
Iara Rebouças Pinheiro  
Isabela Nascimento Tavares Ferreira

**CAPÍTULO 10 ..... 70**

BIOPRODUCTS FROM *Trichoderma harzianum* AS INDUCER OF RESISTANCE TO ANTHRACNOSE IN BEANS

Emanuele Junges  
Marlove Fátima Brião Muniz  
Ângela Diniz Campos  
Thiarles Brun  
Cleudson José Michelin  
Marcio Antônio Mazutti

**CAPÍTULO 11 ..... 81**

ANALYSIS OF PRE-TREATMENT OF PINEAPPLE WASTE WITH HYDROGEN PEROXIDE IN THE OBTENTION OF TOTAL REDUCING SUGARS

Fernanda Ferreira Freitas  
Lorena Costa Vasconcelos Macedo

Carlos Alberto Galeano Suarez  
Araceli Aparecida Seolato  
Inti Doraci Cavalcanti-Montaño,  
Paula Rubia Ferreira Rosa

## **EIXO 3: MÉTODOS ANALÍTICOS, CINÉTICA, SIMULAÇÃO E MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS EM PROCESSOS**

### **CAPÍTULO 12 ..... 86**

USE OF LINEAR EQUATIONS FOR DETERMINATION OF APPARENT KINETIC PARAMETERS IN CELLULOLYTIC MEDIUM WITH *Trichoderma virens*

Nelson Rosa Ferreira  
Suelem Paixão da Silva  
Rubens Menezes Gobira  
Maria Inez de Moura Sarquis  
Alberdan Silva Santos

### **CAPÍTULO 13 ..... 92**

PRODUCTION OF COMMON ORANGE FERMENTED BEVERAGE: KINECTIC STUDY AND SENSORY ANALYSIS

Jacqueline de Moraes Campêlo  
Olga Martins Marques

### **CAPÍTULO 14 ..... 97**

MATHEMATICAL MODELING OF GLUCOSE ACCUMULATION DURING ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CARRAGEENAN WASTE

Samuel Conceição Oliveira  
Fernando Roberto Paz Cedeno  
Fernando Masarin

### **CAPÍTULO 15 ..... 104**

PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Metarhizium anisopliae* POR CULTIVO SÓLIDO EM BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO COM ROTAÇÃO INTERMITENTE: APLICAÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA PREDIÇÃO DE PERFIS DE TEMPERATURA

Érika Fernanda Rezendes Tada  
Lucas Portilho da Cunha  
João Cláudio Thoméo

### **CAPÍTULO 16 ..... 121**

DETERMINAÇÃO DO FATOR DE EFETIVIDADE PARA ENZIMAS IMOBILIZADAS USANDO MÉTODOS DE REGRESSÃO SIMBÓLICA VIA PROGRAMAÇÃO GENÉTICA

Félix Monteiro Pereira  
Luciano Eduardo Gomes Junior  
Fabrício Maciel Gomes  
Messias Borges Silva  
Samuel Conceição Oliveira

### **CAPÍTULO 17 ..... 133**

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD, BY SPECTROSCOPY IN THE MIDINFRARED, AND MULTIVARIATE CALIBRATION FOR ETHANOL QUANTIFICATION IN THE FERMENTED MANGO

PULP (*Mangifera indica* L.) VARIETY BACURI.

Rubens Menezes Gobira  
Patrícia Suelene Silva Costa Gobira  
Ricardo Felipe Alexandre de Mello  
Graziela Cristiane Telles da Silva  
Sanclayton Geraldo Carneiro Moreira  
Alberdan Silva Santos

**CAPÍTULO 18 ..... 138**

MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO PARA ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Anderson dos Santos Barbosa  
Danyelle Andrade Mota  
Lays Carvalho de Almeida  
Juliana Lisboa Santana  
Nayára Bezerra Carvalho  
Sílvia Regina Soares Martins

**CAPÍTULO 19 ..... 156**

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DAS ANTOCIANINAS E DA CORDO EXTRATO DE *Eugênia involucrata* NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE AGENTES CONSERVANTES NA TEMPERATURA DE 90°C

Lauren Menegon de Oliveira  
Francine Antelo

**EIXO 4: BIOTRATAMENTOS PARA GERAÇÃO DE ENERGIA E BIOPRODUTOS**

**CAPÍTULO 20 ..... 163**

BIOTRATAMENTO DE VINHAÇA SINTÉTICA E GERAÇÃO DE ELETRICIDADE UTILIZANDO UMA CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA

Cristiane Angélica Ottoni  
Marta Filipa Simões  
Jonas Gomes dos Santos  
Luciana Peixoto  
Rodrigo Fernando Brambilla de Souza  
Almir Oliveira Neto  
António Guerreiro de Brito  
Alfredo Eduardo Maiorano

**CAPÍTULO 21 ..... 172**

RECUPERAÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA GASEIFICAÇÃO DO LODO DE ESGOTO SANITÁRIO

Renan Barroso Soares  
Ricardo Franci Gonçalves

**CAPÍTULO 22 ..... 179**

BIOPROSPECTING CAROTENOIDS PRODUCTION IN THREE BRAZILIAN MICROALGAE SPECIES

Sabrina da Silva Mesquita  
Natália Guimarães Figueiredo  
Inaiã Costa Cutrim  
Simone Carvalho Chiapetta  
Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira  
Eliana Flávia Camporese Sérvulo

**CAPÍTULO 23 ..... 184**

EFFECT OF TEMPERATURE AND SALINITY ON THE PRODUCTION OF CAROTENOIDS AND LIPIDS BY MARINE MICROALGA

Nicéia Chies Da Fré  
Alessandro de Oliveira Rios  
André Jablonski  
Rosane Rech  
Nilson Romeu Marcílio

**SOBRE O ORGANIZADOR..... 193**

## PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR MICROBIANA PARA A SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM ESCALA LABORATORIAL

**Rafael Firmani Perna**

**Josivan de Sousa Cunha**

**Sergio Andres Villalba Morales**

**Michelle da Cunha Abreu Xavier**

**Cristiane Angelica Ottoni**

**Elda Sabino da Silva**

**Alfredo Eduardo Maiorano**

**RESUMO:** Os fructooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose cujas unidades frutossil estão ligadas na posição  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) na molécula de sacarose. Esses açúcares, de baixa caloria, são classificados como prebióticos e, portanto, apresentam diversos benefícios à saúde humana. Os FOS são disponibilizados comercialmente por meio da produção sintética, utilizando enzimas microbianas como a frutossiltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) e sacarose como substrato. Diante disso, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por fermentação submersa utilizando meio de cultura sintético, assim como realizar a caracterização bioquímica da enzima por meio da avaliação dos efeitos do pH ( $3,0 \leq \text{pH} \leq 6,5$ ) e da temperatura ( $30 \text{ }^\circ\text{C} \leq T \leq 65 \text{ }^\circ\text{C}$ ) do meio reacional nas atividades hidrolítica ( $A_h$ ) e de transfrutossililação ( $A_t$ ). Em 64 h de fermentação, foram produzidas FTases com as maiores atividades de transfrutossililação ( $19,76$

$\pm 0,56 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e menores atividades hidrolíticas ( $1,65 \pm 0,31 \text{ U.mL}^{-1}$ ), resultando numa razão entre atividades ( $A_t/A_h$ ) igual a  $12,22 \pm 1,82$ . Com relação aos estudos de caracterização bioquímica, a enzima apresentou máxima atividade de transfrutossililação e mínima atividade hidrolítica no meio reacional para uma faixa de pH de 4,5-6,0 e temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os resultados obtidos atestaram que o fungo se destacou como fonte produtora de FTases extracelulares e estas, por sua vez, mostraram-se promissoras para a síntese de FOS em escala laboratorial.

**PALAVRAS-CHAVE:** Frutossiltransferase, *Aspergillus oryzae* IPT-301, Fermentação submersa, Caracterização enzimática, Fructooligossacarídeos.

**ABSTRACT:** Fructooligosaccharides (FOS) are fructose oligomers whose fructosyl units are attached at the  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) position in the sucrose molecule. These sugars are classified as prebiotics and present several benefits to human health. FOS are commercially available through synthetic production using microbial enzymes such as fructosyltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) and sucrose as substrate. The aim of this work was to study the extracellular FTase production from *Aspergillus oryzae* IPT-301 by submerged fermentation using synthetic culture medium, and to perform the biochemical

characterization of the enzyme through the evaluation of the effects of pH ( $3.0 \leq \text{pH} \leq 6.5$ ) and the temperature ( $30^\circ \text{C} \leq T \leq 65^\circ \text{C}$ ) of the reaction medium on hydrolytic ( $A_h$ ) and transfructosylation ( $A_t$ ) activities. FTases were produced with the highest transfructosylation activities ( $19.76 \pm 0.56 \text{ U.mL}^{-1}$ ) and lower hydrolytic activities ( $1.65 \pm 0.31 \text{ U.mL}^{-1}$ ) at 64 h of fermentation, resulting in a ratio between activities ( $A_t / A_h$ ) equal to  $12.22 \pm 1.82$ . Regarding the biochemical characterization, the enzyme presented maximum transfructosylation activity and minimal hydrolytic activity in the reaction medium for a pH range of 4.5-6.0 and temperature of  $50^\circ\text{C}$ . The results suggest that the fungus is a promising source for production of extracellular FTases for the synthesis of FOS in laboratory scale.

**KEYWORDS:** Fructosyltransferase, *Aspergillus oryzae* IPT-301, Submerged fermentation, Enzymatic characterization, Fructooligosaccharides.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose cujas unidades frutossil estão ligadas na posição  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) na molécula de sacarose (YUN, 1996; CHEN e LIU, 1996; CHEN *et al.*, 2014; ROMANO *et al.*, 2016). Os FOS de baixo grau de polimerização, tais como a kestose, nistose e  $\beta$ -frutofuranosilnistose (Figura 1), são de grande importância por apresentarem propriedades benéficas à saúde humana (HIRAYAMA *et al.*, 1993; YUN, 1996; ANTOŠOVÁ *et al.*, 2008). Estes açúcares são de baixa caloria, prebióticos e podem ser consumidos, seguramente, por diabéticos, não são cariogênicos, favorecem o aumento da absorção de cálcio e magnésio pelo organismo (DÍAZ *et al.*, 2011) e, por não serem hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais, promovem a seletividade das bifidobactérias na microbiota intestinal (MOORE *et al.*, 2003; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; DOMINGUEZ *et al.*, 2014), ajudando na eliminação de microrganismos patogênicos e na prevenção do câncer de cólon (GIBSON e ROBERFROID, 1995; GANAIE *et al.*, 2014). Os FOS ainda auxiliam na redução do colesterol, triacilgliceróis e fosfolípidios no sangue (TOKUNAGA *et al.*, 1986; ROBERFROID, 2007). Esses oligômeros apresentam cerca de 40 a 60 % do poder edulcorante da sacarose, sendo usados frequentemente pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos como açúcares funcionais (YUN, 1996; SÁNCHEZ *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2016).

Embora os FOS estejam presentes em diversos vegetais, esses açúcares são disponibilizados comercialmente por meio da produção sintética via rota enzimática, utilizando a sacarose como substrato e enzimas de origem microbiana denominada frutossiltransferase (E.C. 2.4.1.9) (CHIEN *et al.*, 2001; ROMANO *et al.*, 2016). Esta enzima é sintetizada por cepas fúngicas, tais como *Penicillium* sp. (USAMI *et al.*, 1991; LIM *et al.*, 2005; GANAIE *et al.*, 2014), *Aureobasidium* sp. (LATEEF *et al.*, 2007; DOMINGUEZ *et al.*, 2012), *Fusarium* sp. (GUPTA e BHATIA, 1982; PATEL *et al.*, 1994) e, principalmente, por *Aspergillus* sp. (CHEN e LIU, 1996; L'HOCINE *et*

*al.*, 2000; CHIEN *et al.*, 2001; WANG e ZHOU, 2006; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; SÁNCHEZ *et al.*, 2008; MUSSATTO e TEIXEIRA, 2010; OTTONI *et al.*, 2012; MÁRQUEZ *et al.*, 2016; ZENG *et al.*, 2016). As enzimas microbianas produtoras de FOS são excretadas para fora das células como enzimas extracelulares e/ou aderidas nas células microbianas como enzimas miceliais (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; GANAIE; GUPTA, 2014).

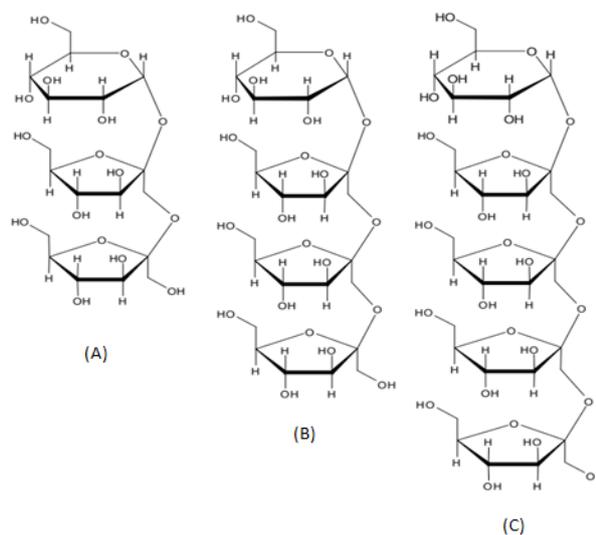


Figura 1. Estrutura molecular dos frutooligossacarídeos: (A) kestose, (B) nistose e (C)  $\beta$ -frutofuranosilnistose.

Afrutossiltransferase (FTase) exhibe, majoritariamente, atividade de transfrutossilção ( $A_t$ ), sendo responsável pela transferência de grupos frutossil entre moléculas de sacarose. Portanto, por meio da reação enzimática, são liberadas moléculas de glicose como subprodutos no meio reacional e geradas moléculas de frutooligossacarídeos (FOS) com diferentes tamanhos de cadeia polimérica (ANTOŠOVÁ *et al.*, 2008; GANAIE *et al.*, 2014; MÁRQUEZ *et al.*, 2016). Além disso, por apresentarem menor afinidade pelas moléculas de água, as FTases são consideradas enzimas que apresentam baixa atividade hidrolítica ( $A_h$ ), o que as tornam biocatalisadores potencialmente aplicáveis à produção de FOS (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIC, 2001).

Ressalta-se que a razão entre as atividades de transfrutossilção e hidrolítica ( $A_t/A_h$ ) pode ser considerada como o critério mais importante para se avaliar a produção de FOS a partir de enzimas microbianas (HIDAKA *et al.*, 1988; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007). Quanto maior o valor da razão, mais elevadas são as atividades de transfrutossilção exibidas pelas enzimas, permitindo altas conversões de sacarose em FOS (KIM *et al.*, 1996; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2007; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007).

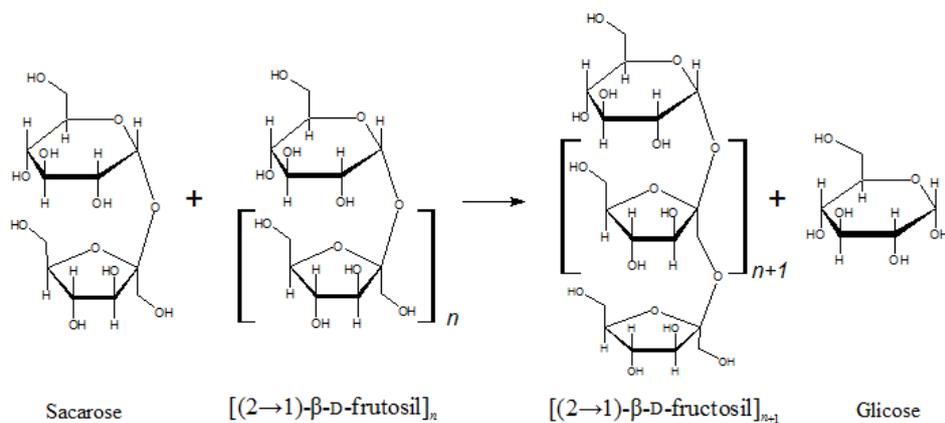


Figura 2 – Reação enzimática de transfrutossilacção (CUNHA, 2017).

Atualmente, é de grande interesse industrial a utilização de cepas microbianas produtoras de FTase com elevada atividade de transfrutossilacção e baixa atividade hidrolítica, afim de se obter altos rendimentos de FOS (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; HIDAKA *et al.*, 1988; HIDAKA *et al.*, 1986). Especificamente, a FTase produzida por *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresenta elevadas atividades de transfrutossilacção quando soluções concentradas de sacarose são utilizadas como substrato, o que acarreta, conseqüentemente, a elevada produção de FOS (PERNA *et al.*, 2018; OTTONI *et al.*, 2012; MAIORANO *et al.*, 2009; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007). Apesar do seu excelente desempenho, não há estudos reportados na literatura que visem avaliar a influência da temperatura e pH do meio reacional nas atividades de FTase produzidas especificamente por este micro-organismo. Diante disso, o presente trabalho centrou-se na produção, em escala laboratorial, de FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por fermentação submersa utilizando meio de cultura sintético e nos estudos de caracterização bioquímica da enzima por meio da avaliação dos efeitos do pH e da temperatura do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutossilacção.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Produção de frutossiltransferase microbiana extracelular

#### 2.1.1 Micro-organismo e condições de cultivo

A enzima FTase extracelular foi produzida a partir da cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). Para isso, um pellet contendo aproximadamente 5 g de esporos liofilizados do micro-organismo foi ressuspenso em 10 mL de água destilada estéril, e alíquotas de 70  $\mu\text{L}$  foram inoculadas em meio sólido contendo (em %, m/v): ágar batata dextrose 2,0, glicerina 2,5, extrato de levedura 0,5 e glicose 2,5. Após incubação por 7 dias a 30  $^{\circ}\text{C}$  em incubadora refrigerada do tipo B.O.D., os esporos produzidos foram coletados por

meio de raspagem utilizando alça de Drigalski e aproximadamente 10 mL de solução constituída por NaCl 0,95 % (m/v) e Tween-80 0,1 % (v/v). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina 20,0 % (m/v), cujo volume foi variável, de modo ajustar a concentração de esporos para aproximadamente  $1 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>, quantificado com auxílio de uma câmara de Neubauer, seguido de armazenamento sob refrigeração a -12 °C.

### *2.1.2 Composição do meio de cultura sintético*

O meio de cultura utilizado para a fermentação e crescimento microbiano foi constituído por (em %, m/v): sacarose 15,0, extrato de levedura 0,5, NaNO<sub>3</sub> 0,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,03 e FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,001 em pH 5,5. Foram distribuídos 50 mL deste meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL e autoclavados a 120 °C e 2,022 atm durante 15 min.

### *2.1.3 Construção da curva de crescimento microbiana*

Foram inoculados 500 µL de suspensão de esporos, contendo aproximadamente  $1 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>, no meio de cultura descrito no tópico 2.1.2. A fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo shaker a 30 °C e 200 rpm durante 76 h, com coleta de amostras em intervalos de tempo pré-determinados. O conteúdo total do frasco foi filtrado em papel do tipo Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm. A biomassa retida no papel (torta) foi lavada abundantemente com água destilada e seca em estufa por 24 h a 55 °C. A concentração de biomassa foi obtida por meio de massa celular seca por volume (g.L<sup>-1</sup>). Os experimentos foram realizados em triplicata.

### *2.1.4 Processo fermentativo*

Foram inoculados 0,5 mL de suspensão de esporos (aproximadamente  $1 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>) em 50 mL de meio de cultura, conforme descrito no tópico 2.1.2. A fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo shaker a 30 °C e 200 rpm com coleta de pontos a cada 8 h para o monitoramento das atividades hidrolítica e de transfrutossilagem, totalizando 72 h de processo. O conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi filtrado em papel do tipo Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm. O caldo fermentado (permeado) foi armazenado em tubos para posteriores ensaios de caracterização bioquímica da enzima em relação a temperatura e pH do meio reacional.

## **2.2 Métodos analíticos**

### *2.2.1 Determinação das atividades hidrolítica e de transfrutossilagem*

Para a determinação das atividades enzimáticas foi definida uma unidade de atividade de transfrutossilagem como a quantidade de enzima que produz um micromol

(1  $\mu\text{mol}$ ) de FOS por minuto sob as condições ensaiadas. Também, definiu-se uma unidade de atividade hidrolítica como a quantidade de enzima que libera um micromol (1  $\mu\text{mol}$ ) de frutose por minuto sob as condições reacionais do ensaio (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; GANAIE; GUPTA, 2014; OTTONI *et al.*, 2012).

Em um tubo foram adicionados 1,2 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. 63,6% (m/v). Tal mistura foi previamente aquecida durante 10 min a 50 °C até atingir o equilíbrio térmico (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007; OTTONI *et al.*, 2012;). A seguir, foi iniciada a reação enzimática ao se adicionar 0,1 mL de caldo fermentado contendo FTase extracelular. A reação foi conduzida em banho Dubnoff a 190 rpm, a 50 °C e por 60 min e, posteriormente, interrompida por banho de água fervente durante 10 min, seguida por banho de gelo (OTTONI *et al.*, 2012; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007).

As atividades enzimáticas de transfrutossilatação ( $A_t$ ) e hidrolítica ( $A_h$ ) foram calculadas pelas Equações (1) e (2), respectivamente.

$$A_t = \frac{[FOS].V_R}{t_r.V_{enzimático}} \quad (1)$$

$$A_h = \frac{[F].V_R}{t_r.V_{enzimático}} \quad (2)$$

em que [FOS] e [F] são as concentrações de frutooligossacarídeos ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e frutose ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), respectivamente,  $V_R$  o volume do meio reacional (L),  $t_r$  é o tempo de reação (min) e  $V_{enzimático}$  o volume do caldo fermentado (solução enzimática) (mL).

Os valores de [F] e [FOS], obtidos durante a reação enzimática, foram calculados pelas Equações (3) e (4), respectivamente.

$$[F] = [ART] - [G] \quad (3)$$

$$[FOS] = [G] - [F] \quad (4)$$

em que [ART] e [G] são as concentrações de açúcares redutores totais e glicose, respectivamente, expressas em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

### 2.2.2 Determinação da concentração de açúcares redutores totais

A concentração de açúcares redutores totais (ART) presentes no meio reacional foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) adaptado de Miller (1959) (MALDONADI *et al.*, 2013; SANTOS-MORIANO *et al.*, 2015).

Primeiramente, foi preparada uma solução de DNS (Reagente A), constituída por 13,98 g.L<sup>-1</sup> de hidróxido de sódio (NaOH), 5,86 g.L<sup>-1</sup> de metabisulfito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 5,37 mL/L de fenol fundido a 50 °C (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) e 7,48 g.L<sup>-1</sup> de ácido 3,5-dinitrosalicílico (C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). A solução antioxidante (Reagente B) foi composta por 15,1 g.L<sup>-1</sup> de tartarato

duplo de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).

A quantificação dos ART foi realizada pela adição, em tudo de ensaio, de 1,0 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 1,0 mL de Reagente A sob agitação vigorosa. A reação foi conduzida em banho maria a 100 °C por 5 min e interrompida, por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 16 mL de Reagente B. Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas por espectrofotometria a 540 nm visando obter as concentrações de açúcares redutores totais (ART).

### *2.2.3 Determinação da concentração de glicose*

A concentração de glicose, presente no meio reacional, foi determinada pelo método colorimétrico (kit enzimático) GOD-PAP (GANAIÉ; GUPTA, 2014; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011; OLIVEIRA, 2007)

A quantificação de glicose foi realizada pela adição, em tudo de ensaio, de 50 µL da amostra oriunda da reação enzimática, em 5 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff a 37 °C por 5 min ou a temperatura de 15-25 °C por 25 min.

Acoloração final foi estável por 30 min. Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas por espectrofotometria a 505 nm, visando obter as concentrações de glicose (G).

## **2.3 Caracterização bioquímica da enzima extracelular**

Uma vez definido o melhor tempo de fermentação em que foram produzidas FTases extracelulares com mínima e máxima atividades hidrolítica e de transfrutossilacção, respectivamente, foi utilizado o caldo fermentado (solução enzimática) coletado neste tempo de processo para a realização dos ensaios de caracterização bioquímica da enzima microbiana. Posteriormente, foram avaliados os efeitos da temperatura e do pH do meio reacional nas atividades enzimáticas.

### *2.3.1 Avaliação dos efeitos da temperatura do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutossilacção*

Os ensaios de atividade enzimática foram conduzidos em meio reacional constituído por 1,2 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. 63,6 % (m/v). Foram avaliadas as temperaturas de reação (30 °C ≤ T ≤ 65 °C, com Δ = 5 °C) e as atividades foram determinadas conforme método descrito no tópico 2.2.1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 2.3.2 Avaliação dos efeitos do pH do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutossilacção

Os ensaios de atividade foram conduzidos em meio reacional constituído por 1,2 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (3,0 ≤ pH ≤ 6,5, com Δ = 0,5) e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. 63,6% (m/v) a 50 °C. As atividades hidrolítica e de transfrutossilacção foram determinadas conforme método descrito no tópico 2.2.1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

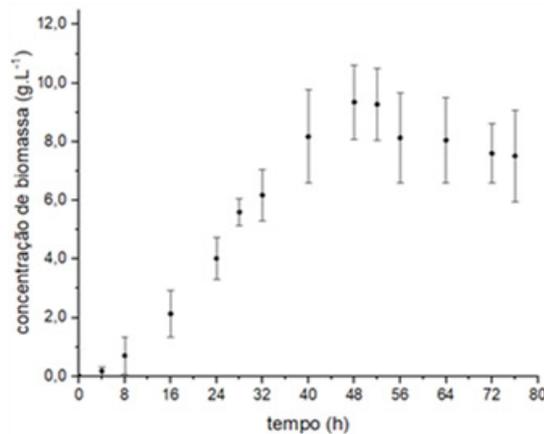
## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Curva de crescimento microbiana

A Figura 3 apresenta a curva de crescimento do fungo *Aspergillus oryzae* IPT 301 em função do tempo de fermentação. Foi possível identificar a fase lag de crescimento durante as primeiras 8 h do processo seguida da fase log até as 48 h, em que se constatou um pico de concentração de biomassa igual a 9,35 ± 1,26 g.L<sup>-1</sup>. Após 56 h de fermentação, foi observado a fase estacionária para a curva de crescimento que se estendeu até o término do processo, cuja concentração de biomassa obtida foi de 7,51 ± 1,57 g.L<sup>-1</sup>. Pelo perfil da curva de crescimento não se pode afirmar que a fase de declínio ou morte celular foi atingida, uma vez que as concentrações de biomassa permaneceram constantes a partir de 56 h de fermentação.

O valor máximo obtido para a concentração de biomassa de *A. oryzae* mostrou-se aproximadamente 2,0 vezes maior que o reportado por Ottoni et al. (2012) em que, utilizando um meio de cultura com composições similares, obteve uma concentração de 4,85 g.L<sup>-1</sup> de micélio. Cuervo-Fernandez et al. (2007), sob as mesmas condições experimentais, produziu 7,39 ± 1,10 g.L<sup>-1</sup> de biomassa de *A. oryzae* IPT-301, ou seja, um valor 21,0 % menor ao obtido neste trabalho.

Ressalta-se ainda que Ottoni et al. (2012), reportaram uma concentração de biomassa de 10,46 g.L<sup>-1</sup> (12,0 % maior que a concentração de biomassa produzida neste trabalho), ao realizar a fermentação em meio de cultura otimizado, composto majoritariamente por 320,5 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 7,13 g.L<sup>-1</sup> de ureia e 2,11 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura.



**Figura 3.** Concentração da biomassa celular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em função do tempo de fermentação a 30°C.

O fato da atividade enzimática da FTase estar intimamente ligada a quantidade de biomassa produzida durante a fermentação, permite sugerir, *a priori*, a utilização de tempo de fermentação de até 52 horas, já que se tem maior quantidade de enzima presente no caldo fermentado. Demais estudos foram realizados por outros autores visando atestar esta afirmação, visto que a atividade enzimática depende de diversos fatores, como o pH do meio fermentado, temperatura, pH do meio reacional da atividade enzimática e concentração de substrato (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER, 2002).

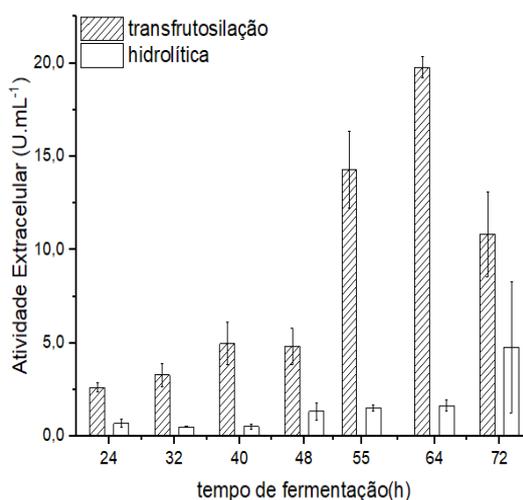
No presente trabalho, a progressão do pH do caldo fermentado para o *Aspergillus oryzae* IPT-301, em que o pH inicial foi de 5,50, mostrou a acidificação do meio de cultura, com valor final de pH igual a 4,82. Os estudos de Cuervo-Fernandez *et al.* (2007) mostraram que os caldos de fermentação produzidos pelas cepas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 e *Aspergillus niger* ATCC 20611, IPT-608 e IPT-615 apresentaram valores finais de pH iguais 5,70, 4,21, 5,43 e 5,53, respectivamente. Segundo Maiorano *et al.* (2009), a produção máxima de FTase, utilizando *Aspergillus oryzae* IPT-301 como fonte produtora da enzima, encontra-se na faixa entre 4,5 a 5,0, ao passo que, a produção máxima de biomassa foi verificada para caldos fermentados com pH 5,0. O *A. oryzae* é produtor de proteases ácidas, responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas e liberação de aminoácidos, o que ocasiona a acidificação do meio de cultura, interferindo também nas atividades enzimáticas (CASTRO; SATO, 2014; TSUJITA *et al.*, 1997).

### 3.2 Influência do tempo de fermentação nas atividades de transfrutossilação e hidrolítica

A Figura 4 apresenta as atividades de transfrutossilação e hidrolítica extracelulares em função do tempo de fermentação. Foi observado um pico de produção da enzima FTase para 64 h de processo ( $19,76 \pm 0,56 \text{ U.mL}^{-1}$ ). Por outro lado, obteve-se uma baixa atividade hidrolítica ( $1,65 \pm 0,31 \text{ U.mL}^{-1}$ ). Portanto, para o mesmo período, foi obtido uma razão  $A_f/A_h$  igual a  $12,22 \pm 1,82$  entre as atividades avaliadas, indicando maior produção de FOS durante o processo fermentativo, já que elevados valores

desta razão indicam predominância da atividade de transfrutoseilação frente à hidrolítica (HIDAKA, 1988; CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007). Esta elevada razão entre as atividades torna-se um fator positivo ao se considerar o uso industrial da enzima (HERNALSTEENS, 2006; OLIVEIRA, 2007).

Cuervo-Fernandez et al. (2007), utilizando o *A. oryzae* IPT-301 e meio de cultura similar ao do presente trabalho, obtiveram a máxima produção da enzima em 72 h de fermentação. Foram obtidos valores de atividades hidrolítica e de transfrutoseilação iguais a 3,44 U.mL<sup>-1</sup> e 17,90 U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, correspondendo a uma razão At/Ah entre as atividades de 5,2. No entanto, neste trabalho, durante 72 h de processo, a atividade de transfrutoseilação obtida (10,82 ± 2,26 U.mL<sup>-1</sup>) foi relativamente menor do que a atividade de transfrutoseilação obtida em 64 h de fermentação, resultando numa razão At/Ah de 3,3 ± 1,96. A diminuição da atividade de transfrutoseilação é atribuída a produção concomitante de proteases ácidas pelo *A. oryzae* IPT-301 (CASTRO; SATO, 2014; TSUJITA et al., 1997). Diante desses resultados, definiu-se 64 h como o tempo de processo favorável para a produção da FTases utilizando o *Aspergillus oryzae* IPT 301 como micro-organismo produtor em meio de cultura sintético, sendo este período utilizado como tempo de fermentação padrão para a avaliação da influência da temperatura e do pH nas atividades enzimáticas.

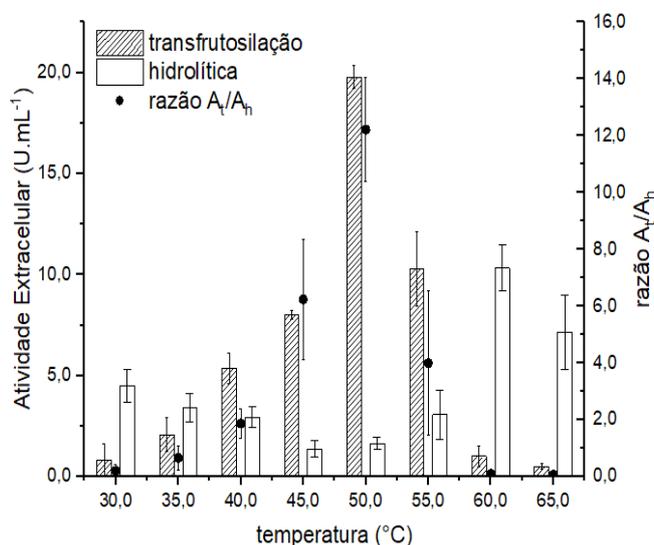


**Figura 4.** Atividades de transfrutoseilação ( $A_t$ ) e hidrolítica ( $A_h$ ) da FTase extracelular, em função do tempo de fermentação, em solução de sacarose 63,6 % (m/v) a 50 °C e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 5,5.

### 3.3 Influência da temperatura do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutoseilação

A influência da temperatura nas atividades enzimáticas é apresentada na Figura 5. A FTase extracelular exibiu atividades máxima (19,53 ± 0,056 U.mL<sup>-1</sup>) e mínima (1,65 ± 0,031 U.mL<sup>-1</sup>) de transfrutoseilação e hidrolítica, respectivamente, para a temperatura de 50 °C. Para as temperaturas de 30 °C e 35 °C houve o predomínio da atividade

hidrolítica, resultado este também observado para as temperaturas de 60 °C e 65 °C, em que ocorreu uma queda na atividade de transfrutoseilação e aumento significativo da atividade hidrolítica, resultando em uma possível na hidrólise enzimática das moléculas de sacarose, conforme reportado por Almeida *et al.* (2005) em estudos utilizando FTases produzida por *Cladosporium cladosporioides*.



**Figura 5.** Influência da temperatura nas atividades hidrolítica ( $A_h$ ) e de transfrutoseilação ( $A_t$ ) da FTase extracelular em solução de sacarose 63,6 % (m/v) e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 5,5.

Similarmente, Yun (1996) e Hayashi *et al.* (1990) indicaram que a faixa ótima de temperatura para a enzima produzida por *Aureobasidium pullulans* e *Aureobasidium* sp., respectivamente, manteve-se entre 45 e 55 °C. Maiorano *et al.* (2009) e Madlová *et al.* (2000) obtiveram uma faixa de temperatura ótima para a atividade de transfrutoseilação compreendida entre 50 °C a 60 °C para FTases produzidas a partir de *A. oryzae* e *Aureobasidium pullulans*. Também Hayashi *et al.* (1990) obtiveram altas atividades de transfrutoseilação a 50 °C para a enzima produzida por *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. Em temperaturas fora dessa faixa, as razões são irrelevantes, não sendo recomendado o uso de FTase extracelular. A razão máxima obtida foi de  $12,22 \pm 1,81$ , isto é, aproximadamente 2,4 vezes maior ao valor da razão obtido por Cuervo-Fernandez *et al.* (2007) nas mesmas condições experimentais utilizando o *A. oryzae* IPT-301 como micro-organismo produtor de FTases.

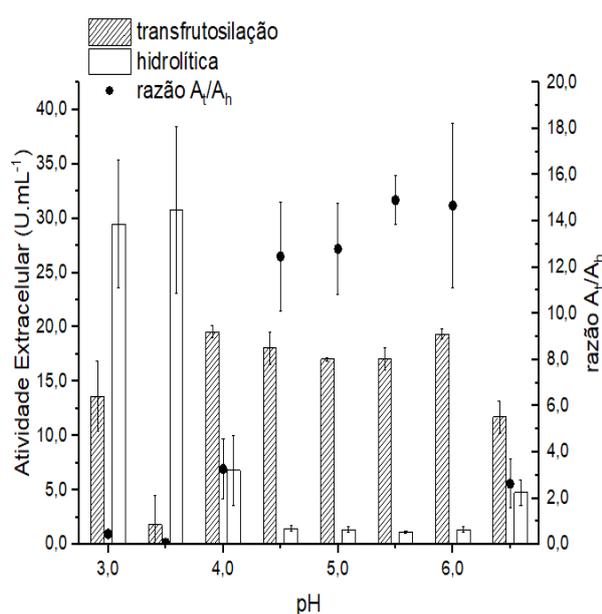
### 3.4 Influência do pH do meio reacional nas atividades hidrolítica e de de transfrutoseilação

A influência do pH do meio reacional enzimático nas atividades hidrolítica e de transfrutoseilação das FTases extracelulares é apresentada na Figura 6. Nota-se que, para valores de pH relativamente baixos (meios reacionais muito ácidos), as atividades hidrolíticas são predominantes.

Contudo, para pH variando entre 4,5 e 6,0, as atividades de transfrutoseilação e hidrolítica mostraram-se estáveis com valores de 18,00 U.mL<sup>-1</sup> e 1,30 U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, caracterizando, portanto, a faixa de pH em que a enzima apresentou máxima atividade, ocorrendo decréscimo nos valores de atividade de transfrutoseilação e aumento da atividade hidrolítica em pH 6,5. Faixas iguais de pH para a atividade da FTase extracelular foram reportadas nos trabalhos de Maiorano *et al.* (2008), Cuervo-Fernandez *et al.* (2007), Sangeetha *et al.* (2005), Katapodis *et al.* (2004) e Hayashi *et al.* (1990).

Oliveira (2007) reportou em seus estudos a ocorrência de hidrólise ácida das moléculas de sacarose em pH inferior a 4,0, tanto para FTases livres ou imobilizadas, inferindo, portanto, na baixa produção de FOS para esta faixa de pH. A ocorrência de hidrólise ácida da molécula de sacarose conjuntamente com a atividade hidrolítica elevada acarretam, possivelmente, a diminuição da razão entre as atividades da FTase extracelular na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 4,0.

Nota-se que na faixa de pH compreendida entre 4,5 a 6,0, a razão entre as atividades manteve-se aproximadamente constante, com valor de  $13,71 \pm 1,26$ , indicando a predominância da atividade de transfrutoseilação. Os estudos de Maiorano *et al.* (2008) reportam que a faixa ótima de pH para a FTase oriunda de *Aspergillus oryzae*, compreendeu-se entre 5,0 e 7,0. Outros trabalhos, como de Ganaie *et al.* (2014) e Kurakake (1996), verificam que a enzima, também produzida por *Aspergillus oryzae*, apresentou valores elevados de atividades de transfrutoseilação para uma faixa de pH compreendida entre 5,0 a 7,0, com pico de atividade em pH 6,0. FTases produzidas por outros micro-organismos possuem faixa ótima de pH próximas aos reportados neste trabalho, como por exemplo as oriundas de *Lactobacillus reuteri* (pH entre 5,0 e 5,5) e *Lactobacillus johnsonii* (pH entre 4,5 e 6,0) (ANWAR *et al.*, 2008; VAN HIJUM *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Influência do pH nas atividades hidrolítica (A<sub>h</sub>) e de transfrutoseilação (A<sub>t</sub>) da FTase extracelular em solução de sacarose 63,6 % (m/v) a 50 °C e solução tampão tris acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup>.

## 4 | CONCLUSÃO

Com base nos resultados desta pesquisa, pode-se concluir que a produção, em escala laboratorial, de FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por fermentação submersa foi bem-sucedida, pois ao decorrer do processo foi possível obter valores satisfatórios para as atividades hidrolítica ( $A_h$ ) e de transfrutossilacção ( $A_t$ ) da enzima e monitorar o crescimento do fungo por meio da construção da sua curva de crescimento ao longo do processo fermentativo. Verificou-se que em 64 h de fermentação, foram produzidas FTases com as maiores atividades de transfrutossilacção ( $19,76 \pm 0,56 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e menores atividades hidrolíticas ( $1,65 \pm 0,31 \text{ U.mL}^{-1}$ ), resultando numa razão entre atividades ( $A_t/A_h$ ) igual a  $12,22 \pm 1,82$ . Com relação aos estudos de caracterização bioquímica, a enzima exibiu máxima atividade de transfrutossilacção e mínima atividade hidrolítica no meio reacional para uma faixa de pH de 4,5-6,0 e temperatura de 50 °C. Portanto, os resultados obtidos atestaram que o fungo se destacou como fonte produtora de FTases extracelulares e estas, por sua vez, mostraram-se promissoras para a síntese de FOS em escala laboratorial.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA A. C. S. et al. **Sucrose hydrolysis catalyzed by autoimmobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides***. Eletronic Journal of Biotechnology, v. 8.,2005.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. **Fructosyltransferase: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides**. Chemical Papers—Chemické Zvesti, v. 55, p. 350–358, 2001.
- ANTOŠOVÁ, M. et al. **Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans***. Journal of Biotechnology, v. 135, p. 58–63. 2008.
- ANWAR, M.A. et al. **The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme**. Applied Environmental Microbiology, v. 74 p. 3426-3433, 2008.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H.H. **Protease form *Aspergillus oryzae*: Biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolases with antioxidant activities**. Journal of Food Processing, v. 2014, 2014.
- CHAPLIN, M; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambrige: Cambrige University Press, 1990.
- CHEN, C. et al. **Cloning, expression and functional validation of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Lactobacillus plantarum***. Process Biochemistry, v.49. p. 758-767, 2014.
- CHEN, W.C.; LIU, C.H. **Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus***. Enzyme and Microbial Technology, v. 18. P 153-160, 1996.
- CHIEN, C.S; LEE,W.C; LIN, T.J. **Immobilization of *A. japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides**. Enzyme Microbiology Technology, v.29. p.252-257, 2001.
- CUERVO-FERNANDEZ, R. et al. **Production of fructooligosaccharides by  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus sp.* 27H**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.79, p.268-272, 2004.
- CUERVO-FERNANDEZ, R. et al. **Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate**. Applied Microbiology and Biotechnology,

v.74, p.87-93, 2007.

CUNHA, J. S. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* ipt-301 visando a obtenção de fructooligossacarídeos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Química, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2017.

DÍAZ, C.J.A.; GUTIERREZ, A.M.; BAHAMON, I.; RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.A.; SÁNCHEZ, O.F. **Computational analysis of the fructosyltransferase enzyme in plants, fungi and bacteria**. *Gene*, 484, 26 (2011).

DOMINGUES, A. L. **An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications**. *Food Bioprocess and Technology*, v. 7, n. 324, 2014.

GANAI, M.A.; LATEEF, A.; GUPTA, U.S. **Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms**. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.172, p. 2143-2159, 2014.

GANAI, M.A.; GUPTA, U.S. **Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides**. *Carbohydrate Polymers*, v.110. p. 253-258, 2014.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. **Dietary modulation of the human colonic microbiota: introduction the concept of prebiotics**. *The Journal of Nutrition*, 125, 1401 (1995).

GUPTA, A.K.; BHATIA, I.S. **Glucofructosan biosynthesis in *Fusarium oxysporum* regulation and substrate specificity of fructosyltransferase and invertase**. *Phytochemistry*, 21, 1249 (1982).

HAYASHI, S. et al. **Production of a fructosyl-transferring enzyme by *Aureobasidium sp.* ATCC 20524**. *Journal of Industrial Microbiology*, v.5, p.395-400, 1990.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de micro-organismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. 184 f. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

HIDAKA, H. **Fructooligosaccharides**. In: The amylase research Society of Japan (ed) *Handbook of amylases and related enzymes*. Pergamon, 1988.

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.

HIDAKA, H. et al. **Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health**. *Bifidobacteria Microflora*, v.5 p.37–50. 1986.

HIRAYAMA, M.; NISHIZAWA, K.; HIDAKA, H. **Production and Characteristics of Fructooligosaccharides**. In: A. Fuchs (Eds.), *Inulin and Inulin-containing Crops*, Elsevier Science, Wageningen, 1993.

KATAPODIS, P. et al. **Biosynthesis of fructo-oligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, p. 378–382, 2004.

KIM, M.H.; IN, M.J.; CHA, H.J.; YOO, Y.J. **An empirical rate equation for the fructooligosaccharide-producing reaction catalyzed by  $\beta$ -fructofuranosidase**. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 458 (1996).

KURAKAKE, M.; ONOUE, T.; KOMAKI, T. **Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae***. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 45, p. 236-239, 1996.

LATEEF, A.; OLOKE, J.K.; PRAPULLA, S.G. **The effect of ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77**. *Enzyme and Microbial Technology*, v.

40, p.1067–1070, 2007.

LEE, J.H.; SHINOHARA, S. **Reaction Route for Enzymatic Production of Neofructooligosaccharides from Sucrose Using *Penicillium citrinum* Cells.** The Journal of Microbiology, v.39, n.4, p.331–333, 2001.

LIM, J.S.; PARK, M.C.; LEE, J.H.; PARK, S.W.; KIM, S.W. **Optimization of culture medium and conditions for Neo-fructooligosaccharides production by *Penicillium citrinum*.** European Food Research and Technology, 221, 639 (2005).

L'HOCINE, L. et al. **Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023.** Journal of Biotechnology, v.81,n. 1, p.73-84, 2000.

MADLOVÁ, A. et al. **Thermal stability of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*.** Chemical Papers, v.54, p.339-344, 2000.

MAIORANO, A.E. et al. **Influence of the culture medium on the fructosyltransferase production.** New Biotechnology, v. 25 S, p. 201, 2009.

MAIORANO, A.E. et al. **Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics.** Biotechnology Letters, v.30. p.1867-1877, 2008.

MALDONADI, I.R.; CARVALHO, P.G.B; FERREIRA, N.A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método DNS.** Brasília: EMBRAPA, 2013.

MÁRQUEZ, D.B.M.; CONTRERAS, J.C.; RODRÍGUEZ, R.; MUSSATTO, S.I.; TEIXEIRA, J.A.; AGUILAR, C.N. **Enhancement of fructosyltransferase and fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in solid-state fermentation using aguamiel as culture medium.** Bioresource Technology, 213, 276 (2016).

MILLER, G.L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** Analytical Chemistry, v.31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOORE, N.C.C.; YANG, L.P.; STORM, H.; OLIVA-HEMKER, M.; SAAVEDRA, J.M. **Effects of fructooligosaccharide-supplemented infant cereal: a double-blind, randomized trial.** British Journal of Nutrition, 90, 581 (2003).

MUSSATTO, S.I.; TEIXEIRA, J.A. **Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source.** Biochemical Engineering Journal, 53, 154 (2010).

OLIVEIRA, E. A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula sp.* e aplicação na produção de frutooligosaccharídeos.** 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2007.

OTTONI, C. A. et al. **Media optimization for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 29, ed. 1, p.49-59, 2012.

PATEL, V.; SAUNDERS, G.; BUCKE, C. **Production of fructooligosaccharides by *Fusarium oxysporum*.** Biotechnology Letters, 16, 1139 (1994).

PERNA, R. F.; CUNHA, J. S.; GONÇALVES, M. C. P; BASSO, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. **Microbial Fructosyltransferase: Production by Submerged Fermentation and Evaluation of pH and Temperature Effects on Transfructosylation and Hydrolytic Enzymatic Activities.** International Journal of Engineering Research & Science, vol 4, Issue-3, 2018.

ROBERFROID, M.B. **Prebiotics: the concept revisited.** Journal of Nutrition, v.137 (sup 3), p.S 830-837, 2007.

ROMANO, N.; SANTOS, M.; MOBILI, P.; VEGA, R.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. **Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-**

- oligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis.** Food Chemistry, 202, 467 (2016).
- SÁNCHEZ, O.; GUIO, F.; GARCIA, D.; SILVA, E.; CAICEDO, L. **Fructooligosaccharides production by *Aspergillus sp. N74* in a mechanically agitated airlift reactor.** Food and Bioprocess Processing, 86, 109 (2008).
- SANGEETHA, P.T. et al. **Fructooligosaccharide production using fructosyltransferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202.** Process Biochemistry, v.40 p.1085–1088, 2005.
- SANTOS-MORIANO, P. et al. **Levan versus fructooligosaccharide synthesis using levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions.** Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, n.119, p. 18-25, 2015.
- SHULER, M.L. **Bioprocess engineering: basic concepts.** 2. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2002.
- TOKUNAGA, T.; OKU, T.; HOSOYA, N. **Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (Neosugar) on growth and gastrointestinal function of the rat.** Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 32, 111 (1986).
- USAMI, S.; ISHII, T.; KIRIMURA, K.; UEHARA, K.; CHEN, J. **Production of  $\beta$ -fructofuranosidase showing fructose-transferring activity by *Penicillium frequentans* (*P. glabrum*).** Journal of Fermentation and Bioengineering, 72, 303 (1991).
- VAN HIJUM, S.A.; VAN DER MAAREL, M.J.; DIJKHUIZEN, L. **Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121.** FEBS Letters, v.534. p.207-210, 2003.
- VEGA, R.; ZÚNIGA-HANSEN, M.E. **Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology.** Bioresource Technology, v.102, p.10180–10186, 2011.
- WANG, L.M.; ZHOU, H.M. **Isolation and identification of a novel *A. japonicus* JN19 producing  $\beta$ -fructofuranosidase and characterization of the enzyme.** Journal of Food Biochemistry, 30, 641 (2006).
- WONG, C.M.; WONG, K.H.; CHEN, X.D. **Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 78, n. 6, p. 927-938, 2008.
- YUN, J. W. **Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation and application.** Enzyme and Microbial Technology, v. 19, p.107-117, 1996.
- YUN, J.W. et al. **Semi-batch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*.** Applied Biochemistry and Biotechnology. v.24/25, p. 299–308, 1990.
- ZENG, X.A.; ZHOU, K.; LIU, D.M.; BRENNAN, C.S.; BRENNAN, M.; ZHOU, J.S.; YU, S.J. **Preparation of fructooligosaccharides using *Aspergillus niger* 6640 whole-cell as catalyst for bio-transformation.** Food Science and Technology, 65, 1072 (2016).

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

**ALBERDAN SILVA SANTOS** é Professor associado das faculdades de Química e Biotecnologia da UFPA; É Engenheiro Químico graduado pela UFPA; É Mestre em Química e Biotecnologia pelo Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL; É Doutor em Bioquímica (Biotransformações com ênfase em oxidações microbiológicas) pelo Instituto de Química da UFRJ. Realizou Estágio pós-doutoral no Departamento de Biotecnologia do Instituto de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos - IATA de Valencia, na Espanha. Atua no ensino de graduação e Pós-graduação no qual orienta Mestrandos e Doutorandos. Coordena projetos de cunho acadêmico-científico nos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular da UFPA, em áreas estratégicas como: Biotransformações; produção de enzimas; desenvolvimento de processos biotecnológicos no aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de biomoléculas de interesse médico, cosméticas e farmacêutica; produção de biomoléculas a partir de cultivo de micro-organismos e cultivo de células vegetais. Aplica técnicas avançadas de Metabolômica e Lipidômica (CG/EM, LC/MS) na investigação metabólica de plantas e micro-organismos. Contribuiu na criação do curso de graduação e do programa de pós-graduação em Biotecnologia da UFPA. Foi o 1º Diretor da Faculdade de Biotecnologia da UFPA no período de 2009-2011. Atuou como vice-coordenador protempore do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFPA. Possui diversas publicações nas áreas da Química e Biotecnologia, assim como patentes. Recebeu a primeira Carta Patente na UFPA em dezembro de 2013. É pioneiro na otimização de processo de produção de metabólitos secundários e enzimas em cultura de células vegetais e de micro-organismos na Região Norte do Brasil.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-85107-47-5

