



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARCOS FELLIPE DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA OBTENÇÃO
DE FRUTOSILTRANSFERASE A PARTIR DE LINHAGENS DE *ASPERGILLUS* spp.
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

GARANHUNS - PE

2018

MARCOS FELLIPE DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA OBTENÇÃO
DE FRUTOSILTRANSFERASE A PARTIR DE LINHAGENS DE *ASPERGILLUS* spp.
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Souza Porto

Co-orientador: Rodrigo Lira de Oliveira

GARANHUNS - PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

S586d Silva, Marcos Fellipe da

Desenvolvimento de processo biotecnológico para obtenção de frutossiltransferase a partir de linhagens de aspergillus spp. utilizando resíduos agroindustriais / Marcos Fellipe da Silva. - 2018. 76 f. : il.

Orientador(a): Tatiana Souza Porto.

Co-orientadora: Rodrigo Lira de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Engenharia de Alimentos, Garanhuns, BR - PE, 2018.

Inclui referências

1. Aspergillus 2. Enzimas 3. Resíduos agroindustriais I. Porto, Tatiana Souza, orient. II. Oliveira, Rodrigo Lira de, co-orient. III. Título.

CDD 612.0151

Marcos Fellipe da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA OBTENÇÃO
DE FRUTOSILTRANSFERASE A PARTIR DE LINHAGENS DE *ASPERGILLUS* spp.
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Comissão julgadora do trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Alimentos

Prof.^a Dr.^a. Tatiana Souza Porto (Presidente)
(Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE)

Prof. Dr.^a. Érika Valente de Medeiros (Membro Titular Interno)
(Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE)

Prof.^a Dr.^a. Camila Souza Porto (Membro Titular Externo)
(Campus Arapiraca - Unidade Educacional de Penedo – UFAL)

*Dedico este trabalho à minha querida avó,
María Elina (in memoriam) que nunca mediu esforços
para me auxiliar nos sonhos que almejo.*

*“A vitória está reservada para aqueles
que estão dispostos a pagar o preço.”*

Sun Tzu

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida, permitindo até neste momento viver debaixo de tua graça. Obrigado por sempre está ao meu lado, me dando forças, conduzindo meus caminhos, cuidando e capacitando a cada momento para enfrentar as diversidades que a vida me impõe.

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Tatiana Souza Porto por tudo que ela me proporcionou durante esses mais de dois anos de iniciação científica. Obrigado professora por ser essa grande mãe científica que és! Agradeço-a por todas as orientações, correções, disponibilidade, confiança, credibilidade, amizade e respeito. És um verdadeiro exemplo de profissional a ser seguido! Sou imensamente grato pela sua fundamental contribuição em minha formação.

Não poderia de deixar de agradecer também a Rodrigo Lira de Oliveira, que além de sua importante co-orientação na execução deste trabalho, se tornou um grande amigo e parceiro científico. Obrigado Zé por todos os ensinamentos repassados, por todas as dicas, correções, puxões de orelha, e também pelas suas descontrações e entusiasmo. Torço bastante pelo seu sucesso e tenho certeza que futuramente você será um excelente profissional.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos. Sobretudo um agradecimento especial a meus pais, Marcos e Cida, por terem sido exemplos para mim em minha criação e pelo amor incondicional que me proporcionam, e ao meu irmão, Ítalo que sempre me apoiou em minha caminhada. Gostaria de lembrar do importante papel que minha querida avó Maria Elina (*In memoriam*) desempenhou na minha vida, sempre me auxiliando e incentivando para que eu alcançasse meus objetivos. Também não poderia deixar de agradecer à minha tia Margarida, por ter me acolhido em seu lar nos primeiros anos da graduação. Quero agradecer também aos meus avós, tias, tio, primos e amigos que sempre torceram e me apoiaram ao longo de minha jornada.

Gostaria de agradecer aos colegas do grupo de pesquisa tanto da presente formação quanto das que já passaram e que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação. Agradecendo especialmente ao meu amigo Allan, que me auxiliou bastante quando iniciei minhas atividades no laboratório, além dos diversos momentos de descontração; a Osmar que sempre contribuiu com seus sábios conselhos e orientações, a Elizane por sempre estar solícita para com todos, além da excelente companhia nos lanches do final da tarde, principalmente quando compensava os experimentos que davam errado; a Yuri pela parceria em um dos experimentos, pela sua amizade e entusiasmo; a Emiliana por toda ajuda e companheirismo; e

a Renann e Jônatas por todas as experiências compartilhadas e pelos diversos momentos de descontração.

Agradeço também às amizades realizadas no CENLAG, especialmente a Jenifer e Julyana por todo companheirismo, paciência e disposição sempre que necessário, além é claro de todas as brincadeiras realizadas ao longo desses anos. A Joyce, Aline, Allana e Melry por todas as conversas e momentos agradáveis durante este período.

Não poderia deixar de agradecer também aos meus amigos e colegas que compõe a maior e melhor turma de engenharia de alimentos que você respeita. A Renann, sou muito grato por todas as parcerias nos trabalhos durante esse curso, pela sua alegria que sempre nos contagiou, pela sua inteligência e até por certas atitudes de gosto duvidoso que inevitavelmente eu julgava. A Giovanna por toda a organização e paciência nos trabalhos, além é claro do seu companheirismo e das diversas sessões de massagens auriculares. A Avla pela sua amizade, companheirismo e também pelas suas neuras na realização dos trabalhos que acabavam se transformando em descontrações. Que esse quarteto continue sempre unido para enfrentar as adversidades impostas pela vida. Gostaria de agradecer também a Marcelo, por todas as caronas oferecidas, pelo seu companheirismo e pelas suas brincadeiras; a Carol pela companhia nos almoços e pelas suas loucuras, que sempre foram motivos de gargalhadas; a Pedro Libório, por sempre ser solícito, pelas suas habilidades com aparelhos eletrônicos e pelas suas loucuras; a Angélica e Pedro Viana pelo seu companheirismo, paciência e reciprocidade; a Keila por suas loucuras e gargalhadas contagiantes; a Aline por sua paciência e pelos seus serviços como representante de sala, a Érica pela sua alegria contagiante e pelos seus brigadeiros deliciosos; a Monnykhe por todas as conversas agradáveis, principalmente aquelas referentes às bolsas e auxílios; a Elyson, Anderson e Emersom por todo companheirismo e pelos momentos agradáveis vivenciados.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) pelo fomento à pesquisa.

Gostaria de agradecer a todos os docentes, profissionais e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação e sempre torceram por mim. Tenho certeza que sem o auxílio de vocês eu não conseguiria chegar até aqui.

Obrigado!

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.1. Estrutura química dos principais fruto-oligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C).

Figura 1.2. Representação da Estrutura Tridimensional da Frutosiltransferase Obtida a Partir de *Aspergillus japonicus*.

Figura 1.3. Mecanismo da reação hidrolítica da 1,2- β -D-frutosiltransferase.

Figura 1.4. Mecanismo da reação de transfrutosilação da 1,2- β -D-frutosiltransferase.

Figura 1.5 Representação Morfológica de uma espécie de *Aspergillus*.

CAPÍTULO II

Figura 2.1. Produção de ocratoxina de espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* após 7 dias de incubação.

Figura 2.2. Produção de aflatoxina de espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* após 7 dias de incubação.

Figura 2.3. Curva de crescimento da biomassa e produção enzimática do *Aspergillus tamaraii* URM4634 em meio farelo de soja por Fermentação em Estado Sólido.

Figura 2.4. Gráfico de Lineweaver-Burk para as atividades hidrolítica e de transfrutosilação da frutosiltransferase de *A. tamaraii* a partir da FES.

Figura 2.5. Efeito da temperatura nas atividades da frutosiltransferase de *A. tamaraii* URM4634.

Figura 2.6. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da frutosiltransferase de *Aspergillus tamaraii* URM 4634.

Figura 2.7. Efeito do pH nas atividades da frutosiltransferase de *A. tamaraii* URM4634.

Figura 2.8. Efeito do pH sobre a estabilidade da frutosiltransferase de *Aspergillus tamaraii* URM 4634.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.1. Frutosiltransferases obtidas por fermentação em estado sólido a partir de diferentes micro-organismos e substratos.

CAPÍTULO II

Tabela 2.1. Relação de fungos filamentos do gênero *Aspergillus* spp. da Micoteca URM/UFPE que foram utilizados nos experimentos.

Tabela 2.2. Níveis que serão utilizados no planejamento 2^3 para estudo da produção de frutosiltransferase por meio da FES.

Tabela 2.3. Micro-organismos de gênero *Aspergillus* e suas respectivas atividades de frutosiltransferase após 72 horas de cultivo em meio à base de farelo de trigo.

Tabela 2.4 Avaliação da produção de frutosiltransferase por *Aspergillus tamaraii* URM4634 por meio da fermentação em estado sólido, utilizando resíduos agroindustriais.

Tabela 2.5. Caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais selecionados para a avaliação da produção de frutosiltransferase por meio da fermentação em estado sólido.

Tabela 2.6. Resultados do planejamento fatorial completo 2^3 para produção de frutosiltransferase de *Aspergillus tamaraii* URM4634 em Fermentação em Estado Sólido.

Tabela 2.7. Efeitos estatísticos calculados para as respostas da produção de frutosiltransferase em Fermentação em Estado Sólido com o planejamento fatorial (2^3).

Tabela 2.8. Parâmetros cinéticos da frutosiltransferase produzida a partir da FES utilizando o *A. tamaraii* URM4634 através do método de Lineweaver-Burk.

Tabela 2.9. Efeitos de íons sobre as atividades da frutosiltransferase de *Aspergillus tamaraii* URM 4634.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AR – Açúcar Redutor

EC – *Enzyme Commission*

F – Frutose

FES – Fermentação em Estado Sólido

FFase- frutofuranosidase

FOS – fruto-oligossacarídeos

F_T – Frutose transferida

FTase - frutossiltransferase

GIA - *Global Industry Analysts*

G - Glicose

GRAS - *Generally Recognized as Safe*

IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

BDA – batata dextrose agar

MAC – meio ágar coco

YES – meio ágar com extrato de levedura e sacarose

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

V_{max} - velocidade máxima de reação

K_m – constante de Michaelis-Menten

RESUMO

A frutossiltransferase é uma enzima envolvida na conversão da sacarose em fruto-oligossacarídeos, açúcares que vêm recebendo uma atenção em especial devido as suas propriedades biológicas e funcionais, que atuam principalmente como prebióticos. Esta enzima, assim como outras biomoléculas podem ser obtidas através de processos biotecnológicos, utilizando diversos tipos de micro-organismos, entre esses processos destaca-se a fermentação em estado sólido por possibilitar o aproveitamento de resíduos agroindustriais, além de promover altas taxas de produção de biomoléculas de interesse. Diante o exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar as variáveis que influenciam a produção de frutossiltransferase utilizando linhagens de *Aspergillus* spp. e resíduos agroindustriais, bem como caracterizar o extrato bruto. Os melhores resultados foram encontrados na espécie *Aspergillus tamarii* URM4634, a qual não apresentou produção de micotoxinas, fermentada no farelo de soja. A partir do planejamento fatorial verificou-se que a melhor condição foi observada utilizando 3g de substrato, 15% de concentração de solução de sacarose e 60% de umidade, durante 72 horas, obtendo 209,11 e 53,90 $\mu\text{mol/mL/min}$ de atividades hidrolítica e de transfrutossililação, respectivamente. Na avaliação do crescimento da biomassa fúngica, verificou-se o maior desenvolvimento em 36 horas de fermentação, observando um teor de 132 mg/g de glicosamina, nesta mesma análise foi verificado que o melhor tempo para produção de frutossiltransferase, utilizando as condições do melhor ensaio do planejamento, foi no período de 96 horas obtendo 221,53 e 66,90 $\mu\text{mol/mL/min}$ de atividades hidrolítica e de transfrutossililação, respectivamente. A enzima produzida apresentou valores de K_m 54,73 e 369,68 $\mu\text{mol/mL}$ e $V_{m\acute{a}x}$ 227,27 e 50,66 $\mu\text{mol/mL/min}$ para as atividades hidrolítica e de transfrutossililação, respectivamente. A temperatura ótima para ambas as atividades foi de 60°C, assim também como pH 6,0. A frutossiltransferase apresentou estabilidade nas faixas de temperatura de 30-50°C e de pH 4,0-5,0. Observou-se também que o íon Mn^{2+} mostrou-se como ativador da atividade hidrolítica, enquanto que o Na^+ apresentou o mesmo efeito na atividade de transfrutossililação. De modo geral todos os resultados mostram-se promissores para a produção biotecnológica de frutossiltransferase, demonstrando altas capacidades de hidrólise da sacarose e transferência dos agrupamentos frutossil, podendo ser potencialmente aplicadas em bioprocessos que visam a síntese de fruto-oligossacarídeos

Palavras-chave: frutossiltransferase, Fermentação em Estado Sólido, *Aspergillus* spp., resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

Fructosyltransferase is an enzyme involved in the conversion of sucrose to fructooligosaccharides, sugars that have received special attention because of their biological and functional properties, which act mainly as prebiotics. This enzyme, as well as other biomolecules can be obtained through biotechnological processes, using several types of microorganisms, among these processes, solid-state fermentation stands out because it allows the use of agroindustrial residues, besides promoting high production rates of biomolecules of interest. The present study had as objective to investigate the variables that influence the production of fructosyltransferase from *Aspergillus* spp. using agroindustrial residues as well as characterize the crude extract. The best results were found in the species *Aspergillus tamaris* URM4634, to which it did not show production of mycotoxins, fermented in the soybean meal. From the factorial design it was verified that the best condition was observed using 3 g of substrate, 15% concentration of sucrose solution and 60% of moisture for 72 hours, obtaining 209.11 and 53.90 $\mu\text{mol} / \text{mL} / \text{min}$ of hydrolytic and transfructosylation activities, respectively. In the evaluation of the growth of fungal biomass, the highest development in 36 hours of fermentation, observing a content of 132 mg / g of glucosamine, in this same analysis it was verified that the best time for production of fructosyltransferase, using the conditions of the best condition of planning were obtained in the 96-hour period, obtaining 221.53 and 66.90 $\mu\text{mol} / \text{mL} / \text{min}$ of hydrolytic and trans-fructosylation activities, respectively. The enzyme produced presented values of K_m 54.73 and 369.68 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ and V_{max} 227.27 and 50.66 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$ for hydrolytic and transfructosylation activities, respectively. The optimal temperature for both activities was 60°C, as well as pH 6.0. The fructosyltransferase presented stability in the temperature ranges of 30-50 ° C and pH 4.0-5.0. It was also observed that the Mn^{2+} ion showed to be an activator of the hydrolytic activity, whereas Na^+ presented the same effect in the transfructosylation activity. In general, all results are promising for the biotechnological production of fructosyltransferase, demonstrating high saccharose hydrolysis and transfer of the fructosyl groupings, potentially being applied in bioprocesses that aim at the synthesis of fructo-oligosaccharides.

Key-words: fructosyltransferase, Solid State Fermentation, *Aspergillus* spp., agroindustrial residues.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
CAPÍTULO I	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Fruto-oligossacarídeos (FOS)	4
3.1.1 Conceitos e legislação	4
3.1.2 Efeitos benéficos dos FOS promovidos à saúde	5
3.1.3 Mercado e aplicações industriais de fruto-oligossacarídeos	6
3.1.4 Fontes de obtenção de fruto-oligossacarídeos.....	7
3.2 Frutossiltransferase	8
3.2.1 Definição e representação estrutural da biomolécula.....	8
3.2.2 Mecanismo de ação	9
3.2.3 Obtenção da enzima	11
3.3 O gênero <i>Aspergillus</i>	12
3.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)	15
3.4.1. Definição, aplicações e outras particularidades	15
3.4.2. Fatores que influenciam a Fermentação em Estado Sólido.....	17
3.5. Resíduos agroindustriais	18

4.REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO II	25
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Obtenção dos micro-organismos	28
2.2. Reativação, esporulação e manutenção dos micro-organismos	28
2.3. Preparação do inóculo	28
2.4. Seleção de linhagens produtoras de frutossiltransferase através da Fermentação em Estado Sólido	29
2.5. Determinação das atividades da frutossiltransferase	29
2.6. Avaliação qualitativa da capacidade de produção de micotoxinas de linhagens de Aspergillus spp.	30
2.7. Seleção do melhor substrato para produção de frutossiltransferase	31
2.8. Caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais	31
2.9. Produção de frutossiltransferase através de um planejamento fatorial	31
2.10. Avaliação do perfil de crescimento da biomassa fúngica em fermentação em estado sólido	32
2.11. Caracterização bioquímica do extrato bruto contendo a frutossiltransferase	33
2.11.1. Determinação dos parâmetros cinéticos das reações catalisadas pela frutossiltransferase	33
2.11.2. Efeitos da temperatura sobre as atividades e estabilidade da frutossiltransferase	33
2.11.3. Efeitos do pH sobre as atividades e estabilidade da frutossiltransferase	33
2.11.4. Efeitos de íons metálicos sobre a atividade da frutossiltransferase	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1. Seleção da melhor linhagem de Aspergillus spp. produtor de frutossiltransferase .	34

<i>3.2. Avaliação qualitativa da capacidade de produção de micotoxinas de linhagens de Aspergillus spp.</i>	36
<i>3.3. Caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais e seleção do melhor substrato para produção de frutossiltransferase</i>	38
<i>3.4. Produção de frutossiltransferase em fermentação em estado sólido com auxílio de um planejamento fatorial</i>	44
<i>3.5. Avaliação do perfil de crescimento da biomassa fúngica em fermentação em estado sólido.</i>	46
<i>3.6. Caracterização bioquímica do extrato bruto contendo a frutossiltransferase</i>	48
<i>3.6.1. Determinação dos parâmetros cinéticos das reações catalisadas pela frutossiltransferase</i>	48
<i>3.6.2. Efeitos da temperatura nas atividades e na estabilidade da frutossiltransferase</i>	50
<i>3.6.3. Efeitos do pH nas atividades e na estabilidade da frutossiltransferase</i>	52
<i>3.6.4. Efeitos de íons metálicos nas atividades da frutossiltransferase.</i>	53
4. CONCLUSÕES	55
5. AGRADECIMENTOS	56
6. REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Atualmente uma parcela significativa da população vem buscando hábitos de vida saudáveis, sendo os cuidados com a alimentação um dos mais pertinentes. Em consequência disto, pesquisadores vem inovando em produtos alimentícios com propriedades nutracêuticas e funcionais de modo a atender este nicho de mercado (BALI et al., 2013). O conceito de alimentos nutracêuticos e funcionais estão relacionados aos produtos ou ingredientes presentes nos mesmos, que proporcionam efeitos positivos na saúde e/ou bem-estar do consumidor além de melhorar seu valor nutritivo, como por exemplo, os prebióticos e probióticos, que atuam principalmente na regulação do sistema gastrointestinal. Entre os prebióticos, os fruto-oligossacarídeos (FOS) tem recebido um interesse particular devido às suas excelentes e diversificadas propriedades biológicas e funcionais (OLIVEIRA; SILVA; PORTO, 2017).

Os FOS são definidos, segundo Yun (1996), como apenas a oligômeros de frutose que são compostos de 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4) em que as unidades de frutose (F) são ligadas na posição beta-2,1 da sacarose (GF), o que os distingue de outros oligômeros. Eles são importantes não apenas pelo seu poder de doçura e pelo baixo conteúdo calórico, mas principalmente por suas propriedades nutricionais, uma vez que atuam principalmente como prebióticos, promovendo o desenvolvimento de bifidobactérias, importantes para o bom funcionamento do intestino; diminuem os níveis de triglicérido sérico, intensificam a absorção de sais minerais, estimulam a redução da pressão sanguínea em indivíduos hipertensos, além de atuarem na prevenção de cáries (DOMINGUEZ et al., 2013).

Diante essa diversidade de benefícios promovidos à saúde humana, no âmbito industrial os FOS acabam possuindo diversas aplicações no setor alimentício, podendo ser utilizados principalmente como enriquecedores ou como substituintes de açúcares e/ou gorduras, especialmente em formulações para sorvetes, sobremesas lácteas, biscoitos e produtos de panificação, barras de cereais, sucos, néctares, produtos de confeitaria, molhos e etc. (ABREU et al., 2011).

Os fruto-oligossacarídeos podem ser obtidos naturalmente de alguns vegetais, como cebola, alho, aspargo, centeio, tomate, e também através da hidrólise enzimática da inulina ou da reação de transfrutoseilação a partir da sacarose. A produção dos FOS em larga escala industrial é preferencialmente realizada pelo processo enzimático de transfrutoseilação, uma vez que a sacarose apresenta custo inferior em relação a inulina, além de proporcionar um maior rendimento em termos de produção quando comparadas aos vegetais (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2011).

As enzimas envolvidas na produção dos fruto-oligossacarídeos são a frutossiltransferase (EC 2.4.1.9) e a β -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26), sendo preferencialmente utilizada a primeira para este processo, uma vez que a mesma possui uma maior atividade de transfrutossilção, possibilitando um maior rendimento de produção de FOS. Ambas enzimas podem ser obtidas a partir de diferentes fontes de origem vegetal e microbiana, sendo preferencialmente obtidas através de micro-organismos, sendo os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* os responsáveis pelas maiores produções a nível industrial, além de que a extração destas enzimas a partir de vegetais é limitada pela sazonalidade (OLIVEIRA; SILVA; PORTO, 2017).

A produção de enzimas através de micro-organismos se dá por processos fermentativos, que podem ser classificados em dois tipos: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). Nesta última, o meio de cultura é composto de substratos sólidos, atuando como fonte de carbono e energia, e apresenta ausência total ou quase total de água livre, o que faz com que essa condição de crescimento tente se aproximar do habitat natural do fungo. Nesse tipo de processo são utilizados produtos ou subprodutos oriundos da agroindústria como substrato, o que proporciona uma vantagem econômica, uma vez que há o aproveitamento de resíduos que seriam possivelmente descartados (ORLANDELLI et. al., 2012).

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do século XX, evidenciou que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental. Entre os setores produtivos, o agroindustrial e o de alimentos destacam-se por produzirem grandes quantidades de resíduos, de diferentes naturezas, tanto líquidos como sólidos. A aplicação destes resíduos em processos biotecnológicos reduziria os elevados problemas de disposição final e potencial poluente, proporcionando a recuperação e reutilização da biomassa e dos nutrientes presentes para a produção de compostos de alto valor agregado (NOVAKI et al; 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as principais variáveis que influenciam a produção de frutossiltransferase por fermentação em estado sólido utilizando linhagens de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp. e resíduos agroindustriais.

2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar as linhagens de *Aspergillus* spp. responsáveis por proporcionar as maiores atividades da frutossiltransferase através da fermentação em estado sólido;
- Avaliar qualitativamente a capacidade de produção de micotoxinas das linhagens selecionadas;
- Caracterizar físico-quimicamente os resíduos agroindustriais;
- Selecionar o responsável pela maior produção de frutossiltransferase através da fermentação em estado sólido;
- Investigar a influência das variáveis: massa de substrato, umidade e concentração de sacarose sobre a produção de frutossiltransferase por fermentação em estado sólido, utilizando um planejamento fatorial completo 2^3 ;
- Avaliar o perfil de crescimento da biomassa fúngica em fermentação em estado sólido a partir do teor de glicosamina na melhor condição do planejamento fatorial;
- Caracterizar bioquimicamente o extrato bruto contendo a frutossiltransferase, investigando os efeitos da temperatura, do pH e dos íons metálicos, além de determinar os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) das reações catalisadas pela enzima.

CAPÍTULO I

3. REVISÃO DA LITERATURA

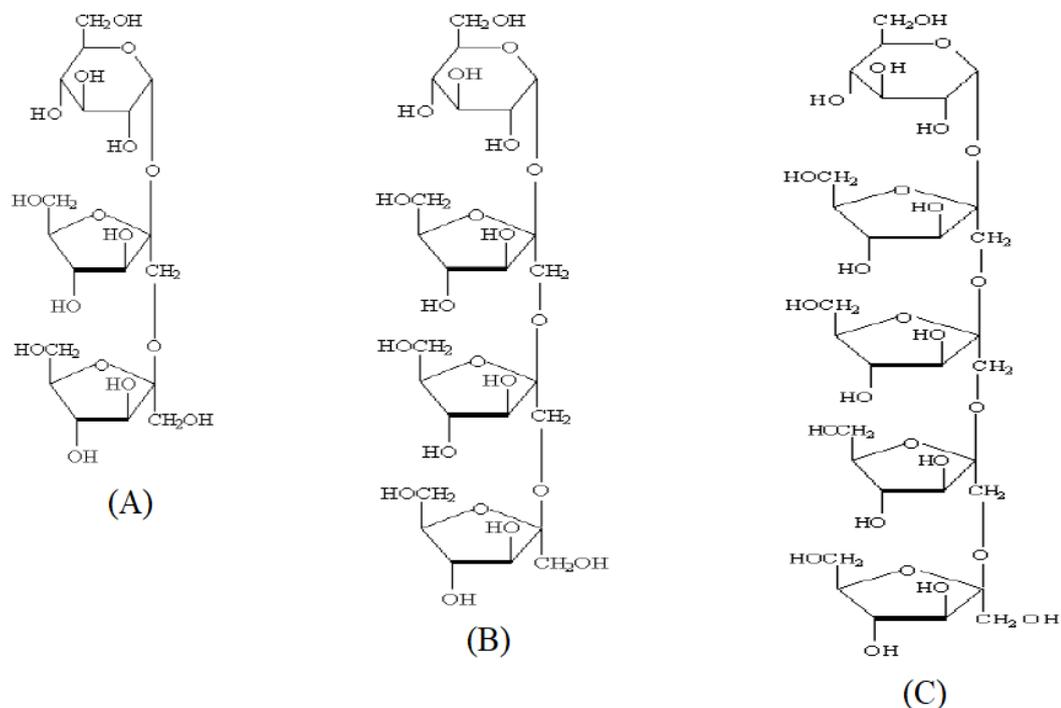
3.1 Fruto-oligossacarídeos (FOS)

3.1.1 Conceitos e legislação

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos conhecidos como açúcares não convencionais e estão entre as classes de prebióticos mais estudadas e utilizadas atualmente, tornando-se de grande interesse para as indústrias alimentícias e farmacêuticas devido principalmente às suas excelentes características funcionais, promovendo, sob o ponto de vista fisiológico, diversos efeitos benéficos ao organismo (SMAALI et al., 2012).

Bioquimicamente falando, os FOS são definidos como apenas a oligômeros de frutose classificados como 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4) em que as unidades de frutose (F) são ligadas na posição β -2,1 da sacarose (Figura 1.1), o que os distingue de outros oligômeros (YUN, 1996).

Figura 1.1. Estrutura química dos principais fruto-oligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C) (DOMINGUEZ et al., 2013).



Este tipo de conformação molecular acaba explicando sua atuação como prebiótico, uma vez que lhe confere resistência contra as enzimas responsáveis pelos processos digestivos. Também são responsáveis pelas suas propriedades físico-químicas, que as distinguem de outros

oligossacarídeos, como sua alta higroscopicidade, estabilidade a temperaturas superiores a 140°C e a pHs ácidos, solubilidade em etanol a 80% e entre outras (ROSA; CRUZ, 2017).

Como status legal, na maioria dos países, os FOS são considerados ingredientes e não aditivos alimentares. São classificados também como fibras dietéticas, assim como a inulina, possuindo o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) podendo ser amplamente aplicados nos processos industriais alimentícios e farmacêuticos (PASSOS; PARK, 2003; ROSA; CRUZ, 2017). De acordo com a Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999 da ANVISA, o consumo de fruto-oligossacarídeos deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis. Recomenda-se que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de FOS se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido. Se o produto for apresentado na forma de comprimidos, cápsulas ou tabletes, os requisitos citados devem ser atendidos na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante, em conjunto da informação destacada no rótulo comunicando que o mesmo deve ser acompanhado da ingestão de líquidos. A quantidade de FOS deve ser declarada na tabela de informação nutricional abaixo de fibras alimentares. O uso de FOS não deve ultrapassar 30 g na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 1999).

Os alimentos cujas formulações incluem FOS como fonte edulcorante, podem incluir no rótulo “açúcar reduzido”, “sem adição de açúcar”, “calorias reduzidas”, produtos “sem açúcar”, produtos “diet” e “produtos funcionais”, se estes promoverem efeito adicional nas áreas de prebióticos, simbióticos e fibras alimentares (ROSA; CRUZ, 2017).

3.1.2 Efeitos benéficos dos FOS promovidos à saúde

Os FOS apresentam ações potencialmente prebióticas, uma vez que não conseguem ser metabolizados através dos processos digestivos, fermentando e conseqüentemente promovendo o crescimento de culturas probióticas como os *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidus* e *Enterococcus faecium* no intestino grosso e no cólon, reduzindo o pH intestinal, principalmente pela produção de ácidos graxos de cadeia curta e outras substâncias de caráter ácido como acetato, propionato e butirato (YU WANG et al., 2010). A incorporação equilibrada dos FOS na dieta intensifica a viabilidade e a adesão desses micro-organismos no intestino; inibindo não só pela competição intraespecífica, mas também pela alteração do próprio pH do meio a ação de bactérias patogênicas e/ou putrefativas, como as do gênero *Escherichia*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Campilobacter*, entre outras; proporcionando a

regularização do peristaltismo e da função de defecação em indivíduos com históricos de constipação intestinal crônica (DOMINGUEZ et al., 2013).

Outros efeitos benéficos que os FOS promovem ao organismo humano constatados na literatura pode-se citar: inibição do desenvolvimento de células cancerígenas, especialmente, no intestino delgado, no cólon e nos tecidos hepáticos e mamários; não causam efeitos cariogênicos, redução dos teores de triglicerídeos, colesterol e glicose sanguíneos, auxiliando no combate de diabetes mellitus e obesidade; estimulação da diminuição da pressão sanguínea, favorecendo os indivíduos hipertensos; intensificação da absorção de sais minerais, principalmente o ferro, cálcio e zinco, demonstrando-se relevante no combate da anemia; ação como imunomoduladores, auxiliando no fortalecimento do sistema imunológico, principalmente no combate contra doenças infecciosas; produção de algumas vitaminas, como as do complexo B e ácido fólico; diminuição dos níveis de uréia no sangue e nos rins, indicando a potencialidade de serem aplicados em terapias de doenças renais crônicas; e entre outros (BALI et al., 2013; DOMINGUEZ et al., 2013; ROSA; CRUZ, 2017).

3.1.3 Mercado e aplicações industriais de fruto-oligossacarídeos

O mercado de fruto-oligossacarídeos demonstra ser bastante promissor tornando-se economicamente viável para as empresas que investem na produção desses bioprodutos. De acordo com as projeções econômicas da *Global Industry Analysts* (GIA), o mercado norte-americano de prebióticos, do qual fazem parte os FOS, chegou a US \$ 225,1 milhões em 2015, enquanto as vendas europeias atingiram cerca de US \$ 1,17 bilhão (CUNHA, 2017). Segundo informações do *Credence Research* (2016), o mercado mundial de fruto-oligossacarídeos foi avaliado em US\$ 344 milhões no ano de 2014 com perspectiva de crescimento de 13,1 % entre os anos de 2015 a 2022.

Algumas empresas como a *Shenzen Victory Biology Engineering Ltd*, *FortiFeed*, *Actilight* e *Allergy Research Group LLC*, investem bastante no seguimento dos prebióticos, em especial os FOS, produzindo e comercializando os mesmos tanto na forma em pó como até em preparações líquidas e xaropes concentrados, que podem ser destinados para a composição de diversas formulações alimentícias e farmacêuticas (BALI et al., 2013).

Além da atuação como prebióticos, outra característica que torna os FOS tão importantes e valiosos é o fato de poderem ser utilizados como substituto de açúcares, uma vez que os mesmos possuem cerca de 40 a 60% do poder edulcorante da sacarose, não deixam sabores residuais, como a maioria dos edulcorantes isentos de calorias, e ainda podem ser

utilizados de maneira segura em formulações destinadas para diabéticos (DOMINGUEZ et al., 2013).

Como algumas fibras dietéticas, os FOS ainda podem atuar como substitutos de gorduras, promovendo o desenvolvimento de produtos mais saudáveis com teor energético reduzido. Também podem exercer a função de agentes estabilizantes, atuando na manutenção e na integridade das substâncias que compõe os alimentos. Além disso, possuem a capacidade de formar géis na presença de água, sendo considerado um bom agente espessante (ABREU et al., 2011; SCOLFORO, SILVA; 2013).

Diante dessa diversidade de benefícios e atuações, os fruto-oligossacarídeos acabam possuindo diversas aplicações no setor alimentício, especialmente em formulações para sorvetes, sobremesas lácteas, biscoitos e produtos de panificação, barras de cereais, geleias, sucos, néctares, produtos de confeitaria, molhos, em alimentos simbióticos funcionais, quando adicionados conjuntamente com micro-organismos probióticos e etc. (ABREU et al., 2011; SCOLFORO, SILVA; 2013).

3.1.4 Fontes de obtenção de fruto-oligossacarídeos

Os FOS podem ser naturalmente obtidos em pequenas quantidades de diversas fontes vegetais, e sua distribuição varia entre as espécies e mesmo dentro das espécies. Na literatura, sua presença é reportada na raiz de alcachofra (*Cynara scolymus*), no alho-poró (*Allium ampeloprasum*), na barba-de-bode (*Scorzonera hispanica*), no alho (*Allium sativum*), no dente-de-leão (*Taraxacum officinale*), na raiz de chicória (*Cichorium intybus*) e na raiz de alcachofra de Jerusalém (*Heliantus tuberosus*) (SINGH; et al, 2017).

No entanto, a produção em larga escala desses prebióticos é realizado preferencialmente através de processos biotecnológicos, uma vez que estes proporcionam maiores rendimentos em termos de produção quando comparados a extração a partir de vegetais (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2011). Os processos enzimáticos são preferidos na indústria de alimentos para a produção dos mais importantes oligossacarídeos, tendo em vista que a estereoseletividade e a regioseletividade das enzimas são necessárias para a síntese de oligossacarídeos estruturalmente bem definidos e estáveis (WANG, 2015).

As enzimas utilizadas para a síntese de FOS são as inulinases (EC 3.2.1.7), enzimas que hidrolisam a inulina, a frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9), que transferem grupos frutossil para moléculas de sacarose e a frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26), também conhecida por invertase, que hidrolisa a sacarose em glicose e frutose, sendo todas estas provenientes de fontes

microbianas ou vegetais (GANAIE et al., 2014). Pelo fato da inulina apresentar um maior custo, há preferência das enzimas que utilizam sacarose como substrato para produção de fruto-oligossacarídeos (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2011). Além disso, há a preferência da utilização da enzima transferase quando comparada com a hidrolase, uma vez que a mesma um maior rendimento de produção de FOS (OLIVEIRA; SILVA; SOUZA, 2017).

3.2 Frutosiltransferase

3.2.1 Definição e representação estrutural da biomolécula

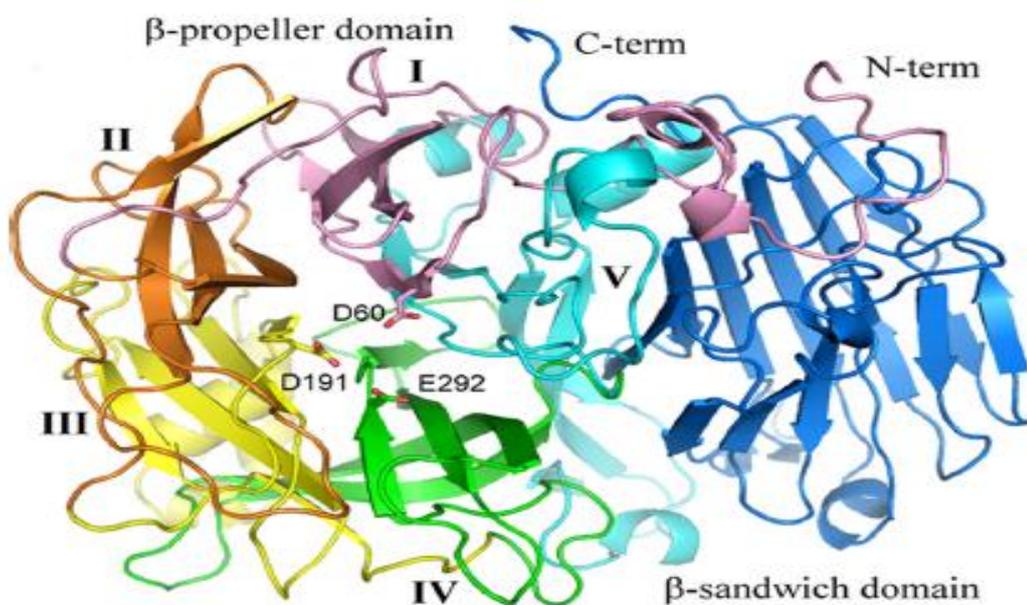
A 1,2 β -D-frutosiltransferase (EC 2.4.1.9) ou simplesmente frutosiltransferase é uma enzima que realiza a catálise da conversão da sacarose em fruto-oligossacarídeos mediante a transferência dos agrupamentos frutossil para resíduos de sacarose, além de outros mecanismos de ação que ainda não são totalmente esclarecidos pela literatura (ANTOŠOVÁ, POLAKOVIČ 2001). Segundo os registros da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), a primeira notificação a respeito desta enzima ocorreu em 1950 mediante os trabalhos desenvolvidos por Bacon e Edelman, sendo catalogada pela *Enzyme Commission* (EC) apenas em 1961 (CUNHA, 2017).

Diversos autores como L'Hocine et al. (2000), Antošová e Polakovič (2001), Ghazi et al. (2005), Ganaie et al. (2014) e Cunha (2017) reportam a inexistência de um consenso na literatura a respeito da nomenclatura correta das enzimas envolvidas na produção de FOS que utilizam a sacarose como substrato, sendo observadas ambiguidades entre as terminologias frutosiltransferase e a frutofuranosidase, mediante os mecanismos hidrolíticos e/ou de transfrutosilação que as mesmas executam.

De acordo com Ghazi et al. (2005), independentemente da fonte de origem e da denominação, tanto a frutosiltransferase (FTase) quanto a frutofuranosidase (FFase) apresentam atividade de transfrutosilação quanto a atividade hidrolítica, em graus diferentes, mas que esta última se limita a produção (normalmente com baixos rendimentos) de FOS necessitando do uso de altas concentrações de sacarose. Ao estudar os processos de separação e purificação de frutosiltransferase e frutofuranosidase produzidas por *Aspergillus niger*, L'Hocine et al. (2000) discutiram amplamente e indicaram que a nomenclatura mais plausível para a enzima responsável pela transferência dos agrupamentos frutossil e a consequente formação dos fruto-oligossacarídeos seria a frutosiltransferase.

Em relação à estrutura tridimensional da enzima, o modelo proposto por Chuankhayan, et al (2010), conforme a Figura 1.2, ao qual foi desenvolvido a partir do sequenciamento da FTase produzida por *Aspergillus japonicus*, sugere a existência de dois domínios com um domínio catalítico N-terminal contendo uma dobra de hélice de cinco lâminas ligadas a um domínio em sanduíche em C-terminal que estão ligados por uma hélice curta de 9 resíduos que estabiliza o dobramento estrutural. Essas interações acabam influenciando diretamente nos mecanismos de ação da biomolécula, assim como também na sua própria caracterização bioquímica.

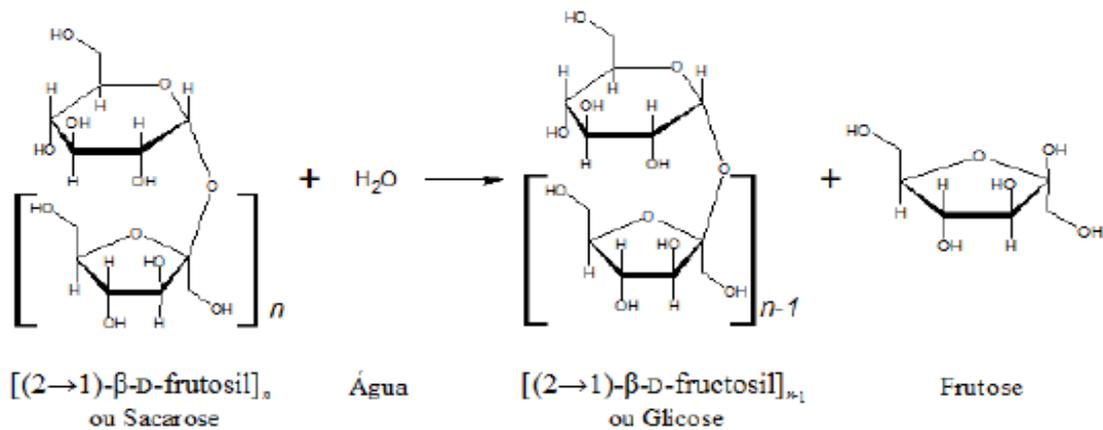
Figura 1.2. Representação da estrutura tridimensional da frutossiltransferase obtida a partir de *Aspergillus japonicus* (CHUANKHAYAN et al., 2010).



3.2.2 Mecanismo de ação

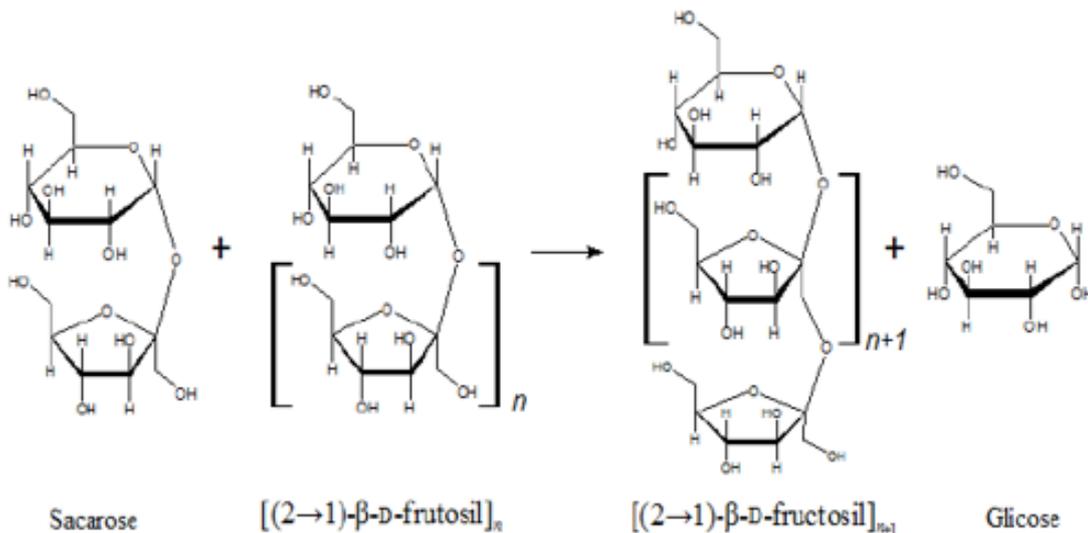
A ação catalítica da frutossiltransferase para a obtenção dos fruto-oligossacarídeos, utilizando a sacarose como substrato, ocorre por meio de pelo menos duas reações distintas: a hidrolítica e a de transfrutossilação. Conforme a Figura 1.3, inicialmente ocorre a hidrólise da sacarose por meio da clivagem da ligação β -1,2, liberando no meio reacional glicose e frutose como subprodutos. Alguns pesquisadores constatam também que após a formação dos FOS, os mesmos ainda podem sofrer esta mesma hidrólise, formando fruto-oligossacarídeos com um grau de polimerização menor (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

Figura 1.3. Mecanismo da reação hidrolítica da frutossiltransferase. (Fonte: CUNHA, 2017).



A reação de transfrutosilação, ilustrada na Figura 1.4, consiste na transferência dos agrupamentos frutosil de um doador ativado, normalmente a frutose, para uma molécula acceptora apropriada, como a sacarose ou outras moléculas, formando diferentes FOS, mediante o grau de polimerização obtido por meio do mecanismo executado (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

Figura 1.4. Mecanismo da reação de transfrutosilação da 1,2-β-D-frutossiltransferase. (Fonte: CUNHA, 2017).



Diante disso, diversos estudos, como os de Hayashi; et al (1990), Chen e Liu (1996), Kurakake; et al (1996), Veja e Zúniga-Hansen (2011) e Cunha (2017) propõem que a concentração de frutose transferida e a conseqüente formação dos fruto-oligossacarídeos pode ser obtida indiretamente pelos balanços de massa demonstrados pelas equações abaixo:

$$[F_T] \text{ ou } [FOS] = [G] - [F] \quad (1)$$

$$[AR] = [G] + [F] \quad (2)$$

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

Substituindo (3) em (1), tem-se:

$$[F_T] \text{ ou } [FOS] = [G] - ([AR] - [G]) \quad (4)$$

$$\text{Logo, } [F_T] \text{ ou } [FOS] = [2G] - [AR] \quad (5)$$

Em que $[ART]$, $[F]$, $[G]$ e $[FOS]$ representam as concentrações de açúcares redutores totais, frutose, glicose e fruto-oligossacarídeos, respectivamente, expressas em $\mu\text{mol/mL}$.

3.2.3 Obtenção da enzima

A frutossiltransferase pode ser obtida tanto a partir de extratos brutos vegetais como microbianos, apresentando vantagens e desvantagens de ambas as fontes de obtenção. A de origem vegetal por exemplo, pode ser obtida a partir de diversas plantas superiores, como aspargos, alcachofra de Jerusalém, chicória, cebola, batata doce, alface, cevada e etc. Apesar do processo de obtenção ser mais simples, com um menor número de etapas, a frutossiltransferase obtida por plantas apresenta limitações por condições sazonais e pela baixa produtividade, assim a produção industrial dos FOS depende principalmente das enzimas de origem microbiana, tendo em vista a possibilidade de aumento de escala e a facilidade no controle das variáveis do processo envolvidas (SINGH et al., 2017; CUNHA, 2017).

Além disso, a frutossiltransferase de origem microbiana geralmente apresenta uma massa molecular maior, além de ser mais termoestável em comparação com as derivadas de plantas, podendo ser produzida em praticamente qualquer lugar, desde que sejam controlados os parâmetros do processo, não dependendo de um período específico para a obtenção, resultando em biocatalisadores com maiores atividades hidrolíticas e de transfrutosilação e consequentemente maiores rendimentos na produção de FOS (YUN, 1996; GANAIE, 2014; BATISTA, 2018).

Diversos micro-organismos são reportados na literatura como produtores de frutossiltransferase através de processos fermentativos. Entre os principais, pode-se citar o *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aureobasidium pullulans*, *Helianthus tuberosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc citreum*, *Myceliophthora heterothallica*, *Paenibacillus macerans*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium purpurogenum* (CUNHA, 2017).

Entre as espécies citadas anteriormente, os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* estão entre as que mais se destacam, uma vez que, além de apresentarem altos rendimentos na produção de enzimas de interesse industrial, os mesmos apresentam a ubiquidade em crescer em ampla faixa de temperaturas (5 – 50°C), pH (2,0 – 11,0) e osmolaridade de até 34% de sal; além disso, algumas espécies, como por exemplo *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus tamarii*, têm incentivado o desenvolvimento de pesquisas e aplicações, principalmente por apresentarem o status de GRAS (LATEEF et al., 2012; SILVA, 2014; BATISTA, 2018).

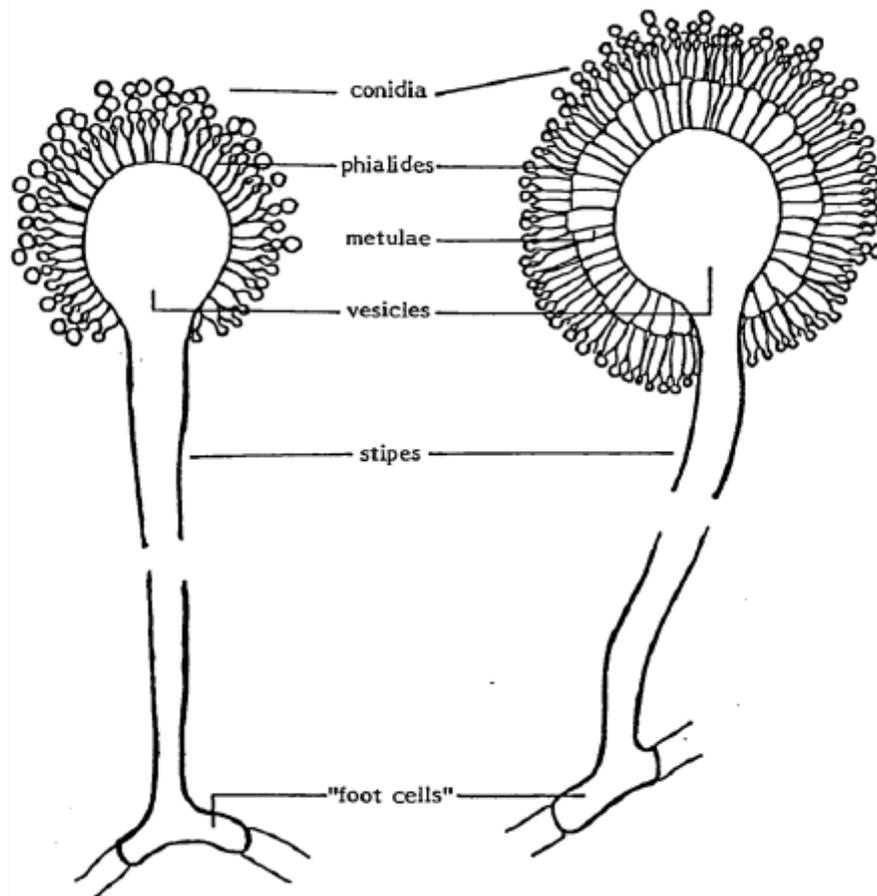
3.3 O gênero *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são organismos pertencentes ao filo *Ascomycota*, classe dos *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales* e família *Trichocomaceae*. Este gênero foi inicialmente catalogado e nomeado pelo sacerdote e botânico italiano Pietro Micheli em 1729. Recebeu este nome devido a sua forma quando observado ao microscópio, parecendo-se com um aspersório (borrifador de água benta) (BENNETT, 2010).

Existem mais de 260 espécies dentro deste gênero, mas apenas cerca de 20 têm sido encontradas como causas de doenças em organismos. As colônias desses micro-organismos, geralmente têm crescimento rápido e densamente distribuídos nos substratos, inicialmente apresentam-se com colorações esbranquiçadas, amareladas, passando para o marrom, o esverdeado ou para o negro. As colônias são compostas por micélios aéreos com conidióforos eretos sobre a superfície do meio (HUBKA et al., 2013; SILVA, 2014).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são anamórficos e produzem conídios assexuados em estruturas características do gênero, os conidióforos denominados *aspergillum*, que estão representados na Figura 1.5. Durante a diferenciação micelial algumas células se ampliam e desenvolvem uma espessa parede celular, formando as células podais, em forma de T ou L, e a partir delas se formam os conidióforos perpendiculares à essas células. O conidióforo se desenvolve ereto a partir do ramo de hifas, que aumenta em sua extremidade, formando uma vesícula arredondada, elíptica ou em forma de taco. Essa vesícula dá origem às métulas e fiálides, que por sua vez, produzem longas cadeias de esporos mitóticos denominados conídios (TERRONE, 2017).

Figura 1.5. Representação morfológica de uma espécie de *Aspergillus* (TERRONE, 2017).



Todas essas estruturas apresentam características específicas, quando cultivadas em um mesmo meio de cultura, como, tamanho, arranjo, formato do conidióforo e dos conídios, bem como a coloração, o que permite a diferenciação e classificação das espécies. Quando a “cabeça *aspergillar*” apresentar métulas esta espécie de micro-organismo deverá ser classificada como bisseriada, quando não, unisseriada. (SILVA, 2014; TERRONE, 2017).

Os micro-organismos pertencentes a este gênero têm sido amplamente utilizados para o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado, principalmente para os segmentos alimentícios, agroindustriais e farmacêuticos. Estes fungos são importantes para a produção de enzimas, sendo utilizados para pesquisas em engenharia metabólica bem como na engenharia genética, demonstrando-se de grande potencial para produção de proteínas e outras biomoléculas, através do desenvolvimento de processos de fermentação em estado sólido e submerso (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009). Diversas pesquisas apontaram que a secreção de proteínas em fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* ocorrem nas zonas apicais das hifas em crescimento, uma vez que as pontas das hifas em crescimento são mais porosas, tornando-

se mais fácil para as enzimas extracelulares se deslocarem através da parede celular (SILVA, 2014).

Diferentes linhagens de *Aspergillus* são reportadas na literatura como produtoras de frutossiltransferase. A Tabela 1.1 apresenta as principais espécies desse gênero utilizadas para síntese desta enzima, por meio da Fermentação em Estado Sólido, assim como também algumas condições para obtenção desta biomolécula.

Tabela 1.1. Frutossiltransferases obtidas por fermentação em estado sólido a partir de diferentes micro-organismos e substratos.

Micro-organismo	Substratos	Tempo de fermentação (horas)	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i>	Farelos de trigo, milho, arroz e aveia, gérmen de milho, fubá, sabugo de milha, polpa de café, casca de café,, bagaço de cana, mandioca	120	Sangeetha et al. (2004)
<i>Aspergillus japonicus</i>	Epiderme do café	48	Mussatto; Teixeira (2010)
<i>Aspergillus niger</i>	Casca de castanha	48	Lateef et al. (2012)
<i>Aspergillus awamori</i>	Farelos de trigo, arroz e aveia, sabugo de milho, bagaço de cana, resíduo de óleo de amendoim e coco, resíduo de abacaxi, fibra do óleo de palma	96	Sathish et al. (2013)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Hidromel	48	Muñiz-Márquez et al. (2016)
<i>Aspergillus flavus</i>	Farelo de trigo	72	Ganaie et al. (2017)

A determinação das condições ótimas para o crescimento e o desenvolvimento dos micro-organismos são essenciais para a viabilidade dos processos biotecnológicos, uma vez que qualquer estresse causado no ambiente que possa afetar a dinâmica populacional do micro-organismo, conseqüentemente interferirá na síntese dos metabólitos de interesse (SILVA, 2014).

3.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)

3.4.1. Definição, aplicações e outras particularidades

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é definida como o cultivo de micro-organismos em substratos sólidos insolúveis na ausência (ou quase) de água livre. Nesse caso, o substrato fornece umidade suficiente para o desenvolvimento do micro-organismo e o funcionamento de seu metabolismo (PANDEY, 2003). Quase todos os processos de fermentação utilizados nos tempos antigos eram baseados nos princípios de FES. Alguns estudiosos sugerem que esta antiga técnica surgiu no oriente, datada aproximadamente de 2.600 a.C. Mesmo assim, como o advento da tecnologia, a técnica foi aprimorada ao longo dos anos no intuito de maximizar a produtividade, oferecendo atualmente inúmeras oportunidades no processamento de substratos agroindustriais (SILVA, 2014).

Uma das principais características desse tipo de cultivo é a fase sólida atuar como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento microbiano. Por esse motivo é interessante que se utilizem substratos com composição rica em nutrientes essenciais e, que, ao mesmo tempo, apresentem boa porosidade, para que o ar necessário ao desenvolvimento microbiano possa chegar ao micro-organismo (PANDEY, 2003).

Entre as vantagens da utilização da Fermentação em Estado Sólido quando comparada à Fermentação Submersa tem-se um maior volume de reaproveitamento de substratos de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, o baixo requerimento de água e energia durante o cultivo, a baixa possibilidade de contaminação, a concentração e maior estabilidade dos produtos e a alta produtividade. Algumas desvantagens como a dificuldade no controle de alguns parâmetros no processo e a heterogeneidade ainda são inerentes ao processo (SINGHANIA et al., 2009).

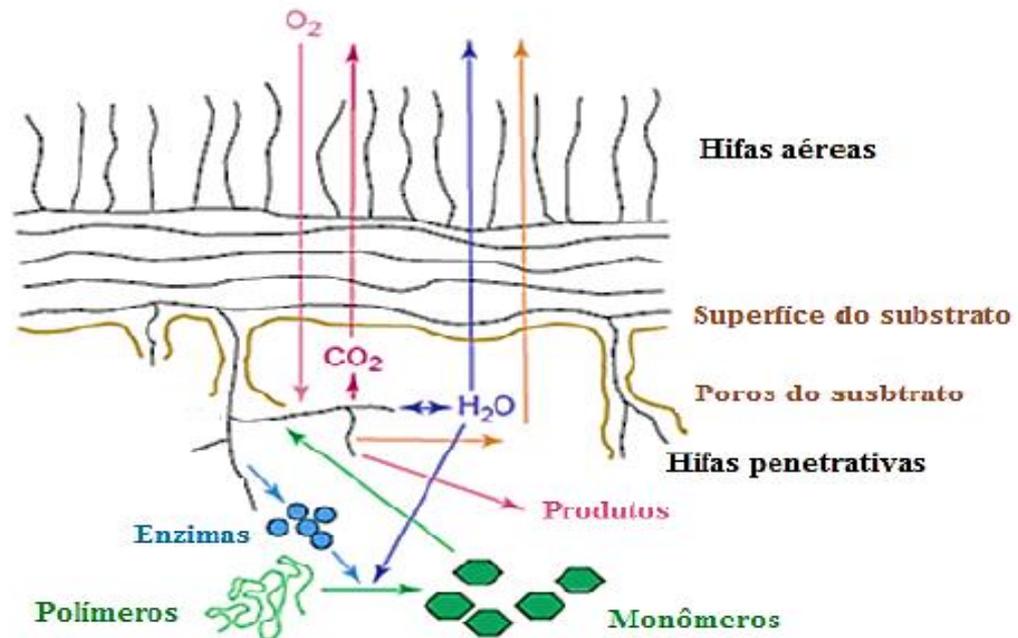
A Fermentação em Estado Sólido tem mostrado um enorme potencial tecnológico no que diz respeito ao desenvolvimento de produtos que apresentam componentes derivados de

micro-organismos como rações para animais, produtos para a indústria alimentícia, química e farmacêutica. Estas aplicações envolvem a biotransformação de produtos e resíduos agrícolas para enriquecimento nutricional, produção de biomassa e formação de produtos com alto valor agregado, como metabólitos biologicamente ativos, incluindo enzimas, antibióticos, alcalóides, ácidos orgânicos, biopesticidas, micro-pesticidas e bioerbicidas, biossurfactantes, biocombustíveis, compostos aromáticos e etc. (MESSIAS et al., 2011).

Bactérias, leveduras e fungos são capazes de crescer nesse tipo de fermentação. Contudo, os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a essa condição, já que necessitam de pouca água (medido como atividade de água, a_w) para o seu desenvolvimento e não são prejudicados com altas concentrações de sólidos no meio. Além disso, seu crescimento por meio de hifas favorece a colonização no substrato sólido (MESSIAS et al., 2011).

Na FES biomoléculas, como as enzimas, por exemplo, são produzidas pelos fungos diretamente sobre substrato insolúvel em água. Para que isso ocorra é necessário que após a esporulação as hifas desenvolvam como um tapete de micélio se espalhando por todo o substrato. Enquanto algumas hifas aéreas se sobressaem outras penetram no substrato por crescimento em espaços entre os grãos dos sólidos padronizados. As atividades metabólicas ocorrem principalmente perto da superfície do substrato e no interior dos poros; no entanto, regiões expostas do micélio mostram também o metabolismo e podem haver um transporte de substâncias a partir da penetração de hifas aéreas. Enzimas hidrolíticas, que são produzidas pelo micélio, difundem para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em unidades menores. Assim, o substrato é tomado pelo fungo para servir como nutrientes. O oxigênio é consumido e o gás carbônico, água, calor e outros produtos bioquímicos são produzidos durante a fermentação, podendo ser extraídos para uso posterior ao final do bioprocessamento (SILVA, 2014). A Figura 1.6 ilustrada abaixo, esquematiza os fenômenos que ocorrem durante a fermentação em estado sólido.

Figura 1.6. Representação do crescimento de um fungo filamentososo em substratos sólidos (SILVA, 2014).



Quanto à frutossiltransferase, conforme a Tabela 1.1 apresentada no tópico anterior, são reportadas na literatura algumas pesquisas que abordam a produção desta enzima a partir da Fermentação em Estado Sólido, utilizando diferentes micro-organismos e substratos, principalmente resíduos agroindustriais.

3.4.2. Fatores que influenciam a Fermentação em Estado Sólido

Há diversos fatores que podem influenciar a FES, estes incluem a seleção do micro-organismo adequado e substrato, concentração do inóculo, umidade, temperatura, oxigênio, pH e a concentração de nutrientes. Essas condições afetam significativamente o crescimento celular microbiano e conseqüentemente a formação dos produtos desejados (SILVA, 2014).

Com relação ao inóculo fúngico, existem várias formas de prepará-lo. Para identificar o tipo de inóculo mais adequado a ser empregado, tanto a natureza dos fungos envolvidos como a finalidade dos estudos têm de ser levados em consideração. Os métodos de preparação de inóculo normalmente aplicados para FES incluem suspensão de esporos, disco de micélios, suspensão de micélios e substratos pré-inoculados. A concentração adequada de inóculo,

relacionada ao substrato, é de grande importância para suprir a necessidade metabólica dos micro-organismos, garantindo a geração de produtos de interesse, sem esgotar os nutrientes prematuramente (YOON et al., 2014).

A aeração cumpre as funções básicas em um sistema como manter a aerobiose, eliminar o dióxido de carbono, regular a temperatura do substrato, ajustar o nível de umidade, além de promover a circulação do ar entre as partículas do substrato fazendo com que as partículas presentes no meio se misturem. A técnica de FES tem caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é limitada por uma película de líquido na superfície do substrato (NIGAM; PANDEY, 2009; SILVA, 2014).

O teor de umidade ótimo em um substrato sólido está intimamente relacionado com a disponibilidade de nutrientes e a difusão de oxigênio durante o cultivo. O alto teor de umidade diminui a porosidade, com a perda da estrutura das partículas, interferindo na difusão do oxigênio, além de aumentar o risco de contaminação. Ao contrário, o baixo teor de umidade pode limitar a solubilidade dos nutrientes, dificultando o desenvolvimento de microrganismos (CASTRO; SATO, 2015).

Os fatores pH e temperatura podem variar no decorrer do cultivo. As variações resultam do consumo de substrato e/ou produção de metabólitos. Eles são indicadores de mudanças na atividade metabólica. O calor gerado durante o processo fermentativo deve ser dissipado, já que o aumento da temperatura pode afetar a germinação de esporos, o crescimento, a formação de produtos e a esporulação. Apesar de ser complexo, devido a heterogeneidade e consistência do substrato, o controle do pH é bastante importante para que não prejudique o crescimento celular e a produção da biomolécula. Uma maneira de manter o pH pouco variável é a utilização de soluções tampão para umidificação do substrato (NIGAM; PANDEY, 2009).

3.5. Resíduos agroindustriais

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do século XX, evidenciou que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental. Entre os setores produtivos, o agroindustrial e o de alimentos destacam-se por produzirem grandes quantidades de resíduos, de diferentes naturezas, tanto líquidos (efluentes) como sólidos. A aplicação destes resíduos em processos biotecnológicos reduziria os elevados problemas de disposição final e

potencial poluente, proporcionando a recuperação e reutilização da biomassa e dos nutrientes presentes para a produção de compostos de alto valor agregado (NOVAKI et al; 2010).

O estudo de meios industriais de fermentação para obtenção de produtos biotecnológicos tem recebido grande atenção nos últimos anos. Diversos coprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e da agroindústria têm sido empregados e reaproveitados para obtenção de produtos biotecnológicos, pela alta disponibilidade e por representarem fonte alternativa de baixo valor comercial (ERNANDES; et al., 2010). Entre esses produtos biotecnológicos destaca-se a produção de enzimas, a qual é frequentemente limitada pelos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Estima-se que aproximadamente 30-40% do custo envolvido na produção de enzimas é devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos micro-organismos, portanto sua otimização é de grande importância para a redução de custos (MANERA; et al., 2011).

Além de serem baratos e abundantes, os resíduos agroindustriais normalmente apresentam estrutura polimérica rica em amido, lignocelulose, pectina e proteína. Estes materiais orgânicos, em sua maioria insolúveis em água, são fontes de carbono e nitrogênio, atuando como suporte para o crescimento de micro-organismos. Normalmente são materiais particulados, e água presente no meio encontra-se complexada na matriz sólida, a qual pode ser aproveitada pela cultura microbiana. Bactérias e leveduras tendem a crescer na superfície, enquanto que a estrutura micelar de fungos filamentosos penetra as partículas do substrato.

Vários resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substrato, em processos fermentativos, como por exemplo, o bagaço de laranja, o de cana e o de abacaxi, casca de maracujá, farelos de trigo, soja, milho e arroz, polpa de maçã e de café, entre outros (NOVAKI et al; 2010).

4.REFERÊNCIAS

ABREU, D. A.; SILVA, L. M. R.; LIMA, A. S.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Desenvolvimento de bebidas mistas à base de manga, maracujá e cajú adicionadas de prebióticos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 22, n. 2, p. 197-203,2011.

AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 03, p. 363–372, 2011.

ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferase: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers—Chemicke Zvesti**, v. 55, p. 350–358, 2001.

BALI, V.; PANESAR, P.; BERA, M.; PANESAR, R. Fructo-oligosaccharides: Production, purification and potential applications. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, v.839, n. 8, p. 37–41, 2013.

BATISTA, J. M. S. **Produção, purificação de frutossiltransferase por *Aspergillus* spp. isolados da caatinga e sua aplicação na síntese de fruto-oligossacarídeos**. 2018. Tese (Doutorado em Biociência Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. ***Aspergillus* molecular Biology and Genomics**. 1th ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2010, p. 1-17

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Resolução n° 18, de 30 de abril de 1999**. Brasília, DF, 1999.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro59 industrial wastes valorization. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 6, p. 1085-1093, 2015.

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

CHUANKHAYAN, P.; HSIEH, C.; HUANG, Y.; HSIEH, Y.; GUAN, H.; HSIEH, Y.; TIEN, Y.; CHEN, C.; CHIANG, C.; CHEN, C. Crystal structures of *Aspergillus japonicus* fructosyltransferase complex with donor/acceptor substrates reveal complete subsites in the active site for catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 30, p. 23251-23264, 2010.

CREDENCE RESEARCH. Fructooligosaccharides (FOS) market by application (Food & Beverage, Dietary Supplements, Animal Feed and Pet Food) - **Growth, Share, Opportunities & Competitive Analysis**, 2015-2022. 2016.

CUNHA, J. S. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* PT-301 visando a obtenção de fruto-oligossacarídeos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Instituto de Ciência e Tecnologia – Campus Poços de Caldas, Universidade Federal de Alfenas.

DOMINGUEZ, A. L.; RODRIGUES, L. R.; LIMA, N. M.; TEXEIRA, J. A. An overview of the recent developments on fructooligosaccharides production and applications. **Food and Bioprocess Technology**. New York, v. 6, n. 12, 2013.

ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C. H. G. Influência da composição do meio para a produção de *Zimomonas mobilis*. **Acta Scientiarum. Technology** v. 32, n. 1, p 21-26, 2010.

GANAIIE, 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.

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

GANAIIE, M. A; SONI, H.; NAIKOO, G. A.; SANTOS, L. T. O.; RAWAT, H. K.; MEHTA, P. K.; NARAIN, N. Screening of low cost agricultural wastes to maximize the fructosyltransferase production and its applicability in generation of fructooligosaccharides by solid state fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 118, p. 19–26, 2017.

GHAZI, I.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; GARCIA-ARELLANO, H.; FERRER, M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J. Purification and kinetic characterization of a

fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v.128, n.1, p. 204-211, 2005.

HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; SHIMOKAWA, Y.; TUBOUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Production of a fructosyl-transferring enzyme by *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v.5, p.395-400, 1990.

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

LATEEF, A.; OLOKE, J. K.; GUEGUIM-KANA, E. B.; RAIMI, O. R.. Production of fructosyltransferase by a local isolate of *Aspergillus niger* in both submerged and solid substrate media. **Acta Alimentaria**, v. 41, n. 1, p. 100–117, mar. 2012.

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.

LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 53–75, 2009.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32 (2): 213-234, 2011.

MANERA, A. P; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; FILHO, F. M. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidade de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum Technology**. Maringá, v. 33, n. 2, p. 155-161, 2011.

MUÑIZ-MÁRQUEZ, D. B. et al. Bioresource technology enhancement of fructosyltransferase and fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in Solid-State Fermentation using aguamiel as culture medium. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 276-282, 2016.

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**, v. 53, n. 1, p. 154–157, dez. 2010.

NEMUKULA, A., MUTANDA, T., WILHELMI, B. S., WHITELEY, C. G. Response surface methodology: synthesis of short chain Fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2040–2045, 2009.

NIGAM, P. S. NEE'; PANDEY, A. **Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues**. Dordrecht: Springer Netherlands, , 2009. (Nota técnica).

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

OLIVEIRA, R. L.; SILVA, M. F.; PORTO, T. S. Imobilização de frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus* por aprisionamento em alginato e àgar-agar. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 2, p. 17-21, 2017.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p.81-84, 3// 2003.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciências Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p.385-390, 2003.

ROSA, L. P. S.; CRUZ, D. J. Aplicabilidade dos fruto-oligossacarídeos com alimento funcional. **Nutrivisa**. v. 4, n. 1, p.68-79, 2017.

SAALI, I; JAZZAR, S.; SOUSSI, A.; MUZARD, M.; AUBRY, N.; MARZOUKI, M. N. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from date by-products using an immobilized crude enzyme preparation of β -d-fructofuranosidase from *Aspergillus awamori* NBRC 4033. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 17, p. 385-392, 2012.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 5, p. 530–537, 2004.

SATHISH, T.; PRAKASHAM, R. S. Intensification of fructosyltransferases and fructooligosaccharides production in solid state fermentation by *Aspergillus awamori* GHRTS. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 337–342, 6 set. 2013.

SCOLFORO, C. Z.; SILVA, E. M. M. Elaboração de geleia de maçã enriquecida com frutooligossacarídeo. **Alim. Nutr. = Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v.24, n.1, p. 115-125, abr./jun. 2013.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 4/15/ 2009.

SILVA, O. S. Produção de proteases por linhagens de *Aspergillus* e extração em sistema de duas fases aquosas. 2014. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal). Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SINGH, S.P.; JADAUM, J. S.; NARNOLIYA, L. K.; PANDEY, A. Prebiotic oligosaccharides: special focus on fructooligosaccharides, its biosynthesis and bioactivity. **Applications Biochemystre Biotechnology** . DOI 10.1007/s12010-017-2605-2. Índia, 2017.

TERRONE, C. C. α -arabinofuranosidase de *Aspergillus hortai* CRM1919: Produção, purificação, caracterização e aplicação na hidrólise de hemiceluloses de resíduos agroindustriais. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Microbiológicas – Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências – Rio Claro. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

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, T. Synthesis of neofructooligosaccharides. **Organic Chemistry Insights**, v.5, p. 1-6, 2015.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides - occurrence, preparation and applications. **Enzymes and Microbial Technology**. Kyungbug, v.19, p.107-117, 1996.

YU WANG, M. A.; TAO ZENG, M. D.; SHU-EWANG, M. A.; WEIWANG, M. A.; QIAN WANG, M. A.; HONG-XIA YU, M. A. Fructooligosaccharides enhance the mineral absorption and counteract the adverse effects of phytic acid in mice. **Nutrition**, v. 26, p. 305–311, 2010.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE A PARTIR DE LINHAGENS DE *ASPERGILLUS* spp. UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

SILVA, M. F¹; OLIVEIRA, R. L²; PORTO, T. S¹.

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns; Av. Bom Pastor, Boa Vista, 55296-901, Garanhuns – PE.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco – Rede Nordeste de Biotecnologia; Dom Manoel Medeiros, Dois Irmãos, 52171-900, Recife – PE.

RESUMO

A frutossiltransferase é uma enzima envolvida na conversão da sacarose em fruto-oligossacarídeos, açúcares que vêm recebendo uma atenção em especial devido as suas atuações como prebióticos. Esta enzima, assim como outras biomoléculas podem ser obtidas através de bioprocessos, destacando-se a fermentação em estado sólido por possibilitar um melhor aproveitamento de resíduos agroindustriais. O presente trabalho teve como objetivo investigar as variáveis que influenciam a produção de frutossiltransferase utilizando linhagens de *Aspergillus* spp. e resíduos agroindustriais, bem como caracterizar o extrato enzimático bruto. Os maiores valores em atividade foram obtidos a partir do *Aspergillus tamaris* URM 4634, com o substrato farelo de soja, onde o mesmo não produziu micotoxinas. A partir do planejamento fatorial e da avaliação do crescimento da biomassa, verificou-se que a melhor condição foi observada utilizando 3g de substrato, 15% de concentração de solução de sacarose e 60% de umidade, durante 96 horas, obtendo 221,53 e 66,90 $\mu\text{mol/mL/min}$ de atividades hidrolítica e de transfrutossililação, respectivamente. A frutossiltransferase produzida apresentou valores de K_m 54,73 e 369,68 $\mu\text{mol/mL}$ e $V_{m\acute{a}x}$ 227,27 e 50,66 $\mu\text{mol/mL/min}$ para as atividades hidrolítica e de transfrutossililação, respectivamente. A temperatura ótima para ambas as atividades foi de 60°C, assim também como pH 6,0. A frutossiltransferase apresentou estabilidade nas faixas de temperatura de 30-50°C e de pH 4,0-5,0 em ambas atividades. Em suma, todos os resultados mostraram-se promissores para a produção biotecnológica de frutossiltransferase, podendo viabilizar a obtenção em larga escala de fruto-oligossacarídeos.

Palavras-chave: frutossiltransferase, produção, *Aspergillus* spp., resíduos agroindustriais.

CHAPTER II

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF FRUCTOSYLTRANSFERASE FROM *ASPERGILLUS* spp. STRAINS USING AGRICULTURAL RESIDUES

SILVA, M. F¹; OLIVEIRA, R. L²; PORTO, T. S¹.

¹Rural Federal University of Pernambuco - Academic Unit of Garanhuns; Av. Bom Pastor, Boa Vista, 55296-901, Garanhuns - PE.

² Rural Federal University of Pernambuco - Northeast Network of Biotechnology; Dom Manoel Medeiros, Dois Irmãos, 52171-900, Recife - PE.

ABSTRACT

Fructosyltransferase is an enzyme involved in the conversion of sucrose to fructooligosaccharides, sugars that have been receiving special attention because to their prebiotic performance. This enzyme, as well as other biomolecules can be obtained through bioprocesses, highlighting the Solid State Fermentation (SSF) for enabling the use of agroindustrial residues. The present work had as objective to investigate the variables that influence the production of fructosyltransferase from *Aspergillus* spp. strains using agroindustrial residues and characterize the crude enzymatic extract. The highest values in activity were obtained from *Aspergillus tamarii* URM 4634, with the substrate soybean meal, where it did not produce mycotoxins. From the factorial planning and evaluation of biomass growth, it was verified that the best condition was observed using 3g of substrate, 15% concentration of sucrose solution and 60% of moisture, during 96 hours, obtaining 221.53 and 66.90 $\mu\text{mol/mL/min}$ of hydrolytic and transfructosylation activities, respectively. The fructosyltransferase produced presented values of K_m 54.73 and 369.68 $\mu\text{mol/mL}$ and V_{max} 227.27 and 50.66 $\mu\text{mol/mL/min}$ for the hydrolytic and transfructosylation activities, respectively. The optimal temperature for both activities was 60°C, as well as pH 6.0. The fructosyltransferase presented stability in the temperature ranges of 30-50 ° C and pH 4.0-5.0 in both activities. In short, all the results showed to be promising for the biotechnological production of fructosyltransferase, being able to make possible the large scale production of fructo-oligosaccharides.

Key-words: fructosyltransferase, production, *Aspergillus* spp., agroindustrial residues.

1. INTRODUÇÃO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos denominados de açúcares não convencionais, formados por unidades de frutossil. Estes tem recebido um interesse especial devido as suas propriedades biológicas e funcionais, principalmente pela a sua atuação como prebióticos e adoçantes alternativos, além de serem aplicados como substitutos de gorduras e agentes estabilizantes, podendo ser utilizados em diversas formulações alimentícias, como para produtos lácteos, de panificação, de sucos e outras bebidas, produtos de confeitaria, molhos e entre outros, tornando-se de grande interesse para indústria (DOMINGUEZ; et al, 2013; ABREU; et al, 2011). Os FOS podem ser encontrados em pequenas quantidades em alguns vegetais, como cebola, alho, aspargo, centeio, tomate; entretanto sua obtenção em larga escala ocorre através de um processo biotecnológico adequado, em que a partir da sacarose e pelas as reações desencadeadas pela enzima frutossiltransferase consegue-se sintetizá-los com mais eficiência e com maiores rendimentos (OLIVEIRA; SILVA; PORTO, 2017).

A frutossiltransferase, assim como outras enzimas, podem ser produzidas intracelularmente e extracelularmente por diferentes tipos de fungos, entre eles os do gênero *Aspergillus* spp., via processo fermentativo. Diferentes linhagens de *Aspergillus* sp. são reportadas na literatura como produtoras de frutossiltransferase, destacando-se *A. oryzae* (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005), *A. aculeatus* (NEMUKULA; et al, 2009), *A. flavus* e *A. terreus* (GANAIE; et al, 2013).

Neste panorama dar-se uma atenção especial à fermentação em estado sólido (FES) pelo seu papel de destaque no maior aproveitamento de resíduos sólidos, diminuindo os problemas de disposição final e potencial poluente, além das de perdas de biomassa e nutrientes de alto valor, em virtude do crescimento microbiano e de condições adequadas, promovendo a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais por ter alto valor agregado (GANAIE; et al, 2013; ORLANDELLI; et al, 2012). Alguns resíduos agroindustriais como bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, farelo de aveia, resíduo de café, sabugo de milho, farelo de arroz e etc, são reportados na literatura como substratos para produção de frutossiltransferase por meio da FES (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2004).

Deste modo o presente trabalho teve como objetivo investigar as principais variáveis que influenciam a produção de frutossiltransferase por fermentação em estado sólido com linhagens de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp. e utilizando resíduos agroindustriais, bem como realizar a caracterização bioquímica do extrato enzimático bruto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos micro-organismos

Neste trabalho foram utilizadas diferentes espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp. (Tabela 2.1) oriundas da coleção de culturas da Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), mantidos em meio inclinado composto por BDA (Batata Dextrose Ágar) imerso em óleo mineral a 28°C.

Tabela 2.1. Relação de fungos filamentos do gênero *Aspergillus* da Micoteca URM/UFPE que foram utilizados nos experimentos de produção de frutossiltransferase.

Nº/URM	Linhagem
4953	<i>A. aculeatus</i>
0269	<i>A. heteromorphus</i>
5620	<i>A. japonicus</i>
5870	<i>A. niveus</i>
4924	<i>A. phoenicis</i>
4634	<i>A. tamarii</i>
4658	<i>A. terreus</i>
5701	<i>A. versicolor</i>

2.2. Reativação, esporulação e manutenção dos micro-organismos

Para tornarem-se aptos para a realização dos experimentos, os fungos selecionados foram reativados em caldo glicosado (10g de peptona, 3g de extrato de carne, 20g de glicose e 1L de água destilada), previamente autoclavado a uma temperatura de 121°C, a 1 atm, durante 20 minutos. Os micro-organismos foram inoculados em frascos contendo 50 mL deste meio nutritivo e encaminhados para um *shaker* a uma temperatura de 30°C e uma agitação de 130 rpm durante 72 horas. Após a reativação, os fungos foram repicados e mantidos em meio BDA previamente esterilizado, encaminhando os mesmos à estufa de crescimento microbiológico a uma temperatura de 30°C, durante 7 dias, para esporulação.

2.3. Preparação do inóculo

Após a esporulação, os esporos foram coletados com a adição de uma solução de cloreto de sódio (0,9%) com Tween 80 (0,01% v/v) previamente esterilizados. Após a coleta dos esporos realizou-se a contagem microscópica em câmara de Neubauer. Uma quantidade suficiente para a concentração de 10^7 esporos/mL foi inoculada em Erlenmeyers de 125 mL contendo o substrato autoclavado para a produção de frutossiltransferase por meio da fermentação em estado sólido.

2.4. Seleção de linhagens produtoras de frutossiltransferase através da Fermentação em Estado Sólido

Para a fermentação foram utilizadas as seguintes condições: 5g de farelo de trigo (substrato), solução nutritiva composta por sacarose a 10% e extrato de levedura a 0,5% dissolvidos em tampão acetato pH 5,0 a 0,1 M, umidade do meio a 50%, a uma temperatura de 30°C durante 72 horas. Após este período realizou-se a extração utilizando a proporção de 7,5 mL de solvente para cada grama de substrato. Os Erlenmeyers foram encaminhados para uma mesa agitadora, a uma velocidade de 130 rpm durante 1 hora e meia. O extrato obtido foi filtrado e submetido à centrifugação a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi separado e utilizado para determinação das atividades hidrolítica e de transfrutossililação da frutossiltransferase. Foram utilizadas diferentes linhagens de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* sp., dispostas na Tabela 2.1, com o objetivo de verificar as que promoveram as maiores atividades da frutossiltransferase a partir da fermentação em estado sólido.

2.5. Determinação das atividades da frutossiltransferase

No estudo da frutossiltransferase há o envolvimento de duas atividades enzimáticas: a hidrolítica e a de transfrutossililação. Para este estudo realizou-se primeiramente a incubação de 250 μ L do extrato bruto enzimático com 750 μ L do substrato (60% solução de sacarose em tampão acetato pH 5,0 e 0,1 M) a 55°C por 60 minutos (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2004). A reação foi interrompida por meio da incubação em banho de gelo e em seguida foram realizadas as determinações das quantidades de glicose livre por meio do kit de glicose-oxidase e de açúcares redutores pelo método de Miller (1959).

Para a determinação da glicose livre através do kit de glicose-oxidase (Labtest) misturou-se vigorosamente 10 μ L da amostra com 1 mL do reagente, incubando em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 505 nm. Para a determinação de açúcares redutores (AR) pelo método de

Miller (1959) foram misturados 100 µL da amostra e 1,0 mL do reagente ácido dinitrosalicílico (DNSA) por 5 minutos sob temperatura de ebulição, colocando em seguida a mistura em banho de gelo para interromper a reação. Adicionou-se 5,0 mL de água destilada, encaminhando as amostras para o espectrofotômetro para que as mesmas fossem lidas a 540 nm. A curva de calibração foi plotada utilizando glicose como padrão nas concentrações de 1,0 a 10,0 mg/mL.

A atividade hidrolítica (U_H) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir um µmol de glicose por minuto. Já uma unidade de atividade de transfrutossiliação (U_{TF}) foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para transferir um µmol de frutose por minuto (CHEN e LIU, 1996). As atividades hidrolítica e de transfrutossiliação foram calculadas pela estimação da quantidade de glicose (G) e frutose transferida (F_T) liberadas na reação enzimática, por meio das relações abaixo:

$$AR = F + G \leftrightarrow F = AR - G \quad (1)$$

$$F_T = G - F \leftrightarrow F_T = 2G - AR \quad (2)$$

Em que AR, F, G e F_T representam as concentrações de açúcares redutores totais, frutose, glicose e frutose transferida, respectivamente, expressas em µmol/mL.

2.6. Avaliação qualitativa da capacidade de produção de micotoxinas de linhagens de *Aspergillus spp.*

Para a detecção de produção de ocratoxina A utilizou-se a metodologia proposta por Lin e Dianese (1976). Um volume de 200 mL de leite de coco foi diluído em 800 mL de água destilada, ajustando o pH do meio para 6,9 com NaOH 2N, adicionando 16 g de ágar, formando assim o meio MAC (meio ágar coco). Após ser aquecido à ebulição, autoclavado por 20 minutos a 121 °C e distribuídos em placas de Petri esterilizadas. No centro da placa foi inoculado com 5 µL de solução de esporos e incubado no escuro a 28°C durante um período de 7 dias. Também foi verificada a produção de ocratoxina A nos meios BDA (batata dextrose ágar) e (YES) (meio ágar com extrato de levedura e sacarose) composto por 20 g de extrato de levedura, 200 g de sacarose, 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada. Para a detecção da micotoxina foi observada a presença de um halo fluorescente azulado a violeta, no reverso da colônia nas placas contendo o fundo, quando submetidos a ondas longas de luz ultravioleta (365 nm) em câmara escura.

Para a detecção de produção de aflatoxina, foi realizado o teste de vapor de amônia, conforme Saito e Machida (1999). Os isolados de *Aspergillus spp.* foram cultivados no centro

da placa com 5 µL de suspensão de esporos dos meios sólidos BDA, YES e MAC, e incubadas no escuro a 28°C. Após 7 dias as placas foram invertidas com 2 mL de hidróxido de amônio. Após dez minutos, foi verificada se a parte inferior dos isolados produtores de aflatoxina foi transformada em cor rosa para vermelho. Caso nenhuma mudança de cor ocorrer, os isolados não serão considerados tóxicos.

2.7. Seleção do melhor substrato para produção de frutossiltransferase

A melhor linhagem de *Aspergillus* (em termos de produtividade e ausência de toxicidade) foi inoculada em diversos resíduos agroindustriais, como o farelo de trigo, farelo de soja, farelo de aveia, sabugo de milho, casca de laranja e casca de limão, obtidos no comércio local de Garanhuns-PE, a fim de selecionar a maior produção de frutossiltransferase. Esses resíduos foram secados em estufa com circulação de ar forçada a 65°C até completa desidratação e padronizados através das peneiras em série de Tyler em uma granulometria entre 0,5 – 2,0 mm verificando posteriormente suas capacidades de absorção de água. As condições da fermentação em estado sólido foram as mesmas dispostas no item 2.4.

2.8. Caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais

Os teores de umidade, cinzas, proteico e lipídico dos resíduos agroindustriais selecionados foram determinados conforme o descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2010). Conforme Castro, Nishide e Sato (2014) o teor de carboidratos foi estimado a partir da diferença entre o valor total da composição (100%) e a soma dos outros componentes. As atividades de água destes resíduos foram determinadas por meio da leitura direta no analisador *Pre Water Activity Analyzer* (Acqualab). Determinou-se também a relação carbono/nitrogênio dos substratos citados, obtendo o teor de nitrogênio a partir do método de Kjeldahl (AOAC, 2010)) e o teor de carbono a partir da metodologia proposta por BEZERRA NETO e BARRETO (2004) que se baseia na oxidação da matéria orgânica em presença do ácido sulfúrico e dicromato de potássio, e posterior dosagem, por titulação, do excesso de dicromato com solução padrão de sulfato ferroso amoniacal. Os parâmetros analisados foram submetidos a análise de variância e comparação de médias através do teste de Tukey em um nível de 95% de confiança, através do *software* estatístico Minitab 17.0.

2.9. Produção de frutossiltransferase através de um planejamento fatorial

Após a seleção da espécie de *Aspergillus* spp. e do substrato responsáveis pelos maiores valores de atividade de frutossiltransferase, investigou-se através de um planejamento fatorial completo 2^3 com três repetições do ponto central, a influência das variáveis, massa de substrato, umidade e concentração de sacarose, na produção da enzima a fim de obter as condições ótimas de cultivo para a produção de frutossiltransferase por meio da fermentação em estado sólido. Os níveis utilizados no planejamento estão dispostos na Tabela 2.2 A análise estatística do planejamento fatorial foi realizada através do software Statistica 7 (STATSOFT, 2008).

Tabela 2.2. Níveis que serão utilizados no planejamento 2^3 para estudo da produção de frutossiltransferase por meio da FES.

Variáveis	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
Massa de Substrato (g)	3,0	5,0	7,0
Umidade (%)	40	50	60
Concentração de Sacarose (%)	5,0	10,0	15,0

2.10. Avaliação do perfil de crescimento da biomassa fúngica em fermentação em estado sólido

Foi realizada a estimativa da biomassa fúngica conforme descrito por Castro, Nishide e Sato. (2014) do melhor ensaio do planejamento fatorial. Essa determinação é baseada na quantidade de N-acetilglicosamina liberada pela hidrólise ácida da quitina, presente na parede celular dos fungos. A amostra seca fermentada foi misturada com ácido sulfúrico concentrado e a mistura reacional deverá ser mantida durante 24 h a 30°C. A mistura foi diluída em 10 mL de água destilada e posteriormente autoclavada a 121°C durante 1 h e filtrada para obter uma solução isenta de qualquer material sólido. A solução obtida foi neutralizada com NaOH 5 M, adicionando em seguida 50 mL de água destilada. A mistura reacional contendo 1 mL da amostra (resultante das extrações descritas) e 1 mL de reagente acetilacetona (1 mL de acetilacetona e 50 mL de solução 0,5 M de carbonato de sódio) foi incubada durante 20 min em temperatura de ebulição. Após o resfriamento, adicionou-se uma alíquota de 6 mL de etanol seguida pela adição de 1 mL de reagente de Ehrlich (2,67 g de p-dimetilamino benzaldeído em mistura 1:1 de etanol reagente analítico e ácido clorídrico concentrado até 100 mL) incubando a 65°C por 10 min. Após arrefecimento, a absorbância da mistura reacional foi obtida a partir

da leitura espectrofotométrica a 530 nm. A estimativa de biomassa foi estimada em intervalos de 12 horas durante 120 h de fermentação e os resultados foram expressos em mg de glicosamina por grama de substrato seco, mediante a curva de calibração plotada a partir do reagente glicosamina (Sigma).

2.11. Caracterização bioquímica do extrato bruto contendo a frutossiltransferase

2.11.1. Determinação dos parâmetros cinéticos das reações catalisadas pela frutossiltransferase

A velocidade máxima da reação (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m) foram determinadas para ambas as reações realizadas pela frutossiltransferase (hidrolítica e de transfrutossililação) utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk, que foi plotado a partir das velocidades de reação em diferentes concentrações de substrato ($25 < S_0 < 800$ mg/mL) diluídas em tampão acetato (0,1 M; pH 5,0), utilizando a Equação 3 descrita abaixo:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

Em que v , K_m , V_{max} e $[S]$ representam a velocidade da reação, a constante de Michaelis-Menten, a velocidade máxima da reação e a concentração de substrato, respectivamente.

2.11.2. Efeitos da temperatura sobre as atividades e estabilidade da frutossiltransferase

Os efeitos da temperatura nas atividades da frutossiltransferase foram determinados pela realização da reação de transfrutossililação, alterando a temperatura de incubação numa faixa de 20 a 80°C, mantendo-se constante a concentração de substrato (60%) e o pH (5,0). A estabilidade à temperatura foi medida mantendo o extrato enzimático na ausência de substrato a temperaturas de 30°C a 60°C, onde foram retiradas alíquotas para determinação da atividade residual em diferentes tempos (0, 60, 120 e 180 minutos).

2.11.3. Efeitos do pH sobre as atividades e estabilidade da frutossiltransferase

Os efeitos do pH sobre as atividades enzimáticas foram observados utilizando tampões com a mesma molaridade (0,1 M) em diferentes faixas de pH (3,0 a 9,0), mantendo constante

a concentração de substrato (60%) e a temperatura da reação (55°C). Para esse experimento foram utilizados os seguintes tampões com variações de 0,5 no pH: citrato (pH 3,0 a 4,5), citrato-fosfato (pH 4,5 a 6,0), fosfato (pH 6,0 a 7,5) e tris HCl (pH 7,5 a 9,0). A estabilidade do pH foi verificada submetendo a enzima aos tampões descritos acima e incubou-se a 5°C. Alíquotas foram retiradas para determinar a atividade residual em intervalos de tempo 0, 4h, 8h e 24h.

2.11.4. Efeitos de íons metálicos sobre a atividade da frutossiltransferase

O extrato bruto enzimático foi inicialmente incubado nas soluções iônicas de concentrações de 10 mM na proporção 1:1 (v/v), durante 1 hora em temperatura ambiente (25°C) verificando os efeitos desses íons nas atividades hidrolítica e de transfrutossilacção da frutossiltransferase. Após a incubação, foi realizada a atividade enzimática, expressando assim os resultados dessa análise em termos de atividades residuais. Os sais utilizados para preparação das soluções iônicas foram: CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, HgCl₂, KCl, MgCl₂, MnCl₂, NaCl e ZnSO₄.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção da melhor linhagem de Aspergillus spp. produtor de frutossiltransferase

Conforme o demonstrado na Tabela 2.3, foram avaliadas oito linhagens de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* cultivados através da fermentação em estado sólido, durante 72 horas em farelo de trigo. Todas as linhagens apresentaram atividade hidrolítica entre 10,55 e 55,47 U/mL e foram estatisticamente diferentes a um nível de confiabilidade de 95%. O maior valor desta atividade foi observado no *Aspergillus tamaritii* URM4634, por outro lado, as linhagens *Aspergillus heteromorphus* URM0269, *Aspergillus niveus* URM5870 e *Aspergillus versicolor* URM5701 foram as que apresentaram os menores resultados.

Com relação a atividade de transfrutossilacção, percebeu-se que nem todas as linhagens apresentaram essa atividade, como o *Aspergillus heteromorphus* URM0269 e o *Aspergillus niveus* URM5870. Os resultados obtidos para essa atividade também apresentaram diferenças estatisticamente significativas a um nível de confiança de 95%, sendo o maior valor observado na espécie *Aspergillus tamaritii* URM4634 com 26,24 U/mL.

Tabela 2.3. Micro-organismos de gênero *Aspergillus* e suas respectivas atividades de frutossiltransferase após 72 horas de cultivo em meio à base de farelo de trigo.

Nº/URM	Linhagem	Atividade hidrolítica (U/mL)	Atividade de transfrutossililação (U/mL)
4953	<i>Aspergillus aculeatus</i>	38,37 ± 2,04 ^b	18,59 ± 1,80 ^b
0269	<i>Aspergillus heteromorphus</i>	14,40 ± 1,14 ^e	0,00 ± 0,00 ^d
5620	<i>Aspergillus japonicus</i>	19,33 ± 1,04 ^d	10,92 ± 0,74 ^c
5870	<i>Aspergillus niveus</i>	10,45 ± 1,92 ^e	0,00 ± 0,00 ^d
4924	<i>Aspergillus phoenicis</i>	19,84 ± 0,55 ^d	11,73 ± 0,30 ^c
4634	<i>Aspergillus tamarisii</i>	55,47 ± 0,19 ^a	26,24 ± 3,43 ^a
4658	<i>Aspergillus terreus</i>	25,68 ± 0,52 ^c	7,81 ± 1,39 ^c
5701	<i>Aspergillus versicolor</i>	14,62 ± 0,19 ^e	0,00 ± 0,00 ^d

Médias que não compartilham uma mesma letra em uma mesma coluna são significativamente diferentes, com 95% de confiança.

Como observado, o extrato bruto enzimático do *Aspergillus tamarisii* URM 4634 foi o responsável por apresentar as maiores atividades hidrolítica e de transfrutossililação da frutossiltransferase. Na literatura ainda não foram reportados estudos da produção desta enzima utilizando esta espécie de micro-organismo, demonstrando assim mais uma nova linhagem de *Aspergillus* com grande potencial para aplicação em processos biotecnológicos para síntese de fruto-oligossacarídeos. Além disso, outro aspecto que fomenta a utilização do *Aspergillus tamarisii* em processos industriais, é o fato do mesmo possuir o status de GRAS, sendo geralmente reconhecido por ser seguro, ideal para aplicações em bioprocessos, principalmente na área alimentícia e farmacêutica (SILVA, 2014).

Diversos trabalhos reportam a espécie *Aspergillus tamarisii*, como promissora na produção de biocatalisadores de grande interesse industrial. Kadowaki et al (1997) estudaram a produção de xilanase utilizando esta espécie; Moreira et al (1999) realizaram estudos sobre a produção de amilases a partir deste micro-organismo; Souza, Gusmão e Campos-Takaki (2010) avaliaram o potencial desta linhagem na produção de enzimas do sistema lignolítico; Amande et al (2013) produziram e caracterizaram pectinases a partir de *Aspergillus tamarisii* e casca de manga; Silva (2014) avaliou a síntese de proteases a partir deste mesmo fungo filamentoso utilizando a fermentação em estado sólido.

Algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* são reportadas na literatura como potenciais produtores de frutossiltransferase, com consideráveis atividades hidrolítica e de transfrutossililação visando a síntese de FOS, destacando-se *Aspergillus oryzae* (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005), *Aspergillus aculeatus* (NEMUKULA; et al, 2009), *Aspergillus flavus* e *Aspergillus terreus* (GANAIE; et al, 2013).

3.2. Avaliação qualitativa da capacidade de produção de micotoxinas de linhagens de *Aspergillus* spp.

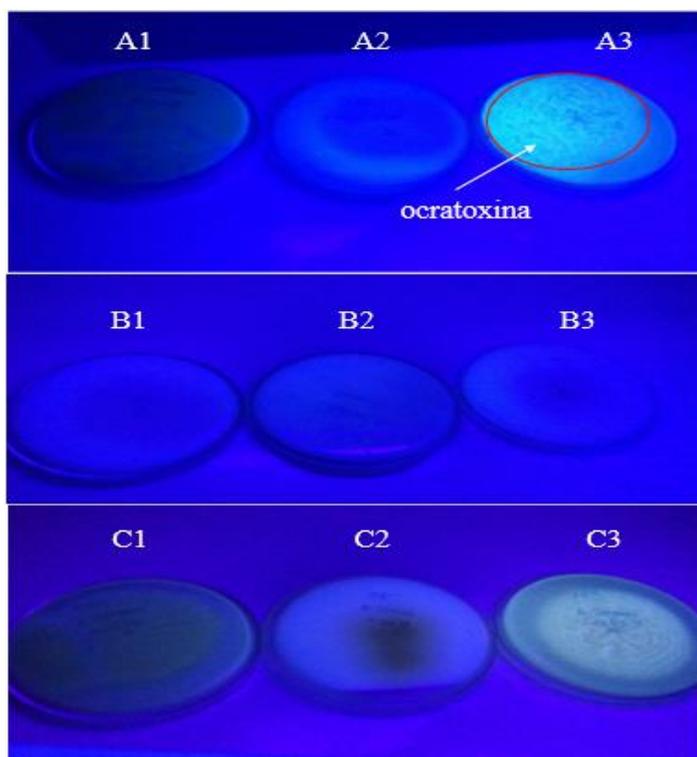
Foi verificado através de testes qualitativos a capacidade de produção de aflatoxinas e ocratoxinas nas linhagens de *Aspergillus* que demonstraram as maiores atividades da frutossiltransferase: *Aspergillus tamaritii*, *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus terreus*, conforme os resultados da Tabela 2.3. Esta análise acaba sendo bastante importante no aspecto de critério de escolha da espécie do micro-organismo que deverá ser utilizado, devendo descartar aquelas que apresentam alta capacidade de produção dessas substâncias tóxicas, ou ajustar as condições do meio, adicionando agentes que inibem a produção destes metabólitos secundários, uma vez que esta enzima está envolvida na produção de FOS que são utilizados principalmente pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas (SILVA; et al, 2015).

Alguns micro-organismos podem produzir metabólitos tóxicos enquanto estão se desenvolvendo, sendo este um fator crucial para a escolha da linhagem adequada para se utilizar em um determinado processo. Estas substâncias recebem a denominação genérica de micotoxinas, e correspondem a produtos metabólicos secundários que, quando ingeridos, causam diversas alterações biológicas prejudiciais tanto para o homem como para os animais, como a indução da Síndrome de Reye, hepatocarcinomas, necroses agudas, cirrose e encefalopatia e etc. No caso de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp., as principais micotoxinas produzidas são as aflatoxinas, que são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e as ocratoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus alutaceus*. Estas micotoxinas ainda tem uma produção favorecida em substratos ricos em carboidratos, proteínas e gorduras (FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAFF, M.; DESTRO, M. T, 2008; SAKATA; SABBAG; MAIA, 2011).

A Figura 2.1 demonstra os resultados obtidos da produção de ocratoxina a partir de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* produtores de frutossiltransferase. Pode-se observar que apenas a espécie *Aspergillus aculeatus* URM 4953 apresentou halos fluorescentes azulados na placa com o meio YES (A3), indicando a presença desta micotoxina. Estas toxinas são

capazes de absorver ondas longas de luz ultravioleta, emitindo fluorescência azulada (FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAFF, M.; DESTRO, M. T, 2008). Alguns descritos na literatura, como os de Iamanaka, Oliveira, Taniwaki (2010), relatam a ocorrência da produção desta micotoxina em *Aspergillus* pertencentes a seção Nigri, subgrupo ao qual o *Aspergillus aculeatus* se encontra.

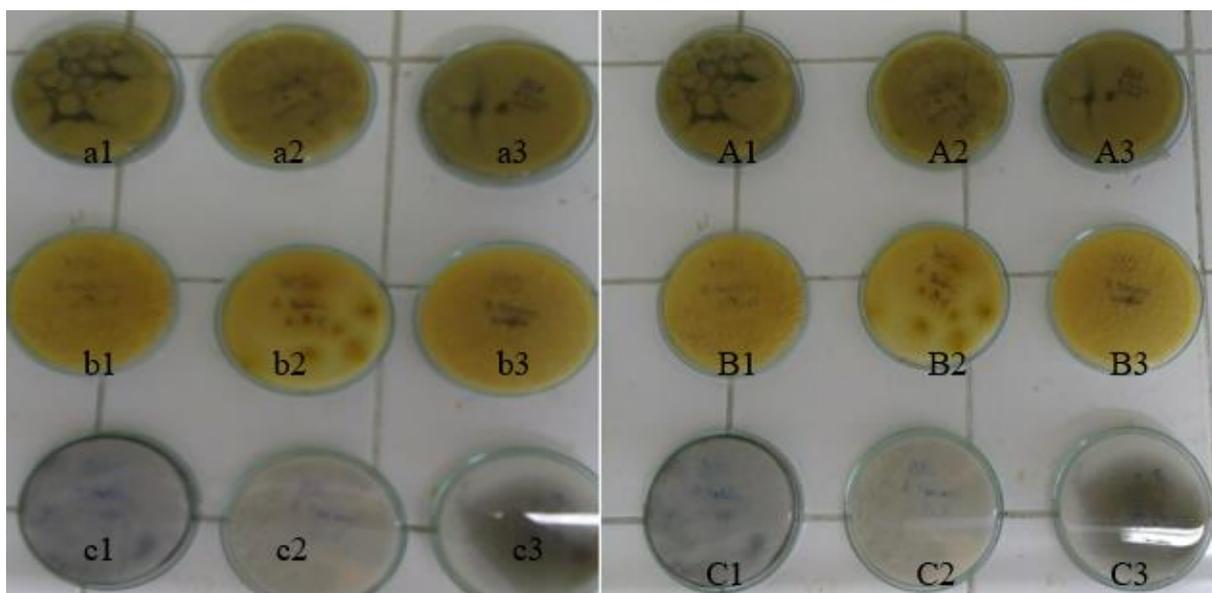
Figura 2.1. Produção de ocratoxina de espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* após 7 dias de incubação. As letras A, B e C representam respectivamente as espécies *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus tamarrii* e *Aspergillus terreus*. Os números 1, 2 e 3 representam respectivamente os meios BDA, MAC e YES .



A Figura 2.2 demonstra os resultados obtidos da produção de aflatoxina a partir de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* produtores de frutossiltransferase. Pode-se observar que nenhum isolado analisado apresentou mudanças na coloração no reverso da colônia, não observando áreas de tons roseados e/ou avermelhados após a adição de hidróxido de amônio em 7 dias de incubação, indicando que as espécies analisadas não se demonstraram como potenciais produtoras de aflatoxina. Segundo Maziero e Bersot (2010) diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, como também, uma única espécie de micro-organismo pode produzir mais de um tipo de toxina. Silva, et al (2015) relata em seus

estudos que algumas espécies de *Aspergillus* podem não produzir aflatoxina e ocratoxina simultaneamente.

Figura 2.2. Avaliação da produção de aflatoxina de espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* após 7 dias de incubação. Os números representam respectivamente as espécies *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus tamarisii* e *Aspergillus terreus*. As letras a, b e c representam respectivamente os meios BDA, MAC e YES, sendo as minúsculas representando as amostras antes da reação e as maiúsculas após a adição de hidróxido de amônio.



Diante desse estudo a espécie *Aspergillus tamarisii* URM4634 foi selecionada para ser aplicada no bioprocesso para obtenção de frutossiltransferase a partir de resíduos agroindústrias, uma vez que, além desta linhagem demonstrar as maiores atividades hidrolítica e de frutossililação, dentre as testadas, a mesma não se apresentou como potencial produtora de ocratoxina e aflatoxina.

3.3. Caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais e seleção do melhor substrato para produção de frutossiltransferase

Conforme o demonstrado na Tabela 2.4, foram avaliados o potencial de seis resíduos agroindustriais para produção de frutossiltransferase por meio de meio da fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus tamarisii* URM4634, durante um intervalo de 72 horas. Observou-se valores de atividade hidrolítica estatisticamente diferentes a um nível de confiança de 95%, variando de 0,19 a 135,30 U/mL sendo o maior resultado encontrado no farelo de soja e os

menores nas cascas de limão e laranja. Já para a atividade de transfrutossilacção os resultados encontrados também apresentaram diferenças estatísticas a um nível de confiabilidade de 95%, variando em uma faixa de 0,19 a 42,36 U/mL, sendo o maior observado no farelo de soja e os menores em ambas as cascas, no sabugo de milho e no farelo e aveia.

Tabela 2.4. Avaliação da produção de frutossiltransferase por *Aspergillus tamarii* URM4634 por meio da fermentação em estado sólido, utilizando resíduos agroindustriais.

Resíduo agroindustrial	Atividade hidrolítica ($\mu\text{mol/mL/min}$)	Atividade de transfrutossilacção ($\mu\text{mol/mL/min}$)
Casca de laranja	0,19 \pm 0,04 ^d	0,19 \pm 0,05 ^c
Casca de limão	0,27 \pm 0,03 ^d	0,19 \pm 0,05 ^c
Farelo de aveia	34,11 \pm 0,39 ^c	8,67 \pm 0,73 ^{b,c}
Farelo de soja	135,30 \pm 4,26 ^a	42,36 \pm 5,90 ^a
Farelo de trigo	99,51 \pm 1,16 ^b	13,43 \pm 4,43 ^b
Sabugo de milho	4,90 \pm 0,71 ^d	2,00 \pm 0,87 ^{b,c}

Médias que não compartilham uma mesma letra em uma mesma coluna são significativamente diferentes, com 95% de confiança.

Como observado, o extrato bruto enzimático do *Aspergillus tamarii* URM 4634 obtido a partir do farelo de soja foi o responsável por apresentar as maiores atividades hidrolítica e de transfrutossilacção da frutossiltransferase. Na literatura ainda não foram reportados estudos da produção desta enzima utilizando este resíduo agroindustrial como substrato para fermentação em estado sólido, demonstrando assim mais um composto de grande potencial para aplicação em processos biotecnológicos de síntese de fruto-oligossacarídeos. Em seus estudos sobre produção de invertase (enzima de mecanismo semelhante à frutossiltransferase, responsável pela clivagem da sacarose, formando açúcar invertido) Novaki, et al (2010) observaram que o farelo de soja foi o responsável pela maior produção enzimática durante um intervalo de 72 horas.

Além da seleção da linhagem do micro-organismo, as próprias composições químicas dos substratos utilizados para a fermentação em estado sólido podem interferir na produção de enzimas, uma vez que estes devem conter os nutrientes necessários para que os micro-organismos consigam assimilar e produzir estas biomoléculas (CASTRO; NISHIDE; SATO, 2014). A Tabela 2.5 apresentada a seguir, demonstra a caracterização físico-química de seis resíduos agroindustriais, casca de laranja, casca de limão, farelo de aveia, farelo de soja, farelo

de trigo e sabugo de milho, utilizados para a avaliação da produção de frutossiltransferase por meio da fermentação em estado sólido a partir de *Aspergillus tamaraii* URM4634 durante um período de 72 horas.

Tabela 2.5. Caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais selecionados para a avaliação da produção de frutossiltransferase por meio da fermentação em estado sólido.

Substrato	Umidade (%)	A_w	Cinzas (%)	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	C:N
Casca de laranja	9,09±0,08 ^a	0,55±0,00 ^b	3,47±0,03 ^c	78,94±0,20 ^b	7,08±0,00 ^d	1,42±0,25 ^e	6,06
Casca de limão	8,88±0,35 ^a	0,57±0,00 ^a	4,25±0,14 ^b	78,25±0,45 ^b	6,47±0,00 ^d	2,14±0,23 ^{d,e}	6,79
Farelo de aveia	8,35±0,02 ^a	0,52±0,00 ^c	2,14±0,01 ^d	66,89±0,16 ^c	15,78±0,29 ^c	6,84±0,13 ^a	3,17
Farelo de soja	7,93±0,11 ^{a,b}	0,55±0,00 ^b	6,34±0,01 ^a	26,26±0,43 ^e	56,24±0,00 ^a	3,23±0,30 ^c	0,77
Farelo de trigo	6,95±0,74 ^{b,c}	0,47±0,00 ^e	6,19±0,08 ^a	63,84±0,34 ^d	18,31±0,43 ^b	4,71±0,57 ^b	2,60
Sabugo de milho	6,24±0,02 ^c	0,49±0,01 ^d	1,36±0,09 ^e	88,03±0,05 ^a	1,82±0,29 ^e	2,55±0,34 ^{c,d}	21,40

Médias que não compartilham uma mesma letra em uma mesma coluna são significativamente diferentes, com 95% de confiança.

A umidade do substrato é um parâmetro muito importante que pode influenciar o processo de fermentação em estado sólido, tendo em vista que esse teor de água presente nos substratos é responsável pela difusão dos solutos adicionais bem como dos metabólitos produzidos pelo micro-organismo, devendo ser estudo para determinar as condições ideais para o processo (NIGAM; PANDEY, 2009; SILVA, 2014). Dos resíduos agroindustriais avaliados, pode-se perceber que os mesmos apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos valores de umidade a nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos variaram de 6,24 a 9,09%, sendo observados os maiores teores de água para as cascas de laranja e limão, e para os farelos de aveia e soja.

Assim como a umidade, a atividade de água (a_w) do meio tem sido atribuída como um parâmetro fundamental para a transferência de massa de água e de solutos através das células microbianas. Este parâmetro está relacionado com o conteúdo de água livre presente na amostra e o controle do mesmo pode ser utilizado para modificar a produção metabólica ou excreção de bioprodutos de um micro-organismo (PANDEY, 2003; SILVA, 2014; SILVA, 2016). Dos substratos analisados, percebe-se que todos apresentaram diferenças estatisticamente significativas na atividade de água a um nível de confiança de 95%. Os valores obtidos variaram de 0,47 a 0,55 sendo verificado os maiores resultados para a casca de limão seguida da casca de laranja e do farelo de soja. O farelo de trigo apresentou a menor atividade de água dentre os substratos testados.

O teor de cinzas é um parâmetro físico-químico que indica a presença de minerais, aos quais são bastante importantes como nutrientes para os micro-organismos, uma vez que os mesmos são necessários para o desenvolvimento da biomassa, além de impulsionar as reações de biossíntese e manutenção celular (SANTOS, 2007; SILVA, 2016). Conforme os resultados obtidos, demonstrados na Tabela 2.5., percebe-se que os resíduos agroindustriais analisados apresentaram diferenças significativas quanto ao teor de cinzas, a um nível de confiabilidade de 95%. Os substratos farelos de soja e farelo de trigo apresentaram teores de cinzas estatisticamente iguais entre si, observando valores superiores a 6% e maiores que os dos demais resíduos.

Outra característica físico-química importante é a determinação do teor de lipídeos. Sabe-se que teores elevados de gorduras, principalmente as poli-insaturadas, podem deixar os substratos mais susceptíveis à oxidação lipídica, ocasionando a formação de peróxidos e hidroperóxidos que interferem no desenvolvimento e no metabolismo dos micro-organismos, além de poderem provocar a desnaturação protéica, inibição da atividade enzimática e diminuição da solubilidade (SOARES; et al, 2012). Os substratos avaliados apresentaram teores

médios de lipídeos significativamente diferentes a um nível de 95% de confiança. Os maiores teores lipídicos foram observados nos farelos de aveia e trigo, apresentando os valores 6,84% e 4,71% respectivamente. As cascas foram os resíduos que demonstraram um menor teor de gordura, verificando médias de 2,14% para a de limão e 1,42% para a de laranja.

O teor de carboidratos é outro fator importante que pode influenciar a escolha do substrato ideal para a fermentação em estado sólido, uma vez que estes devem ser altamente digeríveis e assimiláveis, fornecendo energia necessária para que os micro-organismos consigam desenvolver seus metabolismos (PANDEY, 2003). Conforme os resultados descritos na Tabela 2.5 percebe-se que todos os teores médios dos resíduos agroindustriais apresentaram diferenças estatísticas a um nível de confiabilidade de 95%. Os valores obtidos variaram de 26,26% a 88,03%, sendo o menor observado no farelo de soja e o maior percentual no sabugo de milho.

Assim como o de carboidratos, o conhecimento do teor protéico de um resíduo agroindustrial também é bastante importante para a seleção e aplicação do mesmo em bioprocessos, uma vez que estes devem ser boas fontes de nitrogênio, assimiláveis pelos micro-organismos, fornecendo energia que pode ser usada para o seu desenvolvimento e conseqüentemente para a produção e secreção de enzimas (CASTRO; et al, 2014). Os substratos analisados apresentaram diferenças estatísticas a um nível de confiança de 95%. Os valores variaram de 1,82 a 56,24%, observando o maior teor proteico para o farelo de soja e o menor percentual para o sabugo de milho.

A relação carbono/nitrogênio (C: N) é outro importante parâmetro que deve ser analisado para avaliar o potencial da aplicação dos substratos em bioprocessos. Castro et al (2014) explicam que os substratos devem possuir uma relação C: N adequada para fermentação, sendo preferidos, normalmente valores mais baixos, próximos a 1, onde o teor de carbono e o de nitrogênio sejam equivalentes. Nos substratos estudados, percebe-se que a melhor relação C: N foi observada no farelo de soja, apresentando um valor de 0,77, ao qual pode-se correlacionar com a produção da frutotransferase, que conforme a Tabela 2.4 este resíduo demonstrou-se como melhor, apresentando as maiores atividades hidrolítica e de transfrutossilacção, dentre os testados, sendo o mesmo selecionado para o planejamento de produção.

3.4. Produção de frutossiltransferase em fermentação em estado sólido com auxílio de um planejamento fatorial

Para avaliação da produção de frutossiltransferase em Fermentação em Estado Sólido utilizou-se o micro-organismo *Aspergillus tamaris* URM 4634 e o farelo de soja, uma vez que os mesmos apresentaram a maior produção desta enzima, nos testes isolados, realizados anteriormente. Foram realizados ensaios com base em um planejamento fatorial 2^3 , tendo como variáveis a massa de substrato, o teor de umidade e a concentração de sacarose. Os resultados deste experimento encontram-se representados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Resultados do planejamento fatorial completo 2^3 para produção de frutossiltransferase de *Aspergillus tamaris* URM4634 em Fermentação em Estado Sólido.

Ensaio	Substrato (g)	Sacarose (%)	Umidade (%)	Atividade	Atividade de
				hidrolítica (U/mL)	transfrutossililação (U/mL)
1	3	5	40	130,20	23,24
2	7	5	40	130,85	36,86
3	3	15	40	119,13	22,34
4	7	15	40	155,23	51,08
5	3	5	60	175,17	34,06
6	7	5	60	191,67	29,96
7	3	15	60	209,11	53,90
8	7	15	60	209,99	47,67
9 (C)	5	10	50	146,16	32,47
10 (C)	5	10	50	151,09	35,48
11 (C)	5	10	50	159,39	28,99

Em todos os ensaios do planejamento fatorial a enzima produzida por *A. tamaris* URM4634 apresentou consideráveis atividades hidrolítica e de transfrutossililação. Os resultados obtidos variaram de 119,13 a 209,99 U/mL para a atividade hidrolítica e 22,34 a 53,90 U/mL para a de transfrutossililação. As melhores condições para a produção da enzima foram observadas no ensaio 7 (3g de farelo de soja, 15% de concentração de sacarose e 60% de umidade), durante 72 horas de fermentação, uma vez que este apresentou a maior atividade relacionada com a transferência dos agrupamentos frutossil para a formação dos fruto-oligossacarídeos.

Através da análise dos efeitos das variáveis independentes, apresentados na Tabela 2.7, para a atividade hidrolítica apenas a variável teor de umidade apresentou-se como significativa, demonstrando um efeito positivo, indicando que maiores teores de umidade proporcionaram maiores valores dessa atividade. Esse fenômeno pode ser explicado através do próprio mecanismo de ação de frutossiltransferase, que para a atuação da mesma à necessidade da entrada de uma molécula de água para que a enzima consiga clivar a sacarose, liberando glicose e frutose no meio (CUNHA, 2017).

Para a atividade de transfrutossililação, a concentração de sacarose demonstrou-se significativa apresentando um efeito positivo, indicando que maiores concentrações dessa substância promoveram maiores atividades de transferência dos agrupamentos frutossil. Esse efeito também pode ser explicado pelo próprio mecanismo da enzima, uma vez que quanto maior for a concentração dessa substância possivelmente uma maior concentração de frutose será encontrada no meio favorecendo a formação dos fruto-oligossacarídeos (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001). A interação entre a massa de substrato e o teor de umidade também se apresentou como significativa, com efeito antagônico, para a atividade de transfrutossililação, indicando que o aumento dos níveis de uma variável e a redução dos níveis da outra, concomitantemente promovem a redução dessa atividade catalítica. Este efeito pode ser explicado a partir das próprias condições do meio que devem ser ideais para o desenvolvimento dos micro-organismos. Altos níveis de umidade assim como grandes quantidades de substrato podem resultar em substratos mais compactados, resultando na diminuição da porosidade, na baixa difusão do oxigênio, reduzindo as trocas gasosas necessárias para o processo fermentativo. Por outro lado, baixos níveis de umidade podem levar a um crescimento abaixo do ideal e um menor grau de absorção pelo substrato, assim como reduções na quantidade de substratos podem fornecer uma quantidade insuficiente de nutrientes, interferindo no desenvolvimento dos micro-organismos. (PANDEY, 2009; SILVA, 2014).

Tabela 2.7. Efeitos estatísticos calculados para as respostas da produção de frutossiltransferase em Fermentação em Estado Sólido com o planejamento fatorial (2^3).

Variáveis independentes/ interações	Atividade hidrolítica	Atividade de Transfrutossililação
(1) Substrato (g)	2,86	3,49
(2) Sacarose (%)	3,47	5,54*
(3) Umidade (%)	13,24*	3,49
1 x 2	1,05	1,41
1 x 3	-1,02	-5,74*
2 x 3	2,06	2,64
1 x 2 x 3	-2,70	-1,86

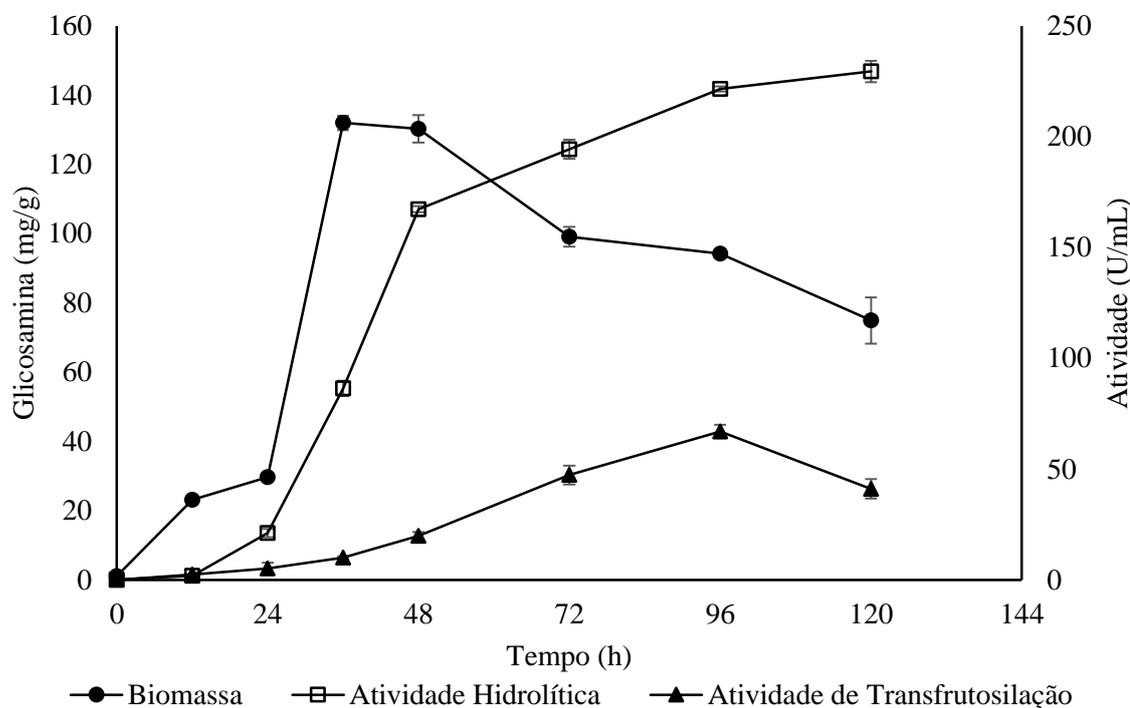
*Estatisticamente significativo a um nível 95% de confiança.

São poucos os trabalhos reportados na literatura que abordam a produção de frutossiltransferase a partir da fermentação em estado sólido por meio de planejamentos fatoriais. Ao estudar a produção de FTase por *Aspergillus japonicus* através da FES, Mussatto et al (2013) perceberam que apenas as variáveis temperatura e concentração de esporos interferiram significativamente no processo, obtendo 64,12 U/mL como maior valor de atividade hidrolítica, no entanto pode-se perceber que foi bem inferior quando comparada com a deste presente estudo que utilizou o *Aspergillus tamaritii* e outras condições de fermentação.

3.5. Avaliação do perfil de crescimento da biomassa fúngica em fermentação em estado sólido.

A partir do melhor ensaio do planejamento fatorial (3g de farelo de soja, concentração de sacarose de 15% e umidade do substrato de 60%) foi realizada a estimativa do crescimento da biomassa do *Aspergillus tamaritii* URM4634, baseada na quantidade de N-acetilglicosamina liberada pelo fungo, durante 120 horas de fermentação, avaliando também a produção enzimática durante este mesmo intervalo. Os resultados desta análise são demonstrados na Figura 2.3.

Figura 2.3. Curva de crescimento da biomassa e produção enzimática do *Aspergillus tamarii* URM4634 em farelo de soja por meio da Fermentação em Estado Sólido.



Conforme a Figura 2.3, *A. tamarii* URM4634 apresentou um nível máximo de glicosamina de aproximadamente 132 mg/g após os cultivos de 36 e 48 h. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva, et al (2016), ao qual esta mesma linhagem, cultivada em farelo de trigo apresentou um teor máximo de glicosamina próximo, 119,33 mg/g, após o cultivo de 96 h. Após 48 horas de fermentação em estado sólido, pode-se verificar também a gradativa diminuição do teor de glicosamina, observando ainda ao término do experimento (cultivo de 120 horas) uma quantidade de glicosamina de 74,9 mg/g.

Quanto às atividades enzimáticas, pode-se perceber que para a hidrolítica, o aumento do tempo de fermentação implicou no aumento dessa atividade, observando um valor de 229,43 U/mL após 120 h. Por outro lado, verificou-se que a atividade de transfrutossilação apresentou um aumento gradativo até 96 horas de cultivo, sendo este o melhor tempo de fermentação para essa reação, observando um valor de 66,93 U/mL. Uma possível explicação para a diminuição da atividade de transfrutossilação seria o próprio impedimento alostérico na transferência dos agrupamentos frutossil causado pela glicose oriunda da reação hidrolítica da sacarose, que conseqüentemente acaba interferindo na formação dos fruto-oligossacarídeos. Portanto o melhor intervalo de tempo de Fermentação em Estado Sólido para a produção de frutossiltransferase a partir de *Aspergillus tamarii* URM4634 em farelo de soja são 96 horas,

uma vez que apresentou uma atividade hidrolítica (221,53 U/mL) e a melhor atividade de transfrutossilação. Na literatura não foram encontrados trabalhos que realizaram este tipo de estudo para a produção de frutossiltransferase por meio da fermentação em estado sólido.

3.6. Caracterização bioquímica do extrato bruto contendo a frutossiltransferase

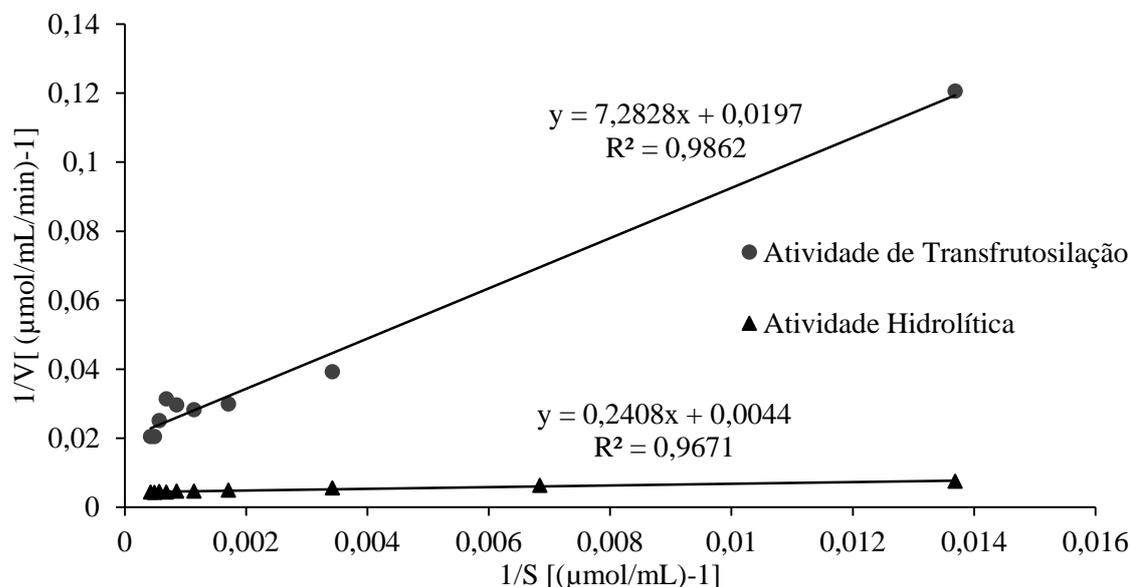
3.6.1. Determinação dos parâmetros cinéticos das reações catalisadas pela frutossiltransferase

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} obtidos tanto para a atividade hidrolítica, quanto para a de transfrutossilação da frutossiltransferase produzida a partir da fermentação em estado sólido através de *Aspergillus tamaraii* URM 4634 encontram-se dispostos na Tabela 2.8, o comportamento cinético de ambas as atividades pode ser observado no gráfico de Lineweaver-Burk descrito nas Figuras 2.4.

Tabela 2.8. Parâmetros cinéticos da frutossiltransferase produzida a partir da FES utilizando o *A. tamaraii* URM4634 através do método de Lineweaver-Burk.

	K_m ($\mu\text{mol/mL}$)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/mL/min}$)	R^2
Atividade Hidrolítica	54,73	227,27	0,97
Atividade de Transfrutossilação	369,68	50,76	0,99

Figura 2.4. Gráfico de Lineweaver-Burk para as atividades hidrolítica e de transfrutossilação da frutossiltransferase de *A. tamaritii* URM4634 a partir da FES.



Diante os resultados obtidos observam-se valores menores de K_m para a atividade hidrolítica da frutossiltransferase ($54,73 \mu\text{mol/mL}$) quando comparado com a de transfrutossilação ($369,68 \mu\text{mol/mL}$). A constante de Michaelis-Menten (K_m) permite compreender a função da enzima que catalisa uma reação específica, onde menores valores dessa constante indicam maior afinidade pelo substrato (SIQUEIRA; et al, 2011). Assim, verifica-se que o comportamento hidrolítico apresentou uma maior afinidade pelo substrato quando comparado com a reação de transfrutossilação. Através de seus estudos, Cunha (2017) relata que a produção de FOS pela ação de FTase é inibida competitivamente pela ação da glicose formada como subproduto, impedindo consideráveis quantias de sacarose de serem convertidas, o que explicaria este valor elevado do K_m na atividade de transfrutossilação. Estes resultados corroboram com as pesquisas de Ghazi, et al (2007) que ao estudarem a cinética enzimática da frutossiltransferase de *A. aculeatus*, os mesmos observaram valores de K_m 27 e $535 \mu\text{mol/mL}$, para as reações hidrolítica e de transfrutossilação, respectivamente.

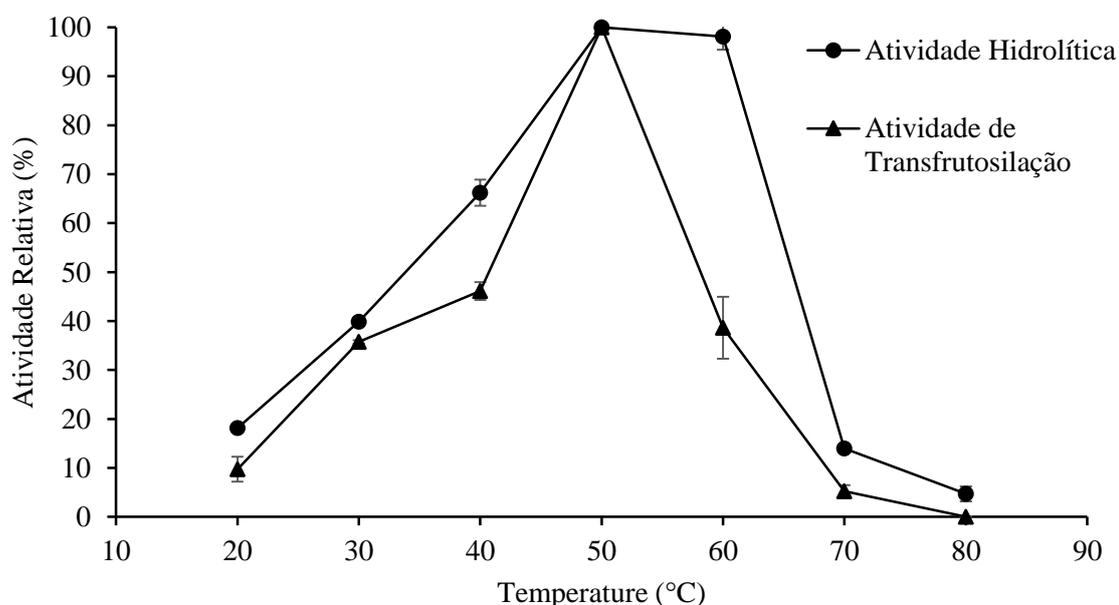
Assim como o K_m , as velocidades máximas das reações apresentaram valores distintos para ambas as atividades da frutossiltransferase. Conforme a Tabela 2.8 verifica-se que por ter uma afinidade maior pelo substrato, o comportamento hidrolítico apresentou uma maior V_{max} , $227,27 \mu\text{mol/mL/min}$, enquanto que a atividade de transfrutossilação apresentou um V_{max} de

50,76 $\mu\text{mol/mL/min}$. Isto pode ser explicado pelo mesmo fenômeno de limitação da glicose explicado anteriormente. Ao produzir e caracterizar frutossiltransferase a partir de *Aspergillus niger*, L'Hocine, et al (2000) observaram valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ de 44,38 mM e 1030 $\mu\text{mol/mL/min}$ respectivamente, resultados bem diferentes quando comparados com os obtidos neste trabalho.

3.6.2. Efeitos da temperatura nas atividades e na estabilidade da frutossiltransferase

O conhecimento da temperatura ótima da frutossiltransferase torna-se um parâmetro importante, tendo em vista a obtenção do valor máximo de atividade enzimática, possibilitando a otimização para a produção dos fruto-oligossacarídeos. Com relação a esse parâmetro o presente experimento obteve tanto para a atividade hidrolítica quanto para a atividade de transfrutossililação da frutossiltransferase de *Aspergillus tamarisii* URM4634 uma temperatura ótima de 50°C. A partir desta temperatura ótima houve decréscimo de atividade em ambas atividades, porém a queda da atividade foi um pouco mais acentuada na atividade de transfrutossililação conforme a Figura 2.5.

Figura 2.5. Efeito da temperatura nas atividades da frutossiltransferase de *A. tamarisii* URM4634.

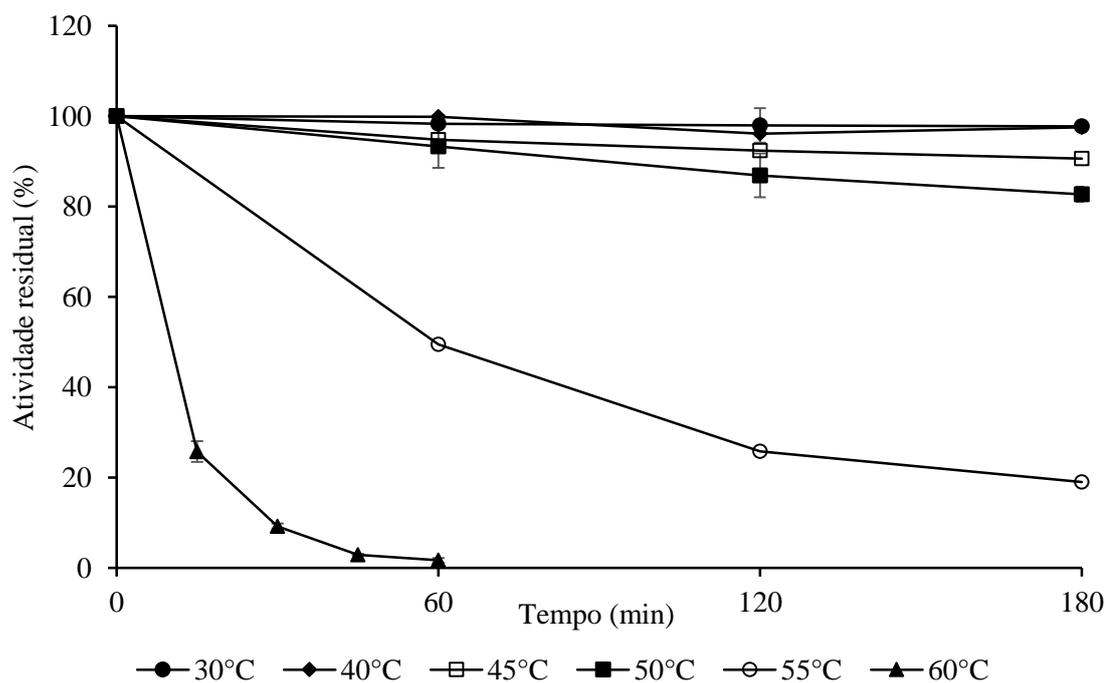


Estudos com a produção de β -frutofuranosidase (enzima de mecanismo semelhante à frutossiltransferase) de *Aspergillus japonicus* realizados por Chen e Liu (1996) demonstraram uma temperatura ótima de 65°C para a atividade hidrolítica e 55°C para a de transfrutossililação. Já as pesquisas de Sangeetha (2004) relacionadas à produção de frutossiltransferase de

Aspergillus oryzae CFR 202 por fermentação em estado sólido, apresentaram uma temperatura ótima de 60°C para esta enzima. Nos estudos de Yang, et al (2016), a frutossiltransferase de *Aspergillus niger* YZ59 (CICIM F0901) apresentou uma temperatura ótima de 55°C, próxima a obtida neste trabalho.

Quanto ao efeito da estabilidade térmica sobre a frutossiltransferase, conforme a Figura 2.6, pode-se observar que após 3 horas de reação a faixa de temperatura de 30 a 50°C apresentou uma considerável estabilidade, uma vez que demonstrou atividades residuais superiores a 80%. Após este mesmo intervalo, verifica-se que na temperatura de 55°C a frutossiltransferase apresentou uma baixa estabilidade, uma vez que a mesma apresentou uma atividade residual de aproximadamente 20%. A enzima não foi estável na temperatura de 60°C já que a mesma não conseguiu suportar uma hora de reação.

Figura 2.6. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da atividade hidrolítica da frutossiltransferase de *Aspergillus tamaraii* URM 4634.



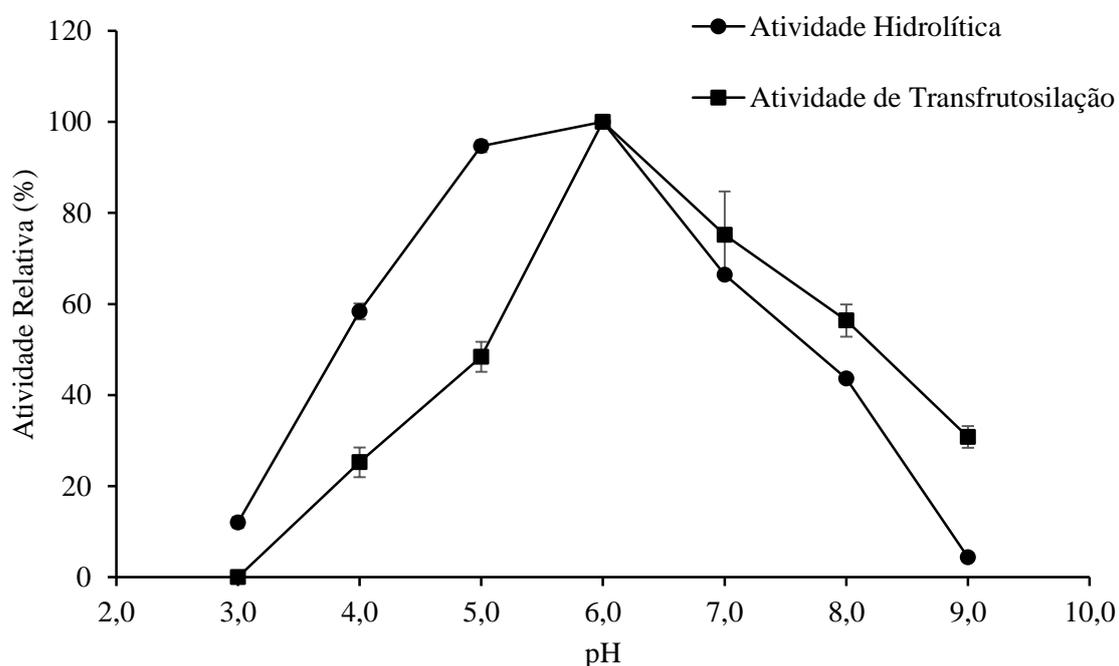
Os resultados deste experimento foram semelhantes aos obtidos pelos estudos de Hernalsteens e Maugeri (2008) que ao avaliar a estabilidade térmica de frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. observaram que a partir da temperatura de 60°C a enzima desnaturava, perdendo assim a sua atividade. Resultados semelhantes também foram encontrados por Yang et al (2016), uma vez que a frutossiltransferase de *Aspergillus niger* apresentou 100% de

atividade residual após 1 hora de reação a 40°C e 60% a 50°C; na temperatura de 60% os mesmos observaram que após 20 minutos a enzima já se encontrava totalmente desnaturada.

3.6.3. Efeitos do pH nas atividades e na estabilidade da frutossiltransferase

Com relação aos efeitos do pH sobre as atividades enzimáticas, conforme a Figura 2.7 apresentada abaixo, pode-se verificar que a frutossiltransferase de *Aspergillus tamaris* URM4634 apresentou uma atividade hidrolítica e uma atividade de transfrutossililação ótimas no pH 6,0. Estes resultados corroboram com os obtidos por de Sangeetha et al (2004), que ao caracterizarem a frutossiltransferase obtida de *Aspergillus oryzae* CFR 202 constataram que o pH 6,0 proporcionava as maiores atividades para ambas as atividades da enzima. Já Yang et al (2006) verificou que o pH 5,5 foi o que proporcionava maiores atividades de frutossiltransferase obtida de *Aspergillus niger*.

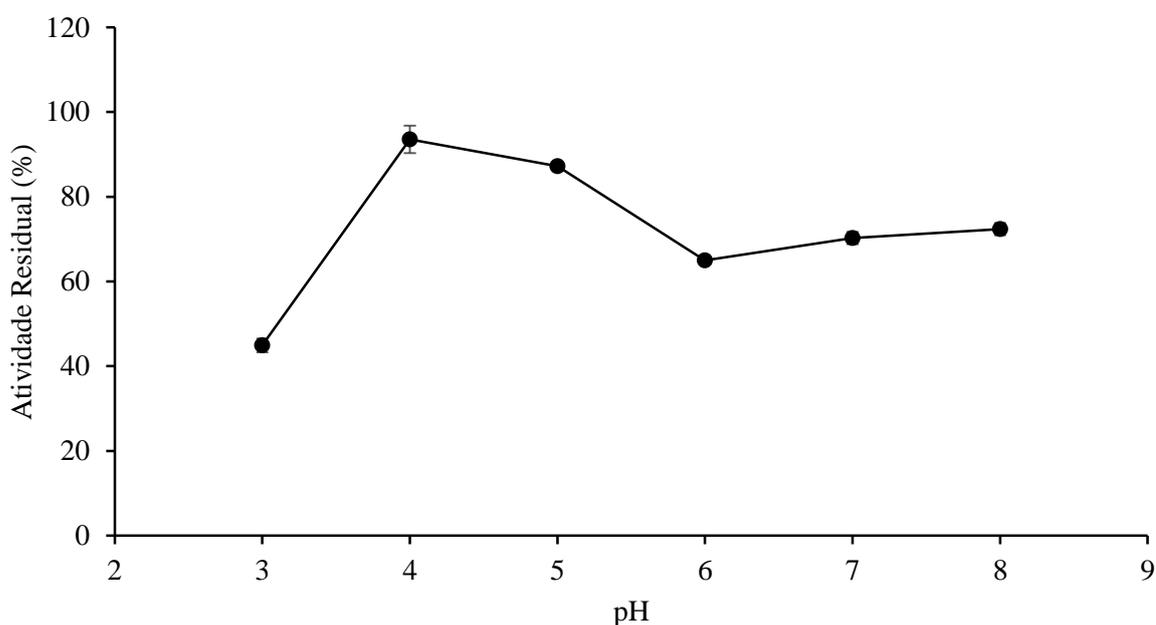
Figura 2.7. Efeito do pH nas atividades da frutossiltransferase de *A. tamaris* URM4634.



Quanto ao efeito do pH na estabilidade da frutossiltransferase obtida de *Aspergillus tamaris* URM 4634, conforme a Figura 2.8, pode-se observar que após 24 horas de incubação a enzima mostrou-se estável entre as faixas de pH 4 e 5 apresentando mais de 85% da atividade residual. No pH 3 a enzima apresentou uma menor estabilidade, uma vez que durante o período

do experimento foi observado uma redução de mais de 50% da sua atividade. Entre as faixas de pH 6-9 a frutossiltransferase apresentou atividades residuais de mais de 65%. Na caracterização bioquímica da frutossiltransferase obtida a partir de *Aspergillus niger*, Yang et al (2016) observaram que a faixa mais estável para enzima foi entre os pHs 5 e 9, verificando mais de 90% de atividade residual.

Figura 2.8. Efeito do pH sobre a estabilidade da atividade hidrolítica da frutossiltransferase de *Aspergillus tamarii* URM 4634.



3.6.4. Efeitos de íons metálicos nas atividades da frutossiltransferase.

Uma característica dos metais que os tornam tão importantes como componentes funcionais e estruturais é sua propensão em perder elétrons facilmente formando íons com cargas positivas, que tendem a ser solúveis em sistemas biológicos, desempenhando importantes funções, uma vez que essa deficiência de elétrons promove a atração eletrostática com biomoléculas de caráter normalmente aniônico, como proteínas e DNA, promovendo assim a interação com essas moléculas biológicas (BENITE; MACHADO; BARREIRO, 2007).

As interações entre íons metálicos e enzimas podem apresentar dois efeitos distintos, podendo favorecer a reação desempenhada pelo biocatalisador, atuando assim como ativadores, como também podem apresentar um efeito inibitório, interferindo na conversão do substrato em produto, uma vez que promoverá a diminuição da atividade enzimática (DAMORAN, PARK, FENNEMA; 2010). Através da Tabela 2.9 descrita abaixo, pode-se perceber os efeitos

de alguns íons metálicos na concentração de 10 mM sobre as atividades hidrolítica e de transfrutossilação da frutossiltransferase de *Aspergillus tamaritii* URM4634.

Tabela 2.9. Efeitos de íons sobre as atividades da frutossiltransferase de *Aspergillus tamaritii* URM 4634.

Íon	Atividade Hidrolítica (%)	Atividade de Transfrutossilação (%)
Ca ²⁺	94,11±0,37 ^d	63,75±0,09 ^{c,d}
Cu ²⁺	42,73±0,55 ^g	60,98±1,00 ^d
Fe ²⁺	91,79±0,61 ^e	65,78±0,89 ^c
Hg ²⁺	0,13±0,00 ^h	0,00±0,81 ^g
K ⁺	96,85±0,85 ^c	54,10±3,75 ^e
Mg ²⁺	100,08±0,82 ^b	94,24±5,02 ^b
Mn ²⁺	102,49±0,01 ^a	0,00±0,81 ^g
Na ⁺	100,62±1,40 ^b	118,67±5,77 ^a
Zn ²⁺	73,23±0,21 ^f	38,24±0,24 ^f
Controle	100,00±0,00 ^b	100,00±0,00 ^b

Médias que não compartilham uma mesma letra em uma mesma coluna são significativamente diferentes, com 95% de confiança.

As análises desse experimento mostraram que para a atividade hidrolítica, os íons apresentaram resultados estatisticamente diferentes a um nível de confiabilidade de 95%. O íon Mn²⁺ se apresentou como ativador, uma vez que sua atividade residual mostrou um aumento de 2,49%, os íons Mg²⁺ e Na⁺ não exerceram efeito nesta atividade enzimática, tendo em vista que sua atividade residual foi estatisticamente igual ao controle, os demais íons apresentaram-se como inibidores, uma vez que as atividades residuais foram inferiores a 100%.

Na atividade de transfrutossilação, também foram observadas diferenças estatísticas nos resultados a um nível de confiança de 95%. Apenas o íon Na⁺ mostrou-se como ativador, verificando um aumento na atividade residual de 18,67%. O cátion Mg²⁺ não exerceu efeito nesta atividade enzimática, tendo em vista que sua atividade residual foi estatisticamente igual ao controle. Os demais íons mostram-se como inibidores. O íon Mn²⁺ inibiu totalmente a atividade de transfrutossilação, já o íon Hg⁺ observou-se uma inibição total em ambas atividades enzimáticas.

De acordo com Benite, Machado e Barreiro (2007) o aumento da atividade enzimática provocado por alguns íons ocorre devido a estes atuarem como estabilizadores dessas biomoléculas, uma vez que os mesmos promovem efeitos eletrônicos, estéricos, termodinâmicos e de solvatação, que podem favorecer a bioconversão dos substratos em produtos. Quanto ao efeito inibitório, os mesmos autores explicam que pode ocorrer devido à própria formação do complexo íon metálico/biomolécula que acaba influenciando no tamanho, forma, flexibilidade e liberdade torsional do biocatalisador, podendo assim interferir no desempenho das reações enzimáticas.

Em seus estudos sobre produção e caracterização de proteases de *Aspergillus tamaritii* URM4634, Silva et al (2016) observaram também a ativação da atividade proteolítica pelo íon Na^+ e a inibição da atividade proteásica pelo íon Hg^{2+} na mesma concentração da solução iônica utilizada neste experimento. Já na caracterização bioquímica da frutossiltransferase obtida a partir de *Aspergillus niger*, Yang et al (2016) observaram que na concentração de 5mM os íons K^+ , Fe^{3+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} apresentaram-se como ativadores, enquanto que os íons Na^+ , Zn^{2+} e Cu^{2+} demonstraram-se como inibidores.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a espécie *Aspergillus tamaritii* URM4634 mostrou-se bastante efetiva na produção da frutossiltransferase, tendo em vista as maiores atividades hidrolítica e de transfrutosilação, além de não demonstrar ser uma produtora de micotoxinas. Além disso, o resíduo agroindustrial farelo de soja mostrou-se o mais eficaz, dentre os testados, para ser aplicado em bioprocessos para obtenção desta enzima utilizando essa espécie de fungo filamentosos.

Através do planejamento fatorial e da avaliação do crescimento da biomassa pode-se observar a melhor condição da fermentação em estado sólido para a produção da enzima foi utilizando 3g de substrato, 15% de concentração de sacarose na solução nutritiva e 60% de umidade, durante em período de 96 horas, uma vez que esta apresentou a maior atividade relacionada com a transferência dos agrupamentos frutossil para a formação dos fruto-oligossacarídeos.

Quanto à caracterização bioquímica da frutossiltransferase produzida a partir de *Aspergillus tamaritii* URM4634, os resultados obtidos foram satisfatórios, observando resultados coerentes para a cinética, além dos efeitos da temperatura, do pH e de íons metálicos que se demonstraram de acordo com os poucos trabalhos existentes na literatura.

De modo geral todos os resultados mostram-se promissores para a produção biotecnológica de frutossiltransferase, uma vez que as melhores condições obtidas apresentaram resultados superiores quando comparados com os poucos trabalhos existentes na literatura, demonstrando altas capacidades de hidrólise da sacarose e transferência dos agrupamentos frutossil, podendo ser potencialmente aplicadas em bioprocessos que viabilizam a síntese de fruto-oligossacarídeos.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), pelo fomento à pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- ABREU, D. A.; SILVA, L. M. R.; LIMA, A. S.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Desenvolvimento de bebidas mistas à base de manga, maracujá e cajú adicionadas de prebióticos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 22, n. 2, p. 197-203, 2011.
- AMANDE, T.; ADEBAYO-TAYO, B.; NDUBUISI-NNAJI, U.; ADO, B. Production and partial characterization of pectinases from mango peels by *Aspergillus tamarii*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 59–62, 2013.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferase: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers—Chemicke Zvesti**, v. 55, p. 350–358, 2001.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis of the Association of Official Agriculture Chemistry AOAC In: Horwitz, W. (Ed.), Washington, DC, 2010.
- BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; BARREIRO, E. J. Uma visão da química bioinoegânica medicinal. **Química. Nova**, vol. 30, Nº, 8, 2062-2067, 2007.
- CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2014.
- CASTRO, R. J. S.; NISHIDE, T. G.; SATO, H. H. Production and biochemical properties secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to diferente agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 236-245, 2014.
- CHEN, W. C.; LIU, C. H. Production of beta-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 2, p. 153–160, 1996.
- CUNHA, J. S. **Produção e Caracterização da Enzima Frutosiltransferase de *Aspergillus oryzae* PT-301 Visando a Obtenção de Fruto-oligossacarídeos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Instituto de Ciência e Tecnologia – Campus Poços de Caldas, Universidade Federal de Alfenas.

DAMODARA, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de alimentos, 4. ed – **Artmed**, 2010, ISBN 978-85.363-2248-3.

DOMINGUEZ, A. L.; RODRIGUES, L. R.; LIMA, N. M.; TEXEIRA, J. A. An Overview of the Recent Developments on Fructooligosaccharide Production and Applications. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 6, n. 12, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAFF, M.; DESTRO, M. T. Microbiologia de alimentos. São Paulo. Editora **Atheneu**, 2008.

GANAI, 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.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, p. 589-596, 2008.

KADOWAKI, K. M.; SOUZA, C.G.M.; SIMÃO, R.C.G.; PERALTA, R.M. Xylanase production by *Aspergillus tamarii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 66, p. 97-106, 1997.

L'HOCINE, L.; WANG, Z.; JIANG, B.; XU, S. Purification and characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0032. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 73-84, 2000.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A. coconut – agar medium rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

MADIGAN, M.T., MARTINKO; J.M. & PARKER, J. (2010) Microbiologia de Brock, 10ª Edição, Perason/Prentice Hall.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MOREIRA, F. G.; LIMA F.A.; PEDRINHO S.R.F.; LENARTOVICZ, V.; SOUZA; C.G.M.; PERALTA, R.M. Produção de amilases por *Aspergillus tamarii*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p.157-162, 1999.

MUSSATTO S.I., AGUILAR C.N., RODRIGUES L.R., TEIXEIRA J.A. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Research**. 344: 795-800, 2009.

NEMUKULA, A., MUTANDA, T., WILHELMI, B. S., WHITELEY, C. G. Response surface methodology: synthesis of short chain Fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2040–2045, 2009.

NIGAM, P. S. NEE'; PANDEY, A. Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues. Dordrecht: **Springer Netherlands**, , 2009. (Nota técnica).

NOVAKI, L.; HASAN, S. D. M.; KADOWAKI, M. K.; ANDRADE, D. Produção de Invertase por Fermentação em Estado Sólido a partir de Farelo de Soja. **ENGEVISTA**, v. 12, n.2, p. 131-140, 2010.

OLIVEIRA, R. L.; SILVA, M. F.; PORTO, T. S. Imobilização de Frutosiltransferase de *Aspergillus aculeatus* por Aprisionamento em Alginato e Àgar-agar. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 2, p. 17-21, 2017.

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

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.

SAITO, M.; MACHIDA, S. A. Rapid Identification method for aflatoxin producing strains of *A. flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. **Mycoscience**. v. 40, p. 205-211. 1999.

SAKATA, R. A. P.; SABBAG, S. P.; MAIA, J. T. L. S. Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n.13, p. 1477, 2011.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 5, p. 530–537, 2004.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide production using fructosyltransferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1085–1088, 2005.

- SANTOS, S. F. M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pendúculo de cajú como substrato .2007. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- SILVA, O. S. Produção de Proteases por Linhagens de *Aspergillus* e Extração em Sistema de Duas Fases Aquosas. 2014. **Dissertação** (Mestrado em Biociência Animal). Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R. L.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PORTO, A. L. F.; PORTO, T. S. Novel protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: Production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v.4, p. 125-143, 2016.
- SILVA, J. C.; SILVA, O. S.; PEREIRA, E. T. L.; SOUTO, M. E. M. M.; PORTO, T. S. Estudo do efeito da pectina cítrica na produção de micotoxinas por *Aspergillus niger* URM3856. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 5, n. 1, p. 81-86, 2015.
- SILVA, M.F.; FRANCA, P.R.L ; PEREIRA, G. N. O.; SILVA, S.P. . Caracterização Físico-Química de Café Solúvel Descafeinado Comercializado no Município de Garanhuns -PE. **Monferrer**. p. 1224-1225, 2016.
- SIQUEIRA, A. J. S. et al. Determinação do K_m e V_{max} : revisão e uma nova proposta. **Ciência em Movimento**, v. 27, n. Ano XIII, p. 1 – 6, 2011.
- SOARES, D. J.; TAVARES, T. M.; BRASIL, I. M.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 30, n. 2, jul./dez. 2012.
- SOUZA, M. A.; GUSMÃO, N. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. **Exacta**, São Paulo, v.8, n. 3, p. 299-305, 2010.
- YANG H., WANG Y., ZHANG L., SHEN W. Heterologous expression and enzymatic characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. **New Biotechnology**. v. 33, p. 164-170, 2016.