

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Produção Simultânea de $\beta$ -Frutofuranosidase e Frutooligossacarídeos por *Penicillium citreonigrum* URM 4459

Ana Karoline Caitano do Nascimento<sup>1</sup>, Clarisse Nobre<sup>2</sup>, Maria Taciana Cavalcanti  
Vieira Sares<sup>1</sup>, José Antônio Teixeira<sup>2</sup> e Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Av.  
Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brasil – e-mail: [analuporto@yahoo.com.br](mailto:analuporto@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a produção simultânea de  $\beta$ -Frutofuranosidase (FFase) e frutooligossacarídeos (FOS) por *P. citreonigrum* utilizando um planejamento fatorial completo. Para isso, o fungo foi cultivado em meio rico em sacarose (20% p/v) a 150 rpm. As condições de tempo de fermentação, temperatura, pH e concentração de extrato de levedura foram definidas utilizando um planejamento fatorial. Ao fim da fermentação, o sobrenadante obtido por filtração foi utilizado para quantificação de FFase e FOS. Todas as variáveis independentes estudadas exerceram efeito estatisticamente significativo sob a produção de FFase. Por outro lado, apenas as variáveis tempo de fermentação e temperatura exerceram efeito significativo sob a produção do FOS. As condições ideais para produção simultânea de FFase e FOS foram obtidas na região dos pontos centrais, onde obteve-se uma produção média de 93,49 g/L de FOS e uma atividade de 260,40 U/mL de FFase.

Palavras-chave: *Penicillium citreonigrum*;  $\beta$ -Frutofuranosidase; Frutooligossacarídeos.

#### INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -frutofuranosidase (FFase) é uma enzima pertencente à família GH32 das glicosil hidrolases, estando agrupadas em diferentes isoformas de acordo com o seu pH de acionamento (Vargas *et al.*, 2003). Em altas concentrações de sacarose, algumas FFase são capazes de catalisar reações de transfrutossilação produzindo frutooligossacarídeos (Aziani *et al.*, 2012). A maioria destas enzimas têm sido encontradas em fungos, tais como *Aureobasidium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp (Dominguez *et al.*, 2012; Chen e Liu, 1996; Prata *et al.*, 2010; Yun, 1996).

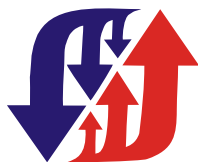
Os frutooligossacarídeos (FOS) são açúcares não-convencionais, representados principalmente por kestose (GF<sub>2</sub>), nistose (GF<sub>3</sub>) e 1-  $\beta$ -frutofuranosilnistose (GF<sub>4</sub>), em que unidades de frutose (F) estão unidas entre si por ligações do tipo  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) e ligadas a uma fração terminal de glicose (G) por ligações do tipo  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 1) (Yun, 1996).

Estes oligossacarídeos constituem um grupo prebiótico importante. Dentre os benefícios de sua ingestão estão, diminuição da incidência de infecções intestinais, proteção contra o câncer de colón, melhoria da absorção mineral, diminuição do teor de colesterol total e lipídeos no soro sanguíneo, e em geral, melhoria da saúde humana (Dominguez *et al.*, 2013).

O objetivo deste trabalho foi a produção simultânea de FFase e FOS por *P. citreonigrum* utilizando um planejamento fatorial completo.

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### Micro-organismo e preparo do inóculo



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

*Penicillium citreonigrum* URM 4459 foi obtido na Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (URM – UFPE), e mantidas em meio Ágar Czapek Dox (Himedia, Índia) a 4 °C. Para preparação do inóculo, o fungo *P. citreonigrum* foi cultivado em meio Ágar Czapek Dox (Oxoid, Inglaterra), a 30 °C, durante 7 dias. O inóculo foi obtido por suspensão de esporos em solução esterilizada de 0,1% (p / v) de Tween 80 (Merck).

### **Produção de FFase e FOS**

O inóculo contendo uma concentração final de  $10^4$  esporos / mL foi transferido para Erlenmeyers (250 mL) contendo 100 mL de meio composto por (% p/v): sacarose, 20,0; NaNO<sub>3</sub>, 0,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5; e KCl, 0,05. O meio de cultura foi previamente autoclavado a 121°C durante 15 minutos. As fermentações foram conduzidas utilizando as condições de tempo de fermentação (36, 48, 60 h), temperatura (25, 30 e 35 °C), pH (4, 5 e 6) e concentração de extrato de levedura (0, 1,375, 2,75 %) definidas no planejamento fatorial completo (Tabela 1) sob agitação de 150 rpm. Ao final da fermentação, as culturas foram filtradas à vácuo em papel Whatman N. 1 e o filtrado obtido foi utilizado para quantificação de FFase e FOS. A análise estatística foi realizada com o auxílio do Software *Statistic 8.0* (Statistica, 2008).

### **Determinação da atividade de FFase**

A atividade de transfrutossilação da FFase foi determinada de acordo com o método descrito por, Ganaie *et al.* (2014). A liberação de glicose foi medida com kit de determinação enzimática de glicose (GOD-POD, Labtest, Brasil) a 505 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 1µmol de glicose por minuto sobre as condições de ensaio.

### **Determinação da concentração de FOS**

As concentrações de FOS (1-kestose, 1-nistose, and 1-β-frutofuranosilnistose), frutose, glicose e sacarose das amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando um equipamento LC-10 A (Shimadzu) equipado com uma coluna Prevail Carbohydrate ES (5 µm, 250 x 4.6 mm, Alltech). Os açúcares foram detectados por meio de um Evaporative light scattering Sedex 85 (Sedere), utilizando as condições descritas por Nobre *et al.* (2009).

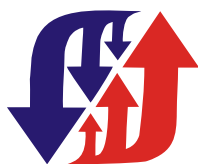
## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Os resultados obtidos com o planejamento fatorial  $2^4$  estão apresentados na Tabela 1, onde observa-se que a maior produção de FFase (287,10 U/mL) foi obtida no ensaio 14 e de FOS no ensaio 10. Em ambos os ensaios, os níveis das variáveis estudadas eram idênticos (36 h de fermentação à 25°C e 2,75% de extrato de levedura), com exceção do pH.

O efeito estatístico das variáveis independentes estudadas, assim como a interação entre elas podem ser observados na Figura 1. Na Figura 1, constata-se que todas as variáveis independentes estudadas exerceram efeito estatisticamente significativo sob a produção de FFase (Figura 1A), o mesmo não ocorreu com a produção de FOS (Figura 1B).

Sendo assim, o aumento do tempo de fermentação, pH e concentração do extrato de levedura, favoreceu a produção de FFase e FOS, enquanto que o aumento da temperatura afetou negativamente a produção das variáveis dependentes estudadas.

Chen e Liu (1996) afirmam que uma elevada atividade de FFase é muito importante para se obter elevada produção de FOS. Este fato explica os efeitos semelhantes das variáveis independentes estudadas sobre a produção de FFase e FOS.



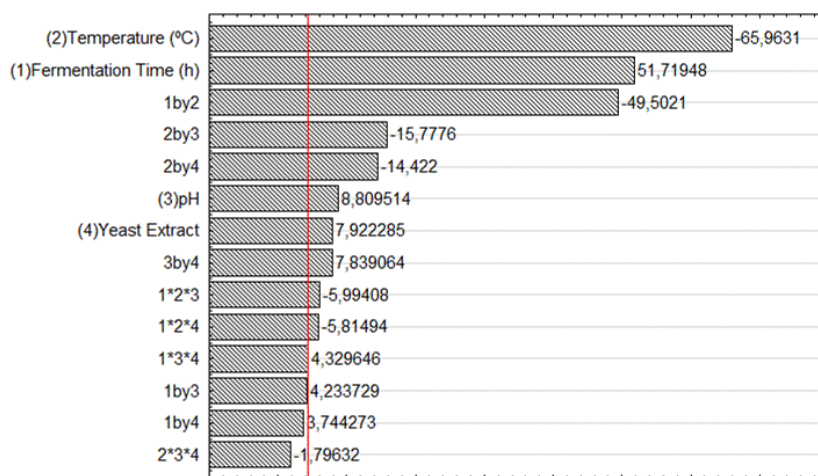
## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Resultados similares quanto ao efeito negativo da temperatura sobre a produção simultânea de FFase e FOS por *Aspergillus japonicus* foram obtidos por Mussato et al. (2013). Estes autores constataram que, o aumento da temperatura, acima de 30 °C propiciou um decréscimo considerável na obtenção dos produtos.

Desta forma, as condições ideais para a produção simultânea de FFase e FOS foram obtidas na região dos pontos centrais, onde obteve-se uma produção média de 93,49 g/L de FOS e uma atividade de 260,40 U/mL de FFase.

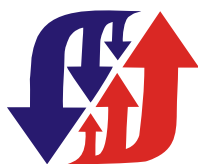
**Tabela 1.** Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial  $2^4$  para produção simultânea de  $\beta$ -frutofuranosidase (FFase) e frutooligossacarídeos (FOS) por *Penicillium citreonigrum*.

Ensaio	Variáveis independentes (valores reais e (codificados))				Variáveis dependentes	
	Tempo de fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Extrato de levedura (%)	Atividade FFase (U/mL)	FOS Total (g/L)
1	36 (-1)	25 (-1)	4 (-1)	0 (-1)	12.03	5,54
2	60 (+1)	25 (-1)	4 (-1)	0 (-1)	168.85	86,01
3	36 (-1)	35 (+1)	4 (-1)	0 (-1)	17.08	0
4	60 (+1)	35 (+1)	4 (-1)	0 (-1)	30.66	2,87
5	36 (-1)	25 (-1)	6 (+1)	0 (-1)	32.89	39,67
6	60 (+1)	25 (-1)	6 (+1)	0 (-1)	200.99	92,36
7	36 (-1)	35 (+1)	6 (+1)	0 (-1)	0	2,11
8	60 (+1)	35 (+1)	6 (+1)	0 (-1)	1.62	65,25
9	36 (-1)	25 (-1)	4 (-1)	2.750 (+1)	30.10	50,72
10	60 (+1)	25 (-1)	4 (-1)	2.750 (+1)	195.83	110,03
11	36 (-1)	35 (+1)	4 (-1)	2.750 (+1)	1.38	14,48
12	60 (+1)	35 (+1)	4 (-1)	2.750 (+1)	1.90	7,78
13	36 (-1)	25 (-1)	6 (+1)	2.750 (+1)	60.14	73,59
14	60 (+1)	25 (-1)	6 (+1)	2.750 (+1)	287.10	54,32
15	36 (-1)	35 (+1)	6 (+1)	2.750 (+1)	0	2,01
16	60 (+1)	35 (+1)	6 (+1)	2.750 (+1)	0	0
17	48 (0)	30 (0)	5 (0)	1.375 (0)	260,37	90,8
18	48 (0)	30 (0)	5 (0)	1.375 (0)	261,09	97,88
19	48 (0)	30 (0)	5 (0)	1.375 (0)	263,56	96,59
20	48 (0)	30 (0)	5 (0)	1.375 (0)	256,57	88,69

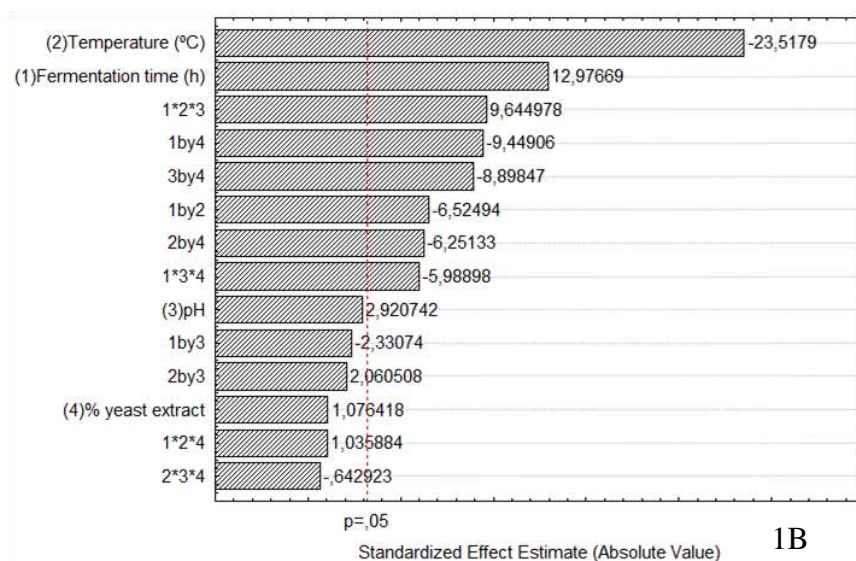


p=,05

Standardized Effect Estimate (Absolute Value)



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016



**Figura 1.** Gráfico de Pareto dos efeitos estimados tendo como variável resposta a produção de  $\beta$ -fructofuranosidase (A) e fructooligosacarídeos (B) por *Penicillium citreonigrum*.

### CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstram que a temperatura e o tempo de fermentação são importantes parâmetros que precisam ser otimizados por meio de estudos mais aprofundados que visem obter um modelo estatístico adequado que forneça as condições ótimas para produção de FFase e FOS.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aziani G, Terenzi HF, Jorge JÁ, Guimarães LHS. 2012. Production of fructooligosaccharides by *Aspergillus phoenicis* biofilm on polyethylene as inert support. *Food Technol and Biotechnol*, 50: 40-45.
- Chen, WC, Liu, CH. 1996. Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. *Enzyme and Microb Technol*, 18: 153-160.
- Dominguez AL, Rodrigues LR, Lima NM, Teixeira JA. 2013. An Overview of the Recent Developments on Fructooligosaccharide Production and Applications. *Food Bioprocess Technol*, 2: 324-337.
- Dominguez A, Nobre C, Rodrigues LR, Peres AM, Torres D, Rocha I. 2012. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydr Polym*, 89: 1174-1179.
- Ganaie MA, Rawatb HK, Wania AO, Gupta US, Kango N. 2014. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. *Process Biochem*, 49: 840-844.
- Nobre C, Santos MJ, Dominguez A, Torres D, Rocha O, Peres AM, Rocha I, Ferreira EC, Teixeira JÁ, Rodrigues LR. 2009. Comparison of adsorption equilibrium of fructose, glucose and sucrose on potassium gel-type and macroporous sodium ion-exchangeresins. *Anal Chim Acta*, 654 (1): 71-76.
- Prata MB, Mussatto SI, Rodrigues LR, Teixeira JA. 2010. Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*. *Biotechnol Lett*, 32(6): 837-840.
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Maltos DAF, Aguilar CN, Teixeira JA. 2013. Maximization of Fructooligosaccharides and  $\beta$ -Fructofuranosidase Production by *Aspergillus japonicus* under Solid-State Fermentation Conditions. *Food Bioprocess Technol*, 6: 2128-2134.
- Statistica (Data analysis Software Systems). 2008, version 8.0, StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA.
- Vargas W, Cumino A, Salerno GL. 2003. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? *Planta*, 216: 951-960.
- Yun, JW. 1996. Fructooligosaccharides—occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microb Technol*, 19 (2): 107-117.