

SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE β -D-FRUTOSILTRANSFERASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Juanize M. Silva¹, José A. C. Teixeira², Camila S. Porto¹ e Ana L.F. Porto¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

² Universidade do Minho, Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia

E-mail para contato: analuporto@yahoo.com.br

RESUMO

A enzima β -D-frutosiltransferase é responsável pela síntese de FOS (frutooligossacarídeos) a partir de sacarose por reação de transfrutosilação é produzida por diferentes micro-organismos, principalmente por fungos filamentosos. O objetivo deste trabalho foi selecionar a melhor linhagem fúngica produtora da β -D-frutosiltransferase por fermentação em estado sólido, bem como o método de extração. A fermentação em estado sólido utilizando o substrato farelo de trigo umedecido com solução de sacarose atingindo 70% de umidade na concentração de esporos de 10^7 no tempo de 96 horas de crescimento. Todas as linhagens manipuladas apresentaram atividade hidrolítica, no entanto apenas uma linhagem não demonstrou atividade transfrutosilação. O isolado SIS 14 que pertence ao gênero *Aspergillus* sp. destacou-se pelos maiores valores em atividade no método de extração utilizando água destilada, apresentando 300,90 U/mL na atividade de transfrutosilação e na atividade hidrolítica de 155,74 U/mL. Contudo, pode-se perceber que dos solventes estudados a água destilada foi melhor obtendo o valor em atividade de transfrutosilação, como também a linhagem SIS 14 é promissora para a produção da β -D-frutosiltransferase.

1. INTRODUÇÃO

Frutooligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos denominados de açúcares não convencionais e têm recebido um interesse especial devido as suas propriedades biológicas e funcionais, principalmente para utilização como prebióticos. FOS podem ser encontrados em pequenas quantidades em frutas e vegetais, tais como, cebola, alho, aspargos, centeio e tomate (Ghazi et al., 2007; Bharti et al., 2015).

No entanto, a produção de FOS industrialmente é através da síntese enzimática a partir da sacarose por enzimas microbianas com atividade de transfrutossilacção, podendo ser denominadas de β -D-frutossiltransferase (EC 2.4.1.9) e β -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26), são produzidas intracelular e extracelular por diferentes gêneros de fungos, como *Auerobasidium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp., no entanto as espécies *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* apresentam o status de *Generally Recognized as safe* (GRAS) (Lateef, Oloke, e Prapulla, 2007; Mussatto et al., 2009; Ganaie et al., 2014;).

Devido à importância biotecnológica de buscar novas fontes de enzimas para síntese de FOS com relação a altos valores em atividade e custo de produção reduzido este trabalho como objetivo selecionar a linhagem de fungo filamentosos com melhor produção da β -D-frutossiltransferase por cultivo em estado-sólido bem como o método de extração da enzima.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados para seleção foram pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp. e *Mucor* sp. isolados do solo da Caatinga mantidos em meio sólido CZ (Czapek Ágar) e incubados em estufa microbiológica a 30°C por 72 horas para esporulação. Após este tempo foram armazenados a 4°C.

2.2. Seleção da linhagem melhor produtora por fermentação em estado-sólido

Como substrato foi utilizado farelo de trigo obtido do comércio local da região metropolitana do Recife/PE. Os ensaios foram realizados em frascos cônicos de 125 mL contendo 3g do substrato, foram esterilizados 121°C/ 1 atm de pressão, durante 30 minutos. Após a esterilização o substrato sendo umedecido com uma solução de sacarose (200 g/L) para obter 70% de teor de umidade e inoculado com a concentração de 10^7 esporos/mL. Os ensaios foram mantidos em escuro e incubados a 30°C por 96 horas.

2.3. Extração do caldo fermentado

A extração foi realizada utilizando a proporção de 7,5 mL para cada 1g de substrato, sendo água destilada e tampão citrato de sódio 0,1M pH 5,15 como solventes, o qual foi encaminhado para um agitador orbital a 100 rpm por 2 horas. Em seguida, foi filtrado utilizando papel de filtro (Watman nº1), por fim realizou uma centrifugação por 20 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante encaminhado para determinação da atividade de transfrutossilacção e hidrolítica.

2.4. Determinação das atividades de transfrutossilacção e hidrolítica

A atividade de transfrutossilacção foi determinada de acordo com Sangeetha et al. (2004), realizada por incubação de 0,25 mL do caldo fermentado livre de células com 0,75 mL do substrato (60% solução de sacarose em tampão citrato de sódio 0,1M no pH 5,15) a 55°C por 60 minutos. A atividade de transfrutossilacção e atividade hidrolítica foram definidas conforme Chen et al. (1996) medindo a

liberação da glicose pelo Kit de glicose-oxidase (BioSystem S.A) e os açúcares redutores por Miller (1959).

As equações abaixo foram utilizadas para calcular as concentrações de frutose livre (F) e frutose transferida (F') na reação:

$$F = R - G \text{ e } F' = G - F = 2G - R \quad (1)$$

Uma unidade de atividade transfrutossilação (U_{TF}) é definida como a quantidade de enzima necessária para transferir 1 μmol de frutose por minuto e uma unidade de atividade hidrolítica (U_H) é definida por 1 μmol de glicose liberada por minuto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 1 pode ser visualizado os resultados das atividades de transfrutossilação e hidrolítica dos fungos filamentosos no cultivo em estado sólido em 96 horas, utilizando o farelo de trigo como substrato. Das seis linhagens estudadas três apresentaram alta atividade hidrolítica em comparação a atividade de transfrutossilação, independentemente do método de extração utilizado, todos os fungos filamentosos pesquisados apresentaram atividade hidrolítica e apenas o isolado SIS 42 (*Mucor subullissimus*) não apresentou atividade de transfrutossilação em nenhum dos métodos de extração estudados.

O valor máximo de atividade transfrutossilação foi apresentada pela linhagem SIS 14 (*Aspergillus sp.*) com 300,90 U/mL utilizando água destilada como solvente e sua atividade hidrolítica foi de 155,74 U/mL. Quando comparado os resultados desta mesma linhagem utilizando tampão citrato de sódio como solvente da extração conclui-se que o contato da solubilização da enzima de interesse com o tampão influenciou consideravelmente na atividade da β -D-frutossiltransferase no qual utilizando o tampão citrato de sódio obteve o valor de 188,01 U/mL em atividade de transfrutossilação. Percebe-se que ao colocar este tampão como solvente para este fungo na extração obteve uma queda relevante da atividade enzimática pesquisada.

Em comparação com o trabalho de Mussatto et al. (2013) que pesquisou a produção de FOS pela β -frutofuranosidase de *Aspergillus japonicus* por fermentação em estado sólido utilizando a parte intertegumentar da semente de café e utilizando a água destilada como solvente, obtiveram o valor de 64,12 U/mL em atividade, sendo inferior a este trabalho, pelo qual obteve-se 300,90 U/mL.

Tabela 1. Produção de β -D-frutossiltransferase por fungos filamentosos isolados da Caatinga

Micro-organismo	Água destilada		Tampão citrato de sódio	
	U_{TF}^*	U_H^{**}	U_{TF}	U_H
SIS 11 (<i>Aspergillus sp.</i>)	142,19	108,05	137,17	109,36
SIS 14 (<i>Aspergillus sp.</i>)	300,90	155,74	188,01	164,95
SIS 15 (<i>Aspergillus sp.</i>)	90,71	94,23	126,96	129,76
SIS 16 (<i>Aspergillus sp.</i>)	150,99	127,95	201,16	156,56
SIS 25 (<i>Aspergillus sp.</i>)	62,40	94,23	50,76	91,60
SIS 42 (<i>Mucor subtilissimus</i>)	0	72,36	0	93,57

* U_{TF} = Unidade de atividade transfrutossilatação

** U_H = Unidade de atividade hidrolítica

4. CONCLUSÕES

Foi selecionado a linhagem SIS 14 (*Aspergillus sp.*) apresentando maior o valor em atividade FTase de 300,90 U/mL utilizando água destilada como solvente na extração. Neste trabalho foi observado que o solvente de extração influencia consideravelmente na atividade de transfrutossilatação e hidrolítica. Portanto, é um aspecto importante a ser discutido ao se tratar de produção e purificação desta enzima na qual tem aplicação industrial na produção de FOS.

5. REFERÊNCIAS

- Cheng, W., Liu, Chi-hsien., 1996. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. Enzyme and Microbial Technology. 18, 153 – 160.
- Bharti, S. K., Krishnan, S., Kumar, A., Gupta, A. K., Ghosh, A. K., Kumar, A., 2015. Mechanism-based antidiabetic activity of Fructo- and isomalto-oligosaccharides: Validation by *in vivo*, *in silico* and *in vitro* interaction potential. Process Biochemistry. 50, 317-327.
- Ghazi, I.; Fernandez-Arrojo, L., Garcia-Arellano, H., Ferrer, M., Ballesteros, A., Plou, F.J, 2007. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. Journal of biotechnology. 128, 204–11, 2007.
- Lateef, A., Oloke, J. K., Prapulla, S. G., 2007. The effect of ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77. Enzyme and Microbial Technology. 40, 1067–1070.
- L'Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B., Xu, S., 2000. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. Journal of biotechnology. 81, 73-84.



XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA

01 a 04 de setembro de 2015
Fortaleza, Ceará, Brasil

- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Mohd, A. G., Uma S. G., 2014. Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides. *Carbohydrate polymers.* 110, 253-258.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F. A., Cristóbal N., Teixeira, J. A., 2013. Maximization of Fructooligosaccharides and β -Fructofuranosidase Production by *Aspergillus japonicus* under Solid-State Fermentation Conditions. *Food Bioprocess Technol.* 6, 2128–2134.
- Mussatto, S.I., Teixeira, J.A., 2009. 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.* 58, 154-157.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G, 2004. Production of fructosyltransferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. *Applied Microbiology Biotechnology.* 65, 530–537.