



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

# SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE OBTIDA DE *Penicillium citreonigrum* URM 4459

A. K. C. do NASCIMENTO<sup>1</sup>, C. NOBRE<sup>2</sup>, M. T. C. V. SOARES<sup>3</sup>, J. A. TEIXEIRA<sup>4</sup>, A. L. F. PORTO<sup>5</sup>

<sup>1,3,5</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

<sup>2</sup> Universidade do Minho, Instituto de Bioengenharia e Biotecnologia, Centro de Engenharia Biológica

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

**RESUMO** – O objetivo deste trabalho foi sintetizar frutooligossacarídeos (FOS) a partir da  $\beta$ -frutofuranosidase (FTase) produzida em biorreator utilizando células livres de *Penicillium citreonigrum*. Para isso, o fungo foi cultivado em meio rico em sacarose (20% p/v) a 150 rpm, pH 6,5, 28°C durante 61 h. Ao fim da fermentação, o sobrenadante obtido por filtração foi utilizado para determinação da atividade extracelular e síntese enzimática de FOS utilizando sacarose a 60% (p/v). A máxima atividade da  $\beta$ -frutofuranosidase extracelular produzida em biorreator (232,16 U/mL) foi obtida após 38 h de fermentação (produtividade de 6,11 U/mL.h). A concentração máxima de FOS foi observada após 24h de reação, correspondendo a um consumo de 30% (m/m) da sacarose inicial. O rendimento máximo de FOS obtido foi de 20% (m/m) em relação à concentração inicial de sacarose, resultando em níveis elevados de GF<sub>2</sub> (18%, m/m) e baixos rendimentos de GF<sub>3</sub> (1,5%, m/m) e GF<sub>4</sub> (0,6%, m/m). Os resultados aqui apresentados sugerem utilização do fungo *P. citreonigrum* em processos que visem à produção de kestose por via enzimática. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para otimizar os parâmetros reacionais, e assim aumentar o rendimento do FOS.

## 1. INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -frutofuranosidase 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  $\beta$ -frutofuranosidase são capazes de catalisar reações de transfrutossilacção 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; Dominguez *et al.*, 2010; Mussatto *et al.*, 2009; Prata *et al.*,

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

2010; Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2004; Yun, 1996).

Os frutooligossacarídeos são oligossacarídeos formados por unidades de frutose, encontrados naturalmente em pequenas quantidades em vários vegetais, porém em concentração muito baixas para exercer qualquer efeito benéfico. Todavia, esses oligossacarídeos podem ser produzidos, em larga escala, por ação de enzimas microbianas com atividade de transfrutoseilação (frutoseiltransferase (EC 2.4.1.9) e/ou  $\beta$ -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26)) (Kralj *et al.*, 2008; Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2005).

Os frutooligossacarídeos são açúcares não-convencionais, representados principalmente por kestose (GF2), nistose (GF3) e 1- $\beta$ -frutofuranosilnistose (GF4), 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 sintetizar frutooligossacarídeos (FOS) a partir da  $\beta$ -frutofuranosidase (FTase) produzida por *P. citreonigrum* URM 4459

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Micro-organismo e Condições de Cultura

*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.

### 2.2. Preparação do inóculo

Para preparação do inóculo, o fungo *Penicillium citreonigrum* URM 4459 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).

### 2.3. Produção da $\beta$ -frutofuranosidase em biorreator utilizando células livres

Para produção da  $\beta$ -frutofuranosidase, o pré-inóculo contendo uma concentração de  $10^4$  esporos/mL foi adicionado em Enrlenmeyers (250 mL) contendo 100 mL de meio composto por (p/v): sacarose (10%),  $\text{NaNO}_3$  (0,2%),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05%),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,5%) e  $\text{KCl}$  (0,05%). O pré-inóculo foi crescido por 3 dias, a 28° C, 150 rpm, e depois transferido para um biorreator de 2 L, tipo tanque agitado, utilizando como volume de trabalho 1 L de meio de cultura, contendo a

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



mesma composição do meio do pré-inoculo, exceto a sacarose, cuja concentração foi ajustada para 20%. A fermentação foi conduzida sob as seguintes condições: temperatura (28°C), pH (6,5) e agitação (150 rpm), durante 61 horas de fermentação. Ao fim da fermentação, as células foram removidas por filtração a vácuo em papel Whatman n. 1, e o filtrado obtido foi utilizado para determinação da atividade extracelular e síntese enzimática de FOS.

## 2.4. Determinação da atividade de transfrutossilação (FTase)

A atividade de transfrutossilação da  $\beta$ -frutofuranosidase foi determinada de acordo com o método descrito por, Ganaie *et al.* (2014), utilizando a sacarose como substrato a uma concentração de 60% (p/v) em tampão citrato, pH 6,0. 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 1  $\mu$ mol de glicose por minuto sobre as condições de ensaio.

## 2.5. Produção de FOS

A produção de frutooligossacarídeos a partir da  $\beta$ -frutofuranosidase de *Penicillium citreonigrum* foi realizada utilizando uma mistura de reação contendo  $\beta$ -frutofuranosidase e sacarose (60%, em tampão citrato, pH 6,0) na proporção de 1:3 (v/v). Essa mistura foi mantida em agitador orbital (150 rpm) a 55° C, retirando-se amostras nos seguintes tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 21 e 24 h. Ao fim da incubação, a reação foi interrompida em banho fervente por 10 min, e as amostras foram diluídas (1:10) e filtradas a 0,2  $\mu$ m. O filtrado obtido foi utilizado para determinação da concentração de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

## 2.6. Determinação da concentração de FOS

As concentrações de FOS (1-kestose, 1-nistose, and 1- $\beta$ -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  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm, Alltech). Os açúcares foram detectados por meio de um Evaporative light scattering Sedex 85 (Sedere). A fase móvel consistiu em acetonitrila e água (70:30 v/v), com 0,04% de hidróxido de amônio diluído em água, a uma vazão de 1 mL / min à 25°C (Dias *et al.*, 2009; Nobre *et al.*, 2009).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1. Produção da $\beta$ -frutofuranosidase de *Penicillium citreonigrum* em biorreator utilizando célula livres

O desempenho de produção da  $\beta$ -frutofuranosidase obtida a partir de *P. citreonigrum* em biorreator, utilizando as condições otimizadas em Erlenmeyers, está ilustrado na Figura 1. Nesta

figura, é possível constatar que a  $\beta$ -frutofuranosidase obteve máxima atividade (232,16 U/mL) após 38 h de fermentação (produtividade de 6,11 U/mL.h). Logo em seguida, houve um declínio acentuado na atividade da enzima, atingindo, ao final das 88 h de fermentação, uma redução de cerca de 40% da atividade.

Lim *et al.* (2006), ao estudarem a produção de frutossiltransferase a partir de culturas de *Penicillium citrinum*, observaram que a máxima produção da enzima foi obtida ao final de 96 h de fermentação, sob as mesmas condições experimentais utilizadas neste trabalho, exceto a agitação (400 rpm) e o volume de trabalho (1,5L) .

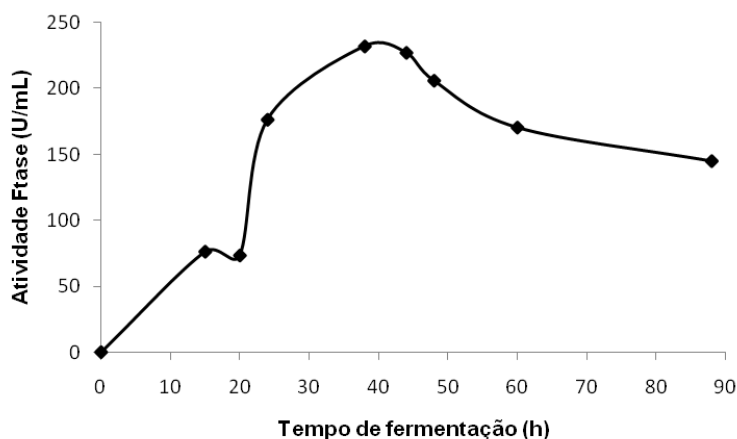


Figura 1- Produção de  $\beta$ -frutofuranosidase a partir de *Penicillium citreonigrum* em biorreator de 2 L.

### 3.2. Síntese enzimática de FOS

A síntese de FOS catalizada pela FTase extracelular obtida de *P. citreonigrum* foi estudada utilizando sacarose a 60% (p/v) (Figura 2). A concentração máxima de FOS foi observada após 24h de reação, correspondendo a um consumo de 30% (m/m) da sacarose inicial. O rendimento máximo de FOS obtido foi de 20% (m/m) em relação à concentração inicial de sacarose, resultando em níveis elevados de GF<sub>2</sub> (18%, m/m) e baixos rendimentos de GF<sub>3</sub> (1,5%, m/m) e GF<sub>4</sub> (0,6%, m/m), sugerindo que a FTase extracelular produzida por *P. citreonigrum* não é capaz de utilizar grandes quantidades de GF<sub>2</sub> para alongamento da cadeia glicosídica. Isto implica na possibilidade da sacarose atuar como frutossil doador e aceitador preferencial para a formação de FOS ou forte ligação de GF<sub>2</sub> ao sítio ativo da enzima por tempo prolongado (Antosová *et al.*, 2008). O perfil de formação de GF<sub>2</sub>, em comparação com os demais oligômeros, é benéfico para os ativos de saúde devido à sua força edulcorante, uma vez que, o aumento da cadeia de frutose diminui o poder edulcorante do FOS (Spiegel, 1994).

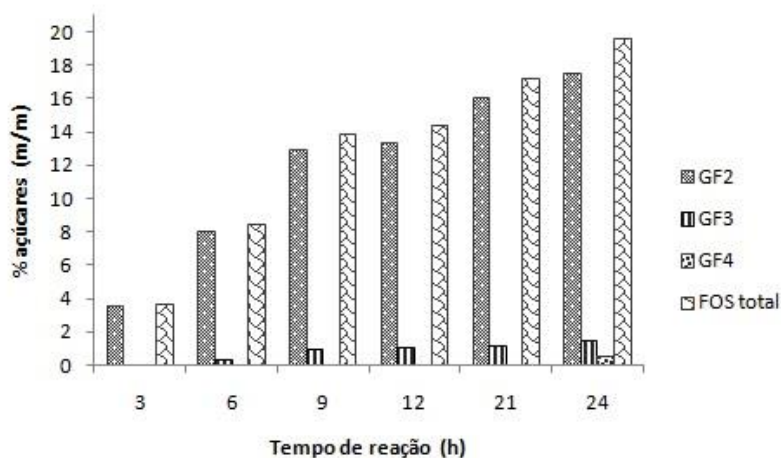


Figura 2 - Produção enzimática de frutooligossacarídeos a partir da  $\beta$ -frutofuranosidase extracelular obtida de *Penicillium citreonigrum*.

## 4. CONCLUSÃO

Assim, os resultados aqui apresentados sugerem a utilização do fungo *P. citreonigrum* em processos que visem à produção de kestose (GF<sub>2</sub>) por via enzimática. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para otimizar os parâmetros reacionais, e assim aumentar o rendimento do FOS.

## 5. REFERÊNCIAS

- Aziani, G.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Guimarães, L. H. S. Production of fructooligosaccharides by *Aspergillus phoenicis* biofilm on polyethylene as inert support. *Food Technology and Biotechnology*, 50, 40-45, 2012.
- Vargas, W.; Cumino, A.; Salerno, G. L. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? *Planta*, 216, 951-960, 2003.
- Dominguez, A., Santos, I. M., Teixeira, J. A., & Lima, N. New and simple plate test for screening relative transfructosylation activity of fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23, 189-191, 2010.
- Dominguez, A.; Nobre, C.; Rodrigues, L. R.; Peres, A. M.; Torres, D.; Rocha, I. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, 89, 1174-1179, 2012.
- Mussatto, S., Aguilar, C., Rodrigues, L. R., & Teixeira, J. A. Fructooligosaccharides and  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials.





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

*Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59 (1-3), 76–81, 2009.

Prata, M. B., Mussatto, S. I., Rodrigues, L. R., & Teixeira, J. A. Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*. *Biotechnology Letters*, 32(6), 837–840, 2010.

Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. Production of fructooligosaccharides by fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. *Process Biochemistry*, 39 (6), 753–758, 2004.

Yun, J. W. Fructooligosaccharides – occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, 19 (2), 107–117, 1996.

Kralj, S.; Buchholz, K.; Dijkhuizen, L.; Seibel, J. Fructansucrase enzymes and sucrose analogues: a new approach for the synthesis of unique fructo-oligosaccharides. *Biocatal. Biotransform*, 26, 32–41, 2008.

Sangeetha, P.T.; Ramesh, M.N.; Prapulla, S.G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol*, 16, 442–457, 2005.

Dominguez, A. L.; Rodrigues, L. R.; Lima, N. M.; Teixeira, J. A. An Overview of the Recent Developments on Fructooligosaccharide Production and Applications. *Food Bioprocess Technol*, 2, 324-337, 2013.

Ganaie, M. A.; Rawatb, H. K.; Wania, O. A.; Gupta, U. S.; Kango, N. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. *Process Biochemistry*, 49, 840–844, 2014.

Nobre, C; Santos, M. J.; Dominguez, A.; Torres, D.; Rocha, O.; Peres, A. M.; Rocha, I.; Ferreira, E. C.; Teixeira, J. A.; Rodrigues, L. R. Comparison of adsorption equilibrium of fructose, glucose and sucrose on potassium gel-type and macroporous sodium ion-exchangeresins. *Analytica Chimica Acta*, 654 (1), 71-76, 2009.

Dias, L. G; Veloso, A. C. A; Correia, D. M; Rocha, O; Torres, D; Rocha, I; Rodrigues, L. R; Peres, A. M. UV spectrophotometry method for the monitoring of galactooligosaccharides production. *Food Chemistry*, 113 (1), 246-252, 2009.

Lim, J. S.; Lee, J. H.; Kim, J. M.; Park, S. W.; Kim, S. W. Effects of morphology and Rheology on Neo-fructosyltransferase production by *Penicillium citrinum*. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 11, 100-104, 2006.

Spiegel, J.E.; Rose, R.; Karabell, P.; Frankos, V.H.; Schmitt, D.F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technol*, 48, 85–89, 1994.

Antosová, M.; Illeová, V.; Vandaková, M.; Druzkovská, A.; Polakovíc, M. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Biotechnology*, 135, 58–63, 2008.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

