

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – CAMPUS DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PCF

**$\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE DE *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM:  
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO NA  
PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO**

LETÍCIA MARA RASBOLD

CASCAVEL  
2020

LETÍCIA MARA RASBOLD

**$\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE DE *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM:  
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO NA  
PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

ORIENTADOR: PROF. DR. ALEXANDRE MALLER

CASCADEL  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Rasbold, Letícia Mara  
β-frutofuranosidase de *Cunninghamella echinulata*  
PA3S12MM: purificação, caracterização bioquímica e aplicação  
na produção de açúcar invertido / Letícia Mara Rasbold;  
orientador(a), Alexandre Maller, 2020.  
72 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste  
do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas  
e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, 2020.

1. Hidrólise da sacarose. 2. Planejamento estatístico. 3.  
Imobilização. 4. Invertase. I. Maller, Alexandre. II.  
Título.

LETÍCIA MARA RASBOLD

**$\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE DE *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM:  
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO NA  
PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

**BANCA EXAMINADORA:**



---

Prof. Dr. Alexandre Maller  
*Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná  
UNIOESTE  
Orientador*



---

Prof. Dr. Marina Kimiko Kadowaki  
*Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná  
UNIOESTE*



---

Dr. Paulo Ricardo Heinen  
*Centro Universitário da Fundação Assis  
Gurgacz  
FAG*

**Cascavel - PR  
2020**

## **BIOGRAFIA RESUMIDA**

Letícia Mara Rasbold, natural de Toledo, Paraná, Brasil, nascida no dia 22 de dezembro de 1992, apresenta graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel (2018). Atualmente atua como discente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas. Desenvolve projeto experimental de dissertação na linha de pesquisa de Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pelo Prof. Dr. Alexandre Maller.

*“Pode-se começar a remodelar a paisagem com uma única flor, Capitão.”*

**Sr. Spock**

*Dedico ao pequeno João.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rosa e Gilmar e meus irmãos Anderson, Fábio e Suzana, que jamais mediram esforços para tornar meus objetivos em meus desejos reais. A melhor família que eu poderia desejar, sou a pessoa mais feliz do mundo por ter vocês.

Ao meu orientador Alexandre, meu maior exemplo, que ao longo de seis anos me aturou demonstrando uma paciência extraordinária. Agradeço pelas palavras certas e incentivos que contribuíram imensamente para a minha formação pessoal e profissional. Obrigada pela confiança a mim depositada, levarei seus ensinamentos para toda a vida.

À professora Marina, pelos valiosos ensinamentos e pela dedicação intensa em alcançar bons resultados, e que assim como eu compartilha grande paixão pelos fungos. Obrigada por cada dia, cada conversa, cada gesto de confiança, minha figura materna asiática.

Ao professor Zé Luis, meu amigo e parceiro de rock n' roll. Obrigada por cada parada para o café, cada discussão sobre música, cada viagem para o colegiado e cada intercessão em meus surtos. Nossas conversas tornaram minha trajetória muito mais leve e esses gestos foram cruciais para a finalização deste trabalho.

À professora Rita, que sempre compartilhou seu grande conhecimento comigo e sempre foi minha fonte de inspiração para ser uma pesquisadora melhor.

À professora Márcia Simões, por sua assistência nas análises estatísticas.

Ao Paulo Heinen que, mesmo à distância, compartilhou seus valiosos conhecimentos.

Meus sinceros agradecimentos ao professor Antonio Donizeti da Cruz pela gentileza em revisar a dissertação.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade concedida.

Meu agradecimento especial a todos que me acompanharam ao longo desta jornada e que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

# **$\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE DE *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO**

## **RESUMO**

Nos mais diversos setores industriais, o uso de enzimas tem sido cada vez mais requerido, substituindo diversos processos químicos convencionais. Embora sejam cada vez mais empregadas, o elevado custo de enzimas comerciais muitas vezes acaba encarecendo etapas essenciais, tornando necessária a busca por novas fontes enzimáticas. Neste contexto, os fungos se destacam como microrganismos promissores, uma vez que são grandes produtores de diversas enzimas de alto valor agregado. Dentre as enzimas produzidas por estes organismos, encontra-se a  $\beta$ -frutofuranosidase ( $\beta$ -FFase), que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica  $\alpha 1 \leftrightarrow 2 \beta$  da sacarose. Esta enzima apresenta aplicações em diversos setores industriais, como na produção de açúcar invertido, mistura equimolar de glicose e frutose. Obtido a partir de um processo conhecido como inversão, o açúcar invertido possui propriedades adoçantes superiores à da sacarose, assim como melhor solubilidade e maior resistência a cristalização e ao crescimento de microrganismos, sendo utilizado na fabricação de bolos, pães, sorvetes, geleias e bombons de recheio pastoso. A produção de açúcar invertido através da enzima  $\beta$ -FFase, embora origine um produto de elevada qualidade, apresenta custos consideráveis, sendo de fundamental importância a busca por novas fontes e metodologias que viabilizem a catálise enzimática. Deste modo, os objetivos deste trabalho consistiram no *screening* enzimático, otimização, purificação, caracterização e aplicação da  $\beta$ -FFase de *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM na produção de açúcar invertido. A partir dos ensaios de *screening* enzimático, verificou-se que o fungo *C. echinulata* produz as enzimas poligalacturonase (20,8 e 16,06 U mL<sup>-1</sup>) e  $\beta$ -FFase (133,65 e 194,31 U mL<sup>-1</sup>) nos extratos extra e intracelular, respectivamente. A maior produção de  $\beta$ -FFase foi verificada em meio Vogel e as condições de cultivo foram otimizadas através do delineamento composto central rotacional, onde a máxima produção desta enzima foi alcançada quando o fungo foi cultivado por 8 dias à 28 °C e suplementado com 1% de casca de maçã, alcançando 1054,85 U mL<sup>-1</sup>. As melhores condições para pH e temperatura da enzima presente no extrato bruto foram pH 5,0 e 60 °C. A  $\beta$ -FFase foi purificada através de colunas de troca iônica e exclusão molecular e apresentou massa molecular relativa de 89,2 kDa, atividade máxima em pH 6,0 e temperatura de 60 °C, além de apresentar estabilidade em pHs alcalinos e termoativação à 50 °C. Foi verificado que a enzima é multifuncional, uma vez que hidrolisou diferentes substratos, e sua atividade aumentou na presença de Mn<sup>2+</sup> e DTT. Os valores aparentes de K<sub>m</sub>, V<sub>máx</sub> e K<sub>cat</sub> para hidrólise da sacarose foram 173,8 mmol L<sup>-1</sup>, 908,7 mmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> e 1388,79 s<sup>-1</sup>, respectivamente. O conteúdo de carboidratos da enzima purificada foi de 83,13% e a análise dos produtos de hidrólise e transfrutossilacção indicaram que a enzima foi eficaz na produção de glicose e frutose, mas não apresentou atividade frutossiltransferase. A enzima imobilizada em alginato de cálcio exibiu bons resultados na conversão da sacarose, mostrando-se promissora para aplicações industriais. Os resultados sugerem que *C. echinulata* PA3S12MM é um excelente produtor de  $\beta$ -FFase, com elevada atividade catalítica, estabilidade em pHs alcalinos, caráter multifuncional, além de exibir bons resultados na inversão da sacarose.

**PALAVRAS-CHAVE:** invertase; enzima multifuncional; hidrólise da sacarose; imobilização em alginato de cálcio; delineamento composto central rotacional; *screening* enzimático.

# **$\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASE FROM *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM: PURIFICATION, BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND APPLICATION ON INVERTED SUGAR PRODUCTION**

## **ABSTRACT**

In the most diverse industrial sectors, the use of enzymes has been increasingly required, replacing several conventional chemical processes. Although they are increasingly used, the high cost of commercial enzymes often ends up making essential steps more expensive, making it necessary to search for new enzyme sources. In this context, fungi stand out as promising microorganisms, since they are major producers of several enzymes with high added value. Among the enzymes produced by these organisms, there is  $\beta$ -fructofuranosidase ( $\beta$ -FFase), which catalyzes the hydrolysis of the  $\alpha 1 \leftrightarrow 2 \beta$  glycosidic link in sucrose. This enzyme has applications in several industrial sectors, such as in the production of inverted sugar, equimolar mixture of glucose and fructose. Obtained from a process known as inversion, inverted sugar has greater sweetening properties than sucrose, as well as better solubility and greater resistance to crystallization and the growth of microorganisms, being used in the manufacture of cakes, breads, ice cream, jams and soft-centered candies. The production of inverted sugar through the enzyme  $\beta$ -FFase, although it originates a high quality product, presents considerable costs, being of fundamental importance the search for new sources and methodologies that make enzymatic catalysis feasible. Thus, the objectives of this work consisted of enzymatic *screening*, optimization, purification, characterization and application of *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM  $\beta$ -FFase in inverted sugar production. From enzymatic *screening* assays, it was found that the fungus *C. echinulata* produces the enzymes polygalacturonase (20.8 and 16.06 U mL<sup>-1</sup>) and  $\beta$ -FFase (133.65 and 194.31 U mL<sup>-1</sup>) in extra and intracellular extracts, respectively. The highest production of  $\beta$ -FFase was verified in Vogel medium and the cultivation conditions were optimized through the central rotational compound design, where the maximum production of this enzyme was achieved when the fungus was cultivated for 8 days at 28 °C and supplemented with 1% apple peel, reaching 1054.85 U mL<sup>-1</sup>. The best conditions for pH and temperature of the enzyme present in the crude extract were pH 5.0 and 60 °C. The  $\beta$ -FFase was purified through ion exchange and molecular exclusion columns and presented a relative molecular mass of 89.2 kDa, maximum activity at pH 6.0 and temperature of 60 °C, in addition to presenting stability in alkaline pH and thermoactivation at 50 °C. It was found that the enzyme is multifunctional, since it hydrolyzed different substrates, and its activity increased in the presence of Mn<sup>2+</sup> and DTT. The apparent values of K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub> and K<sub>cat</sub> for sucrose hydrolysis were 173.8 mmol L<sup>-1</sup>, 908.7 mmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> and 1388.79 s<sup>-1</sup>, respectively. The carbohydrate content of the purified enzyme was 83.13% and the analysis of the hydrolysis and transfructosylation products indicated that the enzyme was effective in the production of glucose and fructose, but did not show fructosyltransferase activity. The enzyme immobilized in calcium alginate showed good results in the conversion of sucrose, showing promise for industrial applications. The results suggest that *C. echinulata* PA3S12MM is an excellent producer of  $\beta$ -FFase, with high catalytic activity, stability in alkaline pHs, multifunctional character, in addition to showing promising results in the sucrose inversion.

**KEYWORDS:** invertase; multifunctional enzyme; sucrose hydrolysis; calcium alginate immobilization; composite central rotational design; enzymatic *screening*.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1 Cana-de-açúcar .....	3
3.2 Sacarose .....	3
3.3 Açúcar invertido .....	5
3.4 $\beta$ -frutofuranosidase.....	6
3.5 Os fungos .....	7
3.6 <i>Cunninghamella echinulata</i> .....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Delineamento do estudo.....	14
4.2 Isolamento e identificação do microrganismo.....	14
4.3 Manutenção da linhagem e preparo do inóculo .....	15
4.4 Extração das enzimas extracelulares e intracelulares .....	15
4.5 Determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas .....	15
4.6 <i>Screening</i> enzimático .....	16
4.7 Otimizações do cultivo .....	17
4.7.1 Efeito do meio de cultura e curva de produção enzimática .....	17
4.7.2 Delineamento composto central rotacional .....	17
4.8 Temperatura e pH de melhor atividade para a $\beta$ -FFase presente no extrato bruto .....	18
4.9 Purificação da $\beta$ -FFase através de colunas cromatográficas .....	18
4.10 Caracterização bioquímica da $\beta$ -FFase purificada .....	19
4.10.1 Análise da pureza e zimograma .....	19
4.10.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática .....	19
4.10.3 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática .....	19
4.10.4 Especificidade ao substrato.....	20
4.10.5 Efeito de íons e outros compostos na atividade da $\beta$ -FFase.....	20
4.10.6 Efeito do composto tiol DTT na $\beta$ -FFase inibida por íons metálicos .....	20
4.10.7 Determinação dos parâmetros cinéticos .....	20
4.10.8 Conteúdo de carboidratos .....	21
4.10.9 Análise dos produtos de hidrólise e transfrutoseilação por CCD.....	21

4.11	Imobilização do extrato bruto de <i>C. echinulata</i> .....	21
4.11.1	Otimização da concentração dos componentes para a imobilização .....	22
4.11.2	Determinação da atividade enzimática dos derivados imobilizados.....	22
4.11.3	Determinação dos parâmetros de imobilização.....	23
4.11.4	Eficiência do derivado imobilizado em relação ao número de usos .....	23
4.12	Hidrólise da sacarose pelo derivado imobilizado em reator tipo leito fixo .....	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
5.1	<i>Screening</i> enzimático .....	24
5.2	Efeito do meio de cultura e curva de produção enzimática .....	25
5.3	Temperatura e pH de melhor atividade para a $\beta$ -FFase presente no extrato bruto .....	25
5.4	Delineamento composto central rotacional.....	26
5.5	Purificação da $\beta$ -FFase.....	30
5.6	Caracterização bioquímica da $\beta$ -FFase purificada .....	31
5.6.1	Efeito da temperatura e pH na atividade e estabilidade enzimática .....	31
5.6.2	Especificidade ao substrato.....	33
5.6.3	Influência de diferentes compostos na atividade da $\beta$ -FFase .....	34
5.6.4	Efeito do composto tiol DTT na $\beta$ -FFase inibida por íons metálicos .....	35
5.6.5	Parâmetros cinéticos da $\beta$ -FFase.....	36
5.6.6	Conteúdo de carboidratos .....	36
5.6.7	Análise dos produtos de hidrólise e transfrutossilação .....	37
5.7	Imobilização do extrato bruto de <i>C. echinulata</i> .....	37
5.7.1	Otimização da concentração dos componentes para a imobilização .....	37
5.7.2	Eficiência do derivado imobilizado em relação ao número de usos .....	39
5.8	Hidrólise da sacarose pelo derivado imobilizado em reator tipo leito fixo.....	39
6.	CONCLUSÕES.....	40
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Fungos filamentosos produtores de $\beta$ -FFase .....	8
Tabela 2 <i>Screening</i> enzimático realizado com os extratos extra e intracelular .....	16
Tabela 3 Meios de cultivo avaliados.....	17
Tabela 4 <i>Screening</i> das enzimas produzidas por <i>C. echinulata</i> PA3S12MM.....	24
Tabela 5 Condições experimentais do delineamento composto central rotacional ...	27
Tabela 6 ANOVA do modelo de segunda ordem para a produção de $\beta$ -FFase.....	28
Tabela 7 Etapas da purificação da $\beta$ -FFase II extracelular de <i>C. echinulata</i> .....	30
Tabela 8 Especificidade ao substrato pela $\beta$ -FFase de <i>C. echinulata</i> .....	33
Tabela 9 Efeito de diferentes compostos na atividade $\beta$ -frutofuranosidásica.....	34

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática das enzimas envolvidas na síntese da sacarose em células vegetais.....	4
Figura 2 Formação de açúcar invertido a partir da reação de hidrólise da sacarose pela enzima $\beta$ -frutofuranosidase .....	4
Figura 3 Reação de inversão do poder óptico rotatório da solução de sacarose catalisada pela enzima $\beta$ -frutofuranosidase .....	5
Figura 4 Fotomicroscopia de <i>Cunninghamella echinulata</i> .....	12
Figura 5 Fungo <i>C. echinulata</i> PA3S12MM em meio batata dextrose ágar.....	14
Figura 6 Representação esquemática da ligação entre as cadeias lineares de alginato unidas através dos íons cálcio .....	22
Figura 7 Influência de diferentes meios de cultura em função do tempo de cultivo na produção de $\beta$ -FFase .....	25
Figura 8 pH e temperatura de melhor atividade para a $\beta$ -FFase presente no extrato bruto .....	26
Figura 9 Gráfico de Pareto para os parâmetros estimados do DCCR para a produção de $\beta$ -FFase .....	28
Figura 10 Superfície de resposta para produção de $\beta$ -FFase .....	29
Figura 11 Perfis cromatográficos obtidos após aplicação do extrato bruto dialisado em DEAE-Sephadex e Sephacryl S-100 HR.....	30
Figura 12 SDS-PAGE e zimograma da $\beta$ -FFase.....	31
Figura 13 Determinação da massa molecular da $\beta$ -FFase de <i>C. echinulata</i> .....	31
Figura 14 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da $\beta$ -FFase .....	32
Figura 15 Efeito do pH na atividade da $\beta$ -FFase.....	32
Figura 16 Efeito do composto tiol DTT na $\beta$ -FFase inibida por íons metálicos .....	36
Figura 17 Análise dos produtos de hidrólise da sacarose pela $\beta$ -FFase e verificação de atividade frutossiltransferase.....	37
Figura 18 Otimização das concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio...38	
Figura 19 Esferas obtidas a partir da imobilização do extrato bruto de <i>C. echinulata</i> em alginato de cálcio.....	38
Figura 20 Teste de reusabilidade dos derivados imobilizados .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise da variância)
BDA	Batata dextrose ágar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i> (Demanda bioquímica de oxigênio)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina de soro bovino)
CCD	Cromatografia em camada delgada
CMC	Carboximetilcelulose
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DEAE	<i>Diethylaminoethyl</i> (Dietilaminoetil)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNS	<i>Dinitrosalicylic acid</i> (Ácido 3,5-dinitrosalicílico)
DTT	<i>Dithiothreitol</i> (Ditiotreitol)
E.C.	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
$F$	Distribuição $F$ de Snedecor
$F_{cal}$	Valor calculado do teste $F$
$F_{tab}$	Valor tabelado do teste $F$
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FES	Fermentação em estado sólido
FOS	Frutooligossacarídeos
Fru	Frutose
FSbm	Fermentação submersa
GA	Ácido glucurônico
Gal	Galactose
GalA	Ácido galacturônico
GH	Glicosil hidrolase
Glc	Glicose
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i> (Geralmente reconhecido como seguro)
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaço interno transcrito)
MSR	Metodologia de superfície de resposta
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para

RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
sp.	Espécie
spp.	Espécies
<i>t</i>	Distribuição <i>t</i> de Student
UDP	<i>Uridine diphosphate</i> (Uridina difosfato)
Xil	Xilose

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
%	Porcentagem
mmol L <sup>-1</sup>	Milimol por litro
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgânico
$[\alpha]_D^{20}$	Ângulo de rotação mensurado no polarímetro no comprimento de onda correspondente à linha do sódio à 20 °C
°C	Grau Celsius
h	Hora
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
m	Metro
mL	Mililitro
min	Minuto
μmol	Micromol
mol L <sup>-1</sup>	Mol por litro
mg mL <sup>-1</sup>	Miligrama por mililitro
g	Gramma
μL	Microlitro
V	Volt
mA	Miliampére
kDa	Kilodalton
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
V <sub>máx</sub>	Velocidade máxima
K <sub>cat</sub>	Constante catalítica
nm	Nanômetro
cm	Centímetro
mL min <sup>-1</sup>	Mililitro por minuto
U mL <sup>-1</sup>	Unidade de atividade enzimática por mililitro
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
$\rho$	Nível de significância
U mg <sup>-1</sup>	Unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína
U	Unidade de atividade enzimática

mg	Miligrama
mmol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	Milimol por litro por minuto
s <sup>-1</sup>	Por segundo
K <sub>cat</sub> K <sub>m</sub> <sup>-1</sup>	Eficiência catalítica
mmol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	Milimol por litro por segundo
mm	Milímetro

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os membros pertencentes à família Poaceae, a cana-de-açúcar se destaca como uma das espécies mais cultivadas e mais importantes para o ser humano. Considerada a principal fonte de sacarose, correspondendo à 80% do suprimento mundial, a cultura canavieira tem recebido notoriedade ao longo dos anos como uma das atividades agroeconômicas mais relevantes para o Brasil, uma vez que o setor sucroalcooleiro brasileiro é considerado o maior produtor de açúcar do mundo.

A sacarose, carboidrato de baixo peso molecular mais abundante na natureza, é um dissacarídeo não-redutor de grande interesse industrial. Consolidada no setor alimentício, a sacarose apresenta alto poder adoçante, sendo também utilizada como matéria-prima para obtenção de derivados de elevado valor agregado. Dentre estes derivados, encontra-se o açúcar invertido, produzido a partir da hidrólise ácida ou enzimática da sacarose, que consiste em uma mistura com quantidades equimolares de D-frutose e D-glicose.

O açúcar invertido possui propriedades adoçantes superiores à da sacarose, assim como melhor solubilidade e maior resistência a cristalização e ao crescimento de microrganismos. É utilizado na fabricação de bolos, pães, sorvetes, geleias, caramelos, bombons de recheio pastoso e outros doces. Ele é obtido a partir de um processo conhecido como inversão, que pode ocorrer de duas formas: catálise ácida, através da adição de ácido ou com uso de resinas catiônicas; ou via enzimática, através da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase.

A  $\beta$ -frutofuranosidase é uma enzima que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica  $\alpha 1 \leftrightarrow 2 \beta$  da sacarose. Esta enzima apresenta aplicações em diversos setores industriais, como na produção de bebidas alcólicas, na indústria farmacêutica, na produção de bioetanol, no desenvolvimento de eletrodos enzimáticos, na síntese de frutooligossacarídeos, na produção de açúcar invertido, entre outros. A  $\beta$ -frutofuranosidase é onipresente em plantas, sendo também produzida por bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

O reino Fungi abrange um grupo bastante heterogêneo de organismos heterotróficos, aclorofilados, eucariontes, uni ou multicelulares encontrados em praticamente todos os nichos ecológicos. Devido a sua característica singular de digestão extracelular, são considerados grandes produtores enzimáticos. Dentre as enzimas produzidas por estes organismos, encontra-se a  $\beta$ -frutofuranosidase, amplamente descrita para os integrantes deste reino.

*Cunninghamella echinulata* é um fungo filamentoso de reprodução assexuada pertencente à ordem Mucorales. Dentre as características distintas exibidas por esta espécie, a acumulação lipídica é uma das mais estudadas, sabendo-se muito sobre enzimas lipogênicas produzidas por este fungo. Outro aspecto significativo sobre *C. echinulata* está relacionado com sua capacidade de bioconversão de fármacos e outros compostos, amplamente descrita em diversos estudos. Além disso, sabe-se que este fungo atua na biorremediação de íons metálicos.

Apesar disso, pouco se sabe sobre enzimas de interesse biotecnológico produzidas por este fungo. Desta forma, este estudo buscou ampliar os conhecimentos sobre algumas enzimas produzidas por *C. echinulata*, especialmente  $\beta$ -frutofuranosidase, focando em estudos de produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicação desta enzima na conversão da sacarose para a obtenção de açúcar invertido.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi isolar uma nova  $\beta$ -frutofuranosidase a partir do fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM, utilizando técnicas de produção e purificação acessíveis que pudessem viabilizar economicamente a integração desse biocatalisador aos processos industriais. Os objetivos específicos consistiram em:

- Determinar as melhores condições de cultivo para a indução de  $\beta$ -frutofuranosidase;
- Determinar a temperatura e pH para melhor atividade da  $\beta$ -frutofuranosidase presente no extrato bruto;
- Purificar a  $\beta$ -frutofuranosidase através de cromatografias de troca iônica e exclusão molecular;
- Determinar a massa molecular, efeito da temperatura e pH, especificidade ao substrato, efeito de diferentes compostos, parâmetros cinéticos, conteúdo de carboidratos, produtos de hidrólise e transfrutossilacção da  $\beta$ -frutofuranosidase purificada;
- Imobilizar o extrato bruto enzimático de *C. echinulata* em matriz de alginato de cálcio e aplicar o derivado imobilizado na hidrólise da sacarose para obtenção de açúcar invertido.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea pertencente à família Poaceae originária da Nova Guiné, e é uma das espécies de metabolismo fotossintético C4 mais cultivadas e importantes para o ser humano (MARIN; NASSIF, 2013). Sua expressiva relevância no âmbito econômico está relacionada com a produção de energia (álcool e eletricidade) e sacarose (CARDOSO et al., 2019), sendo considerada a principal fonte deste açúcar, correspondendo à 80% do suprimento mundial (ALI et al., 2019).

No Brasil, a cana-de-açúcar se destaca como uma das mais antigas atividades agroeconômicas (CARDOSO et al., 2019). De acordo com a literatura, o primeiro espécime chegou ao país por volta de 1532, trazido pelo navegador português Martim Affonso de Souza que iniciou seu cultivo na Capitania de São Vicente, estabelecendo os primeiros engenhos de açúcar. Assim, a cultura canavieira se expandiu rapidamente para outras regiões, detendo ao Brasil o monopólio mundial da produção açucareira (MACHADO, 2003).

Nos dias atuais, o setor sucroalcooleiro brasileiro continua exercendo notoriedade no mercado internacional, sendo o maior produtor de açúcar do mundo, alcançando 30,14 milhões de toneladas na safra de 2019/20 (CONAB, 2019). A variedade cultivada hoje no país consiste em um híbrido das espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, obtidas através de programas de melhoramento genético visando aumentar seu conteúdo sacarídico (ALI et al., 2019). Na cana-de-açúcar, o local de armazenamento de sacarose é o caule, onde podem ser encontradas concentrações de 650 mmol L<sup>-1</sup> (SOUZA et al., 2019).

#### 3.2 Sacarose

A sacarose é o principal produto final da fotossíntese, sintetizada no citosol de células do mesófilo e transportada via floema para outros tecidos, onde é metabolizada ou armazenada no vacúolo (WANG et al., 2019). As principais enzimas envolvidas em sua síntese são a sacarose fosfato sintase (EC: 2.4.1.14) que atua na conversão de uridina difosfato-glicose (UDP-glicose) e frutose-6-fosfato em sacarose-6-fosfato; a sacarose fosfatase (EC: 3.1.3.24) que remove o fosfato inorgânico (P<sub>i</sub>) da sacarose-6-fosfato liberando sacarose (WIND; SMEEKENS; HANSON, 2010) e a sacarose sintase (EC: 2.4.1.13) que catalisa de modo reversível a síntese e a hidrólise da sacarose de/ou para UDP-glicose e frutose (Figura 1) (WANG et al., 2019).

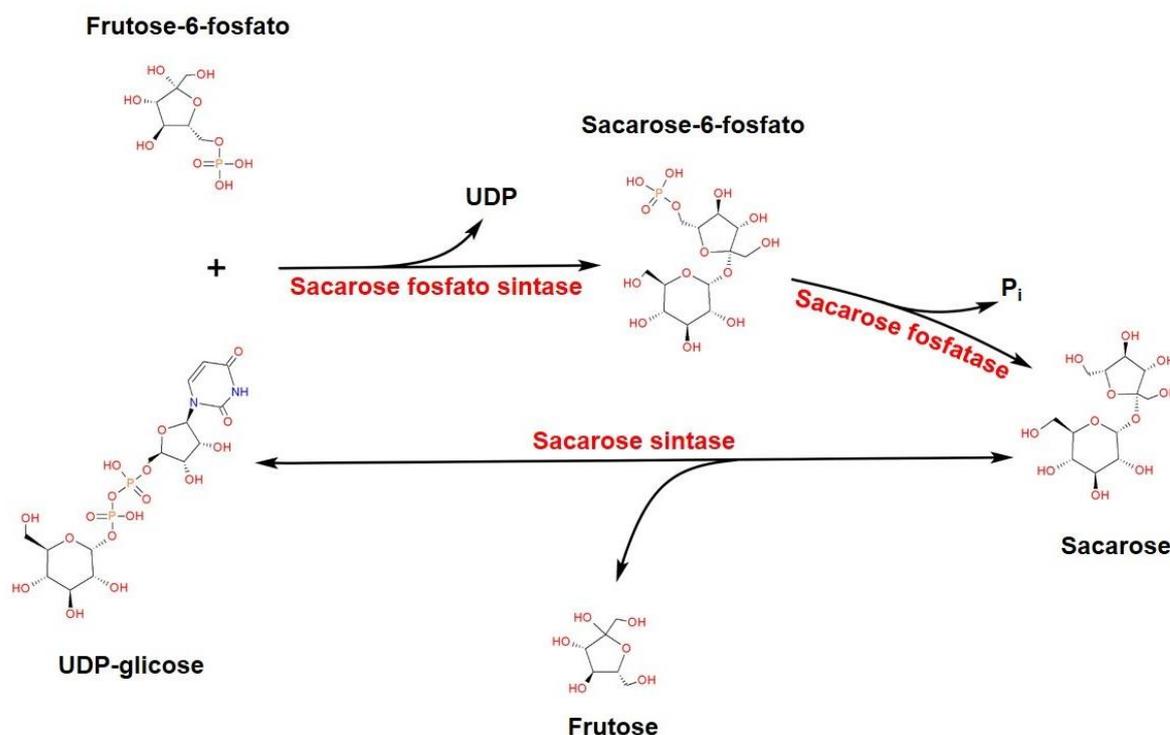


Figura 1 Representação esquemática das enzimas envolvidas na síntese da sacarose em células vegetais. A figura foi preparada utilizando o programa ChemSketch® 12.0.

Através de processos químicos e fermentativos, a sacarose é utilizada como reagente para a obtenção de produtos mais elaborados, como surfactantes não-iônicos, polímeros, emulsificantes e adoçantes (BOSCOLO, 2003). A obtenção desses derivados via processos fermentativos ocorre através de bioconversões catalisadas por enzimas como a  $\beta$ -frutofuranosidase, que catalisa a hidrólise da sacarose, resultando na produção equimolar de D-glicose e D-frutose, mistura conhecida como açúcar invertido (Figura 2) (LINCOLN; MORE, 2018).

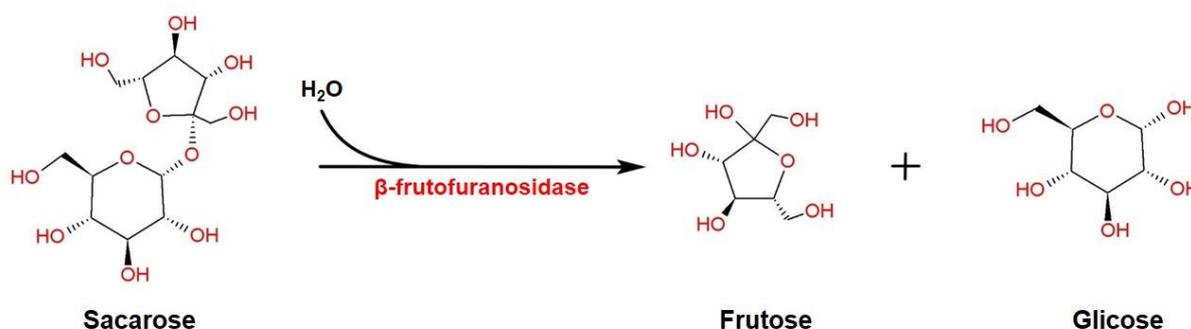


Figura 2 Formação de açúcar invertido a partir da reação de hidrólise da sacarose pela enzima  $\beta$ -frutofuranosidase. A figura foi preparada utilizando o programa ChemSketch® 12.0.

### 3.3 Açúcar invertido

O açúcar invertido recebe este nome devido à reação onde ocorre a inversão do poder óptico rotatório da solução, quando comparado ao sentido da luz incidido sobre a sacarose. Antes da reação, o feixe de luz desvia para a direita, considerando o caráter dextrogiro da sacarose (+66,5°). Após a hidrólise, a solução equimolar de monossacarídeos tem a propriedade de desviar a luz polarizada para a esquerda [+52,7° + (-92,3°) = -39,6°], uma vez que a glicose é fracamente dextrogiro e a frutose é fortemente levogiro (Figura 3) (NADEEM et al., 2015).

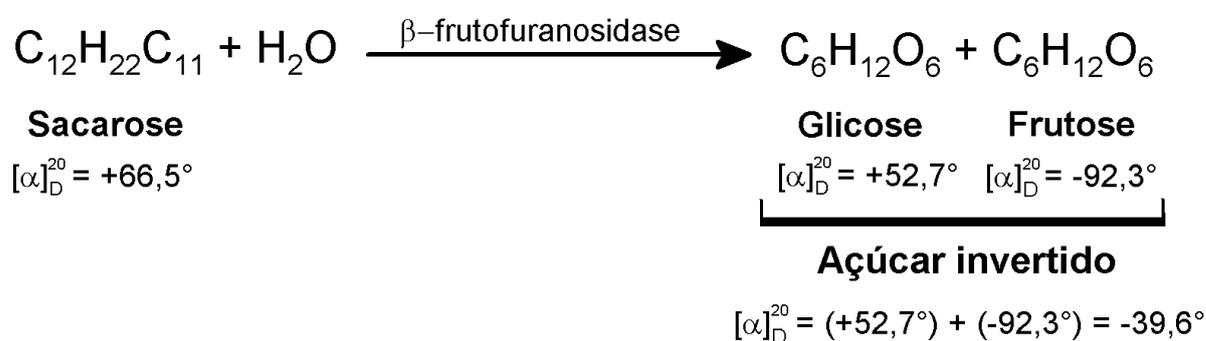


Figura 3 Reação de inversão do poder óptico rotatório da solução de sacarose catalisada pela enzima  $\beta$ -frutofuranosidase. Adaptado de Chemello (2005). A figura foi preparada utilizando o programa ChemSketch<sup>®</sup> 12.0.

O açúcar invertido possui propriedades adoçantes superiores à da sacarose, assim como melhor solubilidade e maior resistência a cristalização e ao crescimento de microrganismos (OZCAN et al., 2019). Devido à sua natureza higroscópica, o açúcar invertido é utilizado como umectante na fabricação de balas e bombons de recheio pastoso (NADEEM et al., 2015); na fabricação de geleias e caramelos (LINCOLN; MORE, 2017); na panificação de pães e bolos, ajudando na fermentação e aumentando a maciez e durabilidade do produto; além de ser empregado na fabricação de sorvetes (TOLEDO et al., 2019).

O processo de inversão da sacarose pode ocorrer de duas formas: catálise ácida através da adição de ácido ou com uso de resinas catiônicas; ou via enzimática através da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase (MARTINEZ et al., 2014). O uso de ácidos e resinas leva a um produto final colorido, devido às condições extremas durante a reação e presença de contaminantes como o hidróxi-metil-furfural (ALMEIDA et al., 2018). O uso de enzimas, embora origine um produto de elevada qualidade, apresenta

custos consideráveis, tornando-se necessária a busca por novas fontes e metodologias que viabilizem a catálise enzimática.

### 3.4 $\beta$ -frutofuranosidase

A  $\beta$ -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, também conhecida como  $\beta$ -frutofuranosidase ( $\beta$ -FFase),  $\beta$ -frutosidase, invertase, sucrase ou sacarase (BRENDA: EC 3.2.1.26) é uma enzima pertencente à família GH32 das glicosil hidrolases que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica  $\alpha 1 \leftrightarrow 2 \beta$  da sacarose (OLIVEIRA et al., 2020). No contexto histórico, a  $\beta$ -FFase apresenta grande importância, motivando inúmeros pesquisadores. A partir dos estudos diretos ou indiretos com esta enzima, foram estabelecidos vários conceitos básicos de enzimologia, como a hipótese de chave-fechadura para atividade enzimática, o modelo matemático descrito por Michaelis e Menten, o conceito de ponto isoelétrico, a teoria do estado estacionário descrita por Briggs e Haldane, além de ser a primeira proteína a ser identificada como biocatalisador (MOURA; PINTO; RODRIGUES, 2007).

As  $\beta$ -FFases apresentam as mais diversas aplicações industriais, sendo empregadas na produção de bebidas alcóolicas, ácido láctico e glicerol (NADEEM et al., 2015), no desenvolvimento de eletrodos enzimáticos para detecção de sacarose e outros alvos analíticos (XIANG; LU, 2011), na indústria farmacêutica para produção de tabletes digestivos (OYEDEJI et al., 2017), na produção de bioetanol a partir do melaço de cana (MALHOTRA; BASIR, 2020), na produção de mel artificial e manufatura de agentes plastificantes usados em cosméticos (NASCIMENTO et al., 2019), na síntese de frutooligossacarídeos (FOS) (AUNG et al., 2019) e na produção de açúcar invertido (OZCAN et al., 2019).

A  $\beta$ -FFase é onipresente em plantas, sendo considerada uma enzima-chave no metabolismo da sacarose, uma vez que os produtos obtidos a partir de sua ação catalítica são utilizados como fonte de energia e carbono, desempenhando papel fundamental no crescimento e desenvolvimento vegetal (ROITSCH; GONZÁLEZ, 2004). Além das plantas, são descritas  $\beta$ -FFases produzidas por bactérias (AWAD et al., 2013; ZHOU et al., 2016; ÁVILA-FERNANDEZ et al., 2016; PEK et al., 2017), leveduras (MORENO; SANCHEZ; RODRIGUEZ, 1990; ODA; TONOMURA, 1994; CHÁVEZ et al., 1997; GHASEMI et al., 2014; JIANG et al., 2016; BHALLA et al., 2017) e fungos filamentosos.

### 3.5 Os fungos

O reino Fungi abrange um grande grupo de organismos encontrados em praticamente todos os nichos ecológicos (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019a). Sua taxonomia é controversa, uma vez que o variado grupo de ramos filogenéticos dificulta a compreensão evolutiva de caracteres, impossibilitando o estabelecimento de sinapomorfias que unifiquem Fungi como um clado monofilético (RICHARDS; LEONARD; WIDEMAN, 2017). Apesar disso, Naranjo-Ortiz e Gabaldón (2019b) propuseram uma classificação taxonômica onde os fungos são divididos em nove filos: Opisthospordia, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Basidiomycota e Ascomycota. Embora diversas espécies *incertae sedis* não estejam inclusas nessa classificação, estas linhagens formam juntas um grupo monofilético conhecido como “fungos verdadeiros”.

Os fungos constituem um grupo bastante heterogêneo de organismos heterotróficos, aclorofilados, uni ou multicelulares e eucariontes (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996) conhecidos como mofos, bolores, leveduras, cogumelos, políporos, ferrugens e carvões (BLACKWELL, 2011). Os fungos desempenham papéis-chave no âmbito ecológico, atuando na ciclagem de nutrientes como decompositores, fazendo interações mutualistas com algas (líquens) e plantas (micorrizas), além de outras interações simbióticas, atuando como parasitas, patógenos e predadores de diversos organismos (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019a).

Os fungos obtêm seus nutrientes através da digestão extracelular, secretando uma gama de enzimas que atuam diretamente no substrato, quebrando macromoléculas em moléculas menores, absorvendo os produtos solubilizados (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019a). Por apresentarem uma grande capacidade de produção enzimática, eles são a principal fonte de enzimas utilizadas em várias áreas industriais como amilases, celulases, proteases, xilanases e  $\beta$ -FFases (McKELVEY; MURPHY, 2017). As  $\beta$ -FFases são amplamente descritas para os integrantes deste reino, especialmente para fungos filamentosos (Tabela 1).

Apesar do amplo conhecimento sobre  $\beta$ -FFases produzidas por diferentes espécies de fungos filamentosos, até o momento, a produção desta enzima por *Cunninghamella echinulata* é desconhecida.

Tabela 1 Fungos filamentosos produtores de  $\beta$ -FFase e suas respectivas condições de cultivo.

(continua)

Microrganismo	Fonte de carbono	Cultivo	Inóculo (esporos mL <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tempo (h)	pH	Agitação (rpm)	Referência
<i>Aspergillus aculeatus</i> URM4953	Farelo de trigo + sacarose	FES	1 x 10 <sup>7</sup>	30	72	-	-	OLIVEIRA et al., 2020
<i>A. thecius</i>	Farelo de trigo	FES	1 x 10 <sup>8</sup>	30	72	-	-	MADYASTHA et al., 1987
<i>A. awamori</i> NBRC 4033	Sacarose	FSbm	-	28	120	-	150	SMAALI et al., 2011
<i>A. caesiellus</i>	Farelo de soja	FES	-	25	72	7,0	-	NOVAKI et al., 2010
<i>A. caespitosus</i>	Farelo de trigo + farinha de aveia	FES	1 x 10 <sup>5</sup>	30	72	6,0	-	ALEGRE et al., 2009
	Farelo de trigo	FSbm		40			100	
<i>A. carbonarius</i> PC-4	Coroa de abacaxi	FSbm	1 x 10 <sup>6</sup>	28	96	6,0	180	NASCIMENTO et al., 2019
<i>A. flavus</i> NSPRI.101	Sacarose	FSbm	9 x 10 <sup>7</sup>	30	96	7,5	-	OLUTIOLA; COLE, 1980
<i>A. flavus</i>	Cascas de abacaxi, laranja e romã	FSbm	1 x 10 <sup>6</sup>	30	96	5,0	125	UMA et al., 2010
<i>A. foetidus</i> NRRL 337	Bagaço de maçã	FES	-	30	96	-	-	HANG; WOODAMS, 1995
<i>A. fumigatus</i>	Palha de trigo	FSbm	1 x 10 <sup>7</sup>	42	12	-	120	REZENDE; FELIX, 1999
<i>A. heteromorphus</i> URM0269	Farelo de trigo + sacarose	FES	1 x 10 <sup>7</sup>	30	72	-	-	OLIVEIRA et al., 2020
<i>A. japonicus</i> MU-2	Sacarose	FSbm	-	30	48	6,5	-	HAYASHI et al., 1992
<i>A. japonicus</i> TIT-KJ1	Sacarose	FSbm	-	30	48	-	500	DUAN; SHEU; CHEN, 1993
<i>A. japonicus</i> TIT-90076	Sacarose	FSbm	4 x 10 <sup>7</sup>	30	96	-	200	CHEN; LIU, 1996
<i>A. japonicus</i> JN19	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>6</sup>	28	96	5,5	-	WANG; ZHOU, 2006
<i>A. japonicus</i> ATCC 20236	Sacarose	FSbm	1,8 x 10 <sup>7</sup>	28	216	-	160	MUSSATTO; RODRIGUES; TEIXEIRA, 2009
<i>A. japonicus</i>	Sacarose	FSbm	-	30	48	6,5	-	HIRABAYASHI et al., 2017

Tabela 1 Fungos filamentosos produtores de invertase e suas respectivas condições de cultivo.

(continuação)

Microrganismo	Fonte de carbono	Cultivo	Inóculo (esporos mL <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tempo (h)	pH	Agitação (rpm)	Referência
<i>A. japonicus</i> URM5620	Farelo de trigo + sacarose	FES	1 x 10 <sup>7</sup>	30	72	-	-	OLIVEIRA et al., 2020
<i>A. kawachii</i> IFO 4308	Sacarose	FSbm	-	30	96	5,5	-	NAGAYA et al., 2017;
<i>A. nidulans</i> 2.124	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>7</sup>	28	15	-	180	VAINSTEIN; PEBERDY, 1991
<i>A. nidulans</i> 2.1	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>7</sup>	28	22	-	180	CHEN et al., 1996
<i>A. nidulans</i>	Farinha de centeio	FSbm	1 x 10 <sup>6</sup>	30	72	6,0	100	ALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2013
<i>A. niger</i>	Sacarose	FSbm	2,6 x 10 <sup>6</sup>	30	48	-	-	RUBIO; MALDONADO, 1995
<i>A. niger</i> N402	Sacarose	FSbm	2 x 10 <sup>7</sup>	28	35	-	120	WALLIS; HEMMING; PEBERDY, 1997
<i>A. niger</i> AS0023	Sacarose	FSbm	-	30	24	6,0	250	L'HOCINE et al., 2000
<i>A. niger</i> IMI303386	Sacarose	FSbm	-	28	48	7,4	200	NGUYEN et al., 2005
<i>A. niger</i> ATCC 20611	Sacarose	FSbm	2 x 10 <sup>6</sup>	30	96	6,5	150	DINARVAND; REZAAE; FOROUGH, 2017
<i>A. niger</i> IBK1	Casca de abacaxi	FSbm	1 x 10 <sup>6</sup>	35	120	5,0	-	OYEDEJI et al., 2017
<i>A. niveus</i>	Bagaço de cana	FSbm	1 x 10 <sup>5</sup>	40	72	-	100	GUIMARÃES et al., 2009
<i>A. niveus</i> URM5870	Farelo de trigo + sacarose	FES	1 x 10 <sup>7</sup>	30	72	-	-	OLIVEIRA et al., 2020
<i>A. ochraceus</i>	Bagaço de cana	FSbm	1 x 10 <sup>5</sup>	40	96	-	100	GUIMARÃES et al., 2007
<i>A. oryzae</i> IPT-301	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>7</sup>	30	72	5,5	200	FERNANDEZ et al., 2007
<i>A. oryzae</i> KB	Sacarose	FSbm	4 x 10 <sup>6</sup>	30	48	-	150	KURAKAKE et al., 2017
<i>A. parasiticus</i>	Bagaço de cana	FSbm	1 x 10 <sup>5</sup>	30	24	6,0	100	LUCCA; JORGE; GUIMARÃES, 2013
<i>A. phoenicis</i> URM4924	Farelo de trigo + sacarose	FES	1 x 10 <sup>7</sup>	30	72	-	-	OLIVEIRA et al., 2020

Tabela 1 Fungos filamentosos produtores de invertase e suas respectivas condições de cultivo.

(continuação)

Microrganismo	Fonte de carbono	Cultivo	Inóculo (esporos mL <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tempo (h)	pH	Agitação (rpm)	Referência
<i>A. phoenicis</i> ( <i>A. saitoi</i> )	Farelo de soja	FES	1 x 10 <sup>5</sup>	40	72	-	-	RUSTIGUEL et al., 2011
<i>A. phoenicis</i> ( <i>A. saitoi</i> )	Farelo de trigo	FSbm	1 x 10 <sup>5</sup>	40	72	6,0	100	RUSTIGUEL; JORGE; GUIMARÃES, 2015
<i>A. sojae</i> JU12	Casca de laranja	FES	1 x 10 <sup>8</sup>	37	120	-	-	LINCOLN; MORE, 2018
<i>A. sydowi</i> IAM2544	Licor de milho	FSbm	-	30	120	6,0	-	MURAMATSU; NAKAKUKI, 1995
<i>A. tamarii</i> URM4634	Farelo de soja + sacarose	FES	1 x 10 <sup>7</sup>	30	120	-	-	OLIVEIRA et al., 2020
<i>A. terreus</i>	Farinha de centeio	FSbm	1 x 10 <sup>5</sup>	30	48	6,0	100	GIRALDO et al., 2014
<i>A. terreus</i> URM4658	Farelo de trigo + sacarose	FES	1 x 10 <sup>7</sup>	30	72	-	-	OLIVEIRA et al., 2020
<i>A. thermomutatus</i>	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>6</sup>	30	72	6,0	100	TÓDERO; RECHIA; GUIMARÃES, 2019
<i>A. tubigenis</i> XG21	Melaço de cana	FSbm	1 x 10 <sup>9</sup>	30	48	-	200	XIE et al., 2017
<i>A. versicolor</i>	Bagaço de maçã	FSbm	1 x 10 <sup>5</sup>	28	288	7,5	-	DAPPER et al., 2016
<i>A. versicolor</i> URM5701	Farelo de trigo + sacarose	FES	1 x 10 <sup>7</sup>	30	72	-	-	OLIVEIRA et al., 2020
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Casca de romã	FSbm	1 x 10 <sup>6</sup>	30	96	4,0	-	UMA et al., 2012
<i>C. herbarum</i> ER-25	Melaço	FSbm	1 x 10 <sup>6</sup>	20	72	5,5	-	TASKIN et al., 2016
<i>Fusarium graminearum</i> HB0810	Palha de trigo	FES	-	30	168	-	-	GONÇALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2015
<i>F. oxysporum</i> NCIM 1072	Sacarose	FSbm	-	25	96	5,5	-	GUPTA et al., 1989
<i>F. solani</i>	Melaço	FSbm	1 x 10 <sup>6</sup> /10 <sup>7</sup>	30	96	5,0	-	BHATTI et al., 2006
<i>Mucor geophilus</i> EFRL 03	Mostarda preta hidrolisada	FSbm	-	45	48	6,5	-	QURESHI et al., 2012
<i>Neurospora crassa</i> 27	Sacarose + licor de milho	FSbm	1 x 10 <sup>4</sup>	28	48	5,5	-	POONAWALLA; PATEL; IYENGAR, 1965

Tabela 1 Fungos filamentosos produtores de invertase e suas respectivas condições de cultivo.

(conclusão)

Microrganismo	Fonte de carbono	Cultivo	Inóculo (esporos mL <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tempo (h)	pH	Agitação (rpm)	Referência
<i>N. sitophila</i> 28	Sacarose + licor de milho	FSbm	1 x 10 <sup>4</sup>	28	120	5,5	-	POONAWALLA; PATEL; IYENGAR, 1965
<i>Paecilomyces variotii</i>	Farelo de trigo	FES	1 x 10 <sup>5</sup>	40	96	-	-	GIRALDO et al., 2012
	Farelo de soja	FSbm			72	6,0	100	
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> URM 5139/URM 5126	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>4</sup>	30	36	5,5	150	NASCIMENTO et al., 2016
<i>P. chrysogenum</i> 71	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>4</sup>	28	120	5,5	-	POONAWALLA; PATEL; IYENGAR, 1965
<i>P. citreonigrum</i> URM 4459	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>4</sup>	25,5	67,8	6,5	-	NASCIMENTO et al., 2016
<i>P. citrinum</i> URM 2725	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>4</sup>	30	36	5,5	150	NASCIMENTO et al., 2016
<i>P. commune</i> URM 4939	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>4</sup>	30	36	5,5	150	NASCIMENTO et al., 2016
<i>P. expansum</i> MUM 02.14	Sacarose	FSbm	1,8 x 10 <sup>7</sup>	25	48	7,0	160	MUSSATTO et al., 2012
<i>P. glabrum</i> URM 4757	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>4</sup>	30	36	5,5	150	NASCIMENTO et al., 2016
<i>P. implicatum</i> URM 5426	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>4</sup>	30	36	5,5	150	NASCIMENTO et al., 2016
<i>P. islandicum</i> URM 5073	Sacarose	FSbm	1 x 10 <sup>4</sup>	30	36	5,5	150	NASCIMENTO et al., 2016
<i>P. oxalicum</i> GXU20	Farelo de trigo + farinha de soja	FSbm	1 x 10 <sup>8</sup>	28	144	5,5	150	XU et al., 2015
<i>P. pinophilum</i> EH2	Sacarose	FSbm	2 x 10 <sup>7</sup>	33,2	72	5,5	-	FLORES-GALLEGOS et al., 2012
<i>Rhizopus</i> sp. CCT 7417	Farelo de trigo	FES	1 x 10 <sup>7</sup>	35	168	-	-	GOULART; ADALBERTO; MONTI, 2003
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sacarose	FSbm	-	25	288	5,5	100	MOUELHI et al., 2014

FES: fermentação em estado sólido; FSbm: fermentação submersa.

### 3.6 *Cunninghamella echinulata*

Descrito pela primeira vez por Roland Thaxter em 1891 como *Oedocephalum echinulatum* (ALCORN; YEAGER, 1938), o fungo *Cunninghamella echinulata* pertence ao filo Mucoromycota, classe Mucoromycetes, ordem Mucorales e família Cunninghamellaceae (NCBI Taxonomy). Esta espécie apresenta reprodução assexuada, além de esporângios hialinos, esféricos, unisporados e agrupados em vesículas globosas localizadas no ápice de esporangióforos simples ou ramificados (WEBSTER; WEBER, 2007). Os esporângios são maiores do que os encontrados em outras espécies deste gênero e apresentam espinhos cobrindo toda a superfície (SHIPTON; LUNN, 1980), compostos principalmente por oxalato de cálcio (Figura 4) (JONES; McHARDY; WILSON, 1976).



Figura 4 Fotomicroscopia de *Cunninghamella echinulata* (BARRON, 2013).

Dentre os papéis ecológicos desempenhados por *C. echinulata*, destacam-se o micoparasitismo exercido sobre o fungo *Rhizopus arrhizus* (WEBSTER; WEBER, 2007) e a capacidade de atuar como bioissorvente para remoção de metais pesados presentes em efluentes como chumbo, cobre e zinco (EL MORSY, 2004). Outro aspecto significativo sobre *C. echinulata* é sua característica de acumulação lipídica, amplamente investigada em estudos anteriores, sabendo-se muito sobre as enzimas lipogênicas produzidas por este microrganismo (CERTIK; MEGOVA; HORENITZKY, 1999; WAN et al., 2009; WAN et al., 2013).

Em relação à importância médica de *C. echinulata*, um único caso de sinusite fúngica invasiva foi relatado em um paciente com leucemia mielóide aguda, onde o fungo apresentou resistência à anfotericina B, antifúngico utilizado no tratamento inicial para mucormicoses (LeBLANC et al., 2013). Devido à presença de um sistema citocromo P450 análogo ao encontrado em seres humanos, *C. echinulata* é considerado um organismo modelo em estudos sobre bioconversão de xenobióticos, sendo amplamente utilizado como modelo microbiano em pesquisas referentes à transformação metabólica de fármacos e outros compostos (FREITAG et al., 1997). A presença deste sistema enzimático permite estudos toxicológicos e farmacológicos adicionais, sendo uma alternativa formidável para investigações sobre o metabolismo de drogas *in vitro* (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

Até o momento, sabe-se que *C. echinulata* é capaz de metabolizar uma ampla variedade de xenobióticos, tais como 3-hidroxi-flavona (MIYAKOSHI; AZAMI; KUZUYAMA, 2010), acronicina (BETTS; WALTERS; ROSAZZA, 1974), ácido corosólico (FENG et al., 2016), ácido fusídico (IBRAHIM et al., 2018), ácido retinóico (HARTMAN et al., 1990), artemisinina (ZHAN et al., 2002), bromexina (DUBE; KUMAR, 2017), diazepam (PAULA et al., 2015), dimetilnortestosterona (SIDDIQUI et al., 2017), diosgenina (DONG et al., 2010), fenazopiridina (FOSTER et al., 1991a), furosemida (OLVERA-VARGAS et al., 2016), isocoronarin D (CHOKCHAISIRI et al., 2019), isosteviol (WONGANAN et al., 2013), lapachol (OTTEN; ROSAZZA, 1981), loratadina (KEERTHANA; VIDYAVATHI, 2018), metoxianfetamina (FOSTER et al., 1992a), N-metilcarbazole (YANG; DAVIS, 1992), nandrolona (BAYDOUN et al., 2014), paracetamol (KUMARI et al., 2009), patchoulol (XU et al., 2016), propranolol (FOSTER et al., 1992b), mexiletina (FREITAG et al., 1997), risperidona (BOCATO et al., 2012), tranilcipromina (FOSTER et al., 1991b), entre outros. Uma vez que não foram encontrados relatos na literatura, a produção de micotoxinas por *C. echinulata* ainda é desconhecida. Assim, *C. echinulata* não apresenta status GRAS (Geralmente reconhecido como seguro) conferido pelo FDA (Food and Drug Administration). Além disso, não foram identificadas enzimas produzidas por este fungo com potencial para aplicação no setor alimentício.

Desta forma, este trabalho buscou ampliar os conhecimentos sobre *C. echinulata* através do *screening* de algumas enzimas de interesse industrial, especialmente  $\beta$ -FFases, focando em estudos de produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicação desta enzima na modificação da sacarose para obtenção de açúcar invertido.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo quantitativo, exploratório e experimental puro. A instabilidade do instrumento de medição e do ambiente experimental foram ameaças eventuais à validade interna do estudo. A população consistiu em todas as proteínas produzidas por *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM e as amostras foram apenas as  $\beta$ -frutofuranosidases produzidas por este fungo. A amostragem é do tipo não-probabilística e a análise dos dados foi feita através da média aritmética de uma distribuição (medida de tendência central) acoplada ao desvio padrão (medida de variabilidade).

### 4.2 Isolamento e identificação do microrganismo

O microrganismo estudado foi o fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM, isolado a partir de uma amostra de solo e serrapilheira coletada em uma cultura de soja 15 dias após inoculação do herbicida glifosato. A plantação, próxima a um fragmento florestal de Mata Atlântica, está localizada no município de Nova Aurora (PR) entre 24° 32' 00" Sul e 53° 15' 10" Oeste com 520 m de altitude em relação ao nível do mar. A linhagem isolada apresenta colônias filamentosas com hifas aéreas abundantes, textura membranosa, anverso marrom e reverso pardo (Figura 5) e está presente na coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel.



Figura 5 Fungo *C. echinulata* PA3S12MM em meio batata dextrose ágar (BDA).

A extração de DNA genômico do fungo foi conduzida através da metodologia de White et al. (1990) seguindo pelo sequenciamento da região não codificadora ITS (Internal Transcrib Spacer) do RNA ribossômico pela técnica de Sanger, realizado pela empresa Helixxa® (Campinas-SP). A determinação da espécie foi realizada comparando-se a sequência obtida com a depositada pelo Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI), utilizando a ferramenta BLAST. A sequência da região ITS1 do fungo *C. echinulata* PA3S12MM está depositada sob o número de acesso MN699284 no GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### **4.3 Manutenção da linhagem e preparo do inóculo**

A manutenção rotineira da cepa foi realizada em tubos de ensaio estéreis contendo meio BDA (Batata dextrose ágar) incubados em estufa bacteriológica à 28 °C por 6 dias. O inóculo foi obtido a partir das culturas em BDA mediante adição de 5 mL de uma solução contendo NaCl 0,8% e Tween 80 0,05%, ressuspendendo os esporos com o auxílio de bastão de vidro estéril. Depois, seguiram-se as diluições necessárias para a contagem de esporos presentes na solução na Câmara de Neubauer. Para o inóculo, padronizou-se uma solução com  $2,4 \times 10^4$  esporos mL<sup>-1</sup>.

#### **4.4 Extração das enzimas extracelulares e intracelulares**

As culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner e papel-filtro, obtendo-se um filtrado livre de células e um micélio. O filtrado foi utilizado para a determinação da atividade enzimática extracelular e nos demais experimentos realizados. O micélio foi triturado com 1 volume de areia (tratada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>) em gral de porcelana, mantido em gelo até obtenção de uma massa homogênea. O triturado foi ressuspenso em 6 mL de água milli-Q gelada, sendo centrifugado a 4000 rpm por 10 min à 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de enzimas intracelulares nos testes de *screening* enzimático.

#### **4.5 Determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas**

A atividade enzimática foi determinada através da reação com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959). Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de produto formado por minuto nas condições de ensaio. A quantificação de proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

#### 4.6 Screening enzimático

Buscando ampliar os conhecimentos sobre *C. echinulata*, foi realizado o *screening* de 11 enzimas de interesse biotecnológico produzidas por este fungo. Os extratos intra e extracelulares foram obtidos através do inóculo em meio Czapek (WISEMAN, 1975) suplementado com 1% das fontes de carbono: bagaço de cana, casca de maçã, cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), pupa (*Spodoptera frugiperda*) e sabugo de milho.

Os cultivos foram incubados em estufa do tipo BOD à 28 °C por 144 h. Após o tempo determinado, as culturas foram filtradas e assim obtidos os extratos intra e extracelulares. Estes foram dialisados contra água deionizada por aproximadamente 12 h à 4 °C. As enzimas analisadas, seus respectivos substratos, condições de reação e curvas de calibração estão resumidos na Tabela 2. Todas as reações foram conduzidas à 40 °C.

Tabela 2 *Screening* enzimático realizado com os extratos extra e intracelular obtidos a partir do cultivo de *C. echinulata*.

Enzima	Substrato	Condições da Reação	Método
<i>Enzimas do complexo celulolítico</i>			
Avicelase	Avicel® 1%	Tempo de reação: 0, 30, 60 min	Miller (1959)
CMCase	CMC 1%	Tampão: acetato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> pH 5,0	
FPase	Papel-filtro 1%	Curva padrão: glicose 2 mg mL <sup>-1</sup>	
β-Glicosidase	p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo 0,06%	Tempo de reação: 60 min Tampão: acetato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> pH 5,0 Curva padrão: p-nitrofenol 1 mmol L <sup>-1</sup>	Tan et al. (1987)
<i>Enzimas do complexo xilanolítico</i>			
Xilanase	Xilano de beechwood 1%	Tempo de reação: 0, 5, 10 min Tampão: acetato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> pH 5,0 Curva padrão: xilose 2 mg mL <sup>-1</sup>	Miller (1959)
β-Xilosidase	p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo 0,05%	Tempo de reação: 60 min Tampão: acetato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> pH 5,0 Curva padrão: p-nitrofenol 1 mmol L <sup>-1</sup>	Tan et al. (1987)
β-FFase	Sacarose 0,2 mol L <sup>-1</sup>	Tempo de reação: 0, 5, 10 min Tampão: acetato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> pH 5,0 Curva padrão: glicose 2 mg mL <sup>-1</sup>	Miller (1959)
Amilase	Amido 1%	Tempo de reação: 0, 5, 10 min Tampão: acetato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> pH 5,0 Curva padrão: glicose 2 mg mL <sup>-1</sup>	Miller (1959)
Poligalacturonase	Ácido poligalacturônico 1%	Tempo de reação: 0, 5, 10 min Tampão: acetato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> pH 5,0 Curva padrão: ácido galacturônico 2 mg mL <sup>-1</sup>	Miller (1959)
Protease	Caseína 0,5%	Tempo de reação: 10 min Tampão: fosfato de sódio 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 Curva padrão: tirosina 0,2 mg mL <sup>-1</sup>	Sandhya et al. (2005)
Quitinase	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina 0,05%	Tempo de reação: 60 min Tampão: acetato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> pH 5,0 Curva padrão: p-nitrofenol 1 mmol L <sup>-1</sup>	Yan e Fong (2018)

## 4.7 Otimizações do cultivo

### 4.7.1 Efeito do meio de cultura e curva de produção enzimática

A fim de aumentar a produção  $\beta$ -frutofuranosidásica, o fungo *C. echinulata* foi inoculado em sete meios de cultura com composições distintas, suplementados com 1% de casca de maçã como fonte de carbono. Os cultivos foram incubados em estufa do tipo BOD à 28 °C por 10 dias sob regime estacionário, sendo retiradas alíquotas a cada 24 h para determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas. Os meios testados e suas composições estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 Meios de cultivo avaliados.

Componentes	MEIOS DE CULTIVO						
	Adams	Czapek	Khanna	Klausen	Maller	SR	Vogel
Extrato de levedura	0,2 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,04 g	0,45 g	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g	0,1 g	-	-	0,04 g	-	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 g	0,05 g	-	-	0,05 g	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	0,3 g	-	-	-	-	-
KCl	-	0,05 g	-	-	-	-	-
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	0,001 g	-	-	-	-	-
CaCO <sub>3</sub>	-	-	-	0,1 g	-	-	-
Peptona	-	-	-	0,1 g	-	0,02 g	-
NaCl	-	-	-	0,5 g	-	-	-
Gelatina	-	-	-	0,25 g	-	-	-
Solução de sais Khanna [20x] <sup>#</sup>	-	-	5 mL	-	-	-	-
Solução de sais SR [20x] <sup>*</sup>	-	-	-	-	-	5 mL	-
Solução de sais Vogel [50x] <sup>▲</sup>	-	-	-	-	-	-	2 mL
Solução de biotina <sup>*</sup>	-	-	-	-	-	-	20 $\mu$ L
Água destilada q.s.p.	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Referências	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]

<sup>#</sup>Solução de sais de Khanna [20x]: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,3 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,362 g; KCl 0,098 g; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,007 g; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,0138 g; Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,0066 g; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,0062 g; água destilada q.s.p. 100 mL.

<sup>\*</sup>Solução de sais SR [20x]: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,24 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g; NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g; água destilada q.s.p. 100 mL.

<sup>▲</sup>Solução de sais de Vogel [50x]: Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O 15 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 g; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 10 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,5 g; CHCl<sub>3</sub> 0,5 mL; Solução de traços de elementos\* 0,5 mL; água destilada q.s.p. 100 mL;

<sup>\*</sup>Solução de traços de elementos: C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O 5 g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5 g; Fe<sub>2</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 g; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,25 g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,05 g; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,05 g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,05 g; CHCl<sub>3</sub> 1 mL.

<sup>\*</sup>Solução de biotina: Biotina 0,05 g; Etanol 50% 100 mL.

<sup>1</sup>Adams (1990); <sup>2</sup>Wiseman (1975); <sup>3</sup>Khanna, Sundari e Kumar (1995); <sup>4</sup>Peralta, Terenzi e Jorge (1990); <sup>5</sup>Maller et al. (2013);

<sup>6</sup>Rizzatti et al. (2001); <sup>7</sup>Vogel (1964).

### 4.7.2 Delineamento composto central rotacional

O delineamento composto central rotacional (DCCR) e metodologia de superfície de resposta (MSR) foram empregados para otimizar a produção de  $\beta$ -FFase por *C. echinulata*. Os fatores selecionados foram tempo de cultivo, temperatura e concentração da fonte de carbono. Os níveis das variáveis independentes foram definidos de acordo com o DCCR e um conjunto de 17 experimentos foi realizado, incluindo três repetições do ponto central.

A resposta para as variáveis, onde Y representa a atividade da  $\beta$ -FFase, pode ser aproximada pela equação polinomial:

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2$$

Onde  $\beta_0$  é o intercepto;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  são os coeficientes de primeira ordem do modelo;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  e  $\beta_{23}$  são os coeficientes de interação; e  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{33}$  são os coeficientes de segunda ordem do modelo.

O teste t de Student foi usado para verificar a significância estatística dos coeficientes de regressão e o programa Statistica 7.0 foi utilizado para analisar os dados experimentais.

#### **4.8 Temperatura e pH de melhor atividade para a $\beta$ -FFase presente no extrato bruto**

A influência do pH na atividade enzimática foi verificada solubilizando o substrato da reação (sacarose 0,2 mol L<sup>-1</sup>) em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (McILVAINE, 1921), variando o pH entre 3,0 e 8,0, seguido pela dosagem de açúcares redutores. O efeito da temperatura na atividade enzimática foi investigado através da dosagem em diferentes temperaturas, que variaram de 10 a 80 °C. O substrato da reação foi solubilizado em tampão citrato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> no pH de melhor atividade para a  $\beta$ -FFase presente no extrato bruto.

#### **4.9 Purificação da $\beta$ -FFase através de colunas cromatográficas**

O extrato enzimático dialisado foi equilibrado com tampão tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,2 e aplicado na coluna de troca iônica DEAE-Sephadex. Após lavagem da coluna com o mesmo tampão, as proteínas carregadas negativamente foram eluídas com um gradiente de 0-1 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. Foram coletadas frações de 5 mL, seguido pela dosagem de atividade enzimática e proteínas. As frações que apresentaram alta atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica foram reunidas e a nova amostra foi dialisada, liofilizada e aplicada na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 HR, previamente equilibrada com tampão citrato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,0. Frações de 2 mL foram coletadas, sendo determinadas a atividade enzimática e conteúdo de proteínas. As frações que apresentaram alta atividade foram reunidas e a nova amostra foi dialisada, liofilizada e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida. Todas as etapas de purificação foram conduzidas à 4 °C.

## **4.10 Caracterização bioquímica da $\beta$ -FFase purificada**

### **4.10.1 Análise da pureza e zimograma**

Para verificar a massa molecular da enzima purificada, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) descrita por Laemmli (1970) utilizando um gel de empilhamento à 6% e de resolução à 10%. A eletroforese foi desenvolvida em temperatura ambiente sob tensão de 120 V e uma corrente elétrica de 20 mA. O marcador de peso molecular utilizado foi o PageRuler Plus Prestained da Thermo Scientific™ de 10 a 250 kDa. Após a corrida, o gel foi revelado com Coomassie Brilliant Blue G-250.

A atividade enzimática foi verificada através da metodologia descrita por Rehm, Willmitzer e Heyer (1998) utilizando o mesmo gel, mas a amostra não foi submetida à fervura antes da eletroforese. Após a corrida, o gel foi incubado por 30 min com triton X-100 0,5% em temperatura ambiente, seguindo pela lavagem com água destilada. Em seguida, o gel foi incubado com uma solução de sacarose 0,3 mol L<sup>-1</sup> em tampão citrato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 5,0 à 60 °C por 30 min, seguindo pela coloração com cloreto de trifetil tetrazólio 1% dissolvido em NaOH 0,25 mol L<sup>-1</sup> aquecido a 100 °C. A reação foi interrompida com ácido acético 5%.

### **4.10.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática**

A temperatura ótima da  $\beta$ -FFase foi investigada através da dosagem da atividade enzimática em diferentes temperaturas, que variaram de 30 a 70 °C. A estabilidade térmica foi determinada pela incubação da enzima sem substrato à 50, 60 e 70 °C por no máximo 120 min, seguindo pela dosagem da atividade na temperatura ótima da enzima empregando a metodologia descrita por Miller (1959).

### **4.10.3 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática**

A influência do pH na atividade enzimática foi verificada solubilizando o substrato da reação (sacarose 0,2 mol L<sup>-1</sup>) em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (McILVAINE, 1921), variando o pH entre 4,0 e 8,0, seguido pela dosagem descrita por Miller (1959). A estabilidade ao pH foi investigada mediante incubação da enzima purificada na ausência de substrato em três diferentes tampões à 4 °C por 24 h, seguindo pela dosagem de açúcares redutores na temperatura e pH ótimos da enzima. Os tampões utilizados foram: citrato-fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0), tris-HCl 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0 e 9,0) e glicina-NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup> (9,0 e 10,0). A atividade enzimática foi determinada pela metodologia de Miller (1959).

#### 4.10.4 Especificidade ao substrato

A especificidade da enzima purificada ao substrato foi conduzida pela incubação da  $\beta$ -FFase com 1% de cada substrato (ácido poligalacturônico, amido, carboximetilcelulose, pectina cítrica, rafinose, trealose e xilano de beechwood), além do controle (sacarose  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão citrato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 por 10 min à  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . A atividade enzimática foi determinada pelo método de Miller (1959). Para o cálculo da atividade relativa de outros substratos, a sacarose foi usada como controle (100%) pois apresentou maior atividade enzimática.

#### 4.10.5 Efeito de íons e outros compostos na atividade da $\beta$ -FFase

Para avaliar o efeito de diferentes compostos sobre a atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica, soluções de  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{PbCl}_2$ ,  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ , DTT e EDTA foram adicionadas ao substrato (sacarose  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0) de modo que se obtivesse misturas reacionais com concentrações finais de 1 e  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os ensaios enzimáticos foram realizados nas condições ótimas de atividade.

#### 4.10.6 Efeito do composto tiol DTT na $\beta$ -FFase inibida por íons metálicos

O efeito protetor do composto tiol DTT na  $\beta$ -FFase inibida por íons metálicos foi verificado de acordo com a metodologia descrita por Heinen et al. (2014). Neste experimento, a enzima foi pré-incubada à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  com o DTT ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 15 min antes da adição dos íons que inibiram fortemente a atividade enzimática. Em seguida, a atividade enzimática foi realizada nas condições ótimas de reação. Os controles consistiram na reação sem os íons metálicos (controle positivo) e na presença dos íons inibidores (controle negativo).

#### 4.10.7 Determinação dos parâmetros cinéticos

As equações de Michaelis-Menten foram usadas para determinar o  $K_m$  e  $V_{\text{máx}}$  da enzima, além do cálculo do  $K_{\text{cat}}$ . O efeito da concentração de substrato na atividade da  $\beta$ -FFase foi conduzido usando sacarose como substrato em várias concentrações ( $0$ - $500 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Os ensaios enzimáticos foram realizados nas condições ótimas de atividade e os dados foram calculados utilizando o programa Enzyplot (LEONE; BARANAUSKAS; CIANCAGLINI, 1995).

#### 4.10.8 Conteúdo de carboidratos

O conteúdo de carboidratos da  $\beta$ -FFase foi estimado através do método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956), utilizando glicose como padrão. A enzima purificada foi diluída em água (q.s.p. 400  $\mu$ L) seguindo pela adição de 10  $\mu$ L de fenol 80% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso em banho de gelo por 10 min. Após este período, a reação foi agitada e incubada em banho-maria à 30 °C por 15 min, sendo feita a leitura em espectrofotômetro à 490 nm.

#### 4.10.9 Análise dos produtos de hidrólise e transfrutoseilação por CCD

Os produtos de hidrólise da sacarose e a produção de frutooligossacarídeos (FOS) foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) após a incubação da  $\beta$ -FFase com sacarose 50% em tampão citrato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,0 durante 15 h à 50 °C. Após o período determinado, a amostra foi fervida à 100 °C por 3 min para interrupção da hidrólise e submetidas à análise por CCD. A fase móvel foi constituída de isopropanol, acetato de etila e água destilada (9:7:4) e os produtos foram revelados por orcinol 0,2% em solução de ácido sulfúrico: metanol (1:9), seguindo pela incubação da placa em estufa a 100 °C até o aparecimento das bandas referentes à hidrólise. Os padrões utilizados foram os monossacarídeos frutose e glicose (1 mg mL<sup>-1</sup>), os frutooligossacarídeos de cadeia curta kestose e nistose (1,6 mg mL<sup>-1</sup>) e sacarose 50%.

#### 4.11 Imobilização do extrato bruto de *C. echinulata*

A imobilização do extrato bruto enzimático foi conduzida empregando-se o método de retenção física em matriz de alginato de cálcio descrito por Mouelhi et al. (2014). O alginato é um polímero extraído principalmente de algas marinhas pardas (filo Ochrophyta, classe Phaeophyceae, ordem Laminariales) (PETEIRO, 2018) e é composto por subunidades monoméricas dos ácidos  $\beta$ -D-manurônico e  $\alpha$ -L-gulurônico, formando cadeias lineares solúveis em água (SOUZA; PERALTA-ZAMORA; ZAWADZKI, 2008). Na presença de cátions bivalentes como o cálcio, as cadeias lineares são ligadas em blocos, formando uma estrutura tridimensional gelatinosa que aprisiona moléculas (Figura 6) (ORTIZ, 2017).

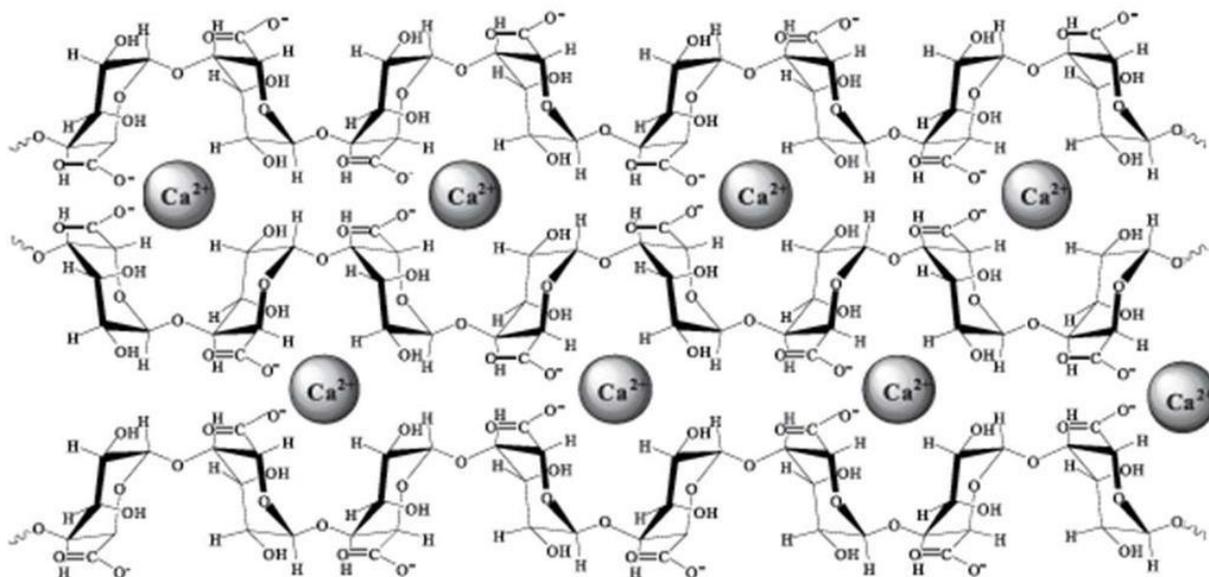


Figura 6 Representação esquemática da ligação entre as cadeias lineares de alginato unidas através dos íons cálcio. Adaptado de Kawaguti e Sato (2008).

O processo de imobilização foi conduzido à 4 °C sob agitação magnética constante e consistiu no gotejamento de uma solução contendo 500 µL de alginato de sódio e 500 µL de extrato bruto em 10 mL de solução de cloreto de cálcio. Após total adição da solução, a agitação prosseguiu por 5 min e em seguida repouso por mais 5 min. Após o tempo determinado, a solução de cloreto de cálcio foi removida e as esferas formadas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,0 e armazenadas à 4 °C no mesmo tampão. O controle do processo consistiu no ensaio de imobilização sem o extrato enzimático.

#### 4.11.1 Otimização da concentração dos componentes para a imobilização

Inicialmente foi realizada a avaliação da concentração de alginato de sódio e cloreto de cálcio na integridade estrutural das esferas. Ambas as soluções foram preparadas em água milli-Q sendo avaliadas as seguintes concentrações: alginato de sódio (1 e 2%) e cloreto de cálcio (100, 200, 300 e 400 mmol L<sup>-1</sup>), totalizando 8 imobilizações experimentais.

#### 4.11.2 Determinação da atividade enzimática dos derivados imobilizados

A determinação da atividade enzimática foi realizada através da metodologia de açúcares redutores descrita por Miller (1959). Inicialmente foi removido o tampão e o volume total de esferas foi ressuspensão em 1 mL de substrato (sacarose

0,2 mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,0) e incubado à 60 °C por 10 min. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 20 µL e adicionadas em tubos contendo 80 µL de tampão e 100 µL de DNS, a mistura foi fervida, esfriada e em seguida lida à 540 nm em espectrofotômetro.

#### **4.11.3 Determinação dos parâmetros de imobilização**

O rendimento da imobilização (%) foi calculado com base na diferença entre a quantidade de proteína oferecida e a quantidade de proteína presente no meio reacional após o processo de imobilização. A atividade recuperada (%) foi determinada pela relação entre a atividade do derivado e a atividade oferecida no início da imobilização.

#### **4.11.4 Eficiência do derivado imobilizado em relação ao número de usos**

Uma vez determinadas as melhores concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio para a imobilização enzimática, foi verificada a reusabilidade das esferas, que consistiu em ciclos de dosagem até a queda da atividade enzimática. Ao final de cada ciclo, as esferas foram lavadas cinco vezes com tampão fosfato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,0 para remoção do substrato.

Por fim, uma nova imobilização foi realizada, aumentando 20 vezes o volume de cada um dos componentes para verificar o potencial de hidrólise da sacarose pela β-FFase presente no extrato bruto imobilizado.

#### **4.12 Hidrólise da sacarose pelo derivado imobilizado em reator tipo leito fixo**

O teste para verificar o potencial de inversão da sacarose pela β-FFase presente no extrato bruto imobilizado foi conduzido segundo a metodologia descrita por Upadhyay e Verma (2014) com modificações. O reator tipo leito fixo utilizado consistiu em uma coluna de vidro com volume total de 31 mL, 10 cm de altura e 2 cm de diâmetro e era dotado de uma camisa externa onde circulava água proveniente de um banho termostático, mantendo a temperatura interna constante à 60 °C.

O derivado imobilizado foi empacotado no reator ocupando um volume de 19 mL. A fase fluida consistiu em uma solução de sacarose 50% em tampão fosfato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,0 e foi adicionada com método de fluxo descendente. Foram avaliados diferentes fluxos de escoamento (0,5; 1; 2 e 3 mL min<sup>-1</sup>) e as frações coletadas foram reacionadas com DNS (MILLER, 1959) para quantificar a presença de açúcar redutor (glicose e frutose) a partir da hidrólise de sacarose.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 *Screening* enzimático

A partir dos extratos extra e intracelulares, verificou-se que o fungo *C. echinulata* produz quantidades significativas de duas enzimas de interesse biotecnológico. Foram verificados valores consideráveis de atividade poligalacturonásica nos extratos extra e intracelulares obtidos a partir do cultivo com bagaço de cana, com valores de 20,80 e 16,06 U mL<sup>-1</sup> respectivamente (Tabela 4). A enzima mais produzida por este fungo foi a  $\beta$ -FFase, sendo encontradas 133,65 e 194,31 U mL<sup>-1</sup> nos extratos extra e intracelular, respectivamente, ambos obtidos a partir do cultivo com casca de maçã.

Tabela 4 *Screening* das enzimas produzidas por *C. echinulata* PA3S12MM.

Enzima	Extrato	Fonte de carbono de melhor indução	Atividade enzimática (U mL <sup>-1</sup> )	
Avicelase	Extracelular	Casquinho	1,04	± 0,05
	Intracelular		0,66	± 0,00
CMCase	Extracelular	Casquinho	0,02	± 0,00
	Intracelular	Pupa	0,09	± 0,03
FPase	Extracelular	Casquinho/Pupa	0,03	± 0,00
	Intracelular	Sabugo de milho	0,10	± 0,01
$\beta$ -glicosidase	Extracelular	Casca de maçã	2,75	± 0,07
	Intracelular	Bagaço de cana	1,53	± 0,14
Xilanase	Extracelular	Bagaço de cana	0,99	± 0,06
	Intracelular		1,29	± 0,36
$\beta$ -xilosidase	Extracelular	Casquinho	0,24	± 0,01
	Intracelular	Bagaço de cana	0,18	± 0,08
$\beta$ -FFase	Extracelular	Casca de maçã	133,65	± 1,34
	Intracelular		194,31	± 0,00
Amilase	Extracelular	Casca de maçã	1,99	± 0,40
	Intracelular		2,37	± 0,28
Poligalacturonase	Extracelular	Bagaço de cana	20,80	± 0,20
	Intracelular		16,06	± 1,86
Protease	Extracelular	Sabugo de milho	0,40	± 0,02
	Intracelular	Casca de maçã/Casquinho	0,14	± 0,00
Quitinase	Extracelular	Casquinho	1,08	± 0,00
	Intracelular	Casca de maçã	1,32	± 0,01

O *screening* de fungos filamentosos se mostra uma ferramenta simples e eficiente, pois permite a descoberta de diferentes enzimas com relevantes aplicações no setor industrial, além de ampliar os conhecimentos sobre a bioquímica de microrganismos selvagens pouco estudados. Uma vez que não haviam relatos na literatura para  $\beta$ -FFase produzida por este fungo, optou-se pelo estudo mais aprofundado desta enzima.

## 5.2 Efeito do meio de cultura e curva de produção enzimática

Os ensaios referentes à influência do meio de cultura em relação ao tempo de incubação indicaram que, quando cultivado em meio Vogel, houve um aumento progressivo entre a atividade enzimática e o tempo, alcançando  $211,6 \text{ U mL}^{-1}$  em 10 dias de cultivo à  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  e em regime estacionário (Figura 7). Dentre os meios de cultura avaliados, o meio Vogel é considerado o mais complexo, uma vez que apresenta uma maior variedade de sais que os demais, indicando que determinados íons podem estar atuando como cofatores, aumentando a atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica. Nascimento et al. (2019) buscando aumentar a produção de invertases por *A. carbonarius*, verificaram que a atividade enzimática máxima neste meio de cultura ocorreu com 96 h de cultivo, chegando a  $12,52 \text{ U mL}^{-1}$  quando cultivado à  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação orbital de 180 rpm.

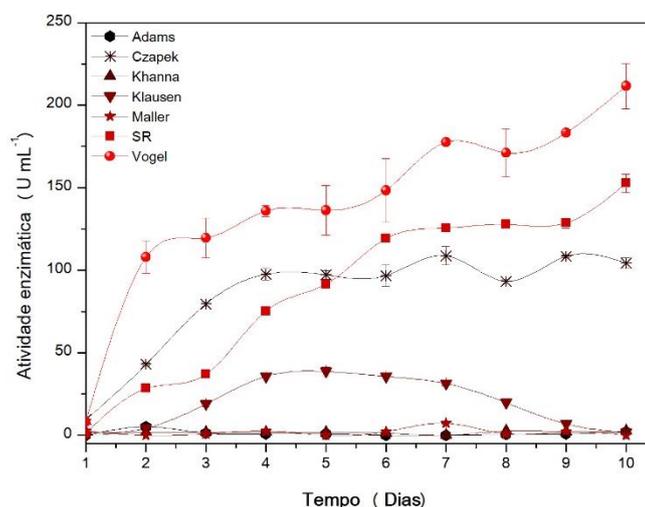


Figura 7 Influência de diferentes meios de cultura em função do tempo de cultivo na produção de  $\beta$ -FFase.

## 5.3 Temperatura e pH de melhor atividade para a $\beta$ -FFase presente no extrato bruto

Os resultados do efeito do pH na atividade da  $\beta$ -FFase presente no extrato bruto indicaram que a atividade máxima ( $451,2 \text{ U mL}^{-1}$ ) foi encontrada em pH 5,0, quando em ensaios à  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 8a). Em pH 4,0 e 6,0 a enzima apresentou uma queda de mais de 25% de atividade. Resultados similares foram encontrados para as invertases de *A. caespitosus* (ALEGRE et al., 2009), *A. flavus* (UMA et al., 2010), *C. cladosporioides* (UMA et al., 2012) e *A. niger* (OYEDEJI et al., 2017).

Considerando que nas reações anteriores vinha-se utilizando o tampão acetato de sódio, a partir do estudo sobre o efeito do pH utilizando o tampão citrato-fosfato foi observado um aumento de 204% na atividade enzimática (dados não mostrados), quando comparado à reações com o tampão acetato de sódio nas mesmas condições reacionais (pH 5,0 e 40 °C). Esse aumento considerável pode ser explicado pela presença de íons metálicos atuando como inibidores da atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica, uma vez que o citrato de sódio é um agente quelante de íons di e trivalentes (MADSEN et al., 2000). Dessa forma, padronizou-se utilizar o tampão citrato de sódio nos experimentos subsequentes.

Em relação à temperatura, verificou-se que em 60 °C a  $\beta$ -FFase presente no extrato bruto apresentou melhor desempenho catalítico, alcançando 780,6 U mL<sup>-1</sup> (Figura 8b) em tampão citrato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,0. Este resultado foi maior que o reportado para as invertases de *C. herbarum* (20 °C) (TASKIN et al., 2016), *Saccharomyces cerevisiae* (40 °C) (BHALLA et al., 2017) e *A. tamaritii* (50 °C) (OLIVEIRA et al., 2019).

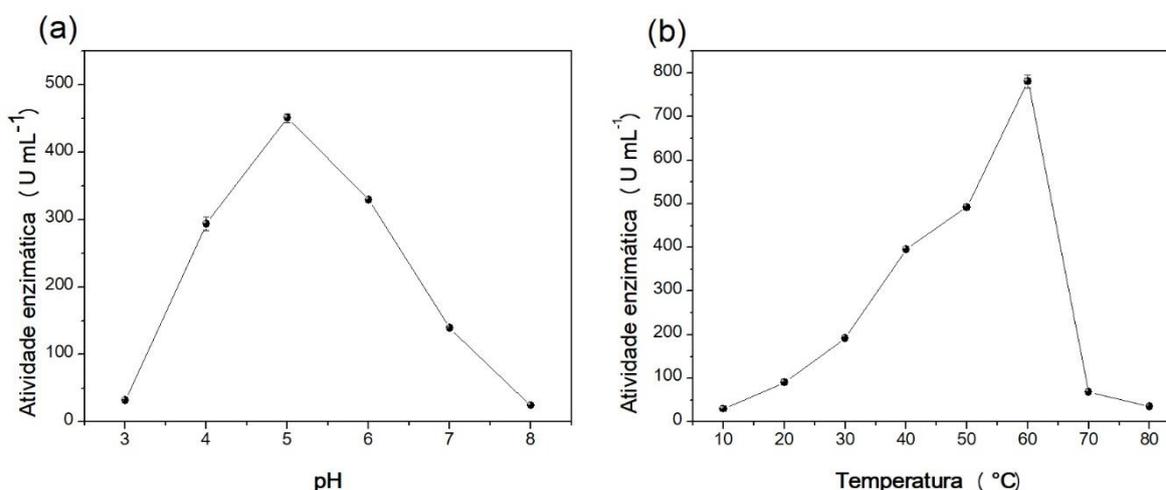


Figura 8 pH e temperatura de melhor atividade para a  $\beta$ -FFase presente no extrato bruto. (a) pH de melhor atividade (b) Temperatura de melhor atividade.

#### 5.4 Delineamento composto central rotacional

De acordo com o DCCR, os melhores resultados para a produção de  $\beta$ -FFase correspondem aos encontrados nos ensaios 15-17, onde o fungo foi cultivado durante 8 dias, à 28 °C e suplementado com 1% de casca de maçã (Tabela 5). Por outro lado, o ensaio 11 mostra que quando cultivado em baixa temperatura (16 °C) o fungo apresenta baixa produção enzimática, com valor de 122,06 U mL<sup>-1</sup>.

A equação de regressão obtida após análise da variância (ANOVA) prevê os níveis de  $\beta$ -FFase em função das variáveis tempo, temperatura e fonte de carbono. A produção enzimática pode ser predita pelo modelo codificado com 95% de confiança:

$$Y(\text{U mL}^{-1}) = 937,440 + 73,027 X_1 - 28,507 X_2 - \mathbf{125,873 X_3} - 13,918 X_1 X_2 - 11,924 X_1 X_3 - 82,715 X_2 X_3 - 34,173 X_1^2 - \mathbf{250,336 X_2^2} - \mathbf{197,122 X_3^2}$$

Onde Y é a atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica ( $\text{U mL}^{-1}$ ),  $X_1$  é o tempo de cultivo (dias),  $X_2$  é a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e  $X_3$  é a concentração de fonte de carbono (%). Os valores reais e preditos encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 Condições experimentais do delineamento composto central rotacional.

Ensaio	Variáveis e os seus valores codificados (reais)			Atividade enzimática ( $\text{U mL}^{-1}$ )		
	Tempo (dias)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Fonte de carbono (%)	Valores reais <sup>a</sup>	Valores preditos	Desvio relativo
1	-1 (5)	-1 (21)	-1 (0,5)	597,11	428,61	84,25
2	-1 (5)	-1 (21)	1 (1,5)	361,24	366,14	2,45
3	-1 (5)	1 (35)	-1 (0,5)	622,41	564,86	28,77
4	-1 (5)	1 (35)	1 (1,5)	138,01	171,53	16,76
5	1 (11)	-1 (21)	-1 (0,5)	762,06	626,34	67,86
6	1 (11)	-1 (21)	1 (1,5)	560,82	516,18	22,32
7	1 (11)	1 (35)	-1 (0,5)	814,02	706,92	53,55
8	1 (11)	1 (35)	1 (1,5)	199,59	265,90	33,16
9	-1,68 (3)	0 (28)	0 (1,0)	655,67	717,97	31,15
10	1,68 (13)	0 (28)	0 (1,0)	881,37	963,60	41,11
11	0 (8)	-1,68 (16)	0 (1,0)	122,06	277,32	77,63
12	0 (8)	1,68 (40)	0 (1,0)	192,16	181,43	5,37
13	0 (8)	0 (28)	-1,68 (0,2)	362,06	591,58	114,76
14	0 (8)	0 (28)	1,68 (1,8)	253,20	168,20	42,50
15	0 (8)	0 (28)	0 (1,0)	930,31	937,44	3,57
16	0 (8)	0 (28)	0 (1,0)	851,96	937,44	42,74
17	0 (8)	0 (28)	0 (1,0)	1054,85	937,44	58,70

<sup>a</sup>Cada valor representa a média de três dosagens enzimáticas.

A Tabela 6 ilustra os resultados da ANOVA para o modelo de segunda ordem. O  $F_{\text{cal}}$  (6,37) da regressão foi 1,73 vezes maior que o  $F_{\text{tab}}$  (3,68), indicando que a regressão é significativa. O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 89,12%, isto demonstra que o modelo quadrático consegue explicar 89,12% da variabilidade dos dados experimentais. O modelo quadrático não apresentou falta de ajuste, pois o  $F_{\text{cal}}$  (3,14) foi menor do  $F_{\text{tab}}$  (19,30). Portanto, este modelo é preditivo e estatisticamente significativo em um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6 Tabela ANOVA do modelo de segunda ordem para a produção de  $\beta$ -FFase.

Fonte de variação	Soma dos quadrados SQ	Graus de liberdade GL	Quadrado médio QM	Teste F		R <sup>2</sup>
				F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>	
Regressão	1515445	9	168382,72	6,37	3,68	89,12
Resíduo	185044	7	26434,79			
Falta de ajuste	164107	5	32821,30	3,14	19,30	
Erro puro	20937	2	10468,50			
Total	1700488	16				

Na Figura 9, o gráfico de Pareto ilustra as variáveis que foram significativas e que influenciaram de forma negativa o aumento da produção enzimática: temperatura (quadrático) e fonte de carbono (linear e quadrático), considerado um modelo com 95% de confiança. Desta forma, temperaturas elevadas e altas concentrações de fonte de carbono são inversamente proporcionais ao aumento de atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica.

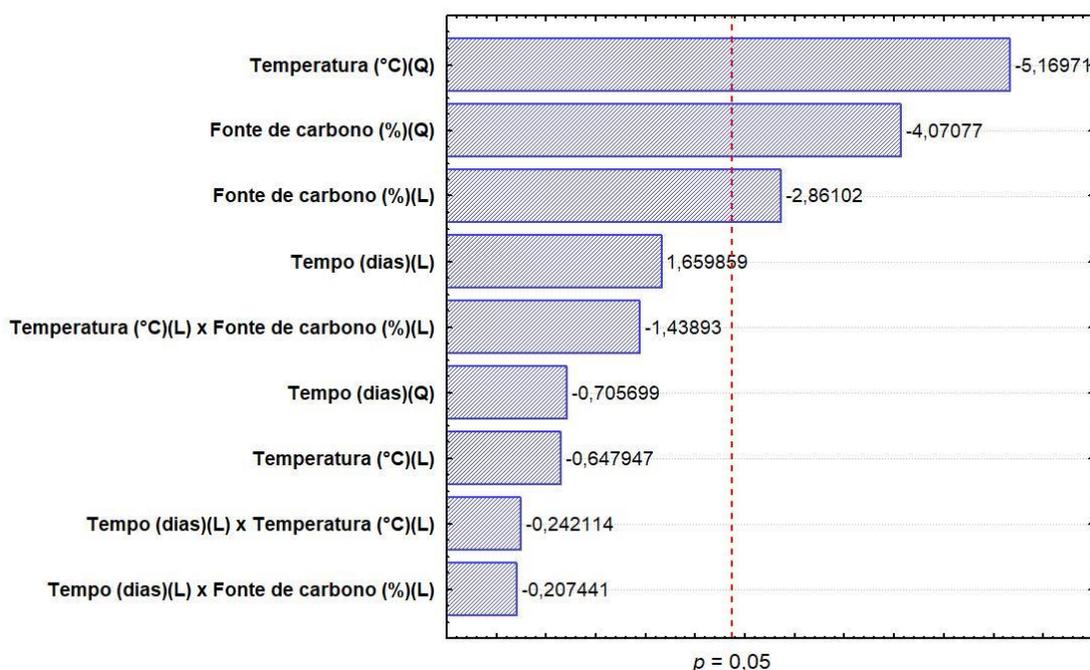


Figura 9 Gráfico de Pareto para os parâmetros estimados do DCCR para a produção de  $\beta$ -FFase.

Os gráficos de superfície de resposta descritos pela equação polinomial de segunda ordem para a produção de  $\beta$ -FFase indicam que os pontos centrais apresentam melhores valores para a produção desta enzima por *C. echinulata* (Figura 10). A partir dos dados obtidos, verificou-se que o resultado é economicamente viável, uma vez que as condições ideais para a produção enzimática consistem em baixas concentrações de fonte de carbono (1%) e temperatura moderada (28 °C).

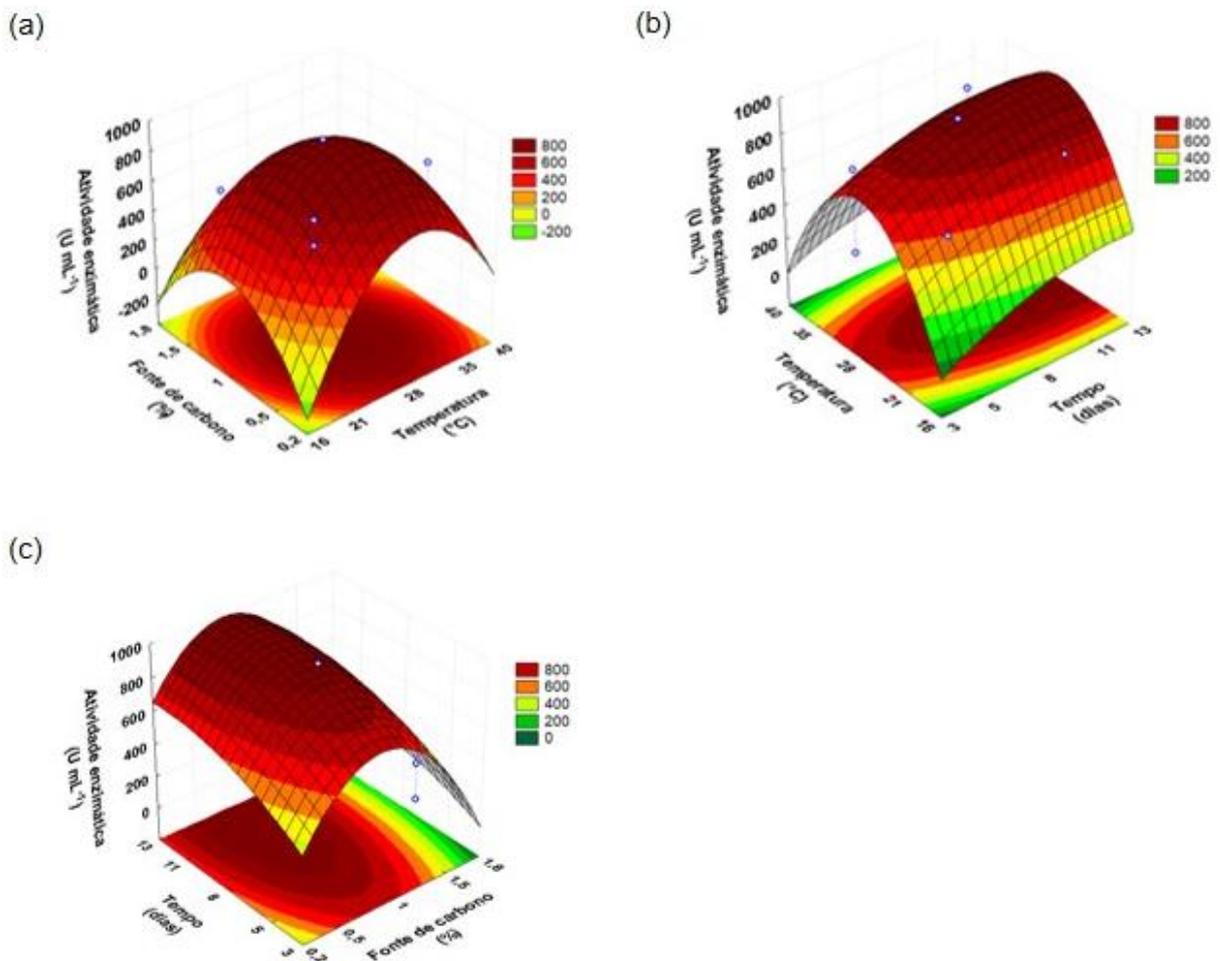


Figura 10 Superfície de resposta para produção de  $\beta$ -FFase (U mL<sup>-1</sup>). (a) Fonte de carbono x Temperatura; (b) Temperatura x Tempo; (c) Tempo x Fonte de carbono.

Após otimização do cultivo, houve um aumento de 35% na produção enzimática (1054,85 U mL<sup>-1</sup>) quando comparado à produção inicial antes da otimização (780,6 U mL<sup>-1</sup>). Em comparação, Dinarvand; Rezaee e Foroughi (2017) utilizando a mesma metodologia, avaliaram o efeito de quatro variáveis sobre a produção de invertase extracelular pela linhagem industrial *A. niger* ATCC 20611, aumentando 60% a produção desta enzima quando comparado a condições não otimizadas.

Em diversos estudos sobre a otimização da produção de invertases são abordadas técnicas de investigação onde é avaliado um fator de cada vez. O emprego desta metodologia nem sempre é eficaz, já que o efeito entre variáveis não é investigado. O uso de métodos estatísticos tem sido cada vez mais abordado para cultivos de fungos para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, uma vez que esta estratégia de otimização aumenta significativamente a produção em relação ao método univariável (GHASEMI et al., 2014).

## 5.5 Purificação da $\beta$ -FFase

Inicialmente, o extrato bruto dialisado foi aplicado na coluna de troca iônica DEAE-Sephadex (Figura 11a), sendo possível identificar dois picos proteicos, indicando que o fungo *C. echinulata* produz duas isoenzimas que hidrolisam sacarose. As frações correspondentes ao pico de atividade enzimática que exibe carga negativa em pH 7,2 ( $\beta$ -FFase II) foram reunidas, a nova amostra foi dialisada, liofilizada e aplicada na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 HR (Figura 11b).

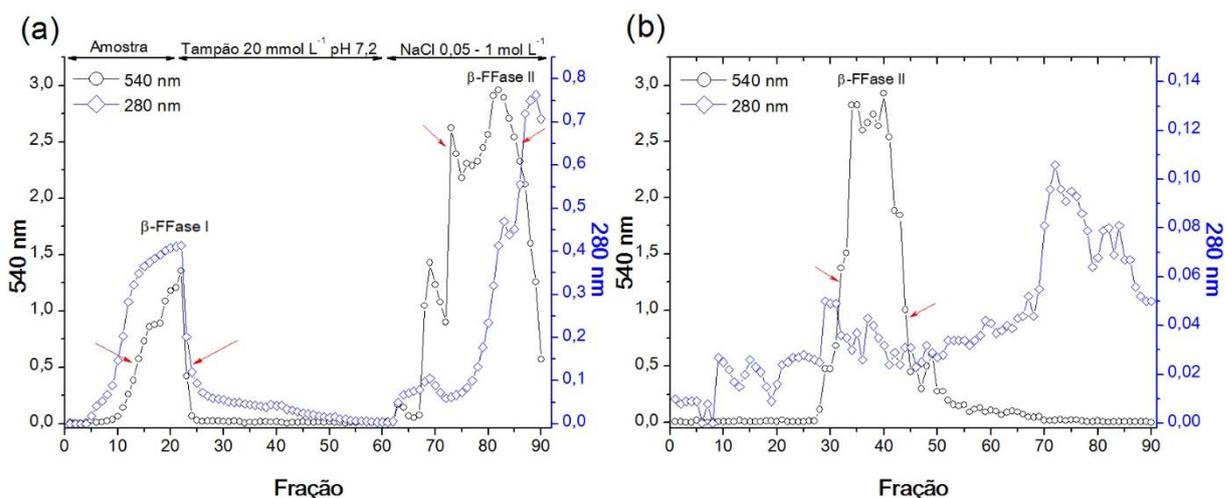


Figura 11 Perfis cromatográficos obtidos após aplicação do extrato bruto dialisado em DEAE-Sephadex (a) e Sephacryl S-100 HR (b).

Os dados referentes as etapas de purificação encontram-se sumarizados na Tabela 7. Ao fim do processo, a enzima foi purificada 5,4 vezes com recuperação de 3,1% e atividade específica de 4516.6 U mg<sup>-1</sup>. De modo similar, a  $\beta$ -FFase de *A. sojae* também foi purificada após dois passos cromatográficos, exibindo o mesmo fator de purificação que a enzima de *C. echinulata* e atividade específica foi de 1886,31 U mg<sup>-1</sup> (LINCORN; MORE, 2018).

Tabela 7 Etapas da purificação da  $\beta$ -FFase II extracelular de *C. echinulata*.

Passos de purificação	Volume (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U mg <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Purificação (fator)
Extrato bruto	100	65309,3	77,3	844,6	100	1,0
DEAE-Sephadex	54	10933,6	7,4	1468,8	16,7	1,7
Sephacryl S-100 HR	19	2033,2	0,5	4516,6	3,1	5,4

A eficiência do processo de purificação foi verificada em SDS-PAGE (Figura 12) onde é possível visualizar uma banda com massa relativa de aproximadamente 89,2 kDa (Figura 13), muito próxima da  $\beta$ -FFase de *A. oryzae*, que é de aproximadamente 100 kDa (XU et al., 2014). A análise do zimograma da enzima purificada ilustra a região de hidrólise da sacarose na altura da enzima, demonstrando a presença de atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica.

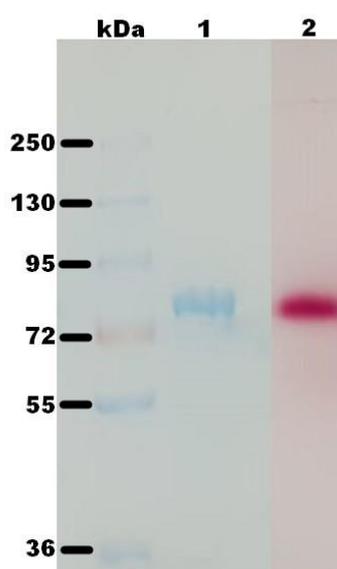


Figura 12 SDS-PAGE e zimograma da  $\beta$ -FFase: (kDa) Marcador de peso molecular; (1)  $\beta$ -FFase II; (2) Detecção da atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica.

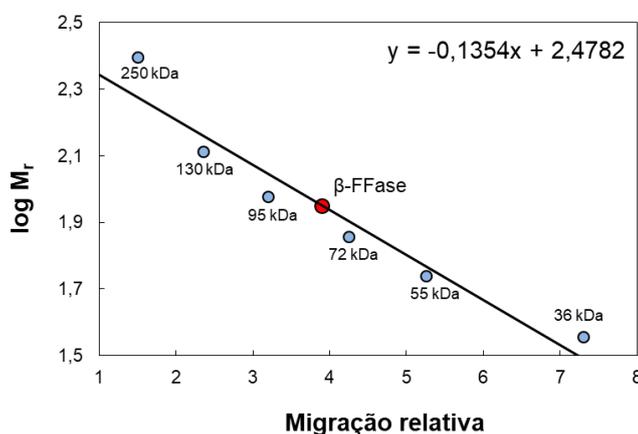


Figura 13 Determinação da massa molecular da  $\beta$ -FFase de *C. echinulata*.

## 5.6 Caracterização bioquímica da $\beta$ -FFase purificada

### 5.6.1 Efeito da temperatura e pH na atividade e estabilidade enzimática

A temperatura ótima para a atividade da  $\beta$ -FFase foi 60 °C (Figura 14a), resultado semelhante ao encontrado para as enzimas de *A. ochraceus* (GUIMARÃES et al., 2007) e *A. terreus* (ALMEIDA et al., 2018). Nos ensaios de estabilidade térmica,

a  $\beta$ -FFase exibiu comportamento similar ao reportado para a invertase de *A. phoenicis* (RUSTIGUEL; JORGE; GUIMARÃES, 2015), entretanto, a enzima de *C. echinulata* manteve aproximadamente 100% de atividade após 30 min, apresentando termoativação a partir dos 45 min de incubação à 50 °C (Figura 14b).

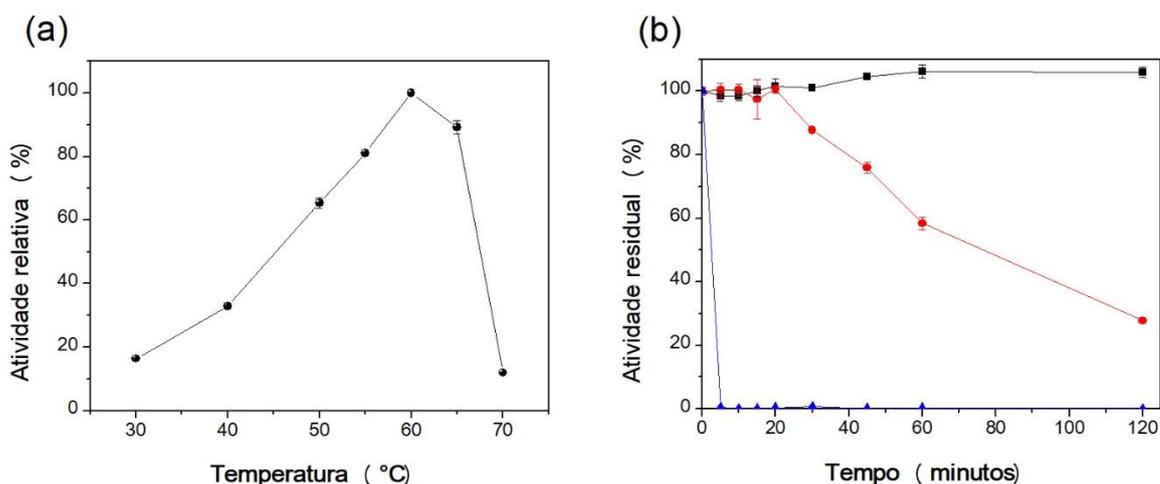


Figura 14 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da  $\beta$ -FFase: (a) Temperatura ótima. (b) Estabilidade térmica (■) 50 °C, (●) 60 °C e (▲) 70 °C.

Os resultados do efeito do pH na reação enzimática indicaram que a enzima apresentou alta atividade em pH 6,0 (Figura 15a), semelhante ao encontrado para a invertase de *A. oryzae* (XU et al., 2014). Em relação à estabilidade da enzima à diferentes faixas de pH, os resultados mostraram que a  $\beta$ -FFase foi estável em pH 6,0 por 24 h, mantendo aproximadamente 73% de atividade (Figura 15b). Em pH 9,0, a enzima manteve 100% de estabilidade após 24 h, quando incubada em tampão glicina-NaOH.

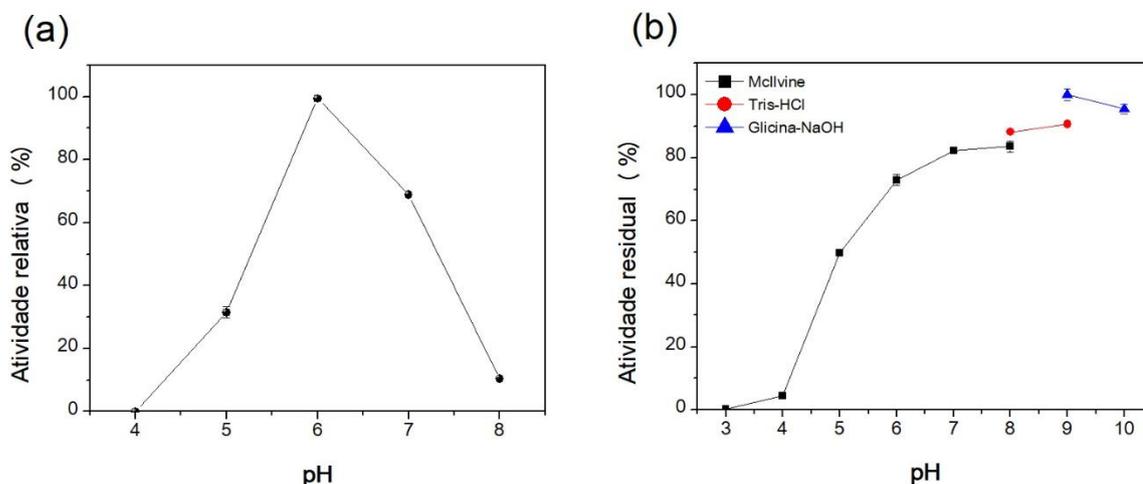


Figura 15 Efeito do pH na atividade da  $\beta$ -FFase: (a) pH ótimo. (b) Estabilidade ao pH.

O caráter levemente ácido associado a estabilidade em pHs neutros/alcalinos, além de ser pouco relatado para invertases microbianas (LINCOLN; MORE, 2018) sugere uma aplicação no desenvolvimento de biosensores enzimáticos. Nos biosensores, a hidrólise da sacarose pela invertase é utilizada como sinal, podendo ser aplicado no monitoramento de metais pesados em ambientes aquáticos (BAGAL-KESTWAL et al., 2008), na quantificação de drogas (XIANG; LU, 2011), além de permitir uma rápida e eficaz determinação da concentração de sacarose em alimentos e bebidas (PARK; RO; KIM, 1991).

### 5.6.2 Especificidade ao substrato

Os resultados de especificidade ao substrato indicaram certa promiscuidade catalítica, uma vez que a  $\beta$ -FFase atuou sobre diferentes tipos de ligações glicosídicas (Tabela 8). Embora a atividade detectada na reação com a rafinose possa ser explicada pela presença da ligação  $\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$ , verificou-se uma atividade considerável na reação com outros substratos, como a pectina, ácido poligalacturônico e trealose, indicando um caráter multifuncional.

Tabela 8 Especificidade ao substrato pela  $\beta$ -FFase de *C. echinulata*.

Substrato	Tipo de ligação	Atividade enzimática (U mL <sup>-1</sup> )	Atividade relativa (%)
Sacarose	Glc( $\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$ )Fru	80,0	100
Pectina cítrica	GalA( $\alpha 1 \rightarrow 4$ )GalA*	13,7	17,1
Trealose	Glc( $\alpha 1 \leftrightarrow 1\alpha$ )Glc	6,7	8,3
Rafinose	Glc( $\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$ )Fru Gal( $\alpha 1 \rightarrow 6$ )Glc	6,3	7,8
Ácido poligalacturônico	GalA( $\alpha 1 \rightarrow 4$ )GalA	4,2	5,3
Amido	Glc( $\alpha 1 \rightarrow 4$ )Glc Glc( $\alpha 1 \rightarrow 6$ )Glc	1,6	2,0
Xilano de beechwood	Xil( $\beta 1 \rightarrow 4$ )Xil GA( $\alpha 1 \rightarrow 2$ )Xil	0,6	0,7
Carboximetilcelulose	Glc( $\beta 1 \rightarrow 4$ )Glc	0,0	0,0

Nota: As atividades relativas foram obtidas considerando a sacarose como 100% por apresentar maior atividade enzimática.

Legenda: Glc (glicose); Fru (frutose); GalA (ácido galacturônico); Gal (galactose); Xil (xilose); GA (ácido glucurônico).

\*Ligações secundárias presentes nos polissacarídeos pécticos: Ramnogalacturonana I ( $\alpha 1 \rightarrow 2$ ) ( $\alpha 1 \rightarrow 3$ ) ( $\alpha 1 \rightarrow 5$ ) ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ); Ramnogalacturonana II ( $\alpha 1 \rightarrow 2$ ) ( $\alpha 1 \rightarrow 3$ ) ( $\alpha 1 \rightarrow 5$ ) ( $\alpha 2 \rightarrow 3$ ) ( $\beta 1 \rightarrow 2$ ) ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) ( $\beta 1 \rightarrow 5$ ) ( $\beta 2 \rightarrow 3$ ); Apiogalacturonana ( $\beta 1 \rightarrow 2$ ) ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ); Xilogalacturonana ( $\beta 1 \rightarrow 2$ ) ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) ( $\beta 2 \rightarrow 1$ ) ( $\beta 4 \rightarrow 1$ ); Galacturonogalacturonana ( $\alpha 1 \rightarrow 2$ ) ( $\alpha 1 \rightarrow 3$ ); Galactogalacturonana ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) ( $\beta 4 \rightarrow 1$ ); Arabinogalacturonana ( $\alpha 1 \rightarrow 3$ ).

A pectina é um ácido poligalacturônico altamente complexo com diversas cadeias laterais. Além da ligação principal ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) que une os inúmeros resíduos de ácido galacturônico, a pectina apresenta cerca de 13 diferentes ligações glicosídicas nos polissacarídeos pécticos que compõem sua estrutura (YAPO; GNAKRI, 2015). Dentre elas, existem resíduos unidos por ligações  $\alpha 1 \rightarrow 2$  e  $\beta 2 \rightarrow 1$ , indicando que a

enzima, além de atuar sobre as ligações presentes em seu substrato nativo (sacarose), também apresentou uma dupla ação catalítica, atuando sobre a ligação  $\alpha 1 \rightarrow 4$ . Essa hipótese de versatilidade enzimática consegue explicar a diferença detectada na reação com a pectina cítrica que foi cerca de 3,3 vezes maior que o encontrado com ácido poligalacturônico.

Outro resultado que corroborou com a hipótese de multifuncionalidade é a hidrólise da ligação  $\alpha 1 \leftrightarrow 1\alpha$  presente na trealose. Este dissacarídeo consiste em um açúcar não-redutor formado por duas  $\alpha$ -glicoses, apresentando estrutura química similar à da sacarose. A hidrólise deste tipo de ligação por invertases também foi reportada para a enzima de *Candida utilis* (LAHIRI et al., 2012).

### 5.6.3 Influência de diferentes compostos na atividade da $\beta$ -FFase

O efeito de diferentes compostos sobre a atividade enzimática nas condições ótimas de reação está apresentado na Tabela 9. Os resultados obtidos indicaram um aumento considerável de mais de 88 e 76% na atividade na presença de  $MnCl_2$  e DTT à  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. Na concentração de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , o agente redutor DTT proporcionou um aumento de mais de 130% de atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica. Os compostos que inibiram fortemente a atividade foram os íons metálicos  $CuSO_4$ , e  $ZnSO_4$  na concentração de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Tabela 9 Efeito de diferentes compostos na atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica.

Composto	Atividade relativa (%)					
	$1 \text{ mmol L}^{-1}$			$10 \text{ mmol L}^{-1}$		
Controle			100,0			100,0
$Al_2(SO_4)_3$	88,3	±	0,62	13,4	±	0,62
$BaCl_2$	86,2	±	0,21	75,3	±	1,24
$CaCl_2$	77,6	±	1,44	66,5	±	0,21
$CoCl_2$	123,1	±	1,65	96,1	±	1,44
$CuSO_4$	53,5	±	0,00	3,1	±	0,21
$FeCl_2$	109,1	±	1,24	36,8	±	1,03
KCl	116,7	±	4,32	120,4	±	2,68
$MgCl_2$	128,8	±	1,24	96,1	±	1,85
$MnCl_2$	188,3	±	0,21	163,6	±	4,73
NaCl	103,5	±	0,62	83,1	±	0,82
$NH_4Cl$	141,8	±	3,09	104,9	±	2,88
$PbCl_2$	15,2	±	0,41	98,6	±	0,21
$SnCl_2$	24,3	±	1,65	27,4	±	2,26
$ZnSO_4$	70,6	±	1,03	3,9	±	0,62
DTT	176,5	±	4,12	238,7	±	3,70
EDTA	121,0	±	0,41	85,8	±	1,03

O aumento na atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica na presença do íon  $Mn^{2+}$  também foi reportado para as invertases de *A. niveus* (GUIMARÃES et al., 2009), *A. phoenicis* (RUSTIGUEL; JORGE; GUIMARÃES, 2015), *A. ochraceus* (GHOSH; DHAR; SAMANTA, 2001) (GUIMARÃES et al., 2007), *A. terreus* (GIRALDO et al., 2014), *Torulaspota pretoriensis* (ODA; TONOMURA, 1994), *Zygosaccharomyces baillie* (AREZ; ALVES; PAIXÃO, 2014) e *Zymomonas mobilis* (PÉREZ de los SANTOS et al., 2016). Outro composto que aumentou consideravelmente a atividade enzimática foi o agente redutor DTT, assim como para a invertase de *Bifidobacterium lactis* (JANER et al., 2004), indicando uma dependência entre a redução dos resíduos de cisteína e o aumento da atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica. Para a enzima de *Lactobacillus reuteri*, o DTT atuou como um forte inibidor, sugerindo que as pontes dissulfeto são necessárias para a integridade enzimática (GINÉS; MALDONADO; VALDEZ, 2000).

Por outro lado, os íons  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  causaram a redução na atividade, indicando novamente o papel chave de grupos tiol (-SH) da  $\beta$ -FFase de *C. echinulata* para a atividade enzimática. A inibição pode ser explicada pela capacidade do íon  $Cu^{2+}$  de oxidar resíduos de cisteína, tal como o  $Zn^{2+}$  que reage com os grupos tiol (ALMEIDA et al., 2013), levando a uma alteração conformacional da enzima, influenciando a interação do substrato com o sítio catalítico e diminuindo a atividade enzimática. Pérez de los Santos et al. (2016) identificaram o mesmo efeito inibitório dos íons  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  na invertase extracelular de *Z. mobilis*, tanto na enzima nativa quanto na recombinada e expressa em *Pichia pastoris*.

#### **5.6.4 Efeito do composto tiol DTT na $\beta$ -FFase inibida por íons metálicos**

Neste experimento, verificou-se que a  $\beta$ -FFase pré-incubada com o DTT apresentou uma recuperação na atividade catalítica quando comparado com ao controle negativo, onde a enzima foi incubada somente com o íon inibidor (Figura 16). Os resultados indicaram que, uma vez em contato prévio com o composto tiol, houve um aumento de 14,2 e 22,1% nas reações com os íons inibidores  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , respectivamente. De acordo com Heinen et al. (2014) esse efeito protetor pode ser explicado pela interação do composto tiol com a enzima, que leva a uma alteração conformacional, diminuindo a afinidade de ligação do metal pesado pela proteína, resultando na recuperação da atividade catalítica.

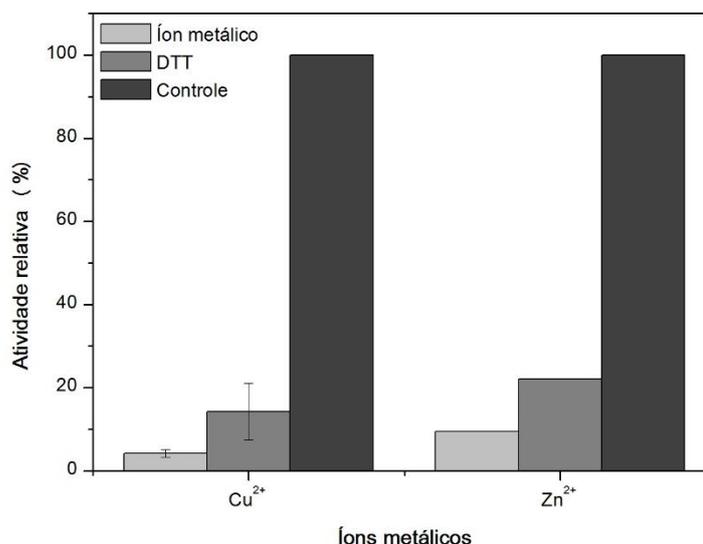


Figura 16 Efeito do composto tiol DTT na  $\beta$ -FFase inibida por íons metálicos.

### 5.6.5 Parâmetros cinéticos da $\beta$ -FFase

O valor da constante de Michaelis ( $K_m$ ) para a degradação de sacarose pela enzima foi de  $173,8 \text{ mmol L}^{-1}$ , muito maior que o encontrado para *A. terreus* ( $K_m = 6,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (ALMEIDA et al., 2018); *A. ochraceus* ( $K_m = 13,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (GUIMARÃES et al., 2007); *A. oryzae* ( $K_m = 37,19 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (XU et al., 2014) e *A. sojae* ( $K_m = 10,17 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (LINCOLN; MORE, 2018). A velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) encontrada foi de  $908,7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , cerca de 2,5 vezes mais alto que da  $\beta$ -FFase de *Candida utilis* ( $V_{\text{máx}} = 355 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) (CHÁVEZ et al., 1997). A constante catalítica ( $K_{\text{cat}}$ ) detectada foi de  $1388,79 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente 3,6 vezes mais elevada que da enzima de *Bifidobacterium longum* ( $K_{\text{cat}} = 383,30 \text{ s}^{-1}$ ) (ÁVILA-FERNÁNDEZ et al., 2016), e o valor da eficiência catalítica ( $K_{\text{cat}} K_m^{-1}$ ) foi de  $7,99 \text{ mmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , indicando que a  $\beta$ -FFase de *C. echinulata* apresenta elevada atividade catalítica.

### 5.6.6 Conteúdo de carboidratos

O conteúdo de carboidratos da  $\beta$ -FFase purificada foi de 83,13%, resultado superior ao encontrado para as invertases de *A. terreus* (11,3%) (GIRALDO et al., 2014), *A. phoenicis* (12,23%) (RUSTIGUEL et al., 2011), *A. niger* (17%) (NGUYEN et al., 2005), *Pycnosporus sanguineus* (24%) (QUIROGA; VATTUONE; SAMPIETRO, 1995), *A. ochraceus* (30%) (GHOSH; DHAR; SAMANTA, 2001) e (41%) (GUIMARÃES et al., 2007), *T. pretoriensis* (50%) (ODA; TONOMURA, 1994), *A. niveus* (53,5%) (GUIMARÃES et al., 2009), *Schizosaccharomyces pombe* (67%) (MORENO; SANCHEZ; RODRIGUEZ, 1990) e *A. sojae* (68,92%) (LINCOLN; MORE, 2018).

### 5.6.7 Análise dos produtos de hidrólise e transfrutossililação

A presença de frutose e glicose (raia 6) indica que a enzima foi eficaz na hidrólise da sacarose, produzindo quantidades equimolares destes produtos (Figura 17). Em relação à transfrutossililação, não foram produzidos frutooligossacarídeos de cadeia curta (kestose e nistose), indicando que a  $\beta$ -FFase não apresenta atividade frutossiltransferase. Esta característica de transferência de resíduos frutossil foi reportada para as invertases fúngicas de *A. niger* (GOOSEN et al., 2007), *A. tamaritii* (OLIVEIRA et al., 2019), *A. terreus* (ALMEIDA et al., 2018), *A. thermomutatus* (TÓDERO; RECHIA; GUIMARÃES, 2019) e *Aureobasidium melanogenum* (AUNG et al., 2019).



Figura 17 Análise dos produtos de hidrólise da sacarose pela  $\beta$ -FFase e verificação de atividade frutossiltransferase. Raias: (1) frutose 1 mg mL<sup>-1</sup>; (2) glicose 1 mg mL<sup>-1</sup>; (3) kestose 1,6 mg mL<sup>-1</sup>; (4) nistose 1,6 mg mL<sup>-1</sup>; (5) sacarose 50%; (6) produtos de hidrólise após 15 h de reação.

## 5.7 Imobilização do extrato bruto de *C. echinulata*

### 5.7.1 Otimização da concentração dos componentes para a imobilização

A partir da avaliação da concentração dos componentes para a imobilização, foi verificado que baixas concentrações de alginato de sódio e elevadas concentrações de cloreto de cálcio conferiram maior resistência estrutural às esferas (Figura 18). Desta forma, para imobilizações posteriores, foram utilizados 1% e 400 mmol L<sup>-1</sup> destes componentes, respectivamente. Esses valores foram diferentes dos descritos para a  $\beta$ -FFase de *S. sclerotiorum*, onde as concentrações ideais de alginato

de sódio e cloreto de cálcio foram 2,5% e 10 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente (MOUELHI et al., 2014).

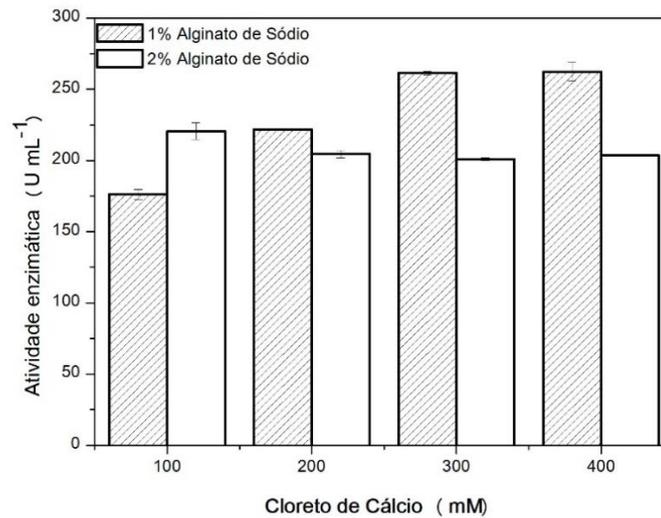


Figura 18 Otimização das concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio.

As esferas resultantes dos processos de imobilização do extrato bruto de *C. echinulata* com as diferentes concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio apresentaram, de modo geral, aspecto uniforme, formato esférico, superfície lisa e diâmetro médio de 2 mm (Figura 19). Em relação aos parâmetros do processo de imobilização, o rendimento de imobilização em relação a 0,358 mg de proteína e 0,005g de matriz de alginato de sódio foi de 97,3%, enquanto que a atividade recuperada foi de 70,3%.

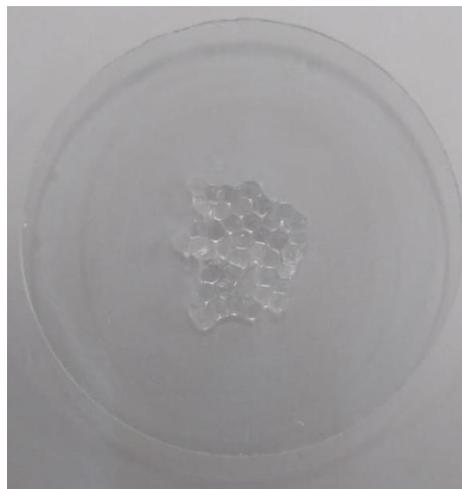


Figura 19 Esferas obtidas a partir da imobilização do extrato bruto de *C. echinulata* em alginato de cálcio.

### 5.7.2 Eficiência do derivado imobilizado em relação ao número de usos

O teste de reusabilidade foi conduzido buscando verificar o número de ciclos de dosagem que a enzima permanece estável, uma vez aprisionada no suporte. Foram conduzidos um total de 6 ciclos de dosagem (Figura 20) e ao segundo ciclo a enzima apresentou meia vida (50% de atividade relativa), indicando que a imobilização do extrato bruto em alginato de cálcio não é ideal, pois a mesma não apresenta estabilidade ao suporte ao longo do tempo. Para a enzima de *S. sclerotiorum*, foi identificada uma estabilidade operacional maior, alcançando seis ciclos de reusabilidade (MOUELHI et al., 2014).

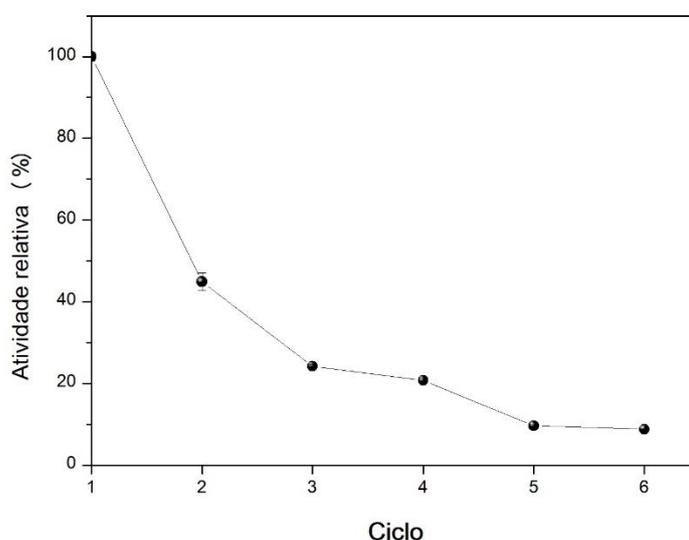


Figura 20 Teste de reusabilidade dos derivados imobilizados.

### 5.8 Hidrólise da sacarose pelo derivado imobilizado em reator tipo leito fixo

Para verificar a aplicação da  $\beta$ -FFase de *C. echinulata* em nível industrial, foi conduzido o teste de hidrólise da sacarose em reator tipo leito fixo para a produção de xarope de açúcar invertido em escala laboratorial. A 60 °C e pH 6,0, as beads levaram cerca de 5 min para começar a hidrolisar a solução de sacarose a 50%, sendo o melhor fluxo de escoamento definido como 0,5 mL min<sup>-1</sup>, onde 15,24  $\mu$ mol de glicose e frutose foram formados por minuto. Cabral et al. (2017) verificaram que o uso deste tipo de reator é eficaz, uma vez que obtiveram 95% de conversão da sacarose em condições otimizadas de produção. De acordo com os resultados obtidos, a enzima imobilizada em alginato de cálcio foi eficiente e relativamente mais rápida na conversão da sacarose em relação à  $\beta$ -FFase comercial imobilizada em gelatina (UPADHYAY; VERMA, 2014).

## 6. CONCLUSÕES

O fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM mostrou-se um excelente produtor de  $\beta$ -frutofuranosidases. A elevada produção enzimática em meio de cultivo suplementado com casca de maçã foi aumentada cerca de 35% após o planejamento estatístico. Esta enzima, após os passos de purificação, apresentou elevada atividade catalítica e estabilidade em pHs alcalinos, além de caráter multifuncional. O derivado imobilizado em alginato de cálcio exibiu bons resultados na conversão da sacarose, mostrando que a  $\beta$ -frutofuranosidase é promissora para aplicações industriais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathologia**, v. 112, n. 1, p. 35–37, 1990.

ALCORN, G. D.; YEAGER, C. C. A Monograph of the Genus *Cunninghamella* with Additional Descriptions of Several Common Species. **Mycologia**, v. 30, n. 6, p. 653-658, 1938.

ALEGRE, A. C. P.; POLIZELI, M. de L. T. de M.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 612-622, 2009.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

ALI, A.; KHAN, M.; SHARIF, R.; MUJTABA, M.; GAO, S. J. Sugarcane Omics: An Update on the Current Status of Research and Crop Improvement. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 344-368, 2019.

ALMEIDA, M. N. de; FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; RAMOS, H. J. de O.; VISSER, E. M.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; REZENDE, S. T. de. Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 413-422, 2013.

ALMEIDA, M. N. de; GUIMARÃES, V. M.; FALKOSKI, D. L.; CAMARGO, B. R. de; FONTES-SANT'ANA, G. C.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; REZENDE, S. T. de. Purification and characterization of an invertase and a transfructosylase from *Aspergillus terreus*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, p. 1-9, 2018.

ALVES, J. N. e O.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of Invertases by Anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and Teleomorphic (*Emericela nidulans*) Fungi under Submerged Fermentation Using Rye Flour as Carbon Source. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 421-429, 2013.

AREZ, B. F.; ALVES, L.; PAIXÃO, S. M. Production and Characterization of a Novel Yeast Extracellular Invertase Activity Towards Improved Dibenzothiophene Biodesulfurization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 6, p. 2048-2057, 2014.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 16–29, 2009.

AUNG, T.; JIANG, H.; LIU, G. L.; CHI, Z.; HU, Z.; CHI, Z. M. Overproduction of a  $\beta$ -fructofuranosidase1 with a high FOS synthesis activity for efficient biosynthesis of fructooligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 988–996, 2019.

ÁVILA-FERNÁNDEZ, Á.; CUEVAS-JUÁREZ, E.; RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M. E.; OLVERA, C.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Functional characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 on

- structurally diverse fructans. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 263-276, 2016.
- AWAD; G. E. A.; AMER, H.; EL-GAMMAL, E. W.; HELMY, W. A.; ESAWY, M. A.; ELNASHAR, M. M. M. Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 740-746, 2013.
- BAGAL-KESTWAL, D.; KARVE, M. S.; KAKADE, B.; PILLAI, V. K. Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ions in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 4, p. 657-664, 2008.
- BARRON, G. **Fungi Image Collection**. Guelph: McLaughlin Library/University of Guelph, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10214/5447>>. Acesso em: 22 jan. 2020.
- BAYDOUN, E.; KARAM, M.; ATIA-TUL-WAHAB; KHAN, M. S. A.; AHMAD, M. S.; SAMREEN; SMITH, C.; ABDEL-MASSIH, R.; CHOUDHARY, M. I. Microbial transformation of nandrolone with *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella blakesleeana* and evaluation of leishmaniacidal activity of transformed products. **Steroids**, v. 88, p. 95-100, 2014.
- BETTS, R. E.; WALTERS, D. E.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations of antitumor compounds. 1. Conversion of acronycine to 9-hydroxyacronycine by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 599-602, 1974.
- BHALLA, T. C.; BANSULI; THAKUR, N.; SAVITRI; THAKUR, N. Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, 178-185, 2017.
- BHATTI, H. N.; ASGHER, M.; ABBAS, A.; NAWAZ, R.; SHEIKH, M. A. Studies on Kinetics and Thermostability of a Novel Acid Invertase from *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4617-4623, 2006.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BOCATO, M. Z.; SIMÕES, R. A.; CALIXTO, L. A.; GAITANI, C. M. de; PUPO, M. T.; OLIVEIRA, A. R. M. de. Solid phase microextraction and LC-MS/MS for the determination of paliperidone after stereoselective fungal biotransformation of risperidone. **Analytica Chimica Acta**, v. 742, p. 80-89, 2012.
- BOSCOLO, M. Sucroquímica: síntese e potencialidades de aplicações de alguns derivados químicos de sacarose. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 906-912, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

CABRAL, B. V.; SANTOS, L. D.; FALLEIROS, L. N. S. S.; CARMO, T. S.; FREITAS, F. F.; CARDOSO, S. L.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on Duolite A-568 employing a packed-bed reactor. **Chemical Engineering Communications**, v. 204, n. 9, p. 1007-1019, 2017.

CARDOSO, T. F.; WATANABE, M. D. B.; SOUZA, A.; CHAGAS, M. F.; CAVALETT, O.; MORAIS, E. R.; NOGUEIRA, L. A. H.; LEAL, M. R. L. V.; BRAUNBECK, O. A.; CORTEZ, L. A. B.; BONOMI, A. A regional approach to determine economic, environmental and social impacts of different sugarcane production systems in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 9-20, 2019.

CERTIK, M.; MEGOVA, J.; HORENITZKY, R. Effect of nitrogen sources on the activities of lipogenic enzymes in oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, p. 289–293, 1999.

CHÁVEZ, F. P.; RODRIGUEZ, L.; DÍAZ, J.; DELGADO, J. M.; CREMATA, J. A. Purification and characterization of an invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 67-74, 1997.

CHEMELLO, E. A Química na Cozinha apresenta: O Açúcar. **Revista Eletrônica ZOOM**, v. 3, n. 4, p. 1-30, 2005. Disponível em: <[www.ciadaescola.com.br/zoom/materia.asp?materia=291](http://www.ciadaescola.com.br/zoom/materia.asp?materia=291)>. Acesso em: 15 maio 2020.

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.

CHEN, J. S.; SAXTON, J.; HEMMING, F. W.; PEBERDY, J. F. Purification and partial characterization of the high and low molecular weight form (S- and F-form) of invertase secreted by *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1296, n. 2, p. 207-218, 1996.

CHOKCHAISIRI, R.; CHAICHOMPOO, W.; SUKCHAROEN, O.; SUKSAMRARN, A.; GANRANOO, L. Microbial transformation of isocoronarin D by *Cunninghamella echinulata* NRRL 1386. **Natural Product Research**, v. 33, n. 20, p. 2890-2896, 2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**: monitoramento agrícola. Brasília, v. 6, n. 3, p. 1-58, 2019. ISSN: 2318-7921.

DAPPER, T. B.; ARFELLI, V. C.; HENN, C.; SIMÕES, M. R.; SANTOS, M. F. dos; DELLA TORRE, C. L.; SILVA, J. L. da C.; SIMÃO, R. de C. G.; KADOWAKI, M. K.  $\beta$ -Fructofuranosidase production by *Aspergillus versicolor* isolated from Atlantic forest and grown on apple pomace. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 25, p. 938-948, 2016.

DINARVAND, M.; REZAEI, M.; FOROUGHI, M. Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 427-441, 2017.

DONG, T.; WU, G. W.; WANG, X. N.; GAO, J. M.; CHEN, J. G.; LEE, S. S. Microbiological transformation of diosgenin by resting cells of filamentous fungus, *Cunninghamella echinulata* CGMCC 3.2716. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3–4, p. 251-256, 2010.

DUAN, K. J.; SHEU, D. C.; CHEN, J. S. Purification and Characterization of  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 11, p. 1811-1815, 1993.

DUBE, A. K.; KUMAR, M. S. Biotransformation of bromhexine by *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata* and *C. blakesleeana*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 259-267, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EL-MORSY, EL-S. M. *Cunninghamella echinulata* a New Biosorbent of Metal Ions from Polluted Water in Egypt. **Mycologia**, v. 96, n. 6, p. 1183-1189, 2004.

FENG, X.; LU, Y. H.; LIU, Z.; LI, D. P.; ZOU, Y. X.; FANG, Y. Q.; CHU, Z. Y. Microbial transformation of the anti-diabetic agent corosolic acid by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, n. 7, p. 645-650, 2016.

FERNANDEZ, R. C.; OTTONI, C. A.; SILVA, E. S. da; MATSUBARA, R. M. S.; CARTER, J. M.; MAGOSSO, L. R.; WADA, M. A. A.; RODRIGUES, M. F. de A.; MAREMA, B. G.; MAIORANO, A. E. Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 87–93, 2007.

FLORES-GALLEGOS, A. C.; CASTILLO-REYES, F.; LAFUENTE, C. B.; LOYOLA-LICEA, J. C.; REYES-VALDÉS, M. H.; AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ HERRERA, R. Invertase production by *Aspergillus* and *Penicillium* and sequencing of an *inv* gene fragment. **Micología Aplicada Internacional**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2012.

FOSTER, B. C.; THOMAS, B. H.; ZAMECNIK, J.; DAWSON, B. A.; WILSON, D. L.; DUHAIME, R.; SOLOMONRAJ, G.; MCGILVERAY, I. J.; LODGE, B. A. Aromatic hydroxylation and sulfation of phenazopyridine by *Cunninghamella echinulata*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 504-508, 1991a.

FOSTER, B. C.; LITSTER, D. L.; ZAMECNIK, J.; COUTTS, R. T. The biotransformation of tranlylcypromine by *Cunninghamella echinulata*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 791-795, 1991b.

FOSTER, B. C.; McLEISH, J.; WILSON, D. L.; WHITEHOUSE, L. W.; ZAMECNIK, J.; LODGE, B. A. Biotransformation of tri-substituted methoxyamphetamines by *Cunninghamella echinulata*. **Xenobiotica**, v. 22, n. 12, p. 1383-1394, 1992a.

FOSTER, B. C.; LITSTER, D. L.; WILSON, D. L.; ORMSBY, E.; DAWSON, B. A. *In vitro* assessment of cytotoxicity and biotransformation of propranolol in *Cunninghamella echinulata*. **Xenobiotica**, v. 22, n. 11, p. 1221-1228, 1992b.

FREITAG, D. G.; FOSTER, R. T.; COUTTS, R. T.; PICKARD, M. A.; PASUTTO, F. M. Stereoselective Metabolism of *rac*-Mexiletine by the fungus *Cunninghamella echinulata* yields the major human metabolites hydroxymethylmexiletine and *p*-hydroxymexiletine. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, n. 6, p. 685-692, 1997.

GHASEMI, Y.; MOHKAM, M.; GHASEMIAN, A.; RASOUL-AMINI, S. Experimental design of medium optimization for invertase production by *Pichia* sp. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 267–275, 2014.

GHOSH, K.; DHAR, A.; SAMANTA, T. B. Purification and characterization of an invertase produced by *Aspergillus ochraceus* TS. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 38, n. 3, p. 180-185, 2001.

GINÉS, S. C. de; MALDONADO, M. C.; VALDEZ, G. F. de. Purification and Characterization of Invertase from *Lactobacillus reuteri* CRL 1100. **Current Microbiology**, v. 40, p. 181–184, 2000.

GIRALDO, M. A.; SILVA, T. M. da; SALVATO, F.; TERENCEI, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Thermostable invertases from *Paecylomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 463–472, 2012.

GIRALDO, M. A.; GONÇALVES, H. B.; FURRIEL, R. dos P. M.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of the co-purified invertase and  $\beta$ -glucosidase of a multifunctional extract from *Aspergillus terreus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1501–1510, 2014.

GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Immobilization of *Fusarium graminearum*  $\beta$ -D-fructofuranosidase using alternative cellulosic supports: Stabilization and production of fructooligosaccharides. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 1429–1435, 2015.

GOOSEN, C.; YUAN, X. L.; van MUNSTER, J. M.; RAM, A. F. J.; van der MAAREL, M. J. E. C.; DIJKHUIZEN, L. Molecular and biochemical characterization of a novel intracellular invertase from *Aspergillus niger* with transfructosylating activity. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 4, p. 674–681, 2007.

GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R. Purificação parcial de invertase a partir de *Rhizopus* sp. em fermentação semi-sólida. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 199-203, 2003.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCEI, H. F.; POLIZELI, M. de L. T. de M.; JORGE, J. A. Production and characterization of a thermostable extracellular  $\beta$ -d-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 1, p. 52-57, 2007.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOMERA, A. F.; TERENCEI, H. F.; POLIZELI, M. de L. T. de M.; JORGE, J. A. Production of  $\beta$ -fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 237–241, 2009.

GUPTA, A. K.; NAGPAL, B.; KAUR, N.; RATHORE, P.; SINGH, R. Properties of Invertase from *Fusarium oxysporum*. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 55, p. 505-512, 1989.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E.  $\beta$ -Fructofuranosidase Production by *Aspergillus* Species From Apple Pomace. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 3, p. 340-342, 1995.

HARTMAN, D. A.; BASIL, J. B.; ROBERTSON, L. W.; CURLEY Jr., R. W. Microbial Biotransformation of Retinoic Acid by *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella blakesleeana*. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 270–273, 1990.

HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K. Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 276-279, 1992.

HEINEN, P. R.; HENN, C.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; SIMÃO, R. de C. G.; SILVA, J. L. da C.; POLIZELI, M. de L. T. de M.; KADOWAKI, M. K. Xylanase from *Fusarium heterosporum*: properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 9, p. 1047-1055, 2014.

HIRABAYASHI, K.; KONDO, N.; TOYOTA, H.; HAYASHI, S. Production of the Functional Trisaccharide 1-Kestose from Cane Sugar Molasses Using *Aspergillus japonicus*  $\beta$ -Fructofuranosidase. **Current Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 145–148, 2017.

IBRAHIM, A. R. S.; ELOKELY, K. M.; FERREIRA, D.; RAGAB, A. E. Microbial Oxidation of the Fusidic Acid Side Chain by *Cunninghamella echinulata*. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 970-981, 2018.

JANER, C.; ROHR, L. M.; PELÁEZ, C.; LALOI, M.; CLEUSIX, V.; REQUENA, T.; MEILE, L. Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 279-285, 2004.

JIANG, H.; MA, Y.; CHI, Z.; LIU, G. L.; CHI, Z. M. Production, Purification, and Gene Cloning of a  $\beta$ -Fructofuranosidase with a High Inulin-hydrolyzing Activity Produced by a Novel Yeast *Aureobasidium* sp. P6 Isolated from a Mangrove Ecosystem. **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 500–510, 2016.

JONES, D.; McHARDY, W. J.; WILSON, M. J. Ultrastructure and chemical composition of spines in Mucorales. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 66, n. 1, p. 153-157, 1976.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 134-143, 2008.

KEERTHANA, M.; VIDYAVATHI, M. Screening and evaluation of fungal resources for loratadine metabolites. **Journal of Biosciences**, v. 43, n. 5, p. 823-833, 2018.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KUMARI, T. R.; VIDYAVATHI, M.; ASHA, S.; PRASAD, K. V. S. R. G. Biotransformation of Paracetamol by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2009.

KURAKAKE, M.; HIROTSU, S.; SHIBATA, M.; TAKENAKA, Y.; KAMIOKA, T.; SAKAMOTO, T. Effects of nonionic surfactants on pellet formation and the production of  $\beta$ -fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. **Food Chemistry**, v. 224, p. 139-143, 2017.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAHIRI, S.; BASU, A.; SENGUPTA, S.; BANERJEE, S.; DUTTA, T.; SOREN, D.; CHATTOPADHYAY, K.; GHOSH, A. K. Purification and characterization of a trehalase–invertase enzyme with dual activity from *Candida utilis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 522, n. 2, p. 90-99, 2012.

LeBLANC, R. E.; MERIDEN, Z.; SUTTON, D. A.; THOMPSON, E. H.; NEOFYTOS, D.; ZHANG, S. X. *Cunninghamella echinulata* causing fatally invasive fungal sinusitis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 4, p. 506-509, 2013.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; CIANCAGLINI, P. ENZYLOT: A microcomputer assisted program for teaching enzyme kinetics. **Biochemical Education**, v. 23, n. 1, p. 35-37, 1995.

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.

LINCOLN, L.; MORE, S. S. Bacterial invertases: Occurrence, production, biochemical characterization, and significance of transfructosylation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 803-813, 2017.

LINCOLN, L.; MORE, S. S. Purification and biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase from *Aspergillus* sp. **3 Biotech**, v. 8, n. 2, p. 86-97, 2018.

LUCCA, A. L.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase from *Aspergillus parasiticus*: Optimization of the production under submerged fermentation and biochemical characterization. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 38, p. 5678-5687, 2013.

MACHADO, F. de B. P. **Brasil, a doce terra – História do setor**. 2003. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/historia\\_da\\_cana\\_000fhc62u4b02wyiv80efhb2attuk4ec.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/historia_da_cana_000fhc62u4b02wyiv80efhb2attuk4ec.pdf)>. Acesso em: 10 mai. 2020.

MADSEN, T.; BOYD, H. B.; NYLÉN, D.; PEDERSEN, A. R.; PETERSEN, G. I.; SIMONSEN, F. **Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products**. Hørsholm: Centre for Integrated Environment and Toxicology, 2000. (Danish Environmental Protection Agency Technical Report, 615).

MADYASTHA, K. M.; GANGULI, A. R.; KUBAIR, V. G.; KOWSER, N.; VIDYA, D. Extracellular invertase from *Aspergillus thecicus*: Isolation and immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 8, p. 555–560, 1987.

MALHOTRA, I.; BASIR, S. F. Immobilization of invertase in calcium alginate and calcium alginate-kappa-carrageenan beads and its application in bioethanol production. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 494-503, 2020.

MALLER, A.; SILVA, T. M. da; DAMÁSIO, A. R. de L.; HIRATA, I. Y.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. de L. T. de M. Functional properties of a manganese-activated exo-polygalacturonase produced by a thermotolerant fungus *Aspergillus niveus*. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 6, p. 615–621, 2013.

MARIN, F.; NASSIF, D. S. P. Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 2, p. 232–239, 2013.

MARTÍNEZ, D.; MENÉNDEZ, C.; ECHEMENDIA, F. M.; PÉREZ, E. R.; TRUJILLO, L. E.; SOBRINO, A.; RAMÍREZ, R.; QUINTERO, Y.; HERNÁNDEZ, L. Complete sucrose hydrolysis by heat-killed recombinant *Pichia pastoris* cells entrapped in calcium alginate. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 87-96, 2014.

McILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 183-186, 1921.

McKELVEY, S. M.; MURPHY, R. A. Biotechnological Use of Fungal Enzymes. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Fungi: Biology and Applications**. 3 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017. p. 201-225.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIYAKOSHI, S.; AZAMI, S.; KUZUYAMA, T. Microbial glucosylation of flavonols by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 320-321, 2010.

MORENO, S.; SANCHEZ, Y.; RODRIGUEZ, L. Purification and characterization of the invertase from *Schizosaccharomyces pombe*. A comparative analysis with the invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Biochemical Journal**, v. 267, n. 3, p. 697–702, 1990.

MOUELHI, R.; ABIDI, F.; GALAI, S.; MARZOUKI, M. N. Immobilized *Sclerotinia sclerotiorum* invertase to produce invert sugar syrup from industrial beet molasses by product. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 1063–1073, 2014.

MOURA, C. L. A. de; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. **Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

MURAMATSU, M.; NAKAKUKI, T. Enzymatic Synthesis of Novel Fructosyl and Oligofructosyl Trehaloses by *Aspergillus sydowi*  $\beta$ -Fructofuranosidase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 2, p. 208-12, 1995.

MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.  $\beta$ -Fructofuranosidase production by repeated batch fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 923–928, 2009.

MUSSATTO, S. I.; PRATA, M. B.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Production of fructooligosaccharides and  $\beta$ -fructofuranosidase by batch and repeated batch fermentation with immobilized cells of *Penicillium expansum*. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 1, p. 13–22, 2012.

NADEEM, H.; RASHID, M. H.; SIDDIQUE, M. H.; AZEEM, F.; MUZAMMIL, S.; JAVED, M. R.; ALI, M. A.; RASUL, I.; RIAZ, M. Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1202-1210, 2015.

NAGAYA, M.; KIMURA, M.; GOZU, Y.; SATO, S.; HIRANO, K.; TOCHIO, T.; NISHIKAWA, A.; TONOZUKA, T. Crystal structure of a  $\beta$ -fructofuranosidase with high transfructosylation activity from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 9, p. 1786-1795, 2017.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. **Biological Reviews**, v. 94, p. 1443-1476, 2019a.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biological Reviews**, v. 94, p. 2101–2137, 2019b.

NASCIMENTO, A. K. C.; NOBRE, C.; CAVALCANTI, M. T. H.; TEIXEIRA, J. A.; PORTO, A. L. F. Screening of fungi from the genus *Penicillium* for production of  $\beta$ -fructofuranosidase and enzymatic synthesis of fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 70-78, 2016.

NASCIMENTO, G. C. do; BATISTA, R. D.; SANTOS, C. C. A. do A.; SILVA, E. M. da; PAULA, F. C. de; MENDES, D. B.; OLIVEIRA, D. P. de; ALMEIDA, A. F. de.  $\beta$ -Fructofuranosidase and  $\beta$ -D-Fructosyltransferase from New *Aspergillus carbonarius* PC-4 Strain Isolated from Canned Peach Syrup: Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Enzyme Production. **The Scientific World Journal**, v. 2019, p. 1-13, 2019.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; BHAT, M. K.; HOSCHKE, Á. Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2461-2466, 2005.

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.

ODA, Y.; TONOMURA, K. Purification and Characterization of Invertase from *Torulaspora pretoriensis* YK-1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 6, p. 1155-1157, 1994.

OLIVEIRA, R. L. de; SILVA, M. F. da; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Biochemical characterization and kinetic/thermodynamic study of *Aspergillus tamaris* URM4634  $\beta$ -fructofuranosidase with transfructosylating activity. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 6, p. 1-12, 2019.

OLIVEIRA, R. L. de; SILVA, M. F. da; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Production of  $\beta$ -fructofuranosidase with transfructosylating activity by *Aspergillus tamaris* URM4634 Solid-State Fermentation on agroindustrial by-products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 343-350, 2020.

OLUTIOLA, P. O.; COLE, O. O. Extracellular invertase from *Aspergillus flavus*. **Physiologia Plantarum**, v. 50, p. 26-31, 1980.

OLVERA-VARGAS, H.; LEROY, S.; RIVARD, M.; OTURAN, N.; OTURAN, M.; BUISSON, D. Microbial biotransformation of furosemide for environmental risk assessment: identification of metabolites and toxicological evaluation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 22, p. 22691–22700, 2016.

ORTIZ, S. **Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio com nanopartículas magnéticas**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

OTTEN, S. L.; ROSAZZA, J. P. Microbial Transformations of Natural Antitumor Agents. 17. Conversions of Lapachol by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 562-568, 1981.

OYEDEJI, O.; BAKARE, M. K.; ADEWALE, I. O.; OLUTIOLA, P. O.; OMOBOYE, O. O. Optimized production and characterization of thermostable invertase from *Aspergillus niger* IBK1, using pineapple peel as alternate substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 218-223, 2017.

OZCAN, O.; YILDIRIM, R. M.; TOKER, O. S.; AKBAS, N.; OZULKU, G.; YAMAN, M. The effect of invertase concentration on quality parameters of fondant. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 9, p. 4242-4250, 2019.

PARK, J. K.; RO, H. S.; KIM, H. S. A new biosensor for specific determination of sucrose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and invertase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 3, p. 217-223, 1991.

PAULA, N. C. de; CORDEIRO, K. C. F. A.; SOUZA, P. L. de M.; NOGUEIRA, D. F.; SILVA e SOUSA, D. B. da; COSTA, M. B.; NOËL, F.; OLIVEIRA, V. de. Biosynthesis of human diazepam and clonazepam metabolites. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 5, p. 1026-1029, 2015.

PEK, H. B.; LIM, P. Y.; LIU, C.; LEE, D. Y.; BI, X.; WONG, F. T.; OW, D. S. W. Cytoplasmic expression of a thermostable invertase from *Thermotoga maritima* in *Lactococcus lactis*. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 5, p. 759–765, 2017.

PERALTA, R. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.  $\beta$ -D-glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1033, n. 3, p. 243-249, 1990.

PÉREZ de los SANTOS, A. I.; CAYETANO-CRUZ, M.; GUTIÉRREZ-ANTÓN, M.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.; FARRÉS, A.; HIDALGO-LARA, M. E. Improvement of catalytical properties of two invertases highly tolerant to sucrose after expression in *Pichia pastoris*. Effect of glycosylation on enzyme properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 83, p. 48-56, 2016.

PETEIRO, C. Alginate Production from Marine Macroalgae, with Emphasis on Kelp Farming. In: REHM, B.; MORADALI, M. (Ed.). **Alginates and Their Biomedical Applications**. New York City: Springer, 2018. p. 27-66.

POONAWALLA, F. M.; PATEL, K. L.; IYENGAR, M. R. S. Invertase production by *Penicillium chrysogenum* and other fungi in submerged fermentation. **Applied microbiology**, v. 13, n. 5, p. 749-754, 1965.

QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. Purification and characterization of the invertase from *Pycnopus sanguineus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1251, n. 2, p. 75-80, 1995.

QURESHI, A. S.; KHUSHK, I.; BHUTTO, M. A.; DAHOT, M. U.; HAQ, I. U.; BANO, S.; IQBAL, H. Production and partial characterization of invertase from *Mucor geophyllus* EFRL 03. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 47, p. 10736-10743, 2012.

REHM, J.; WILLMITZER, L.; HEYER, A. G. Production of 1-Kestose in Transgenic Yeast Expressing a Fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 5, p. 1305-1310, 1998.

REZENDE, S. T. de; FELIX, C. R. Production and characterization of raffinose-hydrolysing and invertase activities of *Aspergillus fumigatus*. **Folia Microbiologica**, v. 44, n. 2, p. 191-195, 1999.

RICHARDS, T. A.; LEONARD, G.; WIDEMAN, J. G. What defines the "Kingdom" Fungi?. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, p. 1-21, 2017.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. de L. T. de M. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001.

ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M. C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 12, p. 606-613, 2004.

RUBIO, M. C.; MALDONADO, M. C. Purification and Characterization of Invertase from *Aspergillus niger*. **Current Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 80-83, 1995.

RUSTIGUEL, C. B.; OLIVEIRA, A. H. C. de; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Biochemical properties of an extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase II produced by *Aspergillus phoenicis* under Solid-State Fermentation using soy bran as substrate. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 1-10, 2011.

RUSTIGUEL, C. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermo-tolerant mycelial  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis* under submerged fermentation using wheat bran as carbon source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 362–369, 2015.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689-2694, 2005.

SHIPTON, W. A.; LUNN, J. A. Sporangiole morphology and species separation in *Cunninghamella*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 483-491, 1980.

SIDDIQUI, M.; AHMAD, M. S.; WAHAB, A. T.; YOUSUF, S.; FATIMA, N.; SHAIKH, N. N.; RAHMAN, A. U.; CHOUDHARY, M. I. Biotransformation of a potent anabolic steroid, mibolerone, with *Cunninghamella blakesleeana*, *C. echinulata*, and *Macrophomina phaseolina*, and biological activity evaluation of its metabolites. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. 1-22, 2017.

SMAALI, I.; SOUSSI, A.; BOUALLAGUI, H.; CHAIRA, N.; HAMDY, M.; MARZOUKI, M. N. Production of high-fructose syrup from date by-products in a packed bed bioreactor using a novel thermostable invertase from *Aspergillus awamori*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, n.6, p. 253-261, 2011.

SOUZA, K. V. de; PERALTA-ZAMORA, P.; ZAWADZKI, S. F. Imobilização de ferro (II) em matriz de alginato e sua utilização na degradação de corantes têxteis por processos Fenton. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1145-1149, 2008.

SOUZA, G. M.; VAN SLUYS, M. A.; LEMBKE, C. G.; LEE, H.; MARGARIDO, G. R. A.; HOTTA, C. T.; GAIARSA, J. W.; DINIZ, A. L.; OLIVEIRA, M. de M.; FERREIRA, S. de S.; NISHIYAMA Jr, M. Y.; TEN-CATEN, F.; RAGAGNIN, G. T.; ANDRADE, P. de M.; SOUZA, R. F. de; NICASTRO, G. G.; PANDYA, R.; KIM, C.; GUO, H.; DURHAM, A. M.; CARNEIRO, M. S.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; ZHANG, Q.; MING, R.; SCHATZ, M. C.; DAVIDSON, B.; PATERSON, A. H.; HECKERMAN, D. Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop. **GigaScience**, v. 8, n. 12, p. 1-18, 2019.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; ILLING, M.; SADDLER, J. N. The copurification of  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase, and 1,3- $\beta$ -glucanase in two separate enzyme complexes isolated from *Trichoderma harzianum* E58. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 65, n. 9, p. 822-832, 1987.

TASKIN, M.; ORTUCU, S.; UNVER, Y.; TASAR, O. C.; OZDEMIR, M.; KAYMAK, H. C. Invertase production and molasses decolourization by cold-adapted filamentous fungus *Cladosporium herbarum* ER-25 in non-sterile molasses medium. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 103, p. 136-143, 2016.

TÓDERO, L. M.; RECHIA, C. G. V.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of short-chain fructooligosaccharides (scFOS) using extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus thermomutatus*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 1-12, 2019.

TOLEDO, L. E. T.; GARCÍA, D. M.; CRUZ, E. P.; INTRIAGO, L. M. R.; PÉREZ, J. N.; CHANFRAU, J. M. P. Fructosyltransferases and Invertases: Useful Enzymes in the Food and Feed Industries. In: KUDDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**. Cambridge: Academic Press, 2019. p. 451-469.

UMA, C.; GOMATHI, D.; MUTHULAKSHMI, C.; GOPALAKRISHNAN, V. K. Production, Purification and Characterization of Invertase by *Aspergillus flavus* Using Fruit Peel Waste as Substrate. **Advances in Biological Research**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2010.

UMA, C.; GOMATHI, D.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; PALANISWAMY, M. Production and properties of invertase from a *Cladosporium cladosporioides* in SmF using pomegranate peel waste as substrate. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 605-611, 2012.

UPADHYAY, L. S. B.; VERMA, N. Highly efficient production of inverted syrup in an analytical column with immobilized invertase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 4120–4125, 2014.

VAINSTEIN, M. H.; PEBERDY, J. F. Regulation of invertase in *Aspergillus nidulans*: effect of different carbon sources. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 2, p. 315-321, 1991.

VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathwas among fungi: evolutionary implications. **The American Naturalist**, v. 98, n. 903, p. 435-446, 1964.

WALLIS, G. L. F.; HEMMING, F. W.; PEBERDY, J. F. Secretion of Two  $\beta$ -Fructofuranosidases by *Aspergillus niger* Growing in Sucrose. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 345, n. 2, p. 214-222, 1997.

WAN, X.; ZHANG, Y.; WANG, P.; HUANG, F.; CHEN, H.; JIANG, M. Production of Gamma-Linolenic Acid in *Pichia pastoris* by Expression of a Delta-6 Desaturase Gene from *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 10, p. 1098-1102, 2009.

WAN, X.; LIANG, Z.; GONG, Y.; ZHANG, Y.; JIANG, J. Characterization of three  $\Delta 9$ -fatty acid desaturases with distinct substrate specificity from an oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata*. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 7, p. 4483-4489, 2013.

WANG, L. M.; ZHOU, H. M. Isolation and identification of a novel *Aspergillus japonicus* JN19 producing  $\beta$ -Fructofuranosidase and characterization of the enzyme. **Journal of Food Biochemistry**, v. 30, p. 641-658, 2006.

WANG, J. G.; ZHAO, T. T.; WANG, W. Z.; FENG, C. L.; FENG, X. Y.; XIONG, G. R.; SHEN, L. B.; ZHANG, S. Z.; WANG, W. Q.; ZHANG, Z. X. Culm transcriptome sequencing of Badila (*Saccharum officinarum* L.) and analysis of major genes involved in sucrose accumulation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 144, p. 455-465, 2019.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.; WHITE, T. (Ed.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Cambridge: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WIND, J.; SMEEKENS, S.; HANSON, J. Sucrose: Metabolite and signaling molecule. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14–15, p. 1610-1614, 2010.

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 1. ed. Chichester: Ellis Horwood, 1975.

WONGANAN, O.; TOCHARUS, C.; PUEDSING, C.; HOMVISASEVONGSA, S.; SUKCHAROEN, O.; SUKSAMRARN, A. Potent vasorelaxant analogs from chemical modification and biotransformation of isosteviol. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 771-776, 2013.

XIANG, Y.; LU, Y. Using personal glucose meters and functional DNA sensors to quantify a variety of analytical targets. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 697–703, 2011.

XIE, Y.; ZHOU, H.; LIU, C.; ZHANG, J.; LI, N.; ZHAO, Z.; SUN, G.; ZHONG, Y. A molasses habitat-derived fungus *Aspergillus tubingensis* XG21 with high  $\beta$ -fructofuranosidase activity and its potential use for fructooligosaccharides production. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 128-137, 2017.

XU, L.; WANG, D.; LU, L.; JIN, L.; LIU, J.; SONG, D.; GUO, Z.; XIAO, M. Purification, cloning, characterization, and N-glycosylation analysis of a novel  $\beta$ -fructosidase from *Aspergillus oryzae* FS4 synthesizing levan- and neolevan-type fructooligosaccharides. **PLoS one**, v. 9, n. 12, p. 1-20, 2014.

XU, Q. S.; ZHENG, X. Q.; HUANG, M. P.; WU, M.; YAN, Y. S.; PAN, J. M.; YANG, Q.; DUAN, C. J.; LIU, J. L.; FENG, J. X. Purification and biochemical characterization of a novel  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1237-1246, 2015.

XU, F.; LIAO, K.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; GUO, D.; SU, Z.; LIU, B. Biotransformation of patchoulol by *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*. **Fitoterapia**, v. 109, p. 201-205, 2016.

YAN, Q.; FONG, S. S. Cloning and characterization of a chitinase from *Thermobifida fusca* reveals Tfu\_0580 as a thermostable and acidic endochitinase. **Biotechnology Reports**, v. 19, p. 1-8, 2018.

YANG, W.; DAVIS, P. J. Microbial models of mammalian metabolism. Biotransformations of *N*-methylcarbazole using the fungus *Cunninghamella echinulata*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 20, n. 1, p. 38-46, 1992.

YAPO, B. M.; GNAKRI, D. Pectic Polysaccharides and Their Functional Properties. In: RAMAWAT, K.; MÉRILLON, J. M. (Ed.). **Polysaccharides**. Cham: Springer, 2015. p. 1729-1749.

ZHAN, J.; GUO, H.; DAI, J.; ZHANG, Y.; GUO, D. Microbial transformations of artemisinin by *Cunninghamella echinulata* and *Aspergillus niger*. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 25, p. 4519-4521, 2002.

ZHOU, J.; HE, L.; GAO, Y.; HAN, N.; ZHANG, R.; WU, Q.; LI, J.; TANG, X.; XU, B.; DING, J.; HUANG, Z. Characterization of a novel low-temperature-active, alkaline and sucrose-tolerant invertase. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-9, 2016.