

FERNANDA ZANINETTE

Efeito da concentração de sacarose na produção de frutooligossacarídeos e β -frutofuranosidases por *Penicillium janczewskii* Zaleski CCIBt 3352

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2015

FERNANDA ZANINETTE

Efeito da concentração de sacarose na produção de frutooligossacarídeos e β -frutofuranosidases por *Penicillium janczewskii* Zaleski CCIBt 3352

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. RITA DE CÁSSIA LEONE FIGUEIREDO RIBEIRO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Zaninette, Fernanda

Z31e Efeito da concentração de sacarose na produção de frutooligossacarídeos e β -frutofuranosidases por *Penicillium janczewskii* Zaleski CCIBt 3352 / Fernanda Zaninette -- São Paulo, 2015.

64 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015

Bibliografia.

1. Frutanos. 2. Fibras solúveis. 3. Neocestose. I. Título

CDU: 547.458

“É impossível sondarmos a complexidade de um ser orgânico, mas, segundo a hipótese aqui proposta, essa complexidade cresce enormemente. Cada criatura viva deve ser vista como um microcosmo – um pequeno universo formado por uma multidão de organismos autopropagadores, inconcebivelmente diminutos e numerosos como as estrelas do firmamento.”

Charles Darwin

“Desistir...

eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério, é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça...”

Cora Coralina

DEDICO

*Aos meus pais, Valdecir e Honorina,
com ternura, respeito e gratidão
Ao Carlos H. Ramos, pela compreensão,
companheirismo e amor*

Agradecimentos

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só nem nos deixa sós; leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo.

Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada; há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso” O pequeno príncipe

Por isso agradeço a cada pessoa que por mim passou e que aqui ainda estão.

À minha orientadora Dra. Rita de Cássia L. Figueiredo Ribeiro pela orientação, paciência dedicação integral e pelo apoio constante.

À Dra. Kelly Simões pela confiança em meu trabalho desde a iniciação científica, pelos aconselhamentos, pelo esforço em me proporcionar melhor conhecimento e me mostrar que as coisas sempre dão certo mesmo quando parecem estarem perdidas. Obrigada por acompanhar e me inserir no mundo científico.

Ao Dr. Mauricio B. Fialho, pela revisão crítica dos resultados e discussão, por todos os ensinamentos científicos, e o esforço em me proporcionar a melhor condição de trabalho, meu respeito e admiração.

Dra. Marília Gaspar, Chefe do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo, por permitir acesso ao laboratório e demais facilidades proporcionadas, pelo interesse e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Cirano Jose Ulhoa, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiânia, pelo estágio concedido em seu laboratório e pela colaboração nas análises enzimáticas.

À Dra. Valdirene Neves Monteiro, da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal de Goiânia, pela dedicação, ensinamentos e pelo auxílio nos experimentos com as enzimas.

À Dra. Moemy Gomes Moraes, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Goiânia, pelo acolhimento, direcionamento, cuidado e respeito.

À Dra. Rosely Ana Piccolo Grandi, do Centro de Pesquisa em Plantas Vasculares e Fungos, do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo apoio e auxílio na identificação microscópica das estruturas morfológicas do fungo estudado.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, pela oportunidade em realizar este trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Mary Monteiro, Ana Alice e Pedro, a todos os pesquisadores pela dedicação em manter as melhores condições de trabalho a nós alunos.

Aos meus amigos do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, Athos Poli, Aline Hell, Cinthia, Daiane Mignoni, Daiane Galvão, Emanuela Oliveira, Evandro Vieira, Flavio Trevisan, Glaucia Rodrigues, João Paulo Naldi, Juliana Zerlin, Kássia Fardin, Leila Díaz, Leiliane Michelle, Roseli Betoni, Rogrigo Cabral e Vanessa Oliveira por todos os momentos felizes e a alegria compartilhada, na rotina de trabalho, dos serões no laboratório, dos momentos divertidos no almoço, pelo carinho, companheirismo e todo o incentivo ao longo destes anos.

À Dra. Maria Ângela pelo incentivo, palavras de apoio, risadas e conversas, também a Dra. Luce pelos momentos filosóficos e ensinamentos.

Às professoras Rosemeire Pessoni, Cândida Vieira, Liliana Medeiros, Vera Cambréa e Laura Araújo Tomé, da Universidade Metodista de São Paulo, por me apresentarem a biologia e me ensinarem a exercer esta profissão com amor, respeito e integridade. Inspiração e exemplo a serem seguidos, pois a paixão, a dedicação com que nos ensinam, leva-nos a querer trilhar com excelência nosso caminho. Obrigada por dedicar suas vidas a ensinar e orientar tantos jovens.

Aos meus pequeninos Miu, Marvin e Ted, pelo amor incondicional, companheirismo, pela bagunça, pelos sorrisos espontâneos que dou quando estou com vocês e por estarem sempre a me esperar.

Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão

Por isso sou grata a cada um de vocês e grata a cada pessoa que da minha vida participou.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Os fungos e sua importância biotecnológica	1
1.2. Frutooligossacarídeos e sua importância para o homem	6
1.3. Produção de frutooligossacarídeos (FOS)	10
1.4. Fungos produtores de FOS	13
1.5. O Cerrado como fonte de fungos que metabolizam frutanos	15
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Material biológico: cultivo, produção em meio líquido e análise dos filtrados	18
3.2. Análises de pH e de potencial osmótico	19
3.3. Determinação da concentração de proteínas, açúcares redutores e açúcares totais... ..	19
3.4. Análise de carboidratos por HPAEC/PAD	20
3.5. Análise de carboidratos por CCD	21
3.6. Otimização dos ensaios enzimáticos	21
3.6.1. Filtração em gel para remoção dos açúcares	21
3.6.2. Atividade de hidrólise	22
3.6.3. Atividade de transfrutossilação	23
3.6.4. Extração e determinação de proteínas intracelulares	24
3.7. Perfil eletroforético das proteínas extracelulares por SDS-PAGE	24
3.8. Análise Estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Aspectos morfológicos de <i>P. janczewskii</i>	26
4.2. Produção de biomassa e proteínas extracelulares.....	28
4.3. Variação do pH e potencial osmótico dos filtrados de cultura	29
4.4. Composição dos filtrados de cultura por HPAEC/PAD e CCD	31
4.5. Perfil de eletroforético das proteínas extracelulares	36
4.6. Otimização dos ensaios enzimáticos para determinação das atividades hidrolítica e de transfrutossilação	37
4.7. Atividades enzimáticas e conteúdo de FOS no meio extracelular e intracelular.....	40
5. DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são polímeros de frutose de grande interesse biotecnológico devido às suas propriedades prebióticas e à capacidade de melhorar as características tecnológicas dos alimentos. Os FOS podem ser sintetizados a partir da sacarose através da atividade de transfrutossilação de β -frutofuranosidases ou frutossiltransferases derivadas de plantas, bactérias ou fungos. *Penicillium janczewskii* Zaleski CCIBt 3352 é um fungo filamentoso isolado da rizosfera de *Vernonia herbacea*, uma Asteraceae do Cerrado que acumula inulina nos órgãos subterrâneos. Neste estudo foi avaliada a capacidade de *P. janczewskii* de produzir FOS a partir do cultivo em meio contendo sacarose filtrada ou autoclavada em concentrações variando de 10 a 400 g L⁻¹. Também foi realizada a otimização das condições empregadas nos ensaios enzimáticos para determinação das atividades de transfrutossilação e de hidrólise (invertase). O cultivo de *P. janczewskii* em altas concentrações de sacarose favoreceu a maior produção de biomassa, embora tenha reduzido os níveis de proteínas extracelulares após 10 e 16 dias de cultivo. Análise dos filtrados de cultura por HPAEC/PAD mostrou que o cultivo em baixas concentrações de sacarose não resulta na produção de FOS pelo fungo, predominando a atividade de hidrólise. No entanto, a partir de 100 g L⁻¹ de sacarose houve acúmulo de FOS, atingindo níveis máximos em 200 g L⁻¹ do substrato após 10 dias de cultivo (54 g L⁻¹ de FOS). O fungo produziu quatro FOS, sendo os dois majoritários identificados como 1-cestose e neocestose. As melhores condições de ensaio para determinação da atividade de transfrutossilação foram definidas como sendo 10 horas de incubação em 400 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,0, a 55 °C. Em tais condições, foram produzidos 3,1 g L⁻¹ de FOS por hora de reação. A atividade de hidrólise da sacarose foi otimizada em 10 minutos de incubação em 10 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,0, a 55 °C. Portanto, os resultados indicam que *P. janczewskii* produz β -frutofuranosidases (invertases) que apresentam atividade

de transfrutossilacção em altas concentrações de sacarose e atividade de hidrólise em baixas concentrações de sacarose. Altas concentrações da fonte de carbono são requeridas para a produção de elevados níveis de FOS pelo fungo, incluindo o FOS da neo-série neocestose, um trissacarídeo pouco comum em fungos filamentosos, e que apresenta características prebióticas e tecnológicas superiores aos FOS convencionais do tipo inulina. Nesse sentido, *P. janczewskii* pode ser considerado um microrganismo potencialmente importante para produção comercial de fibras solúveis com propriedades diferenciadas.

Palavras-chaves: 1-cestose, fibras solúveis, frutanos, β -frutofuranosidases, neocestose,

Penicillium.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are fructose polymers of great biotechnological interest due to their prebiotic properties and ability to improve the technological characteristics of food. FOS can be synthesized from sucrose by transfructosylating activity of β -fructofuranosidases or fructosyltransferases derived from plants, bacteria or fungi. *Penicillium janczewskii* Zaleski CCIBt 3352 is a filamentous fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea*, an Asteraceae from the Cerrado that accumulates high amounts of inulin in the underground organs. In the present study, it was evaluated the ability of *P. janczewskii* to produce FOS from filtrated or autoclaved sucrose ranging from 10 to 400 g L⁻¹. Optimization of the enzyme assays for transfructosylating and hydrolytic activities (invertase) was also performed in this work. The growth of *P. janczewskii* in high sucrose concentrations improved the biomass production, although the extracellular proteins levels had been reduced after 10 and 16 days of cultivation. The analysis of the culture filtrates by HPAEC/PAD showed that at low sucrose concentrations, the production of FOS by the fungus was not significant, predominating hydrolytic activity under this condition. However, it was observed FOS accumulation from 100 g L⁻¹ sucrose reaching the highest levels at 200 g L⁻¹ sucrose after 10 days of culture (54 g L⁻¹ FOS). The fungus produced mainly four FOS, and the two major were identified as 1-kestose and neokestose. The optimal conditions for transfructosylating activity were defined as 10 hours of incubation at 400 g L⁻¹ sucrose, pH 5.0 at 55 °C. Under such conditions, it was produced 3.1 g L⁻¹ FOS per hour of reaction. The activity of sucrose hydrolysis was optimal at 10 minutes incubation at 10 g L⁻¹ sucrose, pH 5.0 at 55 °C. Our results suggest that *P. janczewskii* produces β -fructofuranosidases (invertases) with transfructosilating activity at high concentrations of sucrose and hydrolytic activity in low sucrose concentrations. High concentration of the carbon source is required by the fungus to produce high levels of FOS,

including the neo-type neokestose, an unusual FOS in filamentous fungi, that has superior prebiotic and technological properties over the conventional inulin-type FOS. Therefore, *P. janczewskii* can be considered a potential microorganism for industrial production of soluble fiber with unique properties.

Keywords: Fructans, β -fructofuranosidases, 1-kestose, neokestose, *Penicillium*, soluble fibers.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os fungos e sua importância biotecnológica

A questão da diversidade fúngica, sua extensão e conservação, tem atraído mais atenção nos últimos anos do que em qualquer outro período da história (Hawksworth, 2004). Cerca de 100.000 espécies de fungos foram descritas até o momento, entretanto, o número total de espécies existentes está estimado em cerca de 1,5 milhões, podendo chegar a 5 milhões (Blackwell, 2011). No Brasil, o número de espécies fúngicas descritas é em torno de 14.000, sendo estimada a existência de 150 a 264 mil espécies (Lewinsonh & Prado, 2005). Isto torna os fungos um dos recursos menos conhecidos e explorados da biodiversidade do nosso planeta (Webster *et al.*, 2007).

No curso da evolução, esses microrganismos têm conquistado uma ampla variedade de habitats, desempenhando funções essenciais nos ecossistemas (Dix & Webster, 1995). No entanto, a atuação dos fungos só é notada quando se tornam destaques nos meios de comunicação como aditivos na formulação de um novo produto, no desenvolvimento de algum processo de alto valor econômico, ou quando causam extensos danos a plantas, animais ou humanos (Bononi & Grandi, 1999).

Os fungos são organismos amplamente distribuídos na natureza e apresentam atividade fisiológica extraordinária, sendo capazes de utilizar praticamente todas as fontes de carbono (Archer *et al.*, 2008). O substrato que uma espécie fúngica é capaz de utilizar como fonte de carbono está relacionado diretamente ao tipo de enzima digestiva que é capaz de produzir e liberar para o meio (Alexopoulos *et al.*, 1996; Archer *et al.*, 2008). Organismos quimioheterotróficos alimentam-se por absorção e em substratos insolúveis sintetizam e secretam enzimas capazes de hidrolisar tais substratos (Figura 1) (Tilburg *et al.*, 1993; Grondona *et al.*, 1997).

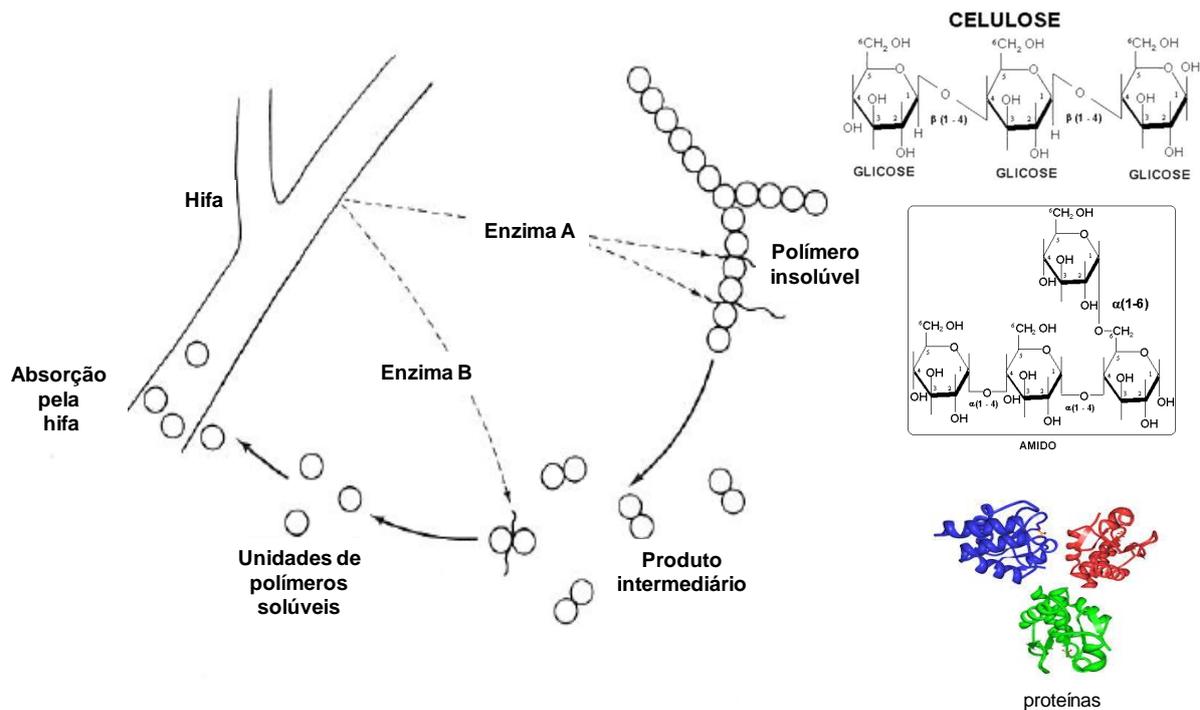


Figura 1. Esquema demonstrativo da digestão e absorção realizada por fungos filamentosos Adaptado de Moore-Landecker (1996).

A maioria dos fungos cresce em temperaturas que variam de 25 a 30 °C, tendo como limite inferior 10 °C e superior 40 °C. Os fungos podem se desenvolver em ambientes com pH variando entre 4 e 7, embora esses microrganismos tenham preferência por condições ácidas. Os fungos digerem os substratos onde crescem, liberando metabólitos que algumas vezes alteram significativamente os níveis de pH no microambiente próximo às suas hifas (Alexopoulos *et al.*, 1996).

A habilidade dos fungos de crescer em substratos simples e de baixo custo e sua capacidade de produzir diversas exoenzimas e metabólitos tem despertado o interesse para o uso biotecnológico desses organismos (Meyer, 2008). Outra vantagem observada na prospecção química de metabólitos e exoenzimas de microrganismos é que estes podem ser cultivados em escala industrial sem causar prejuízos aos ecossistemas, ao contrário das

plantas e algas, por exemplo. A retirada em grande escala desses organismos de áreas naturais pode acarretar danos ao ambiente, muitas vezes irreversíveis, além disso, a produção é afetada pelas condições sazonais (Takahashi & Lucas, 2008; Suryanarayanan *et al.*, 2009).

O metabolismo dos fungos é capaz de gerar diversos compostos com atividades biológicas importantes. O metabolismo desses organismos pode ser dividido em (i) metabolismo primário, que fornece energia e precursores químicos às células, sendo essenciais para o crescimento e a reprodução e (ii) metabolismo secundário, que aparenta não ter função definida no crescimento celular, mas que pode conferir ao organismo vantagens adaptativas importantes (Brakhage *et al.*, 2011).

Os metabólitos primários são moléculas produzidas ao longo do crescimento vegetativo, sendo usadas em indústrias alimentícias e de ração, incluindo álcoois (etanol), aminoácidos (glutamato monossódico, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), nucleotídeos flavorizantes (ácido 5-guanílico, ácido 5-inosínico), ácidos orgânicos (acético, propiônico, fumárico, láctico), polióis (glicerol, manitol, xilitol), polissacarídeos (xantana), açúcares (frutose, ribose) e vitaminas (riboflavina, cianocobalamina, biotina) (Demain, 2000; Rajasekaran *et al.*, 2008).

Os metabólitos secundários são sintetizados quando o crescimento microbiano se encontra na fase estacionária, sendo frequentemente bioativos e de baixo peso molecular. Apresentam atividade antibiótica, imunossupressora e tóxica sendo sintetizados a partir de um metabólito primário. Esses metabólitos geralmente são formados somente quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros são acumulados durante o cultivo. A composição do meio de cultura é essencial para a formação desses metabólitos (Jay, 2005; Keller *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2005; Yu & Keller; 2005; Nigam, 2009).

Os metabólitos secundários são importantes para esses organismos, pois funcionam como hormônios sexuais, substâncias competitivas contra bactérias, fungos, amebas, insetos e plantas, agentes de simbiose, efetores de diferenciação e outras atividades ainda pouco conhecidas (Demain & Adrio, 2008), garantindo aos fungos vantagens ecológicas para competição com outros microrganismos. Assim, muitos desses metabólitos apresentam efeitos tóxicos ou inibitórios sobre outros organismos (Khaldi *et al.*, 2010).

O conhecimento da fisiologia, bioquímica e genética de fungos filamentosos tornou possível a produção de uma grande variedade de enzimas com aplicação industrial (Torres *et al.*, 2008; Orlandelli *et al.*, 2012). O emprego de enzimas fúngicas possibilita a geração de novas matérias-primas, otimiza os processos industriais e aprimora as características físico-químicas do produto final. Atualmente tais enzimas são empregadas nos mais diversos setores e segmentos, incluindo o seguimento têxtil, a indústria farmacêutica, de papel e celulose, de cosméticos (enzimocosméticos) e de alimentos e bebidas (Orlandelli *et al.*, 2012).

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido empregados em estudos científicos na busca por compostos bioativos, recebendo atenção especial da indústria, uma vez que dos 6.500 metabólitos identificados, 30% foram obtidos destes dois gêneros (Suryanarayanan *et al.*, 2009). Além disso, muitas enzimas comercialmente utilizadas também são derivadas destes fungos, como pode ser constatado na Tabela 1 (Bon *et al.*, 2008; Orlandelli *et al.*, 2012).

Tabela 1. Enzimas comerciais obtidas a partir de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*

Fungo produtor	Enzimas comerciais
<i>Aspergillus aculeatus</i>	β -glucanase, pectinase
<i>Aspergillus melleus</i>	protease
<i>Aspergillus niger</i>	aminopeptidase, α -amilase, α -galactosidase, catalase, celulase, fitase, β -glucanase, hemicelulase, inulinase, lipase, pectinase, protease, xilanase
<i>Aspergillus oryzae</i>	aminopeptidase, α -amilase, lactase, protease,
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	pectinase
<i>Penicillium camemberti</i>	lipase
<i>Penicillium citrinum</i>	irotease
<i>Penicillium funiculosum</i>	pectinase, xilanase
<i>Penicillium lilacinum</i>	dextranase
<i>Penicillium roqueforti</i>	lipase

Adaptado de Orlandelli *et al.* (2012).

Fungos do gênero *Penicillium* foram classificados como anamórficos (Hyphomycetes) por longo tempo, sendo alocados em uma classe conhecida como Deuteromycetes, aludidos também como “fungos imperfeitos”. O nome do gênero “*Penicillium*” deriva de “penicillus”, que significa “pequena escova” e foi introduzido por Link em 1809. No século 19 muitas espécies foram descritas, sendo Dierckx em 1901 o primeiro pesquisador a introduzir um sistema de classificação secundário para o gênero (Houbraken & Samsun, 2011).

Esses fungos são disseminados por propágulos que se formam em células onde não ocorre meiose (fiálides), referidas como conídios (Figura 2), entretanto muitos derivam de micélio vegetativo não especializado (Kirk *et al.*, 2001). Esses organismos são comumente encontrados no solo e rizosfera de plantas, e são considerados fungos de ampla importância econômica (Grandi, 1999).

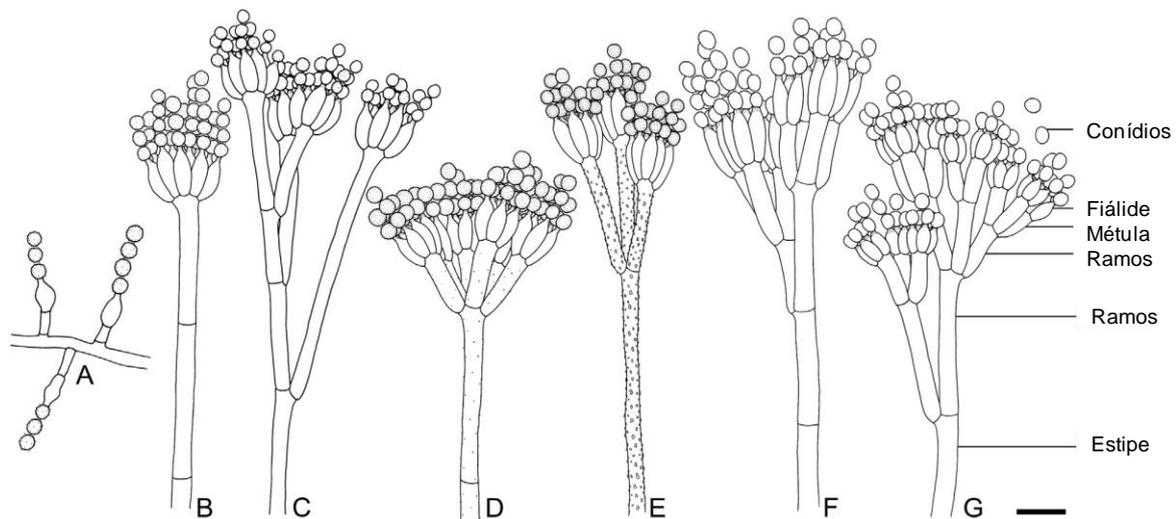


Figura 2. Padrões de conidióforos observados em fungos do gênero *Penicillium*. A) conidióforos com fiálides solitários, B) Monoverticilado, C) Diverticilado, D) e E) Biverticilados, F) Terverticilado, G) Quaternverticilado, Barra = 10 μ m. Adaptado de Visagie *et al.* (2014).

1.2. Frutooligossacarídeos e sua importância para o homem

Tem crescido a consciência por partes dos consumidores de que os alimentos não são necessários apenas para nutrição e obtenção de energia, mas também para prevenir doenças e manter o bem estar físico e mental. Como consequência, a demanda por alimentos funcionais tem aumentado nas últimas décadas. Uma classe de alimento funcional que tem recebido atenção especial são as fibras solúveis, que incluem carboidratos como os frutanos, que são polímeros de frutose unidos por ligações glicosídicas do tipo β - frutanos de cadeia curta são conhecidos como frutooligossacarídeos (FOS) e apresentam de dois a dez resíduos de frutose, geralmente contendo uma molécula de sacarose na extremidade redutora (Velázquez-Hernández *et al.*, 2009).

Existem diferentes classes de FOS dependendo do tipo de ligação existente entre os monômeros do polímero (Figura 3). No tipo inulina, a unidade frutossil é β -2,1 ligada à porção frutossil da sacarose terminal na extremidade redutora, formando o trissacarídeo precursor 1-cestose, ao passo que no tipo levano a unidade frutossil é β -2,6 ligada à sacarose, formando o trissacarídeo 6-cestose. No tipo neolevano o precursor é o trissacarídeo neocestose em que a unidade frutossil é β -2,6 ligada à porção glicosil da sacarose. Em plantas, há ainda a ocorrência de levanos mistos cujo precursor é o tetrassacarídeo bifurcose, com ligações β -(2,1) e β -(2,6) (Sangeetha *et al.*, 2005; Velázquez-Hernández *et al.*, 2009; Yildiz, 2011; Apolinário *et al.*, 2014).

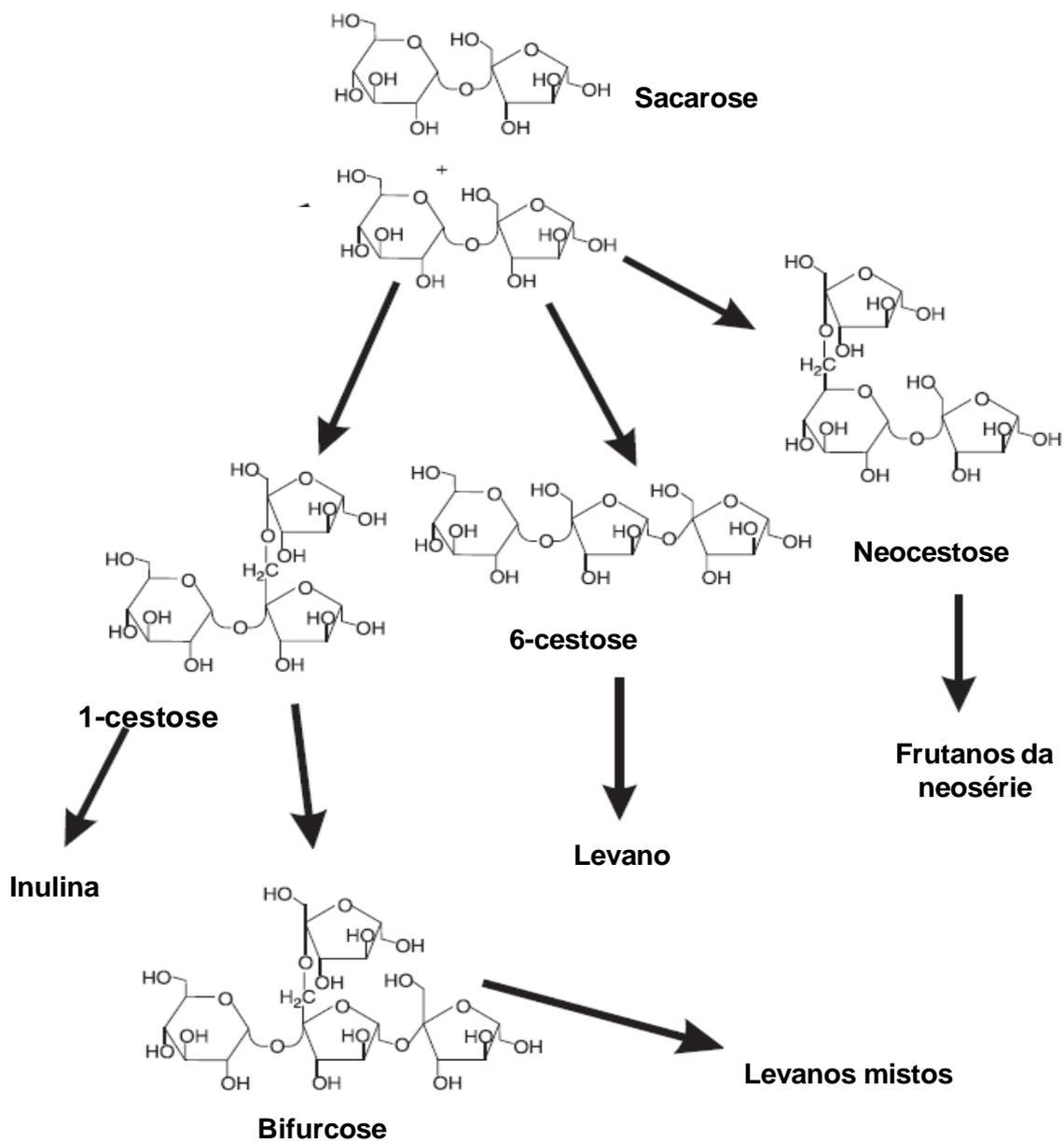


Figura 3. Estruturas químicas de di, tri e tetrasacarídeos precursores dos diferentes tipos de frutanos encontrados. Adaptado de Velázquez-Hernández *et al.* (2009).

O interesse pelos FOS como ingredientes alimentares tem aumentado por serem considerados açúcares dietéticos e não convencionais. As enzimas digestivas humanas não são capazes de hidrolisar as ligações β desses carboidratos, no entanto, as mesmas são metabolizadas seletivamente por bifidobactérias no intestino delgado, sendo, portanto, considerados como prebióticos (Velázquez-Hernández *et al.*, 2009). Os benefícios dos FOS à

saúde humana incluem a ativação do sistema imunológico, redução dos níveis plasmáticos de colesterol, fosfolipídios e triglicérides; melhoram a síntese de vitaminas do complexo B e promovem maior absorção de cálcio e magnésio no trato gastrointestinal, proporcionam alívio da constipação intestinal e podem inibir o desenvolvimento de tumores e doenças inflamatórias do intestino (Dominguez *et al.*, 2014; Mutanda *et al.*, 2014). Além disso, os FOS não são cariogênicos, funcionam como excelentes adoçantes de baixa caloria e seu uso é considerado seguro para pessoas diabéticas (Yun, 1996; Maiorano *et al.*, 2008; Patel & Goyal, 2011).

Os FOS também apresentam propriedades tecnológicas interessantes para a indústria alimentícia, tais como facilidade de incorporação aos alimentos, boa estabilidade a altas temperaturas e ao congelamento, são bons agentes espessantes, e podem substituir as gorduras e açúcares comuns como a sacarose. Também melhoram a textura, umectância, viscosidade, depressão do ponto de congelamento e atividade da água, aumentando dessa maneira a vida de prateleira dos alimentos. A combinação de FOS com adoçantes de alta intensidade proporciona um perfil de doçura equilibrada e mascara o sabor residual de aspartame ou acesulfame K (Crittenden & Playne, 1996; Yun, 1996; Niness, 1999; Patel & Goyal, 2011). Os FOS têm sido muito empregados na formulação de alimentos no leste da Ásia, América do Norte e na Europa (Monsan *et al.*, 2009; Yildiz, 2011).

Do ponto de vista comercial os FOS estão divididos em dois grupos. O grupo (i) produzido por hidrólise enzimática da inulina, com grau de polimerização variando entre 1 e 7 unidades de frutossil, comercializado como Raftilose® e produzido pela Orafit Ltda, da Bélgica ou como Frutafit®, produzido pela Imperial-Suikner Unie, da Holanda. O grupo (ii) é produzido por reação enzimática de transfrutossilacção a partir de sacarose, com grau de polimerização variando entre 1 e 5 unidades de frutossil. Este tipo de FOS é produzido pela Meiji Seika Ltda (Tóquio, Japão) e comercializado como Neosugar®, Profeed®, Meioligo® ou Nutraflora®. O Actilight® é produzido e comercializado na Europa pela Beghin Meiji

Industries (Hidaka *et al.*, 1986; Hartemink *et al.*, 1997; Passos *et al.*, 2003). A síntese de FOS usando frutossiltransferases de *A. niger* foi desenvolvida pela primeira vez por Meiji Seika Kaisha Ltd., Japão, resultando no lançamento do produto comercial Meioligo® (Singh & Singh 2010; Dominguez *et al.*, 2014).

A demanda mundial de prebióticos está estimada em cerca de 167 mil toneladas e cerca de 390 milhões de euros. Entre eles, incluem-se FOS do tipo inulina, isomaltoligossacarídeo, polidextrose, latulose e amido resistente, que são considerados os mais populares. Em 1995, o mercado global de FOS produzidos a partir da sacarose foi estimado em 2000 toneladas (Menrad, 2003; Siró *et al.*, 2008; Dominguez *et al.*, 2014) e estima-se que o mercado de nutracêuticos da Europa apresente uma participação de mais de 20% até 2017 (Dominguez *et al.*, 2014).

Tendo em vista a grande demanda de FOS como ingredientes alimentares, o isolamento e identificação de novas cepas capazes de produzir enzimas com atividade de transfrutossilacção e o desenvolvimento de métodos de produção mais avançados e menos onerosos são fundamentais para o avanço da produção desses açúcares.

1.3. Produção de frutooligossacarídeos (FOS)

Frutanos e seus oligômeros são encontrados em trigo, centeio, banana, aspargos, cebola, alho, alcachofra de Jerusalém, tomate, entre outros vegetais. Entretanto, a concentração de FOS é baixa para exercer efeito benéfico significativo. Além disso, a produção de FOS em larga escala a partir desses vegetais é limitada por condições sazonais e é pouco viável economicamente (Sangeetha *et al.*, 2005). Dessa forma, o uso de sistemas enzimáticos microbianos para a produção de FOS a partir da sacarose é uma alternativa com melhor custo-benefício.

Diferentes processos enzimáticos que podem gerar produtos finais similares vêm sendo utilizados para a produção de FOS. Esses processos incluem a síntese de FOS a partir de sacarose, utilizando enzimas com atividade de transfrutossilacção, ou ainda, por meio de hidrólise controlada de inulina por inulinases (Katapodis *et al.*, 2004; Sangeetha, 2005; Antořová *et al.*, 2008; Singh & Singh, 2010; Vega-Paulino & Zúniga-Hansen, 2012; Mutanda *et al.*, 2014).

A inulina, polímero linear de frutose com ligações β -2,1, é amplamente distribuída na natureza como carboidrato de reserva em órgãos subterrâneos das plantas, especialmente da família Asteracea, sendo a raiz de chicória a principal fonte comercial de inulina. As enzimas responsáveis pela hidrólise da inulina são β -frutofuranosidases, incluindo as inulinases. As exo-inulinases (β -D-frutano frutanohidrolases, EC. 3.2.1.80) catalisam a liberação de unidades de frutose a partir da extremidade não redutora da molécula de inulina, podendo também hidrolisar eficientemente a sacarose e o trissacarídeo rafinose. Por outro lado, as endo-inulinases (2,1 β -D-frutano frutanohidrolases, EC. 3.2.1.7) hidrolisam aleatoriamente as ligações internas da inulina, liberando uma série de FOS, também chamados de inulooligossacarídeos, como a inulotetraose e a inulopentaose, sendo, desta forma, específicas para inulina (Moriyana *et al.*, 2006; Singh & Gill, 2006; Yuan *et al.*, 2006; Chi *et al.*, 2009).

No entanto, a maior parte da produção de FOS em escala industrial é realizada a partir de sacarose por meio da ação de frutossiltransferases (E.C. 2.4.1.9) ou β -frutofuranosidases (EC. 3.2.1.26) - (invertases) de origem microbiana. Essas enzimas atuam sobre a sacarose em uma reação em que uma molécula de sacarose serve como doadora do grupo frutossil e a outra como receptora, sendo adicionada a esta última sucessivas unidades de frutose formando cadeias lineares ou ramificadas (Yun, 1996) - (Figura 4).

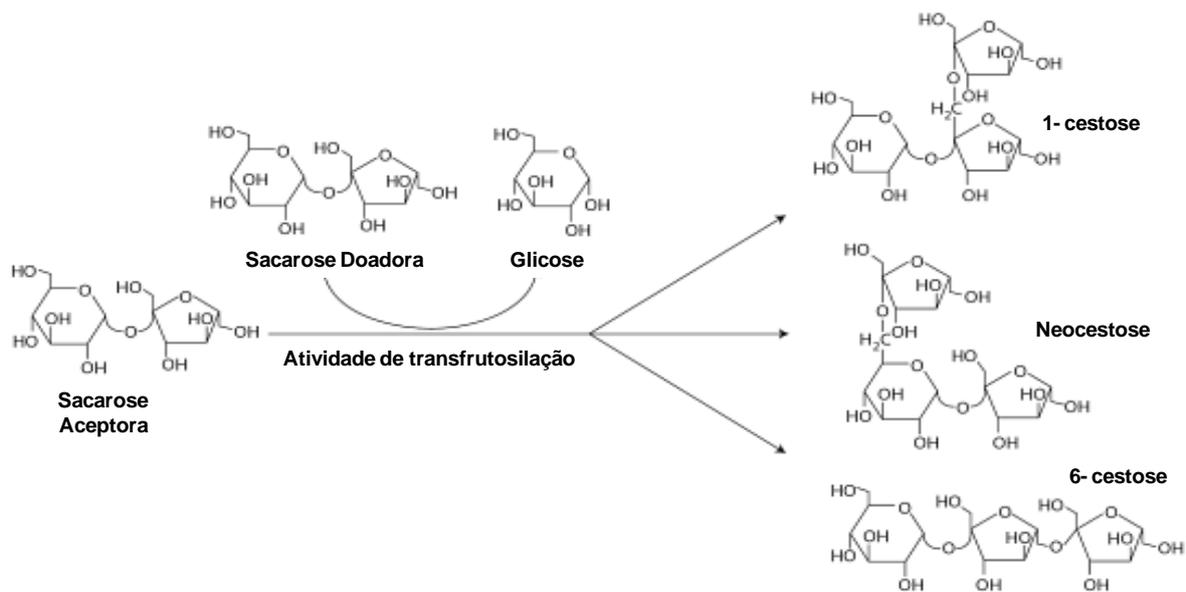


Figura 4. Diferentes estruturas de frutanos produzidas a partir da sacarose por enzimas com atividade de transfrutossilatação. Adaptado de Figueiredo-Ribeiro *et al.* (2014).

Normalmente as invertases hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, no entanto, também podem apresentar atividade de transfrutossilatação, provavelmente devido à hidrólise reversa. A produção de FOS por estas enzimas ocorre apenas em altas concentrações de sacarose. Em contraste, frutossiltransferases têm baixa atividade hidrolítica e alta atividade de transfrutossilatação mesmo em baixas concentrações de sacarose (Antošová & Polakovi, 2001; Singh & Gill, 2006).

As plantas necessitam de duas enzimas distintas para catalisar o alongamento da cadeia de frutanos, especificamente do tipo inulina: a sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST; E.C. 2.4.1.99), que atua de forma irreversível no sentido da síntese e a frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT; E.C. 2.4.1.100), que pode atuar tanto no sentido de síntese quanto no de hidrólise. Por outro lado, a maior parte dos microrganismos sintetizam FOS empregando apenas uma enzima com ambas as atividades (Velázquez-Hernandes *et al.*, 2009; Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 2014). Além disso, as enzimas de origem microbiana são

geralmente mais termoestáveis em comparação às derivadas de plantas, uma característica importante para aplicações biotecnológicas (Yun, 1996).

Muitas espécies fúngicas produzem enzimas envolvidas na biossíntese de FOS, no entanto, particularmente espécies de *Aspergillus*, *Aureobasidium* e *Penicillium* se destacam como as principais fontes dessas enzimas para fins industriais (Sangeetha *et al.*, 2005; Ghazi *et al.*, 2007). Normalmente enzimas fúngicas com atividade de transfrutossilacção geram 1-cestose (GF₂), 1-nistose (GF₃) e ¹F-frutofuranosilnistose (GF₄), em que uma, duas ou três unidades de frutose são ligadas à molécula de sacarose, respectivamente (Yun, 1996; Vega & Zuniga-Hansen, 2014). Segundo Sangeetha *et al.* (2004), são produzidos em escala industrial, 65% de FOS, 25% de glicose, 5% de frutose e 5% de sacarose. Após purificação por cromatografia o produto comercial apresenta 95% de FOS (37% de 1-cestose, 53% de nistose e 10% de ¹F-frutofuranosilnistose) e 5% de sacarose e monossacarídeos (Bornet *et al.*, 2002). A síntese de FOS a partir da sacarose pode ser considerada mais vantajosa do que a partir da hidrólise da inulina, uma vez que é possível produzir FOS com comprimento da cadeia ou com composição da mistura de FOS pré-determinada modulando apenas o tempo de reação (Nemukula *et al.*, 2009).

1.4. Fungos produtores de FOS

Atualmente, as principais fontes microbianas de enzimas com atividade de transfrutossilacção para produção de FOS em escala industrial pertencem aos gêneros *Aureobasidium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Os FOS produzidos por esses microrganismos geralmente são obtidos pela atividade enzimática de frutossiltransferases (FTase) e/ou frutofuranosidases (FFase) (Tabela 2) (Dominguez *et al.*, 2014).

Tabela 2. Produção de frutooligossacarídeos (FOS) por frutossiltransferase (FTase) e/ou frutofuranosidase (FFase) de diferentes espécies fúngicas.

Microrganismo	Enzima	Produção (%)	Referência
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Intra e extracelular FTase	58,0	Yun e Song (1993)
	Intra e extracelular FTase	56.6	Sangeetha <i>et al.</i> (2004a)
	Intra e extracelular FTase	NA	Vandáková <i>et al.</i> (2004)
	Intracelular FTase	59.0	Lateef <i>et al.</i> (2007)
	Extracelular FTase	64.1	Dominguez <i>et al.</i> (2012)
<i>Aspergillus flavus</i>	Extracelular FTase	63.4	Ganaie <i>et al.</i> (2013)
<i>Aspergillus japonicus</i>	Intra e/ou extracelular FTase	NA	Chen e Liu (1996)
	Extracelular FFase	46.0	Mussatto <i>et al.</i> (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	Extracelular FFase	41.0	Mussatto e Teixeira (2010)
	Extracelular FFase	NA	Wallis <i>et al.</i> (1997)
	Intra e extracelular FFase	26.0	Nguyen <i>et al.</i> (1999)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Extracelular FTase	55.8	Ganaie <i>et al.</i> (2013)
	Extracelular FTase	54.1	Sangeetha <i>et al.</i> (2004a)
	Extracelular FTase	57.4	Sangeetha <i>et al.</i> (2005a)
<i>Aspergillus terreus</i>	Extracelular FTase	24.4	Ganaie <i>et al.</i> (2013)
<i>Penicillium citrinum</i>	Intra e/ou extracelular	39.3	Lim <i>et al.</i> (2005b)
<i>Penicillium chysogenum</i>	Extracelular FTase	42.5	Ganaie <i>et al.</i> (2013)

NA: Não Avaliado

Adaptado de Dominguez *et al.* (2014).

Alguns fungos também são capazes de sintetizar FOS do tipo levano ou neolevano, os quais possuem maior atividade prebiótica (Marx *et al.*, 2000; Kilian *et al.*, 2002). Recentemente foi demonstrado que *Gliocladium virens* produz 6-cestose e 1-cestose (Fialho *et al.*, 2013). A síntese destes FOS na proporção de 3:1 também foi relatada em *Schwanniomyces occidentalis* (Álvaro-Benito *et al.*, 2010). Outros fungos também foram capazes de sintetizar FOS do tipo levano e neolevano como relatado em *Rhodotorula* sp. (Hernalsteens & Maugeri, 2008), *P. citrinum* (Lim *et al.*, 2007) e *P. purpurogenum* (Dhake & Patil, 2007).

O significado biológico da produção de FOS por microrganismos é incerto. É possível que fungos isolados de ambientes ricos em sacarose, tais como frutas, possam usar a síntese de FOS como proteção contra estresse osmótico. A hidrólise da sacarose com formação de glicose e frutose acarreta na elevação da pressão osmótica no ambiente devido ao aumento do número de moléculas de açúcar. Por outro lado o número de moléculas não é alterado na transformação da sacarose em FOS. Além disso, a produção de FOS pode ser vantajosa contra microrganismos competidores que são capazes de usar a sacarose, mas não os FOS, que são muito menos suscetíveis a hidrólise microbiana (Yoshikawa *et al.*, 2006).

1.5. O Cerrado como fonte de fungos que metabolizam frutanos

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, representando 21% do território nacional, superado em área apenas pela floresta amazônica, e é considerado um *hotspot* de biodiversidade. O termo "Cerrado" é comumente usado para designar um conjunto de ecossistemas (cerrado, campos e matas de galeria) e caracteriza-se por uma estação seca bem definida (Coutinho, 2002; Batalha, 2011). A vegetação do Cerrado é composta por numerosas espécies adaptadas à seca e ao fogo, em que predominam as espécies herbáceas (Mantovani &

Martins, 1988). As espécies mais representativas pertencem à família Asteracea e cerca de 60% destas armazenam grandes quantidades de frutanos do tipo inulina em seus órgãos subterrâneos (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986; Tertuliano e Figueiredo-Ribeiro, 1993). A rizosfera destas plantas compreende uma zona com elevada exsudação de carboidratos e intensa atividade microbiana devido à presença de bactérias e de fungos filamentosos capazes de produzir enzimas que metabolizam frutanos (Vullo *et al.*, 1991; Cordeiro-Neto *et al.*, 1997).

Estima-se que existam cerca de 70 a 100 mil espécies de fungos (incluindo os linquenizados) no Cerrado (Dianese, 2000). Considerando a grande biodiversidade nos trópicos, para cada espécie de planta vascular estão associados de seis a oito fungos (Hawksworth, 1991; 2001); entretanto, estudos mais recentes realizados na Universidade de Brasília (UnB) constataram a associação de mais de 25 espécies fúngicas por espécie vegetal (Dianese *et al.*, 1997).

Usando inulina como única fonte de carbono, Cordeiro Neto *et al.* (1997) isolaram 50 espécies de fungos filamentosos a partir da rizosfera de *Calea platylepsis*, *Vernonia cognata*, *Vernonia herbacea*, *Viguiera discolor* e *Viguiera aff-robusta*, todas Asteraceas nativas do Cerrado. Muitos desses fungos foram capazes de produzir inulinases extracelulares. Estudos sobre a caracterização de algumas dessas enzimas, particularmente em relação à afinidade por diferentes substratos, e capacidade das mesmas de produzirem FOS foram realizados por Pessoni *et al.* (1999; 2007).

A síntese de FOS por *Gliocladium virens*, outro fungo isolado da rizosfera de *V. herbacea*, foi estudada por Pessoni *et al.* (2009). Os autores constataram que quando esse fungo é cultivado até 18 dias em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose ocorre a produção de FOS, principalmente 1-cestose, nistose e ¹F-frutofuranosilnistose. Também foram observadas diferenças nos níveis de FOS produzidos quando o fungo foi cultivado em 3 e 30 g L⁻¹ de

sacarose, o que sugere uma relação entre a concentração da fonte de carbono com a produção de FOS (Pessoni *et al.*, 2009). Mais recentemente, foi demonstrado que *G. virens* produz altos níveis de 6-cestose e 1-cestose em 150 g L⁻¹ de sacarose (Fialho *et al.*, 2013).

Os fungos filamentosos *Neocosmospora vasinfeca* e *Paecilomyces lilacinum*, também isolados da rizosfera de Asteraceae do Cerrado, apresentaram menor capacidade de hidrolisar sacarose (15 g L⁻¹) após 5 dias de cultivo quando comparado com os outros dois isolados estudados (*Humicola fuscoatra* e *Tiarospora perforans*). No entanto, as análises dos filtrados das culturas de *N. vasinfeca* evidenciaram a presença de FOS com predominância de 1-cestose. Em contraste, os FOS não foram detectados na cultura de *H. fuscoatra* cultivado em meio contendo sacarose, sendo encontrada apenas atividade endo-inulinásica (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 2014), embora relativamente baixa quando comparada à apresentada por *P. janczewskii* (URM 3511), isolado da rizosfera de *V. herbacea*. O fungo *P. janczewskii* se mostrou promissor na produção de grandes quantidades de proteínas extracelulares com atividade inulinásica e invertásica quando cultivado em meio contendo, respectivamente, inulina ou sacarose como fontes de carbono (Pessoni, 2002; Pessoni *et al.*, 1999; 2007). Estudos com um novo isolado de *P. janczewskii* (CCIBt 3352) demonstraram que esta cepa é capaz de produzir elevados níveis de enzimas com atividade invertásica e de transfrutoseilação, levando à produção de 1-cestose e neocestose em meio de cultivo contendo 30, 100 e 150 g L⁻¹ de sacarose (Simões *et al.*, não publicado). Contudo, as condições ótimas de produção desses FOS e de atividade enzimática, como a concentração de sacarose no meio e a investigação da presença de enzimas intracelulares neste organismo, ainda não foram investigadas.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o crescimento de *Penicillium janczewskii* e sua capacidade de produzir frutooligossacarídeos (FOS) e enzimas envolvidas na síntese desses carboidratos, quando cultivado em meio filtrado ou autoclavado, contendo sacarose em diferentes concentrações. O trabalho objetivou também estabelecer as condições ótimas para determinação das atividades de síntese de FOS e de hidrólise da sacarose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico: cultivo, produção em meio líquido e análise dos filtrados

O fungo filamentososo *Penicillium janczewskii* Zaleski CCIBt 3352, originalmente isolado da rizosfera (Cordeiro-Neto *et al.*, 1997) de *Vernonia herbacea* (atualmente *Chrysolaena obovata* (Less.) M. Dematteis), foi obtido da Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Para obtenção dos inóculos o fungo foi crescido em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA, Difco) em estufa Fanem CB Retilínea a 28 °C, no escuro, por 7 dias. Foram utilizados como inóculo três discos (6 mm) do meio contendo micélio fúngico, obtidos com auxílio de furador de rolha esterilizado, que foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido Czapek, constituído pelos seguintes componentes (g L⁻¹): NaNO₃ (3), KH₂PO₄ (1), KCl (0,5), MgSO₄.7H₂O (0,5) e FeSO₄.7H₂O (0,01). Como fonte de carbono foi utilizada sacarose nas concentrações de 10, 30, 100, 150, 200, 300 e 400 g L⁻¹. Os meios foram esterilizados por

autoclavagem (121 °C por 15 min) ou filtrados empregando membranas de nitrocelulose de 0,22 µm. Após a adição do inóculo, as culturas foram mantidas em incubadora Tecnal TE-420 a 28 °C, no escuro, sob agitação orbital contínua (140 rpm). As coletas foram realizadas aos 10 e 16 dias de cultivo, conforme previamente estabelecido (Simões *et al.*, não publicado), sendo a massa micelial separada do meio de cultura por filtração a vácuo, empregando nylon do tipo pele de ovo. A biomassa fúngica foi liofilizada e pesada, sendo subtraída a massa média (N=3) dos inóculos liofilizados e retirados da mesma cultura. Os filtrados foram utilizados para análise de carboidratos, proteínas, pH e potencial osmótico, conforme descrito a seguir. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2. Análises de pH e de potencial osmótico

Para as análises de pH e de potencial osmótico foram utilizados os filtrados de cultura do fungo, sendo o valor de pH medido empregando-se pHmetro EDGE® Hanna® e o de potencial osmótico determinado com Osmômetro Vapro® 5520.

3.3. Determinação da concentração de proteínas, açúcares redutores e açúcares totais

Os filtrados de cultura foram submetidos à quantificação de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945), empregando-se como padrão uma mistura equimolar de glicose e frutose. Os açúcares totais foram quantificados pelo método de antrona, conforme descrito por Jermyn (1956), utilizando-se frutose como padrão.

3.4. Análise de carboidratos por HPAEC/PAD

Alíquotas de 2 mL dos filtrados das culturas foram deionizadas em colunas de troca iônica (10 x 1 cm), contendo resina catiônica (Dowex[®] 50W×8) e aniônica (Dowex[®] 1×8 100-Cl) (Sigma-Aldrich). Após purificação, o pH das amostras foi ajustado para 7 com solução de hidróxido de amônia 3M, sendo em seguida, liofilizadas e retomadas em 2 mL de água deionizada. Após filtração em membrana de nitrocelulose (0,22 µm) (Millipore), as amostras foram diluídas em água deionizada e analisadas por Cromatografia Líquida de Troca Aniônica de Alto Desempenho acoplada a Detector de Pulso Amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex ICS-3000 (USA), utilizando-se coluna Carbo Pack PA 1 (4 x 250 mm). A eluição foi realizada utilizando-se gradientes de hidróxido de sódio 150 mM (eluyente A) e acetato de sódio 500 mM em hidróxido de sódio 150 mM (eluyente B), conforme metodologia estabelecida por Shiomi *et al.* (1991) e Vieira *et al.* (1995). O tempo de eluição das amostras foi de 40 minutos cada, com fluxo de 0,250 mL min⁻¹. Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os padrões comerciais. A quantificação dos açúcares identificados foi realizada utilizando-se curvas com diferentes concentrações dos padrões (25, 50, 100 e 200 µg mL⁻¹), considerando a concentração e a área do pico de cada açúcar. Foram empregados padrões comerciais de frutose, glicose, sacarose, 1-cestose e nistose (Sigma-Aldrich), e padrões de neocestose e 6-cestose, gentilmente fornecidos pelo Dr. Norio Shiomi (Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, Japão).

3.5. Análise de carboidratos por CCD

A composição dos carboidratos solúveis também foi analisada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Amostras contendo 80 µg de açúcares totais foram aplicadas em placas prontas de sílica-gel 60254 20x20 cm (Merck). A CCD foi conduzida utilizando-se como fase móvel álcool isobutílico-álcool n-propílico-água (3:12:4; v:v:v), com desenvolvimento duplo totalizando 12 h de corrida. A revelação dos açúcares contendo frutose na molécula foi feita empregando-se solução de uréia/ácido ortofosfórico conforme descrito por Wise *et al.* (1955). A solução reveladora foi aplicada uniformemente sobre a placa com auxílio de um borrifador, seguido de secagem em estufa a 150 °C por três minutos. Foram empregados padrões comerciais de frutose, glicose, sacarose, 1-cestose e nistose (Sigma-Aldrich), e padrões de neocestose e 6-cestose cedidos por Dr. Norio Shiomi, como já mencionado acima.

3.6. Otimização dos ensaios enzimáticos

3.6.1. Filtração em gel para remoção dos açúcares

Os açúcares presentes nos filtrados das culturas foram removidos através de filtração em gel para os ensaios de atividade de hidrólise e de transfrutossilção. Para isto foram utilizadas seringas de 10 mL, empacotadas com resina Bio-Gel P6-DG (Bio-Rad). Alíquotas de 2 mL foram transferidas para as seringas adaptadas a um tubo cônico de 50 mL (tipo Falcon) coletor. O conjunto foi centrifugado (Internacional Centrifugal PR-2) a 1.380 g por 15 minutos a 4 °C. A amostra retida no tubo coletor foi então empregada para determinação de proteínas totais e das atividades enzimáticas.

3.6.2. Atividade de hidrólise

A determinação das condições ótimas da atividade de hidrólise da sacarose foi conduzida após a remoção dos açúcares presentes nos extratos enzimáticos conforme descrito no item 3.6.1. Alíquotas de 125 μL do extrato enzimático foram incubadas por 5 minutos na presença de 125 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, contendo diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600 e 800 g L^{-1}), a 55 °C. A determinação do pH ótimo foi conduzida utilizando 125 μL do extrato enzimático, na presença de 125 μL de tampão McIlvaine's variando o pH (3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5), contendo 10 g L^{-1} de sacarose e incubação por 30 minutos, a 55 °C. A temperatura ótima foi conduzida utilizando 125 μL de extrato enzimático, na presença de 125 μL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0, 10 g L^{-1} de sacarose variando a temperatura (30, 35,40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 e 85 °C), por 5 minutos de incubação. Para determinação do tempo ótimo foi utilizado 125 μL de extrato enzimático e 125 μL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 contendo 10 g L^{-1} de sacarose a 55 °C em diferentes tempos de incubação (5, 10, 15 e 30 minutos) e (1, 2, 4, 6, 8, 10, 16 e 24 horas). As atividades de hidrólise de sacarose foram determinadas por meio de quantificação dos açúcares redutores liberados empregando-se o método de ADNS (Miller, 1959). Para tal, foi usado o reagente contendo solução A: 2,5 g de ácido 3,5-Dinitrosalicílico (ADNS) em 75 mL de água e solução B: 75 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 50 mL de hidróxido de sódio 2M. As duas soluções foram reunidas e o volume ajustado para 250 mL.

As reações foram paralisadas através da adição de 250 μL do reagente ADNS. As misturas foram fervidas em banho-maria por 5 minutos, adicionados 2,5 mL de água destilada e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. Uma unidade enzimática foi considerada como sendo a quantidade de enzima que produz 1 μmol de glicose/frutose por minuto nas condições de ensaio. Foi utilizada como padrão uma mistura equimolar de glicose e frutose.

Os ensaios foram realizados em triplicata. Como controle foi realizado o mesmo ensaio descrito acima, entretanto foi acrescentada a mistura já na incubação 250 μL de ADNS para inativação das enzimas.

3.6.3. Atividade de transfrutossilacção

Após a remoção dos açúcares presentes nos extratos enzimáticos (item 3.6.1.), alíquotas de 125 μL foram incubadas durante 16 h na presença de 125 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, contendo diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600 e 800 g L^{-1}), a 55 °C. O pH ótimo foi determinado por meio de incubação por 16 h em tampão McIlvaine com (pH 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5), em 400 g L^{-1} de sacarose final, a 55 °C. A temperatura ótima foi determinada por incubação durante 16 h em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 variando a temperatura (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 e 85 °C) utilizando 400 g L^{-1} de sacarose (concentração final). O tempo ótimo de incubação foi determinado por 5, 10, 15, 30 minutos e 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16 e 24 horas, em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 a 55 °C. As reações enzimáticas foram paralisadas por fervura em banho-maria por 5 minutos, seguido de centrifugação a 9.000 g, por 5 minutos em microcentrífuga MiniSpin Eppendorf®. Como controles foram empregados extratos inativados em fervura por 5 minutos antes de serem adicionados ao tampão contendo sacarose nas diferentes condições citadas acima. As misturas de reação foram diluídas 100x em água deionizada e os produtos foram analisados por meio de HPAEC/PAD em sistema Dionex ICS-3000®, conforme descrito anteriormente. Uma unidade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de produto (FOS) por minuto nas condições de ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6.4. Extração e determinação de proteínas intracelulares

As proteínas intracelulares de *P. janczewskii* foram extraídas conforme descrito por Pessoni *et al.* (2009). O micélio fúngico foi coletado por filtração a vácuo, pesado e macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Após adição de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 (10 mL de tampão por grama de massa fresca), o material foi centrifugado (Sorvall® Super T21) a 3.100 g, por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi considerado o extrato enzimático bruto, o qual foi empregado para determinação das proteínas totais (Bradford, 1976) e para as análises enzimáticas como descrito no item 3.6.3.

3.7. Perfil eletroforético das proteínas extracelulares por SDS-PAGE

Os filtrados de cultura foram dialisados em membrana de celulose (21 mm de diâmetro e 30 cm comprimento), com limite de exclusão de 12.000 Da (Sigma Aldrich) por um período total de 24 horas. A diálise foi realizada contra água destilada a 4 °C em câmara fria por uma noite, com trocas de água a cada 2 horas no período diurno. Após diálise as amostras foram liofilizadas re-suspendidas em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, sendo o teor de proteínas determinado pelo método de Bradford (1976), conforme já descrito.

O perfil eletroforético das proteínas extracelulares de *P. janczewskii* foi avaliado por meio de eletroforese em sistema desnaturante, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Foi utilizado poliacrilamida a 10% para o gel de separação e 4% para o gel de empilhamento. As amostras contendo o equivalente a 40 µg de proteínas totais foram preparadas na proporção de 1:1 em tampão de amostra constituído por glicerol 27% (v/v), SDS 6% (m/v), azul de bromofenol 0,01% (m/v), Tris-HCl 0,12 M (pH 6,8), na

presença de 10% (v/v) de β -mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas durante 5 min em água fervente e aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada empregando-se o tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M (pH 8,3), glicina 0,19 M e SDS 0,1% (m/v). Após aproximadamente 1 hora de corrida, sob corrente de 60 V, procedeu-se a coloração das proteínas com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) em metanol:ácido acético glacial:água deionizada (4:1:5; v:v:v), durante 30 minutos sob agitação constante. Em seguida, o excesso de corante foi removido e o gel mantido em solução descorante forte constituída de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) por 1-3 horas até a visualização das bandas de proteína.

Como marcadores moleculares foram utilizados miosina (200 kDa), β -galactosidase (116,2 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina de soro bovino (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa), todos integrantes do conjunto para calibração de massa molecular “Broad Range” da Bio-Rad (USA). O gel foi fotografado sob luz branca empregando-se sistema documentador de captura de imagem modelo L-Pix Touch, da Loccus do Brasil.

A determinação da massa molecular das proteínas detectadas foi feita através do cálculo da mobilidade relativa da proteína de interesse e sua localização na curva de calibração traçada com os valores da mobilidade relativa das proteínas marcadoras, contra os logaritmos de suas massas moleculares, conforme Weber & Osborn (1969).

3.8. Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e para comparação dos dados quantitativos de massa seca, proteínas, pH e produção de FOS foi realizado o teste ANOVA utilizando-se o programa SISVAR 4.3. Foi aplicado o teste de Tukey com 5% de significância, comparando-se as diferentes concentrações de sacarose no meio filtrado e

autoclavado e também comparando o meio filtrado e autoclavado em cada concentração de sacarose.

4. RESULTADOS

4.1. Aspectos morfológicos de *P. janczewskii*

A morfologia de *P. janczewskii* CCIBt 3352 cultivado durante 7 dias em meio BDA foi observada através de microscopia óptica (Figura 5). O fungo produziu conidióforos em forma de pincel com ramificações (Figura 5A), conídios (Figura 5B), hifas septadas e fiálides (Figura 5C). Na Figura 5D é possível observar o aspecto geral das hifas do fungo.

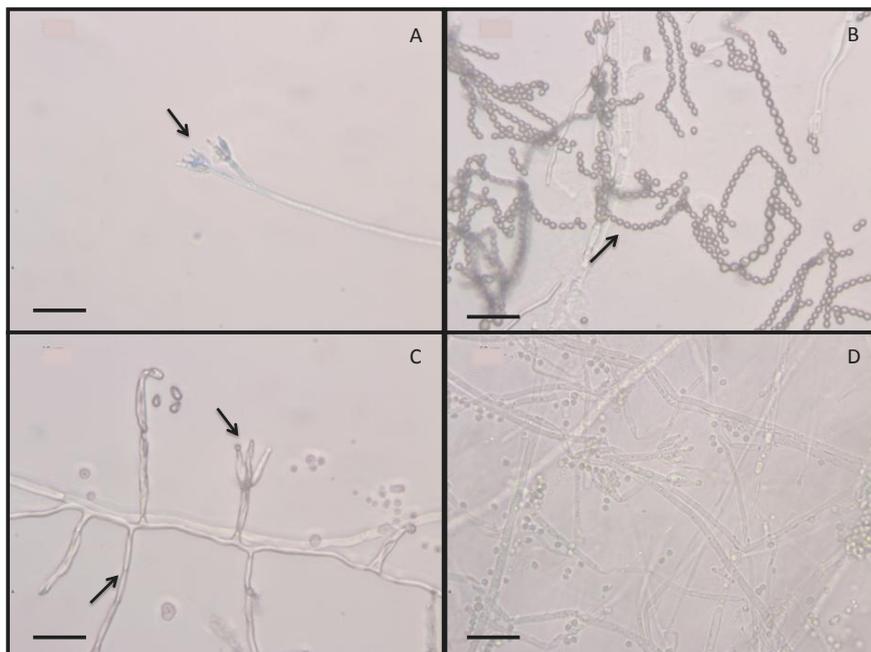


Figura 5. Estruturas vegetativas e reprodutivas de *P. janczewskii* CCIBt 3352 cultivado meio BDA, observadas através de microscopia óptica. Destaque para o conidióforo em forma de pincel com ramificação (A), conídios (B), hifas septadas, fiálides e conidióforos (C) e aspecto geral do fungo (D). Barra = 10 μ m. Aumento de 400x.

O fungo foi isolado originalmente da rizosfera de *Vernonia herbacea* (Figura 6A), Asteraceae do Cerrado que acumula inulina nos órgãos subterrâneos. Quando cultivado em meio BDA, houve a formação de micélio de coloração verde acinzentada devido à grande quantidade de conídios (Figura 6B). Por outro lado, quando *P. janczewskii* foi cultivado em meio líquido Czapek, suplementado com diferentes concentrações de sacarose, variando entre 10 e 400 g L⁻¹, foram produzidas massas miceliares agregadas conhecidas como péletes (Figura 6C). Também foi possível observar diferença na coloração do meio nas diferentes concentrações de sacarose. As hifas ficaram mais hialinas com o aumento da concentração de sacarose, porém não foi analisada a espessura da parede celular, a fim de verificar alterações nessa estrutura em função da concentração do substrato.

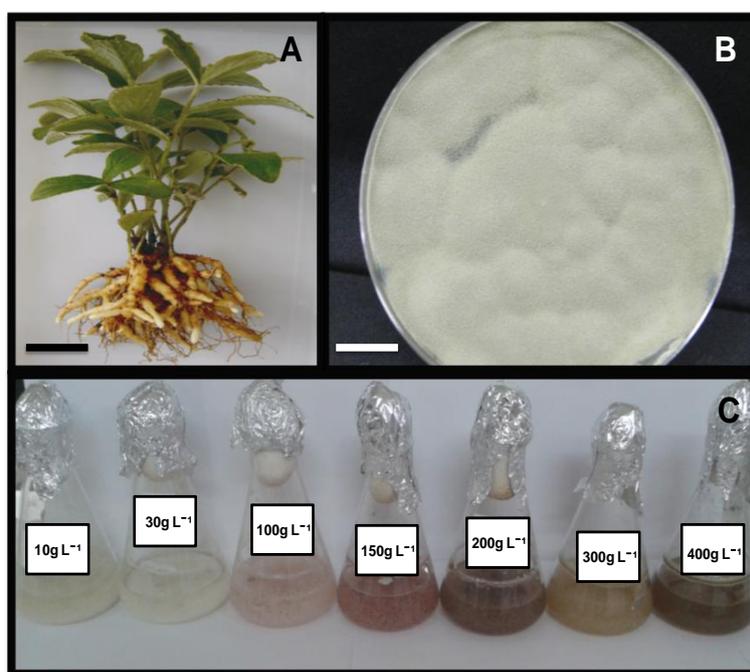


Figura 6. Planta de *Vernonia herbacea* (atualmente *Chrysolaena obovata*), acumuladora de frutanos do tipo inulina nos rizóforos (A), barra 20 cm. Colônia de *P. janczewskii* CCIBt 3352 cultivado em meio BDA por 7 dias no escuro a 28 °C (B), barra 1 cm; e cultivado em meio líquido Czapek suplementado com diferentes concentrações de sacarose (10 a 400 g L⁻¹), por 10 dias no escuro a 28 °C, sob agitação contínua de 140 rpm (C). (Foto de *V. herbacea* gentilmente cedida pela Dra. M.A.M. Carvalho).

4.2. Produção de biomassa e proteínas extracelulares

Penicillium Janczewskii CCIBt 3352 apresentou tendência de aumento na produção de biomassa em função do aumento da concentração de sacarose disponível no meio, tanto em 10 dias quanto em 16 dias de cultivo (Figura 7A e B). No entanto, esta tendência não foi observada com o aumento da fonte de carbono a partir de 200 g L⁻¹. Também foi possível observar que o cultivo em meio autoclavado (Figura 7A e B) foi menos favorável à produção de biomassa fúngica que o meio filtrado em membranas de nitrocelulose de 0,22µm (Figura 7A e B). Em média, *P. janczewskii* produziu em meio filtrado 2,5 vezes mais biomassa do que em meio autoclavado.

A produção de proteínas extracelulares pelo fungo, diferentemente da produção de biomassa, foi inversamente proporcional à concentração de sacarose (Figura 7C e D). Foi detectada maior secreção de proteínas em meio contendo 10 g L⁻¹. No entanto, os níveis de proteínas diminuíram em função do aumento da disponibilidade da fonte de carbono até a concentração de 100 g L⁻¹ e a partir de então os níveis de proteínas estabilizaram. O meio autoclavado, além de não favorecer a produção de biomassa (Figura 7A e B), também não foi propício à secreção de proteínas (Figura 7C e D), quando comparado ao meio filtrado (Figura 7C e D). Considerando 16 dias de cultivo em 10 g L⁻¹ de sacarose, a produção de proteínas extracelulares no meio filtrado foi aproximadamente 1,5 vezes maior que em meio autoclavado.

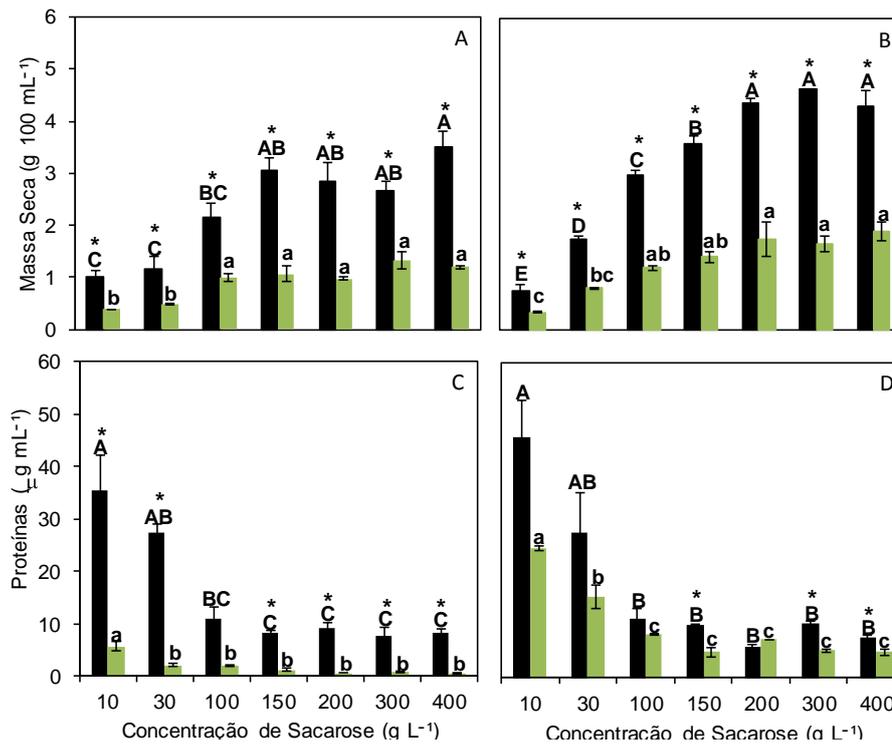


Figura 7. Produção de biomassa por *P. janczewskii* CCIBt 3352, após 10 (A) e 16 (B) dias de cultivo em meio filtrado (■) e meio autoclavado (■) em membranas de 0,22 μm (B) e produção de proteínas extracelulares, após 10 (C) e 16 (D) dias de cultivo em meio filtrado (■) e meio autoclavado (■). Os meios continham de 10 a 400 g L^{-1} de sacarose como fonte de carbono. As barras representam o erro padrão ($n=3$). As letras maiúsculas e minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose no meio filtrado e autoclavado, respectivamente, e * compara o meio filtrado com o meio autoclavado em cada concentração de sacarose (Tukey $p < 0,05$).

4.3. Variação do pH e potencial osmótico dos filtrados de cultura

Houve tendência de alcalinização do meio após 10 e 16 dias de cultivo na presença de sacarose nas concentrações 10, 30 e 100 g L^{-1} (Figura 8A e B). No entanto, em concentrações superiores de substrato (150 a 400 g L^{-1}), o pH do meio se manteve próximo ao pH inicial, em

torno de 5,0. Na concentração de 10 g L⁻¹, o meio autoclavado (Figura 8A e B) apresentou menor alcalinização do que o meio filtrado (Figura 8A e B), com diferença de uma unidade de pH. No entanto, em concentrações maiores de substrato, de modo geral, não foram observadas diferenças significativas entre os dois meios. Foi avaliado o potencial osmótico do meio filtrado contendo diferentes concentrações de sacarose (Figura 9). O aumento do potencial osmótico do meio foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de sacarose. O potencial osmótico do meio contendo 400 g L⁻¹ de sacarose aumentou aproximadamente 12 vezes quando comparado ao meio contendo 10 g L⁻¹ de sacarose.

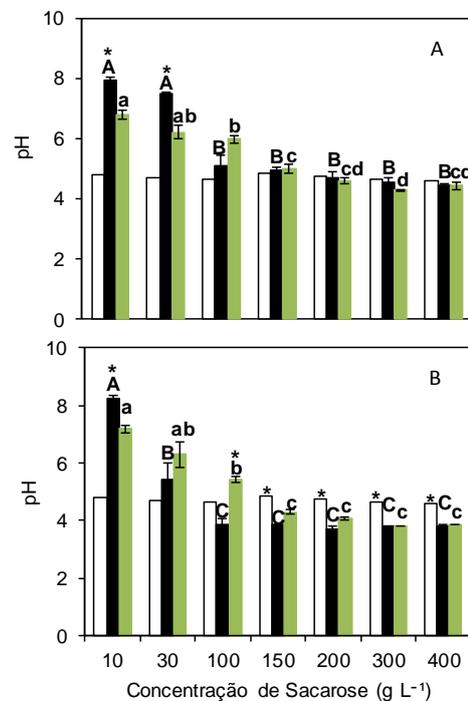


Figura 8. Variação do pH dos filtrados de cultura de *P. janczewskii* CCIBt 3352 obtida após 10 (A) e 16 (B) dias de cultivo em controle (□), meio filtrado (■) e meio autoclavado (■) em membrana 0,22 μm (B). Os meios continham 10 a 400 g L⁻¹ de sacarose como fonte de carbono. As barras representam o erro padrão (n= 3). As letras maiúsculas e minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose no meio filtrado e autoclavado, respectivamente, e * compara o meio filtrado com o meio autoclavado em cada concentração de sacarose (Tukey p<0,05).

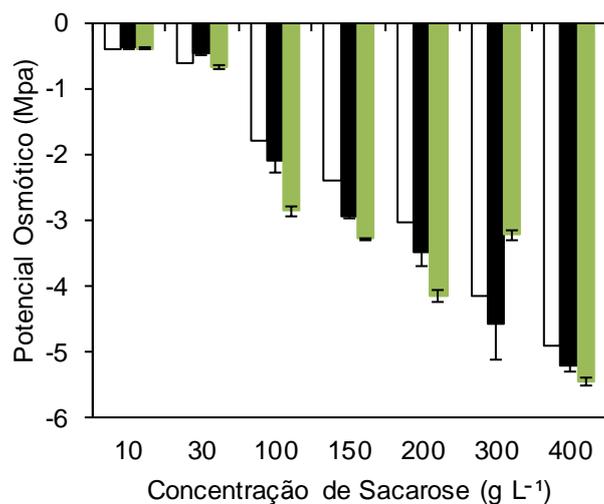


Figura 9. Potencial osmótico dos filtrados de cultura de *P. janczewskii* CCIBt 3352 em meio filtrado em membranas de 0,22 μm , após 0 (□), 10 (■) e 16 (■) dias de cultivo em meio contendo 10 a 400 g L^{-1} de sacarose como fonte de carbono. As barras representam erro padrão ($n = 3$).

4.4. Composição dos filtrados de cultura por HPAEC/PAD e CCD

A análise por HPAEC/PAD dos carboidratos presentes nos meios autoclavado e filtrado (Figura 10) revelou que após 10 dias de crescimento em 10 e 30 g L^{-1} de sacarose toda a fonte de carbono foi hidrolisada por *P. janczewskii*. No meio contendo 10 g L^{-1} de sacarose praticamente toda a glicose e frutose liberadas foram consumidas pelo fungo. Além disso, não foi observada a produção de FOS em baixas concentrações de sacarose. No entanto, nas concentrações de 150 a 400 g L^{-1} de sacarose, o fungo não consumiu toda a fonte de carbono e houve acúmulo de pelo menos quatro oligossacarídeos. Quando comparado ao meio autoclavado, o cultivo em meio filtrado proporcionou maior produção de oligossacarídeos. Dois destes oligossacarídeos foram identificados como sendo 1-cestose e neocestose. O

filtrado de cultura obtido após 10 dias de cultivo em meio contendo 200 g L^{-1} de sacarose foi analisado também por cromatografia em camada delgada (Figura 11). Através da utilização de revelador específico para açúcares contendo frutose na molécula, foi possível comprovar que além de 1-kestose e neocestose, os outros dois produtos não identificados também se tratam de FOS.

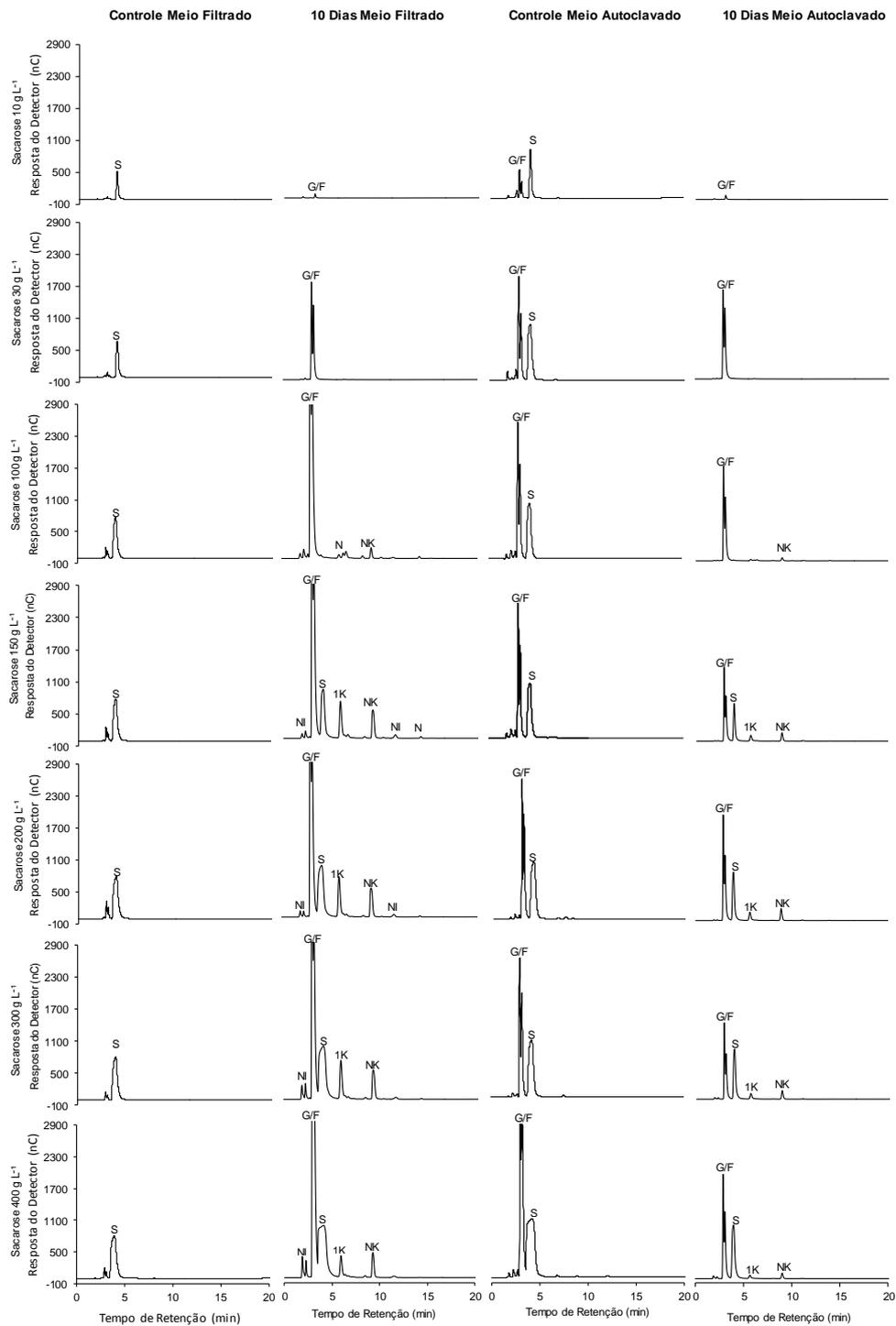


Figura 10. Perfil por HPAEC/PAD dos filtrados de cultura de *P. janczewskii* CCIBt 3352, aos zero e 10 dias de cultivo em meio filtrado em membranas de 0,22 μm ou autoclavado, contendo 10 a 400 g L^{-1} de sacarose. Os picos foram identificados usando-se padrões comerciais: G= glicose; F= frutose; S= sacarose; 1K= 1-cestose; NK= neocestose; e NI= não identificado.

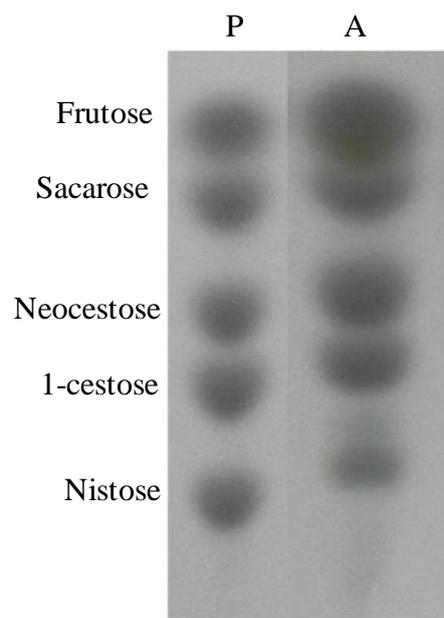


Figura 11. Cromatografia em camada delgada do filtrado de cultura de *P. janczewiskii* CCIBt 3352, obtido após 10 dias de cultivo em meio filtrado em membranas de 0,22 μm , contendo 200 g L^{-1} de sacarose. Foram utilizados 80 μg de açúcares totais (A) e como padrões (P) foram utilizados frutose, sacarose, neocestose, 1-cestose e nistose.

A maior produção de FOS ocorreu no meio filtrado contendo 200 g L^{-1} de sacarose aos 10 dias de cultivo, chegando a valores de 29 g L^{-1} de 1-cestose e 25 g L^{-1} de neocestose (Figura 12C e D), totalizando a produção de 54 g L^{-1} de FOS. No entanto, em concentrações de sacarose superiores a 200 g L^{-1} , a produção de FOS decresceu. No meio autoclavado, também contendo 200 g L^{-1} de sacarose (Figura 12A e B), a produção de 1-cestose e neocestose totalizou apenas 9 g L^{-1} .

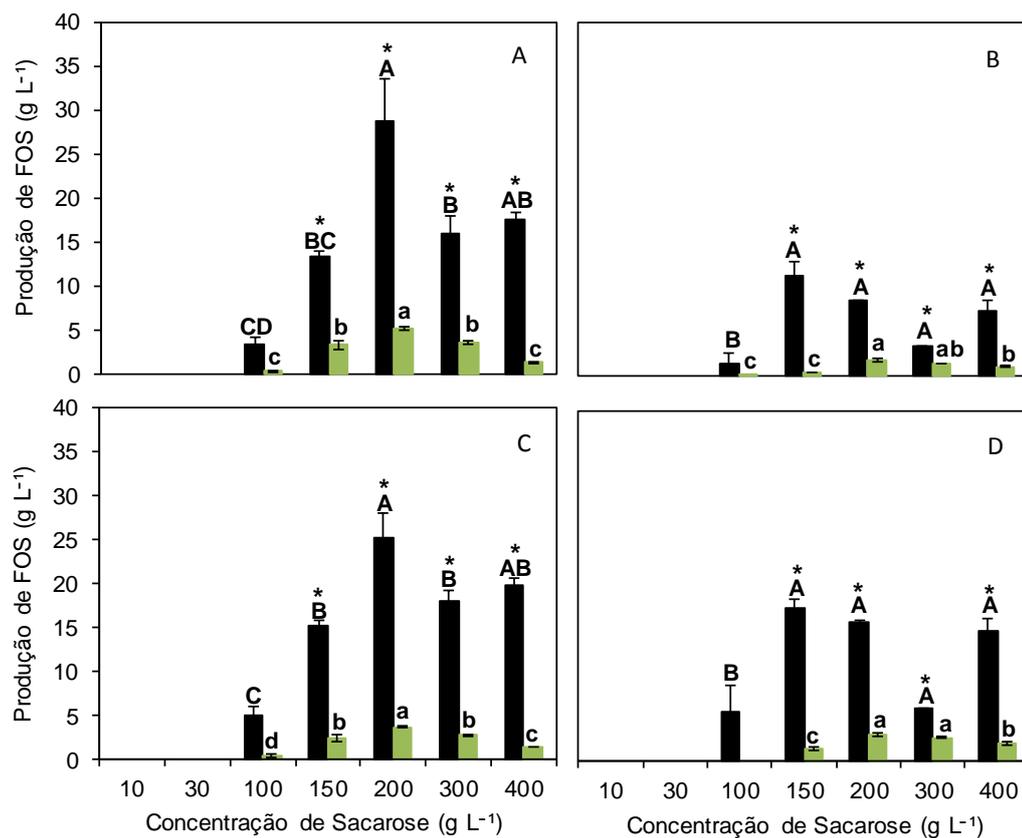


Figura 12. Produção de 1-cestose após 10 (A) e 16 (B) dias de cultivo e neocestose após 10 (C) e 16 (D) dias em meio contendo sacarose filtrado em membrana de 0,22 μm (■) e meio autoclavado (■) por *P. janczewskii* CCIBt 3352. Os cultivos foram realizados em meios de cultura contendo diferentes concentrações de 10 a 400 g L^{-1} de sacarose como fonte de carbono. As barras representam o erro padrão ($n=3$). As letras maiúsculas e minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose no meio filtrado e autoclavado, respectivamente, e * compara o meio filtrado com o meio autoclavado em cada concentração de sacarose (Tukey $p < 0,05$).

4.5. Perfil de eletroforético das proteínas extracelulares

A análise por SDS-PAGE das proteínas extracelulares de *P. janczewskii* cultivado em meio contendo 10, 200 e 400 g L⁻¹ de sacarose mostrou alterações do perfil proteico nas diferentes concentrações de sacarose. No meio contendo 10 g L⁻¹ de sacarose foram observadas duas bandas, respectivamente com massa molecular estimada em 48,8 e 20,8 kDa, não observadas nos meios contendo 200 e 400 g L⁻¹ de sacarose. Por outro lado, bandas com massa molecular de 60,1 e 56,1 kDa estavam presentes somente nas concentrações mais elevadas de sacarose, sendo mais evidentes em 400 g L⁻¹. As bandas com massa molecular 42,5, 38,3 e 33,3 kDa foram visualizadas em todos os três tratamentos. No entanto, apresentaram aumento de intensidade nas concentrações de 200 e 400 g L⁻¹ de sacarose.

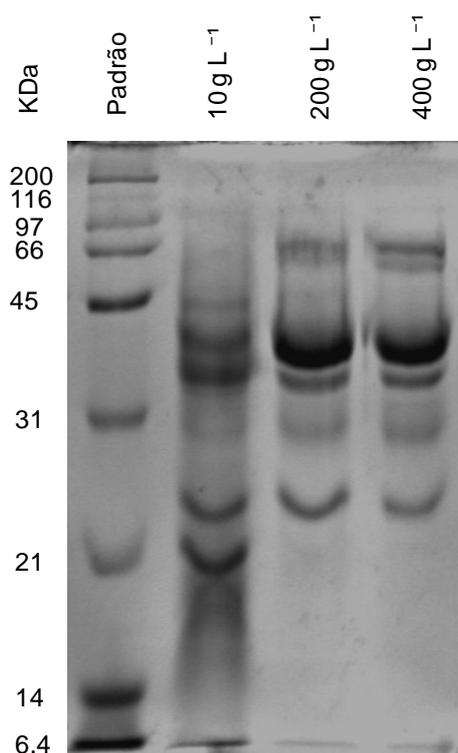


Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema desnaturante (SDS-PAGE) das proteínas extracelulares de *P. janczewskii* CCIBt 3352, obtidas após 10 dias de cultivo em meio filtrado em membrana de 0,22 μ m contendo 10, 200 e 400 g L⁻¹ de sacarose.

4.6. Otimização dos ensaios enzimáticos para determinação das atividades hidrolítica e de transfrutossilação

Com base nos experimentos anteriores, o fungo foi cultivado durante 10 dias em meio filtrado contendo 200 g L^{-1} de sacarose. O filtrado de cultura serviu como fonte de enzimas para a determinação das condições ótimas dos ensaios enzimáticos (atividade hidrolítica e de transfrutossilação). Com relação à atividade hidrolítica, foi verificado que o aumento da atividade foi inversamente proporcional ao aumento da concentração do substrato. Portanto, foi observada atividade máxima realizando a incubação na presença de 10 g L^{-1} de sacarose, decrescendo em concentrações mais elevadas (Figura 14A). Além disso, foram verificados três valores de pH ótimos (3,0, 5,0 e 6,0) (Figura 14B), já temperatura ótima foi estabelecida em $55 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 14C). O tempo de 10 minutos foi considerado ideal para determinação da atividade de hidrólise da sacarose (Figura 14D).

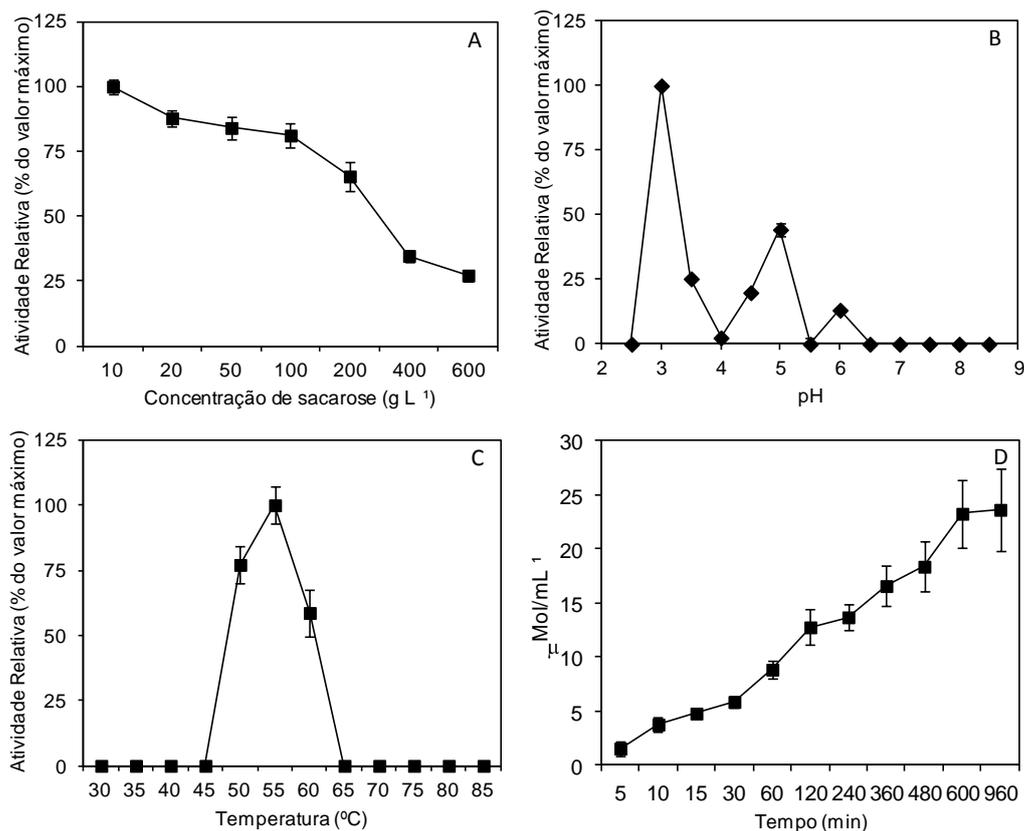


Figura 14. Efeito da concentração de sacarose (A), pH (B), temperatura (C) e tempo de incubação (D) sobre a atividade invertásica no filtrado de cultura de *P. janczewskii*, obtido após 10 dias de cultivo em meio contendo 200 g L⁻¹ de sacarose. As barras representam erro padrão (n = 3).

Também foram estabelecidas as melhores condições para determinação da atividade de transfrutossilagem para síntese de 1-cestose e neocestose. Ao contrário do que foi observado para a atividade hidrolítica, atividade máxima para síntese de FOS ocorreu em concentrações elevadas de sacarose (400 a 800 g L⁻¹), já em concentrações inferiores a 50 g L⁻¹ de sacarose, não foi detectada atividade de síntese significativa (Figura 15A). Os valores de pH e temperatura ótimos foram semelhantes aos observados para a atividade hidrolítica, pH 5,0 e 55 °C, respectivamente (Figura 15B e C). A síntese de FOS exigiu tempos de incubação

superiores aos observados para a atividade invertásica (Figura 15D). A atividade de transfrutoseilação foi máxima após 10 h de incubação, não sendo detectada atividade significativa de síntese de 1-cestose e neocestose em tempos inferiores a 6 e 8 h, respectivamente. Com base na otimização do ensaio enzimático, a produção de FOS através de síntese enzimática pôde ser estimada em 20 g L⁻¹ de 1-cestose, já a produção de neocestose foi significativamente menor (11 g L⁻¹) (Figura 16), portanto, 15,5% da sacarose disponível foram convertidas nos dois FOS.

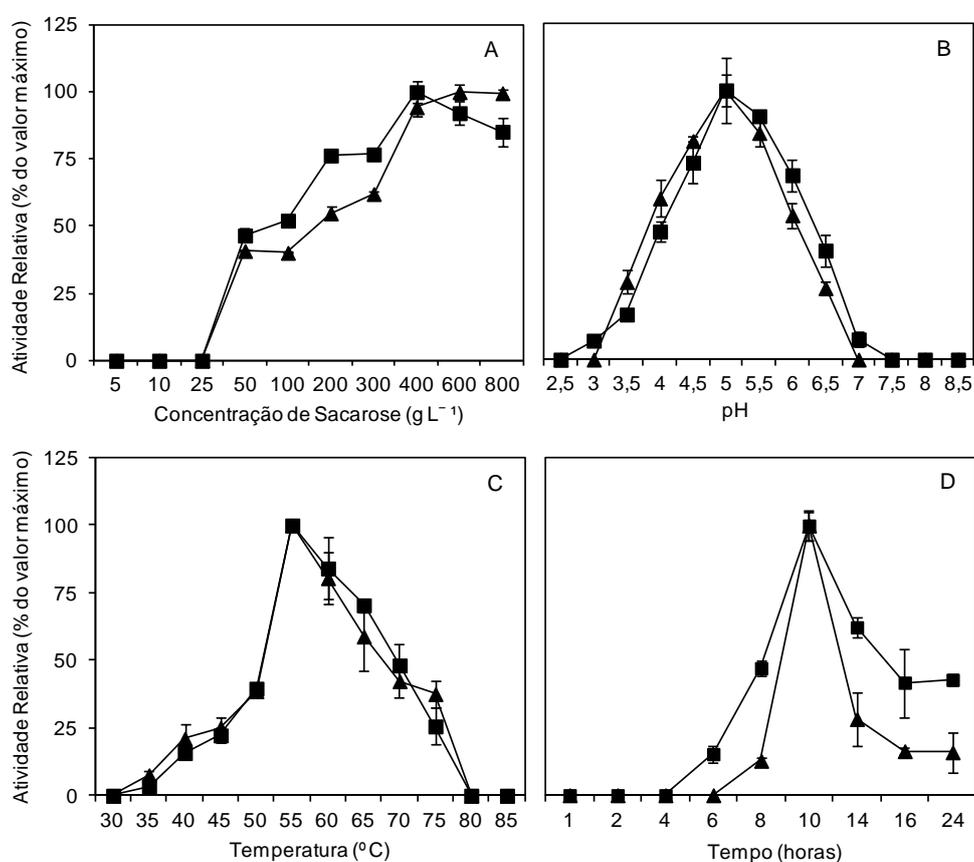


Figura 15. Efeito da concentração de sacarose (A), pH (B), temperatura (C) e tempo de incubação (D) sobre a atividade de transfrutoseilação no filtrado de cultura de *P. janczewskii*, obtido após 10 dias de cultivo em meio contendo 200 g L⁻¹ de sacarose. Quantidade de 1-cestose (■) e neocestose (▲). As barras representam erro padrão (n = 3).

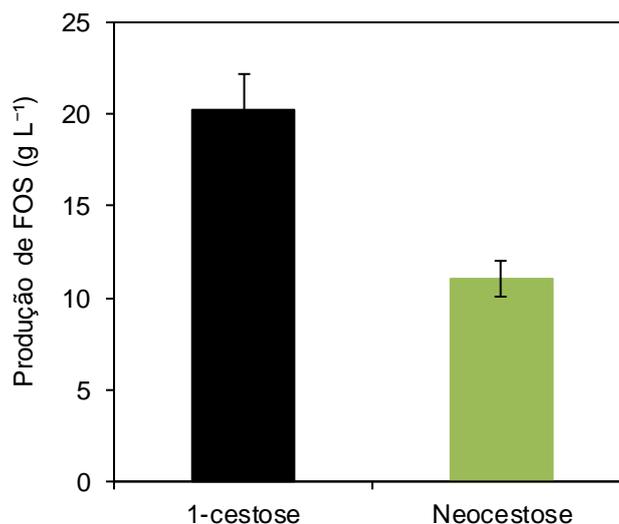


Figura 16. Produção de FOS através de síntese enzimática, utilizando o filtrado de cultura de *P. janczewskii*, empregando as condições ótimas de reação (sacarose 400 g L⁻¹, pH 5,0, a 55 °C por 10 h). O filtrado de cultura foi obtido após 10 dias de cultivo em meio contendo 200 g L⁻¹ de sacarose. As barras representam o erro padrão (n= 6).

4.7. Atividades enzimáticas e conteúdo de FOS no meio extracelular e intracelular

Também foi avaliada a atividade invertásica e de síntese de FOS utilizando extratos enzimáticos intra e extracelulares de *P. janczewskii*, obtidos a partir do cultivo do fungo durante 10 dias em meio filtrado contendo 200 g L⁻¹ de sacarose. Foi observada maior atividade hidrolítica sobre a sacarose no extrato extracelular, com valor 27% maior do que o encontrado no extrato intracelular (Figura 17A). O extrato extracelular também apresentou maior atividade de transfrutoseilação quando comparado ao extrato intracelular. A atividade de síntese de 1-kestose e de neokestose no extrato extracelular foi superior a 50% quando comparado ao extrato intracelular (Figura 17B).

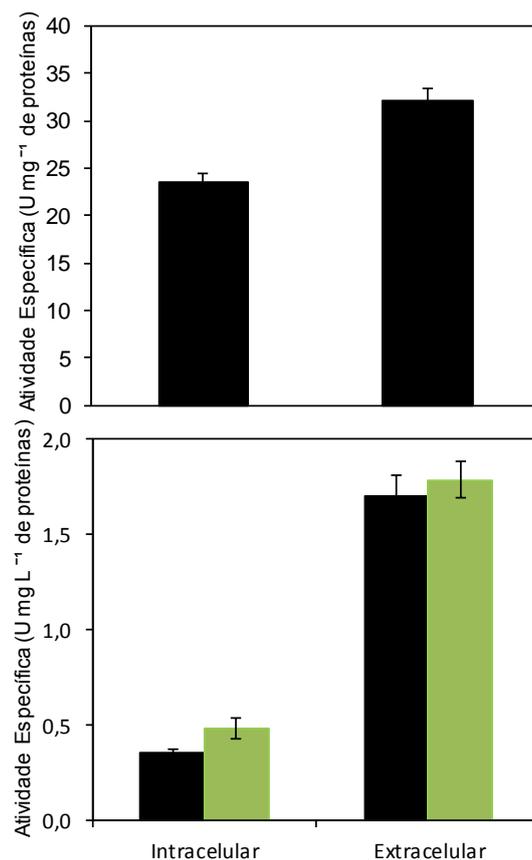


Figura 17. Atividade enzimática intracelular e extracelular de culturas de *P. janczewskii* obtidas após 10 dias de cultivo em meio contendo 200 g L⁻¹ de sacarose. Atividade hidrolítica (sacarose 10 g L⁻¹, pH, 5,0, 55 °C por 5 min) com formação de glicose (A), e atividade de transfrutosilação (sacarose 400 g L⁻¹, pH, 5,0, 55 °C por 16 h) com formação de 1-cestose (■) e neocestose (■) (B). As barras representam o erro padrão (n =6).

Menor teor de proteínas foi observado no meio extracelular (14,9 µg mL⁻¹) em relação ao intracelular (22,3 µg mL⁻¹) - (Figura 18A). A quantificação de 1-cestose e neocestose no extrato extracelular mostrou níveis acima de 50 g L⁻¹, entretanto, não foi detectada a presença de FOS no extrato intracelular (Tabela 3).

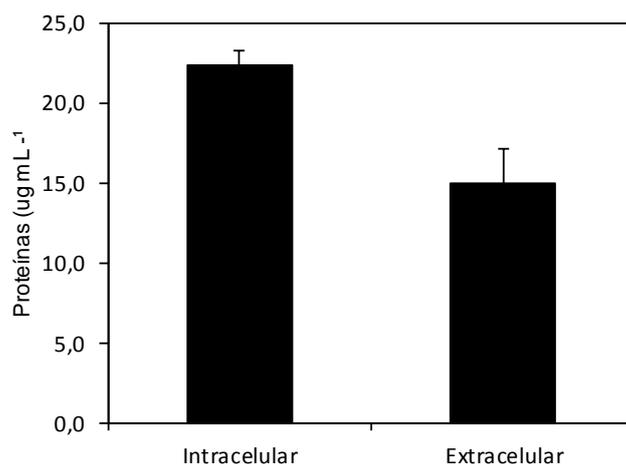


Figura 18. Concentração de proteínas nos extratos intracelulares e extracelulares de culturas de *P. janczewskii*, obtidas após 10 dias de cultivo em meio contendo 200 g L⁻¹ de sacarose como fonte de carbono. As barras representam o erro padrão (n= 6).

Tabela 3. Produção de 1-cestose e neocestose nos extratos extracelular e intracelular de *Penicillium janczewskii*, após 10 dias de cultivo em meio contendo 200 g L⁻¹ de sacarose como fonte de carbono.

Extrato	1-Cestose (g L ⁻¹)	Neocestose (g L ⁻¹)	Total (g L ⁻¹)
extracelular	25,923	26,446	52,372
intracelular	0,000	0,000	0,000

5. DISCUSSÃO

O organismo utilizado neste trabalho foi o fungo filamentosso *Penicillium janczewskii* CCIBT 3352, isolado originalmente da rizosfera de *V. herbacea*. A análise da morfologia do fungo realizada através de microscopia de luz indicou a presença de estruturas em forma de pincel com ramificações, conídios, hifas septadas e fiálides, características que o qualificam como sendo do gênero *Penicillium*, anamórfico, pertencente à classe Hyphomycetes (reprodução assexuada através de estruturas denominadas conídios), e importante componente da micobiota de solo. No Brasil foi isolado em solos dos estados de Pernambuco, São Paulo e Amazonas (Maia *et al.*, 2006).

O cultivo de *P. janczewskii* em meio líquido Czapek contendo altas concentrações de sacarose resultou em maior pigmentação da cultura, quando comparado ao cultivo em baixas concentrações de sacarose. Os pigmentos são encontrados principalmente na parede celular, mas também estão presentes no meio extracelular (Butler & Day, 1998). Os pigmentos da parede, comumente polifenólicos, funcionam como reforço da rede de proteínas e polissacarídeos, através de ligações cruzadas oxidativas ou pela impregnação com um polímero hidrofóbico (Peter, 2001). Esses compostos conferem diferentes colorações às culturas e muitas micotoxinas também são pigmentadas como as naftoquinonas de *Penicillium* e *Aspergillus* sendo antioxidativas (Buzzini & Martini, 1999; Durán *et al.*, 2001). As melaninas protegem os organismos contra estresses ambientais, como por exemplo, exposição a metais pesados, limitação de nutrientes, alterações no pH do meio, radiação UV e condições hiperosmóticas (Loguercio-Leite *et al.*, 2006). Sendo assim, a maior produção de pigmento nas culturas poderia estar relacionada à elevada concentração de sacarose.

O padrão de crescimento observado foi muito semelhante ao verificado por Pessoni *et al.* (2005; 2007) para uma cepa diferente de *P. janczewskii* (URM 3511), porém cultivada em concentrações inferiores de sacarose (10 g L^{-1}). Em *Aureobasidium pullulans* o crescimento exponencial foi observado durante 4,5 dias de cultivo em meio basal contendo 200 g L^{-1} de sacarose como fonte de carbono (Yun *et al.*, 1997). Em *Gliocladium virens* a produção de biomassa também foi proporcional ao aumento da fonte de carbono em 3 e 6 dias de cultivo em meio contendo sacarose variando entre 10 g L^{-1} e 150 g L^{-1} (Fialho *et al.*, 2013). O mesmo padrão de crescimento também foi observado neste trabalho.

Diferentemente do esperado, o cultivo de *P. janczewskii* em meio autoclavado resultou em menor produção de biomassa e de proteínas extracelulares quando comparado ao cultivo em meio filtrado. A autoclavagem do meio resulta em hidrólise térmica de parte da sacarose, liberando glicose e frutose. A maior concentração de monossacarídeos no meio facilitaria a absorção da fonte de carbono pelo organismo, reduzindo o gasto energético para a síntese de invertases. No entanto, a alta temperatura empregada no processo de autoclavagem do meio pode acarretar na formação de substâncias tóxicas para célula como ácidos fracos e compostos furânicos (Palmqvist & Hahn-Hagerdal, 2000; Klinke *et al.*, 2004).

Os compostos furânicos 5-hidroximetilfurfural (HMF) e o furfural apresentam maior potencial tóxico (Dunlop, 1948; Antal *et al.*, 1991; Larsson *et al.*, 1999; Lewkowski, 2001) e seu efeito inibitório depende da concentração e da sensibilidade da espécie exposta (Almeida *et al.*, 2007). Esses compostos podem afetar a fisiologia celular através da redução da atividade de enzimas, desnaturação do DNA, inibição da síntese de RNA e de proteínas, e danos à parede celular, resultando, portanto, em baixa viabilidade e desenvolvimento do organismo (Zaldivar *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2011). Baptista *et al.* (2013) avaliando o efeito inibitório do hidroximetilfurfural na fermentação alcoólica por *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269 concluíram que o composto afeta o crescimento da levedura

devido à perda de integridade e do potencial da membrana citoplasmática. Os autores também constataram a completa inibição do crescimento e do processo de fermentação realizado pela levedura na presença do hidroximetilfurfural na concentração de 15 g L⁻¹. Petersson *et al.* (2006) atribuiu ao hidroximetilfurfural o efeito de acúmulo de lipídios e a redução de proteínas em leveduras, o que também pode ter ocorrido em *P. janczewskii*. Portanto, o menor desenvolvimento de *P. janczewskii* em meio autoclavado pode ser explicado, pelo menos em parte, pela provável formação de furfurais e hidroximetilfurfural tóxicos a partir da sacarose submetida à alta temperatura.

Maior produção de proteínas foi detectada em meio contendo baixa concentração de sacarose (10 g L⁻¹ de sacarose). Em estudos com a cepa URM 3511 de *P. janczewskii*, Pessoni *et al.* (2007) constataram alto teor de proteínas até o 9º dia de crescimento em 10 g L⁻¹ de sacarose, atingindo níveis de cerca de 100 ug mL⁻¹, os quais são superiores aos detectados no cultivo de *P. janczewskii* CCIBT 3352. Observação semelhante também foi relatada por Fialho *et al.* (2013), estudando o fungo *G. virens*. Os autores verificaram que em concentrações de sacarose superiores a 150 g L⁻¹, o teor de proteínas extracelulares não foi significativamente alterado. Provavelmente isso ocorre devido à limitação de nitrogênio, visto que estudos anteriores realizados por Pessoni *et al.* (2009) mostraram que mudanças nas fontes e concentrações de nitrogênio podem aumentar os níveis de proteínas extracelulares em *G. virens*.

O cultivo de *P. janczewskii* em 10 e 30 g L⁻¹ de sacarose resultou em alcalinização do meio, principalmente no meio filtrado, no entanto, quando na presença de concentrações superiores da fonte de carbono, o fungo apresentou tendência de acidificação do meio após 16 dias de cultivo. Mashiro *et al.* (2008) constataram que culturas líquidas de *Aspergillus oryzae*, sem a presença de sacarose ou em baixas concentrações (10 g L⁻¹) apresentam pH alcalino (pH 8,8), no entanto, quando há excesso da fonte de carbono (50 g L⁻¹), o pH torna-se ácido

(pH 4,9). Segundo os autores, o pH afetou a atividade enzimática do fungo. O pH inicial do meio desempenha papel chave na produção e estabilidade de enzimas, na utilização dos nutrientes presentes no meio e no crescimento do microrganismo (Kim *et al.*, 2000; Dhake & Patil, 2005). Um sistema de regulação gênica garante que enzimas sejam secretadas predominantemente quando o pH do meio extracelular se encontra próximo ao pH ótimo dessas enzimas (Maccheroni Jr., 2004).

O aumento do potencial osmótico do meio foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de sacarose, significando, portanto, a elevação da pressão osmótica. A hidrólise enzimática da sacarose libera glicose e frutose resultando em aumento do número de moléculas livres, elevando ainda mais a pressão osmótica no meio. A síntese de FOS pode ser um mecanismo empregado pelo organismo a fim de proporcionar proteção contra esse estresse (Yoshikawa *et al.*, 2006).

Após 10 dias de cultivo em meio contendo 10 e 30 g L⁻¹ de sacarose, *P. janczewskii* consumiu toda a fonte de carbono disponibilizada e não foi detectada a formação de FOS. Provavelmente, o fungo empregou os FOS produzidos como fonte alternativa de carbono quando a sacarose no meio foi esgotada. No cultivo em concentrações variando entre 150 e 400 g L⁻¹ de sacarose foram detectados glicose, frutose, sacarose e níveis substanciais de FOS. Portanto, a baixa concentração de sacarose favorece predominantemente a hidrólise e assimilação do dissacarídeo como fonte de carbono, no entanto, quando há alta disponibilidade de sacarose, o fungo consome a fonte de carbono e o excesso pode ser empregado na síntese de FOS. Neste estudo foram identificados dois tipos diferentes de FOS, a 1-cestose do tipo inulina, formada por cadeias lineares e a neocestose da neoserie, com cadeias ramificadas.

A síntese de FOS do tipo levano e neolevano como a 6-cestose e a neocestose, respectivamente, é incomum em fungos filamentosos, mas relativamente bem documentada

em leveduras tais como *S. cerevisiae*, *Schwanniomyces occidentalis* e *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Fialho *et al.*, 2013).

Embora pouco documentada a síntese de neocestose desperta interesse, pois estudos têm demonstrado que neo-FOS são mais estáveis que os FOS do tipo inulina, visto que os neo-FOS possuem uma estrutura ramificada que confere maior estabilidade em relação aos FOS com estruturas lineares (Lim *et al.*, 2007). Neo-FOS apresentam estabilidade de 95% depois de 48 horas a 80 °C. Além disso, apresentam baixa viscosidade, resultando em menor custo energético no processo de produção quando comparado a outros oligossacarídeos.

Fialho *et al.* (2013) verificaram maior produção de 6-cestose por *G. virens* em 10, 30 e 50 g L⁻¹ de sacarose após 3 dias de cultivo, no entanto, após 6 dias de cultivo os níveis de FOS declinaram devido ao consumo de 6-cestose como fonte de carbono. No entanto, os autores verificaram que o cultivo em 100 e 150 g L⁻¹, o fungo acumulou maiores níveis do FOS após 6 dias. Prata *et al.* (2010) verificaram em *P. expansum* que o aumento exponencial da produção de FOS iniciou-se a partir de 12 horas de cultivo. A máxima produção de FOS foi verificada após 36 h, um total de 117,7 g L⁻¹, correspondendo a 80% de 1-cestose, 19% 1-nistose, e 1% ¹F-frutofuranosilnistose. Os autores constataram que é necessário altas concentrações do oligossacarídeo precursor para a síntese do homólogo com mais uma unidade de frutose. Após 36 h, quando toda a sacarose havia sido consumida, o fungo iniciou o consumo dos FOS anteriormente produzidos. De acordo com Maiorano *et al.* (2008) a sacarose é preferencialmente hidrolisada e utilizada para o crescimento micelial, mas em altas concentrações a fonte de carbono é geralmente convertida em FOS. Ning *et al.* (2010) verificaram em *X. dendrorhous* que concentrações elevadas de sacarose afetam positivamente o rendimento máximo de neo-FOS, atingindo 227,7 g L⁻¹ em 400 g L⁻¹ de sacarose. Chen e Liu (1996) observaram em *Aspergillus japonicus* maior produção de frutossiltransferase em cultivo contendo 250 g L⁻¹ de sacarose. Antošová *et al.* (2002) obtiveram maior atividade

frutossiltransferase em *A. pullulans* utilizando sacarose a 350 g L⁻¹. Assim como nos trabalhos acima citados, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a produção de FOS é altamente dependente da presença de elevadas concentrações de sacarose.

Maior produção de FOS ocorreu no meio filtrado contendo 200 g L⁻¹ de sacarose aos 10 dias de cultivo, atingindo um rendimento de 27%. Tal rendimento pode ser considerado relativamente baixo quando comparado ao rendimento obtido por linhagens empregadas como fontes comerciais de FOS (55-60%) (Yun & Song, 1993; Sangeetha *et al.*, 2005; Nobre *et al.*, 2013). Outros fungos apresentaram rendimento de FOS próximo ou acima do rendimento da cepa estudada. Foi alcançado um rendimento de 44% na produção de FOS por *A. pullulans* (Shin *et al.*, 2004). Para *A. japonicus*, esse valor foi de 55,8% (Wang & Zhou, 2006), enquanto que para *A. niger* o rendimento foi de 24% (Nguyen *et al.*, 1999). Os resultados também indicaram o decréscimo na produção de FOS nos cultivos contendo concentrações de sacarose superiores a 200 g L⁻¹. Vega-Paulino & Zúniga-Hansen (2012) também verificaram redução na produção de FOS por *A. pullulans*, entretanto, esse decréscimo foi constatado em concentrações superiores aos observados no presente estudo (700 e 800 g L⁻¹ de sacarose). Os autores acreditam que isso se deve ao declínio da taxa de reação enzimática, ao efeito de não-idealidade termodinâmica, a inibição por sacarose, e a limitação de transferência de massa ou baixa atividade da água devido à alta concentração de sacarose.

Apesar de o fungo apresentar bom rendimento de FOS quando cultivado em meio filtrado, em meio autoclavado o rendimento foi de apenas 4,5%. Segundo Antošová & Polakovic (2001), a produção de FOS pela ação de frutossiltransferases é inibida competitivamente pela glicose formada como subproduto de reação. Além do acúmulo de glicose ocorrer devido à ação enzimática, a formação de glicose, bem como de frutose livre a partir da sacarose também é observada quando o dissacarídeo é submetido a altas temperaturas, como ocorre durante o processo de autoclavagem (Eggleston *et al.*, 2000).

Portanto, o baixo rendimento de FOS no meio autoclavado provavelmente se deve em grande parte a presença de monossacarídeos liberados durante a esterilização do meio. Outro fator que pode justificar o baixo rendimento de FOS obtido no meio autoclavado é a presença de compostos furânicos.

Uma estratégia empregada no intuito de reduzir a inibição da síntese de FOS causada pela glicose é a adição da enzima glicose oxidase ao meio reacional. A enzima promove a formação de ácido glicônico a partir da glicose, eliminando assim o seu efeito inibitório sobre as enzimas de transfrutossilação. Nesses casos, o rendimento de FOS pode alcançar 90–98% (Dominguez *et al.*, 2014).

A análise das proteínas extracelulares de *P. janczewskii* através de SDS-PAGE revelou a presença de pelos menos cinco bandas proteicas que aumentaram de intensidade ou que foram visualizadas apenas em cultivos realizados na presença de altas concentrações de sacarose. Por outro lado, duas bandas apresentaram elevação na intensidade na concentração mais baixa de sacarose. Yoshikawa *et al.* (2008) encontraram pelo menos cinco formas de β -frutofuranosidades em *A. pullulans*, sendo uma delas dominante na fase de produção de FOS, e as outras quatro enzimas elevaram seus níveis somente no período de degradação de FOS. Kurakake *et al.* (2008) verificaram que *A. oryzae* KB é capaz de produzir duas formas de β -frutofuranosidades, uma denominada F1 (96 kDa), com alta atividade de transfrutossilação, preferencialmente produzida em alta concentração de sacarose, e outra denominada F2 (79 kDa), que apresenta atividade predominantemente de hidrólise, sendo expressa em baixa concentração de sacarose. Como ocorre em *A. oryzae* KB, é provável que *P. janczewskii* produza diferentes β -frutofuranosidades que diferem na capacidade de predominantemente hidrolisar sacarose ou sintetizar FOS, em baixas e altas concentrações do dissacarídeo, respectivamente. Portanto, será necessário realizar estudos de purificação e caracterização enzimática no intuito de identificar as diferentes isoformas da enzima e as reações que cada uma realiza.

Os experimentos de otimização das condições empregadas nos ensaios enzimáticos mostraram que a atividade de hidrólise foi maior em baixas concentrações de sacarose. Por outro lado, foi observada atividade de transfrutossilacção máxima apenas em concentrações elevadas de sacarose. Tal fato reforça a existência de β -frutofuranosidases em *P. janczewskii* que apresentam atividade hidrolítica e de síntese de FOS dependendo da disponibilidade de substrato. Uma frutossiltransferase típica sintetiza FOS mesmo em baixas concentrações de sacarose, no entanto, a presença dessa enzima em *P. janczewskii*, ainda não pode ser descartada, visto que β -frutofuranosidases presentes no complexo enzimático podem estar hidrolisando os FOS formados por frutossiltransferases.

A atividade de hidrólise sobre a sacarose apresentou temperatura ótima de 55 °C e foi observada atividade ótima em três valores diferentes de pH (3,0, 5,0 e 6,0). Pode-se especular que o complexo hidrolítico de *P. janczewskii* possa ter isoformas que apresentem diferentes pH ótimos de atividade. Atividade hidrolítica em *A. japonicus* TIT-900.76 apresentou pH e temperatura ótimos de 4,0 e 65 °C, respectivamente (Chen & Liu, 1996). β -frutofuranosidases com valores de pH ótimo em faixa tão ácida como 3,0 são pouco comuns, no entanto, há relatos na literatura de enzimas que apresentam estabilidade em uma faixa de pH variando entre 3,5 e 8,0 (Rustiguel, 2009). A β -frutofuranosidase de *Candida utilis* apresenta estabilidade de pH entre 3,0 e 6,0 (Chavéz *et al.*, 1997), já a enzima produzida por *Fusarium graminearum* apresenta estabilidade em uma faixa mais ampla de pH, entre 3,0 e 8,0 (Gonçalves, 2013).

Com relação à atividade de transfrutossilacção, os valores de pH e temperatura ótimos foram 5,0 e 55 °C, respectivamente. De forma similar, a atividade de síntese de FOS em *A. japonicus* TIT 90076 apresentou pH ótimo entre 5,0 e 6,0, temperatura ótima entre 55 e 65 °C e concentração ótima de substrato de 250 g L⁻¹ de sacarose (Chen & Liu, 1996). Em *A. japonicus* JN19 os autores verificaram pH ótimo de 5,5, entretanto, a temperatura e

concentração ótima de sacarose foi de 30 °C e 180 g L⁻¹, respectivamente (Wang & Zhou, 2006). O tempo ótimo de incubação para a atividade de transfrutossilacção pode ser considerado baixo em relação ao observado para enzimas de outros fungos. Em *A. pullulans* a reação de síntese de FOS requer 24 horas de incubação (Sangeetha *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2004; Yoshikawa *et al.*, 2008), como também é observado para enzimas de *P. chrysogenum* (Ganaie *et al.*, 2013). Já a atividade de transfrutossilacção realizada por enzimas de *A. japonicus* requer 16 horas (Mussato & Teixeira, 2010). Embora o tempo de incubação necessário para a reação de síntese de FOS tenha sido menor no presente estudo do que é observado para as enzimas citadas acima, o rendimento foi significativamente menor.

A produção de neo-FOS em fungos filamentosos é pouco frequente, mas tem sido reportada mais recentemente. Alguns trabalhos sugerem que estes microrganismos têm vantagens funcionais com relação aos demais, devido às suas características estruturais (Lim *et al.*, 2005; 2007). Segundo Lim *et al.* (2007), a produção de neo-FOS empregando enzimas de *P. citrinum* imobilizadas apresentou rendimento máximo de 105 g L⁻¹. Em estudo realizado por Linde *et al.* (2012), a produção de neo-FOS pela enzima de *X. dendrorhous* foi de 40 a 168 g L⁻¹, quando a concentração de sacarose variou de 420 a 600 g L⁻¹. Essa produção foi bem acima daquele alcançado pela cepa estudada que foi de 11 g L⁻¹ de neocestose em 400 g L⁻¹ de sacarose. A produção de FOS e neo-FOS pela bactéria *Bacillus megaterium* foi descrita por Homann *et al.* (2007) e os FOS produzidos foram identificados como 1-cestose, 6-cestose, neocestose e blastose.

Frutossiltransferases e β-frutofuranosidases são produzidas intra e/ou extracelularmente por vários microrganismos. Diversos autores descreveram o isolamento de linhagens capazes de produzir estas enzimas (Maiorano *et al.*, 2008). *P. janczewskii*, assim como alguns outros fungos, são capazes de produzir enzimas intracelulares com atividade de transfrutossilacção, embora a sua produção tenha sido 50% menor quando comparado à sua produção

extracelular. Dhake & Patil (2007) identificaram *P. purpurogenum* como produtor de frutossiltransferases intra e extracelulares. Estudos realizados por Lattef *et al.* (2007) em *A. pullulans* indicam produção de 56% de FOS a partir de enzimas intracelulares. Masahiro *et al.* (2008) constataram através de análises enzimáticas em *A. oryzae* que a produção de 1-kestose, nistose e ¹F-frutofuranosilnistose, a partir da sacarose, ocorreu quase que exclusivamente pela ação de enzimas de transfrutossilacção localizadas no micélio, enquanto que cerca de 40% da hidrólise da sacarose em glicose e frutose foi localizada no meio extracelular. Fungos como *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *A. pullulans* também são capazes de produzir enzimas intra e extracelulares produtoras de FOS (Dhake & Patil, 2007). Em análises feitas no meio de cultivo e no extrato intracelular *P. janczewskii*, obteve-se uma produção de FOS extracelular expressiva, entretanto não foi observada a presença de FOS no extrato intracelular. Provavelmente as enzimas são produzidas e rapidamente enviadas para o meio extracelular onde têm papel na síntese de FOS.

A diferença no teor de proteínas encontrada entre os meios intra e extracelular se deve principalmente à seletividade com a qual os fungos exercem sobre seus substratos. Assim, no meio extracelular os teores de proteínas são menores devido à secreção de proteínas específicas para determinada função reduzindo assim o gasto de energia (Moore-Landecker, 1996). Por outro lado, a célula possui no seu interior um conjunto muito maior e concentrado de proteínas envolvidas nos mais diversos processos metabólicos.

Apesar das concentrações de FOS detectadas nas culturas e nas atividades enzimáticas deste trabalho terem sido inferiores às aquelas detectadas nos estudos descritos acima, foi possível verificar que a cepa CCIBT 3352 de *P. janczewskii* possui potencial biotecnológico para produção de FOS, particularmente neocestose, um FOS pouco relatado em fungos filamentosos.

CONCLUSÕES

As fibras solúveis incluindo os FOS tem atraído cada vez mais a atenção da comunidade acadêmica e da indústria devido principalmente às suas características nutricionais e propriedades físico-químicas importantes. Como esses oligossacarídeos são produzidos industrialmente por enzimas microbianas, o estudo da secreção de enzimas que os sintetizam é de grande interesse biotecnológico.

Penicillium janczewskii requer altas concentrações de sacarose para a produção de quantidades apreciáveis de 1-cestose (FOS do tipo inulina), além de neocestose (FOS do tipo neolevano), esse último, pouco comum em fungos filamentosos, e que apresenta características prebióticas e tecnológicas superiores em relação aos FOS convencionais do tipo inulina. Os resultados também indicaram que a síntese de FOS é promovida por β -frutofuranosidases (invertases) com atividade de transfrutossilacção quando na presença de altas concentrações de sacarose. Estudos mais aprofundados devem ser conduzidos no sentido de maximizar as condições de produção enzimática, bem como, purificar e caracterizar as enzimas envolvidas na síntese de FOS. No entanto, os resultados apresentados já indicam que *P. janczewskii* é um fungo promissor como fonte industrial de fibras solúveis com propriedades diferenciadas. Além da importância biotecnológica, o presente estudo forneceu dados importantes e ainda pouco investigados sobre a síntese de frutanos por microrganismos isolados de plantas nativas do cerrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M.** 1996. *Introductory Micology*. 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Almeida, J.R.M., Modig, T., Peterson, A., Hahn-Hägerdal, B., Liden, G. & Gorwa-Grauslund, M.** 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82: 340-349.
- Alvaro-Benito, M., de Abreu, M., Portillo, F., Sáenz-Aparicio J. & Fernández-Lobato, M.** 2010. New insights into the fructosyltransferase activity of *Schwanniomyces occidentalis* b-fructofuranosidase emerging from a non-conventional codon usage and directed mutation. *Applied Environmental and Microbiology* 76: 7491-7499.
- Antal, M., Leesomboon, T., Mok, W. S. & Richards, G.N.** 1991. Mechanism of formation of 2-furaldehyde from D-xylose. *Carbohydrate Research* 217: 71-85.
- Antošová, M., & Polakovi, M.** 2001. Fructosyltransferases: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. *Chemical Papers* 55: 350-358.
- Antošová, M., Illeová, V., Vandáková, M., Druzkovská, A. & Polakovic M.,** 2008. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Biotechnology* 135: 58-63.
- Antošová, M., Polakoviè, M., Slovinská, M., Madlová, A., Illeová, V. & Bále V.** 2002. Effect of sucrose concentration and cultivation time on batch production of fructosyltransferase by *Aspergillus pullulans* CCY 27-1-1194. *Chemical Paper* 56: 394-399.
- Apolinário, A.C., Damasceno, B.P.G.L., Beltrão, N.E.M., Converti, A. & Silva, J.A.** 2014. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers* 101: 368-378.
- Archer, D.B., Connerton, I.F. & Mackenzie, D.A.** 2008. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 111: 99-147.
- Baptista, C.V.R.** 2013. Efeitos do hidroximetilfurfural na fermentação alcoólica: avaliação por citometria de fluxo. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa.
- Batalha, M.A.** 2011. The Brazilian cerrado is not a biome. *Biota Neotropica* 11: 21-24.
- Blackwell, M.** 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98: 426-438.
- Bon, E. P. S., Pereira Jr., N., Gottschalk, L. M. F., Sá-Pereira, P., Roseiro, J. C. & Ferrara, M. A.** 2008. Bioprocessos para a produção de enzimas. In: *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Bon, E. P. S., Ferrara, M. A. A. & Corvo, M. L. (Eds.). *Rio de Janeiro: Interciência* 95-122.

- Bononi, V.L.R. & Grandi, R.A.P.** 1999. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. *São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente.*
- Bornet, F.R., Brouns, F., Tashiro, Y. & Duvillier, V.** 2002. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: Natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestive and Liver Disease* 34: S111-S120.
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.
- Brakhage, A.A. & Schroeckh, V.** 2011. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology* 48: 15-22.
- Butler, M. J. & Day, A. W.** 1998. Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 1115-1136.
- Buzzini, P. & Martini, A.** 1999. Production of carotenoids by strains of *Rhodothorula glutinis* cultured in raw material of agro-industrial origin. *Bioresearch Technology* 71: 41-44.
- Chávez, F. P., Rodrigues L., Díaz J., Delgado, J. M. & Cremata J. A.** 1997. Purification and characterization of an invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases. *Journal of Biotechnology* 53: 67-74
- Chen, W.C. & Liu, C.H.** 1996. Production of b-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus* in batch and in fed-batch cultures. *Biotechnology Letters* 17: 1221e1224.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G. & Yue, L.** 2009. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 211-220.
- Cordeiro-Neto, F., Pessoni, R.A.B. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1997. Fungos produtores de inulinases isolados da rizosfera de asteráceas herbáceas do cerrado (Moji-Guaçu, São Paulo-Brasil). *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 21: 149-153.
- Coutinho, L.M.** 2002. O bioma do cerrado . In: *Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois* ed. A.L. Klein, 77-92, São Paulo: Editora Unesp.
- Crittenden, R.G. & Playne, M.J.** 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* 7: 353-361.
- Demain, A.L. & Adrio, J.L.** 2008. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology* 38: 41-55.
- Demain, A.L.** 2000. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances* 18: 499-514.
- Dhake, A.B. & Patil, M.B.** 2005. Production of β -Glucosidase by *Penicillium Purpurogenum*. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 170-176.

- Dhake, A.B. & Patil, M.B.** 2007. Effect of substrate feeding on production of fructosyltransferase by *Penicillium purpurogenum*. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 194-199.
- Dianese, J.C.** 2000. Micodiversidade associada a plantas do Cerrado. In: Tópicos atuais em Botânica. *Embrapa* 109-115. Brasília.
- Dianese, J.C., Medeiros, R.B. & Santos, L.T.** 1997. Biodiversity of microfungi found on native plants of the Brazilian Cerrado. In: Biodiversity of Tropical Microfungi. Hyde, K.D. (Ed.) *Hong Kong University Press*. 367-417.
- Dierckx, R.P.** 1901. Un essai de revision du genre *Penicillium* link. *Annales de La Société Scientifique Bruxelles* 25: 83-89.
- Dix, N.J. & Webster, J.** 1995. Fungal ecology. Chapman & Hall, London.
- Dominguez, A.L., Rodrigues, L.R., Lima, N.M. & Teixeira, J.A.** 2014. An overview of the developments on fructooligosaccharide production and applications. *Food Bioprocess Technology* 7: 324-337.
- Dunlop, A.P.** 1948. Furfural formation and behavior. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 40: 204-209.
- Durán, N., Teixeira, M. F. S., De Conti, R. & Esposito, E.** 2001. Ecological-friendly pigments from fungi. *Critical Review Food Science Nutrition* 42: 53-66.
- Eggleston, G. & Vercellotti, J. R.** 2000. Degradation of sucrose, glucose and fructose in concentrated aqueous solutions under constant pH conditions at elevated temperature. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 19: 1305-1318.
- Fialho, M.B., Simões, K., Barros, C.A., Pessoni, R.A.B., Braga, M.R. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Production of 6-kestose by the filamentous fungus *Gliocladium virens* as affected by sucrose concentration. *Mycoscience* 54: 198-205.
- Figueiredo-Ribeiro R.C.L., Dietrich, S.M.S., Chu, E.P., Machado de Carvalho, M.A., Vieira, C.C.J. & Graziano, T.T.** 1986. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. *Revista Brasileira de Botânica* 9: 159-166.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Simões, K., Fialho, M.B., Pessoni, R.A.B., Braga, M.R. & Gaspar, M.** 2014. Potencial of the filamentous fungi from the brazilian cerrado as producers of soluble fibers. In: Polysaccharides natural fibers in food and nutrition. Benkeblia, N. (Ed.) *CRC Press, New York*.
- Ganaie, M. A., Gupta, U. S. & Kango, N.** 2013. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97: 12-17.
- Ghazi, I., Fernandez-Arrojo, L., Garcia-Arellano, H. Ferrer, M., Ballesteros, A. & Plou, F.J.** 2007. Purification and kinetic properties of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biotechnology* 128: 204-211.

- Gonçalves, H.B. 2013.** β -D-frutofuranosidases de *Fusarium graminearum*: produção, purificação, imobilização e determinação das propriedades bioquímicas de enzimas solúveis e secas em *Spray dryer*. Tese de Doutorado. Instituto de Química de Araraquara. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- Grandi, R.A.P. 1999.** Utilização de deuteromicetos em processos biotecnológicos. 167-181. *In: Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.* V.L.R. Bononi (Org.). *Instituto de Botânica, Secretaria do Estado do Meio Ambiente, São Paulo.*
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M., Mateos, P., Bridge, P., Monte, E. & Garcia-Acha, I. 1997.** Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3189-3198.
- Hartemink, R., Vanlaere, K.M.J. & Rombouts, F.M. 1997.** Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 383: 367-374.
- Hawksworth, D.L. 1991.** The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655.
- Hawksworth, D.L. 2001.** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432.
- Hawksworth, D.L. 2004.** Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology* 50: 9-18.
- Hernalsteens, S., & Maugeri, F. 2008.** Purification and characterization of fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 589-596.
- Hidaka, H. et al. 1986.** Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacterium Microflora* 5: 37-50.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D. & Seibel, J. 2007.** Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochemical Journal* 407: 189-198.
- Houbraken, J. & Samson, R.A. 2011.** Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology* 70: 1-51.
- Jay, J.M. 2005.** Micotoxinas. *In: Microbiologia de alimentos* 6th, Artmed.
- Jermyn, M.A. 1956.** A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177: 38-39.
- Katapodis, P., Kalogeris, E., Kekos, D. & Macris, B.J. 2004.** Biosynthesis of fructooligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 378-382.

- Keller, N.P., Turner, G. & Bennett, J.** 2005. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3: 937-947.
- Khalidi, N., Seifuddin, F.T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W.C., Wolfe, K.H. & Fedorova, N.D.** 2010. SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology* 47: 736-741.
- Kilian, S., S. Kritzinger, C., Rycroft, G., Gibson & J. du Preez.** 2002. The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 637-644.
- Kim, B.W., Kwon, H.J., Park, H.Y., Nam, S.W., Park, J.P. & Yun, J.W.** 2000. Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. *Bioprocess Engineering* 23: 11-16.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F. David, J.C. & Stalpers, J.A.** 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th Edition. CABI Publishing, Wallingford.
- Klinke, H.B., Thomsen, A. & Ahring, 2004.** Inhibition of ethanol producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 10-26.
- Kurakake, M., Masumoto, R., Maguma, K., Kamata, A., Saito, E., Ukita, N. & Komaki, T.** 2010. Production of Fructooligosaccharides by β -Fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 488-492.
- Kurakake, M., Ogawa, K., Sugie, M., Takemura, A., Sugiura, K. & Komaki, T.** 2008. Two Types of β -Fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 591-596.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of the structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C. Stenberg, K., Zacchi, G. & Nilvebrant, N.O.** 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 151-159.
- Lateef, A., Oloke, J. K. & Prapulla, S. G.** 2007. Purification and partial characterization of intracellular fructosyltransferase from a novel strain of *Aureobasidium pullulans*. *Turkish Journal of Biology* 31: 147-154.
- Lewinsohn, T.M. & Prado, P.I.** 2005. Quantas espécies há no Brasil? *Megadiversidade* 1: 36-42.
- Lewkowski, J.** 2001. Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethylfurfural lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82: 340-349. and its derivatives. *Arkivoc* 1: 17-54.
- Lim, J.S., Lee, J.H., Kang, S.W., Park, S.W. & Kim, S.W.** 2007. Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase. *European Food Research and Technology* 225: 457-462.

- Lim, J.S., Park, M.C., Lee, J.H., Park, S.W. & Kim, S.W.** 2005. Optimization of culture medium and conditions for Neo-fructooligosaccharides production by *Penicillium citrinum*. *European Food Research and Technology* 221: 639–644.
- Linde D., Rodríguez-Colinas B., Estévez M., Poveda A., Plou F.J. & Fernández Lobato M.**, 2012. Analysis of neofructooligosaccharides production mediated by the extracellular b-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource Technology* 109: 123e130.
- Link, H.F.** 1809. Observationes in Ordines plantarum naturales. *Dissertatio Ima Berlin Ges. Nat Kde* 3: 1–42.
- Loguercio-Leite, C., Groposo, C., Dreschler-Santos, E.R., Figueiredo, N.F., Godinho, P.S. & Abrão, R.L.** 2006. A particularidade de ser um fungo - I. Constituintes celulares. *Biotemas* 19: 17-27.
- Maccheroni Jr, W., Araújo, W.L. & João Lúcio Azevedo, J.L.** 2004. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. *Scientia Agricola* 61: 298-302.
- Machado, A.S., Sehnem, N.T. & Ayub, M.A.Z.** 2011. Adaptação de *Spathaspora arborariae* a altas concentrações de compostos furânicos e seu perfil cinético para produção de etanol na presença de 5-hidroximetilfurfural e furfural. 1-13.
- Maia, L. C., Cavalcanti, M.A.Q., Gibertoni, T., Goto, B. T., Melo, A.M.M., Baseia, I.G. & Silvério, M.** 2006. Fungos. In: Pôrto, K.C., Almeida-Cortez J.S., Tabarelli M.. (Org.). *Diversidade Biológica e Conservação da Floresta Atlântica ao Norte do Rio São Francisco*. 1 ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Maiorano, A.E., Piccoli, R.M., Silva, E.S. & Rodrigues, M.F.A.** 2008. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of prebiotics. *Biotechnological Letters* 30: 1867-1877.
- Mantovani, W. & Martins, F.R.** 1988. Variações fenológicas das espécies de cerrado da reserva biológica de Mogi-Guaçu, São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 11: 101-112.
- Martín, J.F., Casqueiro, J. & Liras, P.** 2005. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Current Opinion in Microbiology* 8: 282-293.
- Marx, S. P., Winkler, S. & Hartmeier, W.** 2000. Metabolization of beta-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 182: 163-169.
- Masahiro, K., Kenji, O., Motoki, S., Akihiro, T., Kouji, S. & Toloshiki, K.** 2008. Two Types of β -fructoranosidases from as *Aspergillus oryzae* KB. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 591-596.
- Menrad, K.** 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering* 56, 181–188.

- Meyer, V.** 2008. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances* 26: 177-185.
- Miller, G.H.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-429
- Monsan, P.F., Ouarne, F., Charalampopoulos, D. & Rastall R.A.** 2009. Prebiotics and Probiotics *Science and Technology* 293-320.
- Moore-Landecker, E.** 1996. Fundamentals of the fungi. 4th Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Moriyama, S., Akimoto, H., Suetsugu, N., Kawasaki, S., Nakamura, T. & Otha, K.** 2006. Purification and properties of an extracellular exoinulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 and sequence analysis of the encoding gene. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66: 1887-1896.
- Mussatto, S. I. & Teixeira, J. A.** 2010. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. *Biochemical Engineering Journal* 53: 154–157.
- Mutanda, T., Mokoena, M.P., Olaniran, A.O., Wilhelmi, B.S. & Whiteley,** 2014. Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41: 893-906.
- Nemukula, A., Mutanda, T., Wilhelmi, B. S. & Whiteley, C. G.** 2009. Response surface methodology: synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Bioresource Technology* 100: 2040–2045.
- Nguyen, Q. D., Mattes, F., Hoschke, Á., Rezessy-Szabó, J. & Bhat, M. K.** 1999. Production, purification and identification of fructooligosaccharides produced by β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. *Biotechnology Letters* 21: 183–186.
- Nigam, P.S.** 2009. Production of bioactive secondary metabolites. In: Poonam Singh nee' Nigam. Pandey, A. (Ed.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization, Springer Science + Business Media*.
- Niness, K.R.** 1999. Inulin and oligofructose: What are they? *The Journal of Nutrition* 129: 1402S-1406S.
- Ning, Y., Wang, J., Chen, J., Yang, N., Jin, Z. & Xu, X.** 2010. Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource Technology* 101: 7472-7478.
- Nobre, C., Teixeira, J.A. & Rodrigues, L.R.** 2013. New trends and technological challenges in the industrial production and purification of fructo-oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* . doi:10.1080/10408398.2012.697082.

- Orlandelli, R.C., Specian, V., Felber, A.C. & Pamphile, J.A.** 2012. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia* 3: 97-109.
- Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B.** 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates i: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* 74: 17-24.
- Passos, L.M.L. & Park, Y.K.** 2003. Fructooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural* 33: 385-390.
- Patel, S. & Goyal, A.** 2011. Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 1119-1128.
- Pessoni, R.A.B., Simões, K., Braga, M.R., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2009. Effects of substrate composition on growth and fructo-oligosaccharide production by *Gliocladium virens*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* 3 (Special Issue 1): 96-101.
- Pessoni, R.A.B., Braga, M.R. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2007. Purification and properties of exo-inulinases from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources. *Mycologia* 99: 493-503.
- Pessoni, R.A.B., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Braga, M.R.** 1999. Extracelullar inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae). *Journal of Applied Microbiology* 87: 141-147.
- Pessoni, R.A.B., Freshour, F., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Hahn, M.G. & Braga, M.R.** 2005. Cell-wall structure and composition of *Penicillium janczewskii* as affected by inulin. *Mycologia* 97: 304-311.
- Pessoni, R.A.B., Freshour, G., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Hahn, M.G. & Braga, M.R.** 2002. Woronin bodies in *Penicillium janczewskii* Zaleski. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 127-130.
- Peter, M. G.** 2001. Chitin and Chitosan in Fungi. In: Steinbüchel, A. (ed.). *Biopolymers*. Wiley-Vch, Bonn, Germany 44-52.
- Peterson, A., Almeida, J.R.M., Modig, T., Karhumaa, K., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F. & Lidén, G.** 2006. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae ADH6* gene conveys HMF tolerance. *Yeast* 23: 455-464.
- Prata, M.B., Mussatto, S.I., Rodrigues, L.R. & Teixeira, J.A.** 2010. Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*. *Biotechnology Letters* 32: 837-840.
- Rajasekaran, R., Chandrasekaran, R. & Muthuselvam, M.** 2008. Microbial biotechnology: Rapid advances in an area of massive impact. *Advanced Biotech* 8: 19-25.

- Rustiguel, C.B.** 2009. Produção, purificação e caracterização bioquímica das invertases do fungo filamentoso *Aspergillus phoenicis*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. Universidade de São Paulo.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. & Prapulla, S.G.** 2004. Production of fructooligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. *Process Biochemistry* 39: 753–758.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N. & Prapulla S.G.** 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* 16: 442-457.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G.,** 2005. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. *Process Biochemistry* 40: 1085-1088.
- Shin, H. T., Park, K. M., Kang, K. H., Oh, D. J., Lee, S. W., Baig, S. Y., et al.** 2004. Novel method for cell immobilization and its application for production of oligosaccharides from sucrose. *Letters in Applied Microbiology* 38: 176–179.
- Shin, H. T., Park, K. M., Kang, K. H., Oh, D. J., Lee, S. W., Baig, S. Y. et al.** 2004. Novel method for cell immobilization and its application for production of oligosaccharides from sucrose. *Letters in Applied Microbiology* 38: 176–179
- Shiomi N., Onodera, S., Chatterton, J. & Harrison P.A.** 1991. Separation of fructooligosaccharide isomers by anion-exchange chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry* 55: 1427-1428.
- Singh, P. & Gill, P.K.** 2006. Production of inulinases: recent advances. *Food Technology and Biotechnology* 44: 151-162.
- Singh, R.S. & Singh, R.P.** 2010. Fructooligosaccharides from inulin as prebiotics. *Food Technology and Biotechnology* 48: 435-450.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. & Lugasi, A.** 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—a review. *Appetite* 51: 456–467.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugar. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-68.
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Sasse, F., Jansen, R. & Murali. T.S.** 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. *Biology Reviews* 23: 9-19.
- Takahashi, J.A. & Lucas, E.M.F.** 2008. Occurrence and structural diversity of fungal metabolites with antibiotic activity. *Quimica Nova* 31: 1807-1813.
- Tertuliano, M.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1993. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. *NewPhytologist* 123: 741-749.

- Tilburg, A. & Thomas, M.** 1993. Production of extracellular proteins by the fungus *Gliocladium virens*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 236-242.
- Torres, F. A. G., Moraes, L. M. P., De Marco, J. L., Poças-Fonseca, M. J. & Felipe, M. S. S.** 2008. O uso de leveduras e fungos filamentosos para a expressão heteróloga de enzimas. *In: Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Bon, E. P. S., Ferrara, M. A. A. & Corvo, M. L. (Eds). *Rio de Janeiro: Interciência* 55-70.
- Vandáková, M., Platková, Z., Antošová, M., Báleš, V. & Polakovič, M.** 2004. Optimization of cultivation conditions for production of fructosyltransferase by *Aureobasidium pullulans*. *Chemical Papers* 58: 15–22.
- Vega, R. & Zuniga-Hansen, M.E.** 2014. A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. *Biochemical Engineering Journal* 82: 158-165.
- Vega-Paulino, R.J. & Zuniga-Hansen, M.E.** 2012. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 76: 44-51.
- Velázquez-Hernández, M.L., Baizabal-Aguirre, V.M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M.P. & Valdez-Alarcón, J.J.** 2009. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1763-1778.
- Vieira, C.C.J., Braga M.R. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1995. Fructans in callus of *Gomphrena officinalis* Mart. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 233-238.
- Visagie, C.M., Houbraeken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T. & Samson, R.A.** 2014. Identification and nomenclature of genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78: 343-371.
- Vullo, D., Coto, C.E. & Sineriz, F.** 1991. Characteristics of α -inulinases produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2392-2394.
- Wang, L.M. & Zhou, H.M.** 2006. Isolation and identification of a novel *A. japonicus* JN19 producing β -fructofuranosidase and characterization of the enzyme. *Journal of Food Biochemistry* 30: 641–658.
- Weber, K. & Osborn, M.** 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 244: 4406-4412.
- Webster, J. & Weber, R.W.S.** 2007. Introduction to fungi. Cambridge, New York.
- Wise, C.S., Dimler, R.J., Davies, H.A. & Rirst, C.E.** 1955. Determination of easily hydrolysable fructose units in dextran preparations. *Analytical Chemistry* 27: 33-36.
- Yildiz, S.** 2011. The Metabolism of fructooligosaccharides and fructooligosaccharide-related compounds in plants. *Food Reviews International* 27: 16–50.

- Yoshikawa, J., Amachi, S., Shinoyama, H. & Fujii, T.** 2006. Multiple *b*-fructofuranosidases by *Aureobasidium pullulans* DSM2404 and their roles in fructooligosaccharide production. *FEMS Microbiology Letters* 265: 159-163.
- Yoshikawa, J., Amachi, S., Shinoyama, H. & Fujii, T.** 2006. Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters* 30: 535-539.
- Yoshikawa, J., Amachi, S., Shinoyama, H. & Fujii, T.** 2008. Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters* 30: 535-539.
- Yu, J.H. & Keller, N.** 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology* 43: 437-458.
- Yuan X.L, Goosen C., Kools H., Van der Maarel M.J.E.C., Van den Hondel C.A.M.J.J., Dijkhuizen L. & Ram A.F.J.** 2006. Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger*. *Microbiology* 152: 3061-3073.
- Yun, J.W. & Song, S. K.** 1993. The production of high-content fructooligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. *Biotechnology Letters* 15: 573-576.
- Yun, J.W.** 1996. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and application. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 107-117.
- Yun, J.W., Kim, D.H. & Song, S.K.** 1997. Enhanced production of fructosyltransferase and glucotransferase by substrate-feeding cultures of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84: 261-263.
- Zaldivar, J., Nielsen, J. & Olsson, L.** 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 17-34.