



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
Campus Universitário de Palmas-TO  
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

RYHÁRA DIAS BATISTA

**PRODUÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INVERTASES E  
FRUTOSILTRANSFERASES DE *Aspergillus carbonarius* PARA PRODUÇÃO DE  
ALIMENTOS**

PALMAS-TO  
2018

**RYHÁRA DIAS BATISTA**

**PRODUÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INVERTASES E  
FRUTOSILTRANSFERASES DE *Aspergillus carbonarius* PARA PRODUÇÃO  
DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Linha de pesquisa: Biotecnologia aplicada à Indústria de Alimentos**  
**Orientador(a): Dr. Alex Fernando de Almeida**

PALMAS-TO  
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

B333p Batista, Ryhára Dias.

Produção, otimização e caracterização de invertases e frutotransferases de *Aspergillus carbonarius* para produção de alimentos. / Ryhára Dias Batista. – Palmas, TO, 2018.

91 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2018.

Orientador: Dr. Alex Fernando de Almeida

1. Plackett-burman. 2. Simplex lattice. 3. Delineamento Composto Central Rotacional. 4. Enzimas. I. Título

**CDD 664**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CÂMPUS DE PALMAS

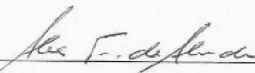
Avenida NS 15, Quadra 109 Norte | Plano Diretor Norte  
Sala 32, Bloco II, Câmpus de Palmas | 77001-090 | Palmas/TO  
(63) 3229 4305 - | www.uft.edu.br/ppgcta | mcta@uft.edu.br




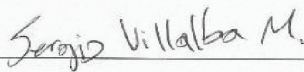
**ATA DA 03ª SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Ao 15º dia do mês de agosto do ano de dois mil e dezoito, na Sala 15 do Bala II, no Campus de Gurupi desta Universidade, às quatorze horas, reuniu-se a Banca Examinadora indicada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos composta por: Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida, orientador do trabalho e presidente da banca, Prof. Dr. Sérgio André Villalba Morales e a Profª. Drª. Glêndara Aparecida de Souza Martins. A reunião teve por objetivo julgar o trabalho da estudante Ryhára Dias Batista, sob o título "*Produção, otimização e caracterização de invertases e frutossiltransferases de Aspergillus carbonarius para a produção de alimentos*". Os trabalhos foram abertos e a seguir foi dada a palavra à estudante para apresentação do trabalho. Em seguida cada examinador arguiu a examinando, com tempos iguais de arguição e resposta. Procedeu-se então o julgamento do trabalho, concluindo a Banca Examinadora por sua A provação. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Palmas, 15 de agosto de 2018.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida (Presidente)

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Glêndara A. de Souza Martins

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sérgio André Villalba Morales

*Dedico...*

*À Deus que nos conduz passo a passo e me deu coragem para concluir este projeto. Aos meus queridos pais Raimundo e Dasirê e aos meus irmãos Rayssa e Ryhan.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar em todos os momentos, porque sem ele eu não chegaria até aqui.

Aos meus pais Raimundo e Dasirê, meu muito obrigada por toda confiança, por todos os conselhos, por sempre me apoiarem e me ajudarem em todas as decisões. Agradeço pelo amor incondicional, constante incentivo... Amo muito vocês.

A minha irmã Rayssa que esteve ao meu lado sempre, foi minha melhor amiga e me aguentou nos momentos de estresses. Ao meu irmão Ryhan que me alegrou nos momentos de tristeza.

Aos meus familiares que me ajudou sempre que eu precisei.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Alex Fernando de Almeida, meu muito obrigada por sua orientação, por sempre estar disponível e disposto a me ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver todo tipo de conhecimento, obrigada pela sua competência, sabedoria, confiança e apoio constante em todos os momentos na execução deste trabalho. Melhor orientador!

Ao Prof. Dr. Sérgio André Villalba Morales e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glendâra A. de Souza Martins que aceitaram participar da minha banca.

Ao Prof. Dr. Ezequiel Marcelino da Silva por me ajudar sempre que precisei.

Aos meus colegas do laboratório LABAP e a técnica Claudianny que me apoiaram e me ajudaram sempre.

Aos meus companheiros de trabalho Gustavo Carvalho e Fernanda, vocês fazem parte dessa dissertação, sem a ajuda de vocês não conseguiria concluir.

Aos meus amigos Kah, Anina, Fernanda, Anderson, Kleber e Ygor pela amizade sincera e pelo companheirismo. Em especial a minha amiga Kah que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos e ao Ygor pela ajuda no final do trabalho e pelo conhecimento que adquiri com você.

A Mayra por me ajudar com a estatística e me ensinar a mexer no programa Statistic.

Aos meus colegas do mestrado em especial a Mariana que se tornou uma verdadeira amiga.

Aos meus amigos Débora, Raiana, Leonardo, Isabella, Sandy, Ticinha e Larissa que estiveram sempre juntos comigo durante essa caminhada e pela amizade sincera.

Em especial a minha amiga Débora pelos conselhos e por ter me aguentado nos momentos de angústias.

Aos meus amigos de escola Millena, Gabriela, Victor, Ana Carolina, Paulo Victor, Kayo, Sâmara e Rosi que permaneceram na minha vida durante todo esse tempo. As minhas amigas Rachel, Brenda, Lorena, Rafaela, Lôany e a minha prima Katrinne que estavam presente durante essa caminhada. Obrigada pela amizade sincera de vocês.

A incubadora de empresas que proporcionou o espaço ao Laboratório de Biotecnologia, Análise de Alimentos e Purificação de Produtos (LABAP).

A Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas que proporcionou o meu mestrado.

As pessoas que de alguma forma me motivaram e torceram para que eu chegasse até aqui.

## RESUMO

Invertases são enzimas que catalisam a hidrólise da sacarose em uma mistura equimolar de D-glicose e D-frutose, comumente conhecida como açúcar invertido, e em altas concentrações pode exibir uma atividade significativa de transfrutosilação. Frutossiltransferase possui atividade de transfrutosilação em altas quantidades de sacarose, hidrolisando a sacarose nas ligações  $\beta$ -(1-2) e transferindo o radical frutossil para outra molécula de sacarose formando os frutooligossacarídeos (FOS) e liberando glicose. Estas enzimas são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos para a produção de xarope de frutose e frutooligossacarídeo. Ambas as enzimas podem ser produzidas por diferentes microrganismos, porém os fungos se destacam, principalmente as espécies do gênero *Aspergillus*. Este trabalho teve como objetivo a otimização das condições de cultivo para a produção de invertase e frutossiltransferase por uma nova linhagem de *Aspergillus carbonarius* PC-4, a caracterização das condições de cultivo, bem como a caracterização bioquímica da enzima frutossiltransferase produzida em condições submersas. A otimização da produção de invertase foi obtida utilizando metodologia simplex lattice onde a concentração de coroa de abacaxi e extrato de levedura proporcionaram um aumento de 1,67 vezes (9,44 U/mL). A otimização da produção de frutossiltransferase foi obtida utilizando DCCR. As condições físico-químicas para a produção de invertase proporcionaram uma produção de 18,67 U/mL de invertase sob agitação 180 rpm, temperatura 20 °C e pH 5,5, após 72 horas de cultivo. Os parâmetros da fermentação nestas condições foram de  $Y_{P/S} = 1184,82$  U/g e  $P_p = 4,41$  U/h. Para a produção de frutossiltransferase, as melhores condições de cultivo foram obtidas utilizando metodologias Plackett & Burman e Delineamento Composto Central Rotacional onde a concentração de coroa de abacaxi e nitrato de amônio proporcionaram um aumento de 1,77 vezes (66,46 U/mL). A produção máxima foi obtida após 72 horas de cultivo a 28 °C sob agitação 180 rpm e pH 6. As propriedades bioquímicas da frutossiltransferase mostraram que as melhores condições de reação são em pH 5 e temperatura 50°C. A enzima foi estável na temperatura de 40 °C, cuja meia vida ( $T_{1/2}$ ) foi de 1 hora. O uso da nova linhagem de *Aspergillus carbonarius* PC-4 para a produção das enzimas foi eficaz podendo futuramente ser aplicado para a produção de xarope de frutose e frutooligossacarídeos.

**Palavras-chaves:** Plackett-burman; Simplex lattice, Delineamento Composto Central Rotacional; Propriedades bioquímicas; Enzimas.



## ABSTRACT

Invertases are enzymes that catalyze the hydrolysis of sucrose in an equimolar mixture of D-glucose and D-fructose, commonly known as inverted sugar, which at high concentrations may exhibit significant transfructosylation activity. Fructosyltransferases have transfructosylation activity in high amounts of sucrose, hydrolyzing the  $\beta$ - (1-2) bonds in sucrose and transferring the fructosyl radical to another sucrose molecule forming the fructooligosaccharides (FOS) and releasing glucose. These enzymes are widely used in food industries for the production of fructose syrup and fructooligosaccharide. Both enzymes can be produced by different microorganisms, however the fungi stand out, mostly the species of the genus *Aspergillus*. This work aimed to optimize the culture conditions for the production of invertase and fructosyltransferase by a new strain of *Aspergillus carbonarius* PC-4, the characterization of the culture conditions, as well as the biochemical characterization of the enzyme fructosyltransferase produced under submerged conditions. The optimization of invertase production was obtained using simplex lattice methodology, increasing the production by 1.67-fold (9.44 U/mL) when pineapple crown and yeast extract were used. The optimization of the fructosyltransferase production was obtained using CCRD. Physicochemical conditions to invertase production provided a yield of 18.67 U/mL of invertase, when incubated at 25°C, pH 5.5 and shaken at 180 rpm for 72 hours of cultivation. The fermentation parameters under these conditions were  $Y_{P/S}$  = 1184.82 U/g and  $P_p$  = 4.41 U/h. The best cultivation conditions for fructosyltransferase production were obtained using Plackett & Burman design and Central Composite Rotational Design providing an increase of 1.77-fold (66.46 U/mL) when using pineapple crown and ammonium nitrate. The maximum production was obtained after 72 hours of cultivation at 28 °C, 180 rpm and pH 6. The biochemical properties of the fructosyltransferase showed that the best reaction conditions are pH 5 and 50 °C. The enzyme was stable at 40 °C, whose half-life ( $T_{1/2}$ ) was 1 hour. The use of the new strain of *Aspergillus carbonarius* PC-4 for the production of the enzymes was effective and could be used in the future for the production of fructose syrup and fructooligosaccharides.

**Keywords:** Plackett-burman; Simplex lattice; Central Composite Rotational Design; Biochemical Properties; Enzymes.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

- Tabela 1.** Culturas de fungos, leveduras e bactérias para a produção das enzimas FTase e invertase.....26
- Tabela 2.** Produção de Ftase e invertases microbianas utilizando diversas fontes de carbono na fermentação submersa e em estado sólido .....29
- Tabela 3.** Otimização da produção das enzimas invertase e FTase utilizando delineamento estatístico .....31

### Capítulo 2

- Tabela 1.** Variáveis selecionadas e seus níveis atribuídos pelo Simplex Lattice. ....45
- Tabela 2.** Combinação das variáveis independentes gerado pelo Simplex Lattice. ....45
- Tabela 3.** Atividade de invertase e parâmetros do cultivo obtidos pelo planejamento Simplex Lattice. ....51
- Tabela 4.** Estimativas dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de invertase utilizando o planejamento experimental Simplex Lattice. ....51
- Tabela 5.** Análise de variância (ANAVA) pelo delineamento Simplex Lattice. ....52
- Tabela 6.** Condições experimentais, resultado predito e resultado experimental obtidos nas condições de ponto ótimo de processo. ....55
- Tabela 7.** Efeito dos surfactantes na produção de invertase por *A. carbonarius* PC-4 após 72 horas. ....56
- Tabela 8.** Efeito da temperatura de incubação na produção de invertase por *A. carbonarius* PC-4 após 72 horas. ....57
- Tabela 9.** Efeito do pH inicial do meio de fermentação na produção de invertase por *A. carbonarius* PC-4 após 72 horas. ....59
- Tabela 10.** Rendimento e produtividade nos pontos com maior produção de invertase. ....60

### Capítulo 3

- Tabela 1.** Variáveis selecionadas e seus níveis atribuídos pelo Plackett & Burman. ....70
- Tabela 2.** Variáveis selecionadas e seus níveis atribuídos pelo DCCR. ....70

<b>Tabela 3.</b> Variáveis selecionadas e seus níveis atribuídos pelo DCCR. ....	71
<b>Tabela 4.</b> Resultados do Design Plackett-Burman de 4 variáveis para a produção de FTase. ....	74
<b>Tabela 5.</b> Principais efeitos das variáveis independentes sobre a produção de FTase utilizando o planejamento experimental Plackett & Burman. ....	75
<b>Tabela 6.</b> Planejamento experimental DCCR usado para a superfície de resposta com 2 variáveis independentes para a produção de FTase por <i>A. carbonarium</i> PC4. ....	77
<b>Tabela 7.</b> Análise de variância (ANOVA) pelo delineamento DCCR. ....	77
<b>Tabela 8.</b> Estimativas do coeficiente das variáveis independentes sobre a produção de FTase utilizando o planejamento experimental DCCR. ....	78
<b>Tabela 9.</b> Condições experimentais, resultado predito e resultado experimental obtidos nas condições de ponto ótimo de processo. ....	80
<b>Tabela 10.</b> Resultados do Design DCCR de 2 variáveis, pH e temperatura. ....	81
<b>Tabela 11.</b> Análise de variância (ANOVA) pelo delineamento DCCR. ....	82
<b>Tabela 12.</b> Estimativas do coeficiente das variáveis independentes sobre a produção de FTase utilizando o planejamento experimental DCCR. ....	82
<b>Tabela 13.</b> Condições experimentais, resultado predito e resultado experimental obtidos nas condições de ponto ótimo de processo. ....	84

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

<b>Figura 1.</b> Ação da frutossiltransferase na molécula de sacarose. ....	18
<b>Figura 2.</b> Frutooligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C). .....	18
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de hidrólise e de transfrutossilação da enzima FTase. ....	19
<b>Figura 4.</b> Biossíntese de frutano a partir da sacarose. ....	20
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de ação da enzima invertase. ....	22
<b>Figura 6.</b> <i>Aspergillus carbonarius</i> PC-4. ....	24
<b>Figura 7.</b> (A) antes da ingestão de prebióticos. (B) depois da ingestão de prebióticos. .....	32
<b>Figura 8.</b> Volume do mercado de frutooligossacarídeos (FOS), por aplicação, 2013- 2024. ....	33
<b>Figura 9.</b> Açúcar invertido. ....	34
<b>Figura 10.</b> Aplicações da enzima invertase. (a) xarope de frutose, (b) calda de chocolate, (c) mel artificial, (d) pães, (e) suplemento enzimático. ....	34

### Capítulo 2

<b>Figura 1.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta atividade enzimática invertase, (A) 3 dias e (B) 5 dias. ....	49
<b>Figura 2.</b> Gráficos de contorno de mistura e plotagem de linha entre os valores previstos e experimentais para produção de invertase por <i>A. carbonarium</i> PC4, sob fermentação em estado submerso por 72h (A) e 120 h (B) em função dos efeitos de interação significativos ( $p < 0,05$ ) de misturas ternárias de cloreto de amônio, extrato de levedura e coroa de abacaxi para produção máxima de invertase. .....	54
<b>Figura 3.</b> Atividade enzimática e biomassa quanto a temperatura do meio de fermentação para produção de invertase a partir do <i>A. carbonarius</i> PC-4 após 72 horas. .....	55
<b>Figura 4.</b> Efeito da agitação na produção de invertase por diferentes períodos. .....	60

### Capítulo 3

**Figura 1.** Gráfico de pareto dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta atividade enzimática FTase, (A) 3 dias e (B) 5 dias. ....73

**Figura 2.** Produção de FTase influenciada pela interação entre coroa de abacaxi ( $X_1$ ) e nitrato de amônio ( $X_2$ ). (A) gráfico de superfície de resposta (B) gráfico de curva de contorno. ....79

**Figura 3.** Produção de FTase influenciada pela interação entre pH ( $X_1$ ) e Temperatura ( $X_2$ ). (A) gráfico de superfície de resposta (B) gráfico de curva de contorno. ....83

**Figura 4.** Estabilidade da FTase quanto ao pH (A) após 7 horas (■) e 24 horas (●) e térmica (B) a 40 °C (■), 50 °C (●), 60 °C (▲) por diferentes períodos. ....85

## LISTA DE ABREVIATURAS

E.C – Enzyme Commission  
FOS - frutoligossacádeos  
GF2 – 1- kestose  
GF3 – 1-nistose  
GF4 – 1<sup>F</sup>-β-frutofuranosilnistose  
1-SST - sacarose: sacarose 1-frutossiltransferase  
6-SFT - sacarose: frutano 6-frutossiltransferase  
1-FFT - frutano: frutano 1-fructossiltransferase  
G6-FFT - frutano: frutano 6G- frutossiltransferase  
FTase – frutossiltransferase  
FFase – invertase  
p/v – peso por volume  
CSm – cultivo submerso  
CES – cultivo estado sólido  
g - gramas  
U/mL – unidade de enzima por mL  
U/mg - unidade de enzima por gramas  
U/gss – unidade de enzima por gramas de substrato seco  
°C – graus Celsius  
ε – coeficiente de extinção molar  
V<sub>i</sub> – volume inicial  
V<sub>f</sub> – volume final  
A – atividade enzimática  
t - tempo  
DNS – ácido dinitrosalisílico  
Y<sub>p/s</sub> – rendimento (U/g)  
P<sub>p</sub> – produtividade (U/h)  
P<sub>F</sub> – enzima no final do cultivo  
P<sub>0</sub> – enzima no início do cultivo  
S<sub>0</sub> – substrato inicial  
SDS - sodium dodecyl sulfate  
SQ – soma dos quadrados  
SQM – soma dos quadrados médios  
GL – graus de liberdade  
DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional  
PB – Plackett & Burman

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	14
2. Objetivos .....	16
2.1. Objetivo geral .....	16
2.2. Objetivo específico .....	16
<b>Capítulo 1. Revisão de literatura .....</b>	<b>17</b>
1. Frutossiltransferase .....	18
2. Invertase .....	22
3. Microrganismos produtores de invertase e frutossiltransferase .....	23
4. Métodos de cultivo para produção das enzimas .....	27
5. Otimização da produção de invertase e FTase .....	30
6. Aplicação .....	32
6.1. FTase .....	32
6.2. Invertase .....	33
7. Referências .....	35
<b>Capítulo 2. Otimização da enzima invertase e caracterização do meio de cultivo a partir do fungo <i>A. carbonarius</i> PC-4 em condições submersas .....</b>	<b>41</b>
<b>Capítulo 3. Frutossiltransferase de <i>Aspergillus carbonarius</i> PC-4.: otimização da produção e propriedades bioquímicas. ....</b>	<b>64</b>
Considerações finais.....	90