



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LUNARA THAÍS ALVES DE BASTOS

**PRODUÇÃO DE INVERTASES A PARTIR DE
MICRORGANISMOS ISOLADOS DE FRUTOS AMAZÔNICOS**

Palmas - TO

2022

LUNARA THAÍS ALVES DE BASTOS

**PRODUÇÃO DE INVERTASES A PARTIR DE
MICRORGANISMOS ISOLADOS DE FRUTOS AMAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de pesquisa: Biotecnologia aplicada à indústria de alimentos

Orientador: Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Coutinho de Paula Elias

Palmas - TO

2022

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

B327p Bastos, Lunara Thais Alves.

Produção de invertases a partir de microrganismos isolados de frutos amazônicos. / Lunara Thais Alves Bastos. – Palmas, TO, 2022.

100 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2022.

Orientador: Alex Fernando De Almeida

Coorientador: Fabrício Coutinho de Paula Elias

1. Invertase. 2. Frutossiltransferase. 3. Frutos amazônicos. 4. Pupunha. 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
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS - TO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
LUNARA THAÍS ALVES DE BASTOS

**PRODUÇÃO DE INVERTASES A PARTIR DE
MICRORGANISMOS ISOLADOS DE FRUTOS AMAZÔNICOS**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 08 de Fevereiro de 2022, pela Banca
Examinadora constituída pelos membros:

Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida
Orientador - UFT

Prof. Dr. Rafael Firmani Perna
UNIFAL - MG

Prof. (ª) Dr. (ª) Marlí Camassola
UCS

Dedico este trabalho à minha mãe
Belcina, que um dia eu me torne
metade da mulher e ser humano que
ela é.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha mãe, Belcina por desde sempre me ensinar que a educação e conhecimento são sempre os melhores caminhos a seguir, por sempre me incentivar a ir além e nunca medir esforços para me fornecer todo o suporte essencial nessa caminhada. Espero te orgulhar em cada passo dado na minha vida.

Ao meu irmão, Lucas e meus primos Renata e Marcos Vinícius, por tornarem essa trajetória mais leve.

À toda minha família que sempre me apoiou e cuidaram de mim nos mais conturbados momentos. Em especial aos meu avós Maria e Vicente que me acompanham em cada conquista, e ao meu avô Tarciso, que não está mais presente para dividir essa conquista, mas sempre torceu por mim, se tive oportunidade de continuar crescendo grande parte se deve a ele.

Às pessoas que desde o início torceram por mim, desde a aprovação ao término da pesquisa: Patrícia, Evandro, Thiago e Matheus.

À Iara e Alanna que se tornaram mais que amigas nessa caminhada, sempre estiveram presente e foram meu alicerce em toda a pesquisa, dividimos lágrimas e sorrisos, dia e noite, no laboratório, tornando tudo mais leve. Desejo que continuemos sempre uma pelas outras em todas as etapas da vida.

Aos meus amigos, Pedro Henrique, Dheyson, Larissa e Hermany. que também percorreram essa caminhada e me ajudaram em cada urgência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alex Fernando, e coorientador, Prof. Dr. Fabrício Coutinho, por todo apoio, paciência e dedicação. Sempre estiveram presentes em todos os momentos, sempre dispostos a ajudar em qualquer situação.

Agradeço aos parceiros Iarley Uchôa e Fernanda Zimmer pelo auxílio na realização dos experimentos.

À professora Solange por ter fornecido o laboratório, tornando possível a realização dos experimentos.

À CAPES pela concessão de recursos de custeio para o desenvolvimento do Projeto PROCAD-AM 1707/2018 (Processo nº 88881.200497/2018-01).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

À Universidade Federal do Tocantins pela infraestrutura disponibilizada para a execução dos experimentos.

RESUMO

A diversidade vegetal brasileira é rica em espécies pouco exploradas comercialmente, entre elas os frutos amazônicos, os quais são nutritivos e abundantes em bioativos. A pupunha e o tucumã são facilmente encontrados na região amazônica e podem ser fontes de microrganismos produtores de invertase, uma hidrolase capaz de clivar a sacarose em glicose e frutose, resultando em um composto mais doce que a sacarose. E da frutossiltransferase, que transfere grupos frutossil para uma molécula de sacarose ou para um frutooligossacarídeo. O objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos produtores de invertase e frutossiltransferase a partir dos frutos pupunha e tucumã, além de analisar diferentes condições de cultivo e realizar a caracterização das propriedades bioquímicas das enzimas sintetizadas. Dentre 481 linhagens isoladas dos frutos, 19 apresentaram produção enzimática e, então, foram analisadas quanto a características morfológicas e bioquímicas. Entretanto, a linhagem PP6, *Bacillus sp.* isolada de pupunha, apresentou resultados mais promissores quanto à síntese enzimática, sendo submetida a análises referentes a fontes de carbono (glicose, frutose, xilose, sacarose, lactose, galactose, inulina, amido, pectina, glicerol, sorbitol e inositol) e nitrogênio (extrato de levedura, tripton, pepton, milhocina, sulfato de amônio, fosfato de amônio e cloreto de amônio), assim como a caracterização bioquímica em que se avaliou a influência do pH (1,0 – 8,0) e da temperatura (20-70°C) do meio reacional na atividade enzimática, estabilidade térmica (35 – 60 °C) e frente ao pH de incubação (1,0 – 8,0) além de estudos de diferentes condições de cultivo (adição de adjuvantes, concentração de sacarose e pH do meio de cultivo). As melhores sínteses de invertase/frutossiltransferase foram encontradas utilizando-se sacarose (1,92 U/mL/0,89 U/mL) e sulfato de amônio (2,01 U/mL/0,78 U/mL) como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Os maiores valores de atividade para a invertase (1,96 U/mL) foram alcançados em pH 4,5, ao passo que, para a frutossiltransferase (0,78 U/mL) foram obtidos para pH 3,5. Entretanto, ambas as enzimas exibiram maiores valores de atividade à 50 °C. Os resultados obtidos neste trabalho contribuirão na geração de informações sobre a comunidade microbiana dos frutos analisados, agregando conhecimento à área de bioprocessos, valorizando e aumentando o conhecimento em torno do rico bioma amazônico, além de apresentar uma nova fonte das enzimas invertase e frutossiltransferase para a aplicação industrial.

Palavras-chave: invertase, frutossiltransferase, frutos amazônicos, pupunha, tucumã.

ABSTRACT

The Brazilian plant diversity is rich in species that are not commercially explored, among them the Amazonian fruits, which are nutritious and abundant in bioactives. The peach palm and tucumã are easily found in the Amazon region and can be sources of microorganisms that produce invertase, a hydrolase capable of cleaving sucrose into glucose and fructose, resulting in a sweeter compound than sucrose. And fructosyltransferase, which transfers fructosyl groups to a sucrose molecule or to a fructooligosaccharide. The objective of this work was to isolate microorganisms that produce invertase and fructosyltransferase from peach palm and tucumã fruits, in addition to analyzing different cultivation conditions and characterizing the biochemical properties of the synthesized enzymes produced. Among 481 strains isolated from the fruits, 19 showed enzyme production and, then, were analyzed for morphological and biochemical characteristics. However, the PP6 strain, *Bacillus* sp. isolated from peach palm, showed more promising results in terms of enzyme synthesis and production, being subjected to several analyzes referring to different carbon sources (glucose, fructose, xylose, sucrose, lactose, galactose, inulin, starch, pectin, glycerol, sorbitol and inositol) and nitrogen (yeast extract, tryptone, peptone, cornicene, ammonium sulfate, ammonium phosphate and ammonium chloride), as well as the biochemical characterization in which the influence of pH (1.0 - 8.0) and temperature were evaluated. (20-70°C) of the reaction medium in the enzymatic activity as well as the biochemical characterization, in which the optimal pH and temperature, maximum stability time, thermal stability (35 - 60 °C) were evaluated. and compared to incubation pH (1.0 - 8.0) what is the pH range?, in addition to studies of different culture conditions (addition of adjuvants, sucrose concentration and pH of the culture medium) . The best syntheses of invertase/fructosyltransferase production were found using sucrose (1.92 U /mL/0.89 U /mL) and ammonium sulfate (2.01 U /mL/0.78 U/mL) as carbon and nitrogen sources, respectively. The highest activity values for invertase (1.96 U/mL) were reached at pH 4.5, while for fructosyltransferase (0.78 U/mL) they were obtained at pH 3.5. However, both enzymes exhibited higher activity values at 50 °C. The optimal pH of invertase was observed at 4.0 while fructosyltransferase was pH 3.5, however both had their highest performance at 50°C. The results obtained in this work will contribute to the generation of information about the microbial community of the analyzed fruits, adding knowledge to the area of bioprocesses, valuing and increasing the knowledge around the rich Amazon biome, in addition to presenting a new source of invertase and fructosyltransferase enzymes for the industrial application.

Keywords: invertase, fructosyltransferase, Amazonian fruits, peach palm, tucumã

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Linhagens microbianas isoladas de frutos e suas aplicações na indústria enzimática.....	20
Tabela 2. Possíveis aplicações dos microrganismos isolados da Pupunha.....	21
Tabela 3: Localização de invertases produzidas por bactérias.	24
Tabela 4: Fontes de invertases microbianas e vegetais.....	25
Tabela 5: Propriedades bioquímica de invertases produzidas por microrganismos.	26
Tabela 6: Fungos e leveduras produtores de FOS.	34
Tabela 7: Bactérias produtoras de FOS.....	34

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 8: Fontes de carbono utilizadas na caracterização dos cultivos de invertase e frutossiltransferase	42
Tabela 9: Fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio utilizadas na caracterização dos cultivos de invertase e frutossiltransferase	43
Tabela 10. Adjuvantes utilizados na análise.....	43

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 11. Linhagens de microrganismos isoladas dos frutos pupunha e tucumã durante fermentação espontânea	49
Tabela 12: Triagem de linhagens microbianas isoladas de frutos pupunha e tucumã com potencial para a produção de invertase	51
Tabela 13: Atividade de invertase e transfrutossilativa de linhagens microbianas isoladas de frutos de pupunha	53
Tabela 14: Caracterização das linhagens microbianas com potencial para produção de invertase e frutossiltransferase.....	55
Tabela 15: Grupo e morfologia celular das linhagens microbianas isoladas de frutos amazônicos.	56

Tabela 16: Testes bioquímicos das linhagens microbianas isoladas de frutos amazônicos.....	57
Tabela 17: Cepas produtoras de invertase e frutossiltransferase	57
Tabela 18: Análise da extração de DNA das linhagens produtoras de invertase	58
Tabela 19: Identificação de Leveduras amplificadas pela região intergênica ITS1–5.8S rDNA – ITS2.....	59
Tabela 20: Identificação de bactérias a partir da amplificação do gene 16S rRNA	60
Tabela 21: Produção de invertase e atividade transfrutossilativa de <i>Bacillus</i> sp. PP6 em diferentes fontes de carbono.....	61
Tabela 22: Produção de invertase e frutossiltransferase por <i>Bacillus</i> sp. PP6 em diferentes fontes de nitrogênio.....	64
Tabela 23: Influência de adjuvantes sobre a produção de invertase e frutossiltransferase de <i>Bacillus</i> sp. PP6.	66
Tabela 24: Diferentes concentrações de sorbitol adicionados ao meio de cultivo.	67

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1:** Mecanismo de ação da invertase..... 23
- Figura 2:** Reação de transfrutossilatação..... 28
- Figura 3:** Fórmula estrutural dos frutooligossacarídeos: (A) kestose, (B) nistose e (C) β -frutofuranosilnistose 29
- Figura 4:** Rota da produção de FOS. 30

MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 5:** O ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor, formando o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, dando origem ao ácido aldônico. 45

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Figura 6:** Avaliação da presença de açúcar redutor em linhagens isoladas dos frutos Pupunha e Tucumã..... 50
- Figura 7:** Produção de invertase e frutossiltransferase por *Bacillus* sp. PP6 em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo. 68
- Figura 8:** Influência do pH do meio de cultivo sobre a produção de invertase e frutossiltransferase por *Bacillus* sp. PP6..... 69
- Figura 9:** Cinética de produção de invertase, atividade transfrutossilativa e crescimento microbiano da linhagem *Bacillus* sp. PP6..... 71
- Figura 10:** Influência da temperatura do meio reacional nas atividades de invertase e frutossiltransferase de *Bacillus* sp. PP6..... 73
- Figura 11:** Influência do pH do meio reacional nas atividades de invertase e frutossiltransferase de *Bacillus* sp. PP6 75
- Figura 12:** Estabilidade térmica da invertase e frutossiltransferase de *Bacillus* sp. PP6 77
- Figura 13:** Estabilidade frente ao pH de incubação de invertase e frutossiltransferase produzida por *Bacillus* sp. PP6. 79

LISTA DE ABREVIATURAS

- E.C. – Enzyme Comission
- FOS - frutoligossacaídeos
- GF2 – 1- kestose
- GF3 – 1-nistose
- GF4 – 1^F-β-frutofuranosilnistose
- 1-SST - sacarose: sacarose 1-frutosiltransferase
- 6-SFT - sacarose: frutano 6-frutosiltransferase
- 1-FFT - frutano: frutano 1-fructosiltransferase
- G6-FFT - frutano: frutano 6G- frutosiltransferase
- FTase – frutosiltransferase
- FFase – invertase
- UFC- Unidades Formadoras de Colônias
- DNS - ácido dinitrosalisílico
- HMF - hidroximetil furfural
- m/v – massa 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
- °C – graus Celsius
- MM – Meio mineral
- TTC - cloreto de trifeniltetrazólio
- PP – Microrganismo extraído da Pupunha

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. Frutos amazônicos.....	20
2.2 Isolamento de microrganismos em frutos.....	21
2.3 Invertase	24
2.3.1 Caracterização bioquímica Invertase.....	28
2.4 Frutossiltransferase	30
2.5 Fruto-oligossacarídeos	32
2.5.1 Ocorrência de fruto-oligossacarídeos a partir da frutossiltransferase	34
2.5.1.1 Plantas.....	34
2.5.1.2 Microrganismos	35
2.5.1.3 Fungos e leveduras	35
2.5.1.4 Bactérias	37
2.6 Aplicação.....	38
2.6.1 Invertase	38
2.6.2 Frutossiltransferase	39
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo geral	40
3.2. Objetivos específicos.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Microrganismos e manutenção	41
4.2. Seleção de microrganismos produtores de enzimas.....	42
4.2.1. Triagem em placa de linhagens microbianas potenciais produtoras de invertase.....	42
4.2.2. Triagem em cultivos submersos de linhagens microbianas potenciais produtoras de invertase e frutossiltransferase	42
4.3. Caracterização dos microrganismos produtores de invertase e frutossiltransferase.....	43
4.3.1. Caracterização morfológica e bioquímica	43
4.3.2. Coloração de Gram.....	43
4.3.3. Morfologia celular	43
4.3.4 Teste de Catalase.....	43
4.3.5. Teste de Oxidase	44
4.3.6. Identificação molecular	44
4.3.7. Produção de invertase e frutossiltransferase em cultivos submersos	45
4.3.8. Seleção de fontes de carbono.....	45

4.3.9. Seleção de fontes de nitrogênio	46
4.3.10. Variação das concentrações de sacarose no meio de cultivo	46
4.3.11. Cultivo submerso em diferentes valores de pH	46
4.3.12. Seleção de adjuvantes para suplementação do meio de cultivo.....	46
4.3.13. Cinética da síntese de invertase e frutossiltransferase a partir de sacarose pela linhagem PP6	47
4.4 Métodos Analíticos	47
4.4.1. Determinação da atividade da enzima invertase	47
4.4.2. Determinação da atividade da enzima frutossiltransferase	49
4.4.3 Determinação da concentração de massa seca celular	50
4.4.4. Monitoramento do pH do meio de cultivo.....	51
4.5. Caracterização bioquímica da invertase e frutossiltransferase.....	51
4.5.1. Influência da temperatura e pH do meio reacional na atividade enzimática	51
4.5.2. Estabilidade térmica e frente ao pH de incubação	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1. Triagem de microrganismos produtores de invertase	52
5.1.1. Seleção em placa de linhagens produtoras de invertase com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	52
5.1.2. Seleção de linhagens produtoras de invertase e frutossiltransferase em cultivos submersos	55
5.2. Caracterização dos microrganismos produtores de invertase e frutossiltransferase.....	57
5.2.1. Análise Molecular	61
5.3. Cultivos de produção de invertase e frutossiltransferase pela linhagem <i>Bacillus</i> sp. PP6	66
5.3.1. Efeito de fontes de carbono sobre a produção de invertase e frutossiltransferase	66
5.3.2. Efeito de fontes nitrogênio sobre a produção de invertase e frutossiltransferase.....	68
5.3.3 Influência de diferentes adjuvantes.....	70
5.3.4 Influência da concentração de sacarose no meio de cultivo	72
5.3.5 Influência dos valores de pH inicial do meio de cultivo na síntese de enzimas	73
5.3.6 Produção de invertase e frutossiltransferase em diferentes tempos de cultivo	74
5.4. Propriedades Bioquímicas da invertase e frutossiltransferase de <i>Bacillus</i> sp. PP6.....	76
5.4.1. Influência da temperatura do meio reacional na atividade enzimática	76
5.4.2 Influência do pH do meio reacional na atividade enzimática.....	78
5.4.3. Estabilidade térmica da invertase e frutossiltransferase	80

5.4.4 Estabilidade frente ao pH de incubação	83
6. CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de reações químicas, sendo consideradas essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos, as quais são comumente utilizadas na biologia molecular, no desenvolvimento de metodologias analíticas e na fabricação de produtos tecnológicos. O que as tornam altamente desejáveis como catalisadores são a sua versatilidade, não necessitam de altas temperaturas ou valores extremos de pH, executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, adequando-se ao processo industrial (ORLANDELI et al., 2012). Embora existam outras fontes enzimáticas, como animais e plantas, a utilização de enzimas microbianas é a mais utilizada, devido à alta taxa de crescimento na obtenção de biomassa, além de não serem afetadas por flutuações sazonais e, portanto, sendo mais viáveis economicamente (MANOOCHEHRI et al., 2020)

De acordo com Araújo (2015) as indústrias têxteis, papel, farmacêutica, processamento de couro, biocombustíveis, alimentícia, processamentos ambientais, entre outros segmentos, são responsáveis pelo crescimento exponencial do mercado de enzimas nas últimas décadas. Esse fato está relacionado pela eficiência e economia nos processos produtivos e a preocupação mundial com a sustentabilidade ambiental, cujo mercado enzimático se faz particularmente importante para o Brasil devido a necessidade do país se inserir como usuário de tecnologia enzimática, conciliando desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental (POLITZER; BOM, 2005). O cenário do mercado enzimático está dividido basicamente em enzimas técnicas que são aplicadas a indústrias de tecido e produtos de limpeza, enzimas para alimentos e bebidas e enzimas para ração animal (MONTEIRO; SILVA, 2009)

As aplicações mais amplas em escala industrial exigem que a comunidade científica investigue fontes alternativas de invertases que podem resistir a ambientes robustos, como aqueles encontrados em processos industriais (NADEEM et al., 2015). A invertase (β -frutofuranosidase, E.C. 3.2.1.26) catalisa a hidrólise de sacarose. Quando a ligação glicosídica é clivada em uma reação de hidrólise, é produzida uma mistura equimolar de glicose e frutose, denominada de açúcar invertido (NADEEM et al., 2015). Essa mistura equimolar de frutose e glicose (xarope invertido) é mais doce em relação a sacarose devido ao alto grau de doçura da frutose. Como resultado, o teor de açúcar pode ser aumentado sem a cristalização do material,

sendo a produção de xarope de açúcar sem cristalização uma das principais aplicações da enzima (KULSHRESTHA et al., 2013). O denominado açúcar invertido é comumente utilizado na indústria alimentícia, de bebidas e confeitaria, devido ao aumento da doçura em relação à sacarose e ao melhor prazo de validade do produto, pois ele não cristaliza facilmente, além de sua aplicação no comércio farmacêutico (KOLI e GAIKAR, 2017).

A enzima invertase pode ser isolada de uma diversidade de fontes microbianas, incluindo bactérias, leveduras e fungos. Exemplos clássicos de produtores de invertase são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Arthrobacter sp.* e *Bacillus macerans* (PANG et al., 2019). Entretanto, *S. cerevisiae*, conhecida como a levedura do padeiro, é mais comumente utilizada para a produção da enzima por apresentar crescimento rápido em meios de culturas simples, alta densidade celular e facilidade de manipulação (ANDJELKOVIĆ et al., 2015). Nadeem et al., (2015) citam linhagens de *Bacillus cereus*, *Arthrobacter globiformis*, *Bifidobacterium breve*, entre outras, como fontes bacterianas para produção de invertase.

A frutossiltransferase (FTase, E.C. 2.1.4.9) também é uma enzima utilizada pela indústria, cuja ação enzimática ocorre através da hidrólise da sacarose na ligação β -1,2 e a transferência do grupo frutossil para uma outra molécula, podendo ser a própria sacarose ou frutooligossacarídeos (FOS), ocorrendo, por fim, a liberação da molécula de glicose, sendo essa reação chamada de transfrutossilção. Como resultado da reação da frutossiltransferase, são produzidos um tipo de carboidrato denominado de frutooligossacarídeos (FOS). FOS são carboidratos não digeríveis que representam uma das principais classes de oligossacarídeos bifidogênicos, os quais são carboidratos que estimulam o crescimento das bifidobactérias (bactérias não patogênicas) na microbiota intestinal (FLORES-MALTOS et al., 2016). FOS possuem propriedades interessantes como efeitos na diminuição dos níveis de fosfolipídios, triglicérides e colesterol, além de auxiliarem na absorção intestinal de cálcio e magnésio e estimularem o crescimento de bifidobactérias no cólon humano (MUSSATTO et al., 2015). Além disso, os FOS são aplicados como novos adoçantes alternativos com propriedades funcionais, possuem fibras solúveis com diversas características desejáveis como baixas calorias e, portanto, podem ser consumidos seguramente por diabéticos (BHALLA et al., 2017).

A região Amazônica apresenta uma ampla diversidade microbiana que pode contribuir com o setor industrial por meio de estudos que explorem o seu potencial enzimático, mostrando-se como um vasto campo de estudos (PAIVA, 2010). Estima-se que a região amazônica possua

aproximadamente 220 espécies de plantas produtoras de frutas comestíveis. Esses frutos são considerados uma fonte potencial de micronutrientes, entretanto as informações sobre sua microbiota são limitadas (BROINIZI et al., 2007). Dentre os frutos pertencentes ao bioma Amazônico estão a pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart).

O tucumã é uma palmeira das terras firmes da Amazônia que desenvolve um mercado de importância para região, sua polpa é muito apreciada e rica em compostos bioativos como flavonóides, β -caroteno e rutina. Também proveniente da Amazônia a pupunha é vista como uma alternativa alimentar devido seu valor nutricional que possui altos níveis de fibra, β -caroteno, gordura, minerais e alguns aminoácidos essenciais. A pupunha não possui proteínas formadoras do glúten, o que pode ser visto como uma matéria-prima de interesse para o desenvolvimento de novos produtos no mercado de alimentos para pacientes com doença celíaca (SILVA et al., 2005; SAGRILLO et al., 2015)

De acordo com Araújo (2015), os frutos são micro habitats importantes para uma variedade de espécies de microrganismos na natureza e as diferentes partes das plantas (raízes, caule, folhas, flores, frutos etc.) constituem um dos substratos mais abundantes para o desenvolvimento dessas linhagens, com excelente potencial tecnológico. A diversidade microbiana pode demonstrar um grande potencial biotecnológico para a produção de novas moléculas e seu isolamento permite identificar novas linhagens microbianas do ecossistema brasileiro, além de explorar, biotecnologicamente, o potencial dessas linhagens para a produção de enzimas (FILHO et al., 2014). Diante disso, o trabalho teve como objetivo a identificação dos microrganismos isolados dos frutos pupunha e tucumã com potencial para a produção das enzimas invertase e frutossiltransferase, assim estudos de caracterização de suas propriedades bioquímicas e das condições de cultivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Frutos amazônicos

A biodiversidade brasileira é vista como uma das mais representativas do mundo e inúmeras literaturas já demonstraram o potencial biotecnológico de frutos e vegetais consumidos pela população. O crescente interesse mundial por matérias-primas nativas do Brasil tem causado impulso na realização de pesquisas na região amazônica, que possui inúmeras espécies nativas de plantas com potencial tecnológico, econômico e nutricional, despertando o interesse de pesquisadores que visam o melhor aproveitamento dessas espécies, tornando possível a identificação de novas fontes de matéria-prima de baixo custo, com elevado potencial industrial. A caracterização desses produtos se torna importante para a constatação da presença de compostos bioativos, trazendo também benefícios para população amazônica, gerando renda pelo aumento no consumo do produto (LAMARÃO et al., 2020; BECKER et al. 2018; SILVA et al., 2014; CUNHA JUNIOR., 2020). Dentre os diversos frutos encontrados na região amazônica estão presentes a pupunha e tucumã.

A pupunha (*Bactris gasipaes*) é uma palmeira pertencente à família Arecaceae, composta por cerca de 183 gêneros e 2.450 espécies. Todas as partes da planta pode ser utilizada para algum fim comercial, como as flores, que podem ser cozidas e usadas como condimento, as raízes e o caule têm ação vermífida, e o tronco fornece madeira de qualidade (JESUS e ABREU, 2002). A pupunheira é definida como uma palmeira multiuso nativa da América Latina tropical, que fornece frutos comestíveis amiláceos e palmito e já era utilizada de forma ampla durante os tempos pré-colombianos e atualmente Peru, Brasil, Colômbia e Costa Rica são seus maiores produtores. Sua produção comercial começa geralmente de 3 a 5 anos após o plantio e dura de 50 a 75 anos, o diâmetro do fruto varia de 1 a 9 centímetros e a palmeira possui cachos que podem pesar até 12 kg, e produzindo normalmente 75 a 300 frutos por cacho. A colheita é considerada a etapa mais difícil para produção da pupunheira pelo fato dos espinhos e tamanho representarem risco a segurança (CLEMENT et al., 2010; GRAEFE et al., 2013).

O tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia que abrange territórios como Bolívia, Colômbia, Venezuela, Guiana e no Brasil está presente em toda Amazônia ocidental. Possui uso popular na região amazônica onde é utilizada na composição

de sorvetes, pastas, doces, entre outros produtos. A palmeira demonstra também grandes potencialidades de aproveitamento em indústrias farmacêutica, cosmética e de biodiesel (FORTES et al., 2016). A fruta tem uma forma elipsoide com comprimento de 3 a 5 cm, espessura de 2 a 4 mm, cor amarelo/laranja. Quando a fruta se encontra madura é fibrosa e gelatinosa, quando consumida é possível aproveitar quase todas as partes da palmeira (SANTOS et al., 2018). Estudos desenvolvidos por Jobim et al. (2014) demonstraram efeitos antibacterianos e antifúngicos do tucumã quando testado contra cepas patogênicas e Baldissera et al. (2017) reportaram que devido ao alto índice de carotenoides na fruta, o óleo de tucumã foi capaz de amenizar as alterações causadas pela hiperglicemia. O fruto também desperta interesse por possuir baixo teor de ácido e açúcares e pelas altas taxas de β -caroteno, precursor da vitamina A, o que esclarece seu potencial antioxidante, além de sua suculência e alto valor energético (SAGRILLO et al., 2015; DA COSTA et al., 2012).

2.2 Isolamento de microrganismos em frutos

As plantas vivem intimamente em contato com variados tipos de microrganismo, os quais podem ser considerados epifíticos ou endofíticos, sendo os microrganismos epifíticos aqueles que podem sobreviver e multiplicar na superfície das plantas enquanto os classificados como endofíticos são aqueles que colonizam os tecidos internos das plantas, sem geração de danos para as plantas, pelo contrário, conseguem proteger seu hospedeiro contra ameaças externas, em uma única planta ocorre a diversidade entre as populações microbianas encontradas, mesmo levando em consideração uma pequena diferença de localização ou tempo. Os frutos retratam um micro-habitat propício para o crescimento microbiano devido seu baixo pH e alta concentração de açúcares (SEBASTIANES et al., 2017; THAPA et al., 2017). A biotecnologia atualmente permite a descoberta e produção de bioprodutos agregando valor às suas matérias-primas, o desenvolvimento desses produtos originários da Amazônia proporciona maior fortalecimento na defesa da biodiversidade contribuindo para sua conservação e sustentabilidade (ASTOLFI FILHO et al., 2014). Serra et al. (2019) ao analisarem a microbiota do fruto do cacau amazônico relaram a presença de microrganismos como *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus murinus*, enquanto Ramos et al. (2020) descreveram a presença de bactérias do gênero *Acetobacter* ao estudarem o fruto do cupuaçu.

Dewan, (2017) relata que as enzimas produzidas pelos microrganismos autóctones dos frutos estão entre os bioprodutos com alto valor agregado e aplicação biotecnológica, ainda esclarece que o mercado tecnológico tem apresentado crescimento contínuo nos últimos anos e alguns estudos relatam um crescimento de US\$ 5 bilhões, em 2016, para US\$ 6,3 bilhões, em 2021 no mercado enzimático. Além da aplicação enzimática, esses microrganismos possuem diversas aplicações, entre elas na indústria farmacêutica e cosmética, em pigmentos alimentares, e como agentes de controle biológico de fitopatógenos (RAJASEKARAN et al., 2008; HANADA et al., 2010). Na tabela abaixo é possível visualizar as diversas aplicações de linhagens microbianas isoladas de frutos.

Tabela 1. Linhagens microbianas isoladas de frutos e suas aplicações na indústria enzimática.

Fruto	Microrganismo	Enzima	Aplicação	Referência
Tucumã	<i>Aspergillus niger</i>	Lipase	Síntese de ésteres Resolução racêmica	Fonseca Machado (2020)
Acerola	<i>Candida azyma</i> <i>Cryptococcus laurentii</i>	Protease	Indústria alimentícia – melhora do aroma, sabor, textura, etc.	Trindade et al. (2002)
Pitanga	<i>Rhodotorula gaminis</i> <i>Candida sorbosivorans</i> <i>Pseudozyma antarctica</i>			
Umbu	<i>Cryptococcus</i> sp.	Pectinase	Clarificação de sucos	Trindade et al. (2002)
Mangaba	<i>Pichia membranifaciens</i>			
Pinha	<i>Meyerozyma caribica</i>	Invertase	Produção do açúcar invertido	Araújo et al. (2015)

Neste estudo, a partir do fruto da pupunha foram isolados uma variada gama de microrganismos produtores de invertase, dentre eles leveduras do gênero *Meyerozyma* sp. e linhagens bacterianas como *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Corynebacterium* sp., e *Microbacterium* sp. Na literatura a utilização de *Meyerozyma* sp. para produção de invertase é extremamente escassa, porém Araújo (2015) ao isolar essa linhagem do fruto pinha (*Annona squamosa*) conseguiu uma produção de invertase intracelular de 15,83 U/mL. Entretanto invertases produzidas a partir de linhagens de *Bacillus* sp. são mais comumente encontradas.

Ahmed et al. (2008) produziu a enzima por *Bacillus macerans*, enquanto Yoon et al. (2007) e YI et al. (2007) utilizaram *Bacillus cereus*. Já a espécie de *Enterobacter sp.* para produção da enzima foi relatada por Zhao et al. (2015). Uma invertase produzida a partir do gênero *Corynebacterium sp.* foi descrita por Nadkarni et al. (1993). Já Liu et al. (2021) identificou uma nova invertase a partir *Microbacterium trichothecenolyticum*. É importante enfatizar que os microrganismos aqui isolados, proveniente do fruto da pupunha podem ser aplicados em outras áreas que não seja a produção da invertase, como descrito na tabela a seguir.

Tabela 2. Possíveis aplicações dos microrganismos isolados da pupunha.

Microrganismo	Aplicação	Referência
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Produção de ácidos orgânicos, poliálcoois, biocontrole de fitopatógenos.	Yan et al. (2021)
<i>Bacillus sp.</i>	Probióticos na agricultura, Formação de biofilme, desintoxicação de corantes, biocontrole.	Kuebutornye et al. (2019) Ye et al. (2018)
<i>Enterobacter sp.</i>	Produção de biosulfactante e biofertilizante.	Jadhav et al. (2011) Mendonza-Arroyo et al. (2020)
<i>Corynebacterium sp</i>	Produção de aminoácidos e isobutanol	Blombach et al. (2011) Wendisch et al. (2016)
<i>Microbacterium sp.</i>	Produção de bioemulsificante	Aniszewski et al. (2010)

O isolamento de microrganismos autóctones envolve variados cuidados, desde a coleta à realização do experimento no laboratório, ambiente esse que necessita ser adequado para evitar contaminações cruzadas e deterioração dos frutos. Para limpeza da superfície do fruto o tratamento requer o uso de etanol 70%, e hipoclorito de sódio em seguida, finalizando com etanol ou água esterilizada (BATISTA et al., 2018). A etapa-chave para estudo desses microrganismos é o isolamento. Para análise qualitativa esse isolamento pode ser realizado através da distribuição de fragmentos do material de estudo sobre a superfície do meio de cultura, seguindo para incubação em condições adequadas para o crescimento microbiano. Para realização de testes quantitativos as amostras podem ser trituradas e ressuspensas em soluções aquosas ou salinas em suas determinadas diluições seriadas (SILVA et al., 2005)

O isolamento em questão se dá através de técnicas de plaqueamento em superfície ou em profundidade. O primeiro permite a contagem e isolamento dos microrganismos na superfície do meio de cultura, onde a amostra é espalhada pela superfície com o auxílio da alça de Drigalski. Quando esse isolamento é feito em profundidade a amostra é dispensada nas placas de Petri vazias e em seguida o meio de cultura escolhido é despejado sobre a amostra e após solidificação é colocado em incubação para crescimento microbiológico, o qual é expresso em Unidades Formadoras de Colônias (UFC). É de extrema importância que os meios de cultivo atendam às necessidades nutricionais dos microrganismos. Os fungos filamentosos requerem meios de cultura ricos em carboidratos e pH ácido, como o Ágar Batata Dextrose ou Ágar Sabouraud, adicionando antibióticos para evitar o crescimento indesejado de bactérias. Para se isolar bactérias os meios devem ser ricos em proteínas, sais minerais e com pH alcalino, como o Ágar nutriente ou Ágar Luria-Bertani (LB), com adição de fungicidas para inibir fungos filamentosos e leveduras (LIMA et al., 2020)

A seleção de microrganismos produtores de enzimas através de métodos qualitativos é realizada através de um meio de cultura com nutrientes que garantam o crescimento do microrganismo com adição de uma fonte de carbono indutora da enzima de interesse, como o cloreto de trifeniltetrazólio para revelação da invertase. O resultado desse método é exposto pelo índice enzimático que é dado a partir da relação entre o diâmetro do crescimento das colônias e o diâmetro do halo que se formou em torno da colônia, o que indica uma degradação do substrato indutor utilizado. Essa seleção pode ser realizada também a partir do método quantitativo onde é utilizado o substrato puro em meio tamponado, adequando a temperatura e pH. Essa quantificação é expressa através de uma curva de calibração utilizando o produto da reação (LIMA et al., 2020).

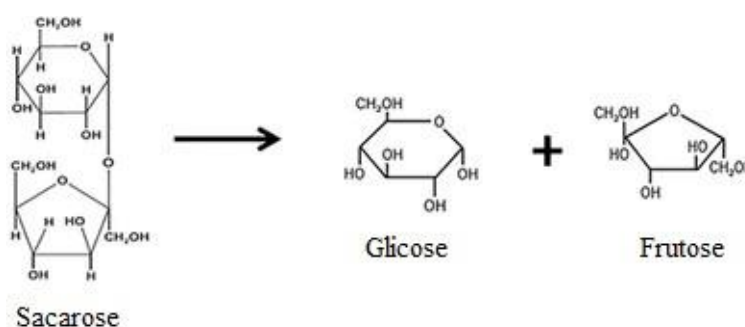
2.3 Invertase

Diferente da glicose e da frutose, a sacarose é um açúcar não redutor pelo fato de a ligação glicosídica ocorrer entre o carbono 1 da aldose (glicose) e o carbono 2 da cetose (frutose). As soluções aquosas de sacarose e glicose são dextro-rotatórias, pois causam rotação da luz polarizada plana para a direita, enquanto a solução de frutose é fortemente levorotatória, pois causam rotação da luz polarizada plana para a esquerda. Como a enzima catalisa a inversão do plano da luz na solução de açúcar invertido, então "invertase" é o nome comumente utilizado

para esta enzima (NADEEM et al., 2015). A sacarose também pode ser hidrolisada em meio ácido e em temperaturas elevadas, contudo a hidrólise ácida demonstra algumas desvantagens na formação de produtos indesejados, como a produção de hidroximetil furfural (HMF) que altera a coloração do xarope, gasto de alta energia e baixa eficiência, tornando a hidrólise enzimática preferível para obtenção de um produto com maior potencial de aplicação industrial (SOARES et al., 2019),

A invertase é um dos biocatalisadores mais antigos e conhecidos, pertencente à família das hidrolases glicosídicas (GH) que abrange cerca de 370 enzimas, e possui variadas denominações como seu nome formal β -frutofuranosidase (EC.3.2.1.26) e seu nome sistemático sacarose glicosidase, além de ser conhecida por invertina, frutohidrolase, entre outros (TIMERMANN., 2012). Kulshrestha et al. (2013) explicam que a enzima atua catalisando a hidrólise da ligação glicosídica $\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$ da sacarose em D-glicose e D-frutose (Figura 1) formando unidades de monossacarídeos equimolares dando origem ao açúcar invertido amplamente utilizado por diversas indústrias. Além da produção desse açúcar, a enzima quando em concentrações mais elevadas de sacarose apresenta uma propriedade de transferase, o que a agrupa na classe de enzimas transferase, podendo ser utilizada na produção de frutooligossacarídeos (FOS) (BHALLA et al., 2017).

Figura 1: Mecanismo de ação da invertase. Fonte: Lincoln e More (2017).



As variadas isoformas com características distintas da invertase estão presentes em diferentes partes das células e são produzidas nas formas intracelular e extracelular a depender do microrganismo estudado, como descrito na Tabela 3. As invertases extracelulares são glicoproteínas compostas por carboidratos, manose e glucosamina, enquanto as invertases intracelulares não possuem carboidratos (BARBOSA et al., 2018; MANOOCHEHRI et al., 2020).

Tabela 3: Localização de invertases produzidas por bactérias.

Microrganismo	Tipo de enzima	Referência
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Extracelular	Win et al. (2004)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Extracelular	Awad et al. (2013)
<i>Enterobacter</i> sp.	Extracelular	Kumar et al. (2016)
<i>Bifidobactéria</i> sp.	Extracelular	Bujacz et al. (2011)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Intracelular	Gines et al. (2000)
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Intracelular	Warchol et al. (2002)
<i>Bacillus</i> sp.	Intracelular	Zhou et al. (2016)

Além disso, de acordo com o pH ótimo da enzima, as invertases são classificadas em dois grupos principais: invertases ácidas (4,5-5,5) e invertases neutras ou alcalinas (6,5-8,0). Enquanto as invertases neutras e alcalinas podem ser localizadas no citosol, mitocôndrias ou plastídeos, as invertases ácidas estão ligadas à parede celular ou encontradas em vacúolos (TAUZIN et al., 2014). É relatado que as invertases ácidas são capazes de separar o resíduo da frutose do oligossacarídeo contendo frutose, entretanto as invertases alcalinas que são consideradas a principal classe de invertases, são relatadas em várias plantas e cianobactérias (VARGAS et al., 2003; LINCOLN e MORE., 2017). Contudo, as invertases bacterianas mostram potencial de atividade tanto em pH ácido (DISPASQUALE et al., 2009; KAUR et al., 2005) quanto em alcalino (AWAD et al., 2013).

As invertases são distribuídas em variados organismos como plantas, bactérias, leveduras e fungos (Tabela 4). Barbosa et al. (2018) e Wan et al. (2017) relatam que as invertases bacterianas apresentam características diversas, podendo ser tanto intracelulares quanto extracelulares, apresentando diferentes quantidades de glicosilação.

Tabela 4: Fontes de invertases microbianas e vegetais.

Fonte	Gênero	Referência
Fungos	<i>Aspergillus niger</i>	Dinarvand et al. (2017) Lorenzoni et al. (2014)
	<i>Fusarium graminearum</i>	Gonçalves et al. (2013)
	<i>Penicillium sp.</i>	Matei et al. (2017)
	<i>Trichoderma sp.</i>	Matei et al. (2017)
Leveduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bhalla et al. (2017) Margetic et al. (2017)
	<i>Candida guilliermondii</i>	Espinosa et al. (2014)
Bactérias	<i>Enterobacter asburiae</i>	Kumar et al. (2016)
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Win et al. (2004)
	<i>Bacillus cereus</i>	Yoon et al. (2007)
	<i>Bacillus macerans</i>	Ahmed et al. (2008)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Kaur e Teotia (2021)
	<i>Lactobacillus brevis</i>	Awad et al. (2013)
Plantas	Agave	Cortes-Romero et al. (2012)
	Camellia	Qian et al. (2016)
	Hévea brasilienses (seringueira)	Liu et al. (2015)

Bergareche et al. (2018) classificam as plantas como um dos mais abundantes produtores de invertase, entretanto o uso das plantas para produção industrial de invertase não é visto como algo economicamente viável pela baixa taxa de crescimento, demora e alto custo de produção, além de sofrerem flutuações sazonais. Pelos microrganismos não sofrerem essas flutuações e possuírem alta taxa de crescimento as invertases microbianas são preferidas na produção industrial, os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e leveduras como *S. cerevisiae* são os organismos mais utilizados para a produção de invertase (VEANA et al., 2018). Apesar dos fungos e leveduras serem os mais comuns produtores, Manoochchri et al. (2020) relata também a produção da enzima por bactérias, podendo ser intra ou extracelular em diferentes quantidades de glicosilação.

2.3.1 Caracterização bioquímica Invertase

Para qualquer enzima atingir valores mais altos de atividade é necessário analisar qual pH e temperatura são mais apropriados para a mesma, além de selecionar qual o meio de cultivo ideal para a produção da enzima. Kulshrestha et al. (2013) explicam que ao contrário da maioria das enzimas, a invertase demonstra atividade significativamente alta em ampla faixa de pH, com seu pH ótimo aproximadamente em 4,5 atingindo valores de atividade máxima a 55°C. Resultados esses que validam os valores ótimos de pH e temperatura encontrados por Rustiguel et al. (2010) ao analisar uma invertase da linhagem de *Aspergillus phoenicis*, que teve sua maior atividade em pH de 4,5 a 55°C. Entretanto, a enzima invertase pode atuar em uma ampla faixa de temperatura e pH, o que pode ser observado na Tabela 5, onde é demonstrado também diferentes formulações de meios de cultivo para obtenção da enzima.

Tabela 5: Propriedades bioquímica de invertases produzidas por microrganismos.

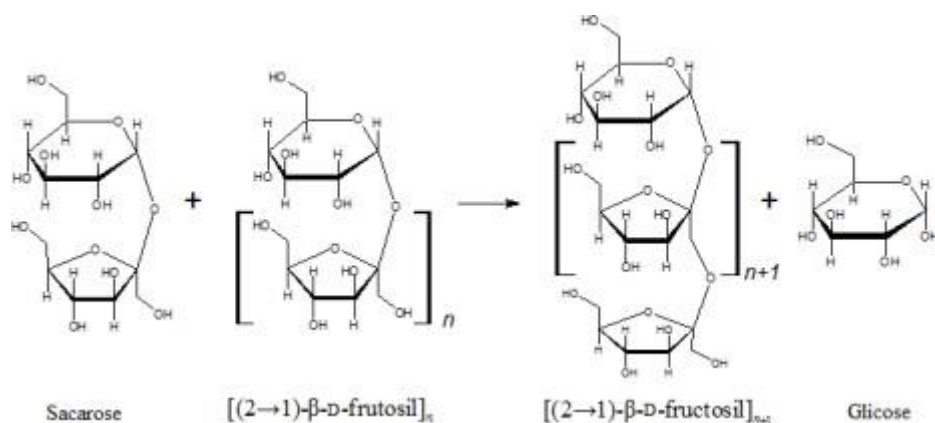
Microrganismo	pH	Temperatura (°C)	Meio de cultivo	Condições de cultivo	Atividade enzimática	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	5,5	55°C	5 % de sacarose, 0,7% de extrato de malte, 1 % de polipeptona, 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) e 0,3% NaCl	28°C / 72h	NR	Hirayama et al. (1989)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	4,5	60°C	2% de sacarose, 0,1% KH ₂ PO ₄ , 0,05% MgSO ₄ , 0,05% KCL, 0,001% FeSO ₄ , NaNO ₃ , 0,1% (v/w) Tween 80	30°C / 72h	15,2 U/mL	Guimarães et al. (2007)
<i>Bacillus cereus</i>	7,0	50°C	1% sacarose, 0,6% extrato de levedura, 0,1% KH ₂ PO ₄ , 0,1% H ₂ HPO ₄ .	50°C / 36h	3,0 μmol/min	Yoon et al. (2007)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	6,8	37°C	1% sacarose, 1% de poli-peptona, 0,2% de extrato de levedura, 0,4% (NH ₄) ₂ HPO ₄	25°C / 36h	NR	Win et al. (2004)
<i>Bifidobacterium breve</i>	6,0	37°C	Meio de Man-Rogosa-Sharpe modificado com 1% de sacarose, 0,05% de L-cisteína-HCl	NR	24 μmol/min	Ryan et al. (2005)

Legenda: (NR): não relatado.

2.4 Frutosiltransferase

A 1,2 β -D-frutosiltransferase (E.C 2.4.1.9), ou mais comumente conhecida como frutosiltransferase, é uma enzima que realiza a catálise da conversão da sacarose em fruto-oligossacarídeos mediante a transferência dos agrupamentos frutossil para resíduos de sacarose, além de outros mecanismos de ação que ainda não foram totalmente esclarecidos. A primeira notificação a respeito da enzima ocorreu em 1950, sendo catalogada apenas em 1961, porém ainda é reportada a inexistência de um consenso na literatura a respeito da nomenclatura correta das enzimas envolvidas na produção de FOS que utilizam a sacarose como substrato, sendo observadas ambiguidades entre as terminologias frutosiltransferase e a frutofuranosidase, mediante os mecanismos hidrolíticos e/ou de transfrutossilção que as mesmas executam (GANAIE et al., 2014; CUNHA et al., 2017; MACEDO et al., 2020; SPOHNER e CZERMAK, 2016; ANTOŠOVÁ e POLAKOVIČ, 2001; ANTOŠOVÁ e POLAKOVIČ, 2008). No que se refere a estrutura tridimensional da enzima, Chuankhayan et al. (2010) sugere a existência de dois domínios, com um domínio catalítico N-terminal contendo uma dobra de hélice de cinco lâminas ligadas a um domínio em sanduíche em C-terminal, que estão ligados por uma hélice curta de 9 resíduos, a qual estabiliza o dobramento estrutural e influencia diretamente os mecanismos de ação e a caracterização bioquímica.

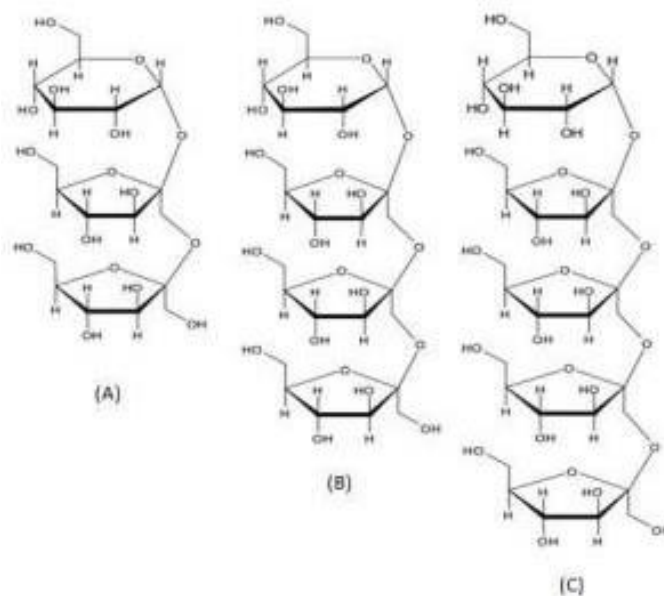
Figura 2: Reação de transfrutossilção. Fonte: CUNHA (2017).



As frutosiltransferases podem ser divididas em quatro grupos, denominadas 1-SST (sacarose: sacarose 1-frutosiltransferase), 6-SFT (sacarose: frutano 6-frutosiltransferase), 1-FFT (frutano: frutano 1-fructosiltransferase), e G^6 -FFT (frutano: frutano 6G-

frutossiltransferase). Para sintetizar frutanos mais complexos, a classe da kestose é a mais utilizada pelas frutossiltransferases, na qual se dá com a conversão da sacarose em 1-kestose, sendo a sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST) a enzima responsável por essa conversão, enquanto a 1-FFT usa 1-kestose ou frutanos com um maior grau de polimerização como doadores de frutose e tem como função determinar o comprimento da inulina sintetizada, sendo então a 1-SST e 1-FFT necessárias e suficientes para a síntese de frutanos do tipo inulina. A 6-SFT catalisa a transferência de uma unidade de frutose da sacarose a uma ampla variedade de receptores, produzindo frutanos com unidades de frutose ligadas entre si através da ligação β (2-6). Para a produção de frutanos do tipo neoserie, se faz necessária a enzima G^6 -FFT a qual usa a 1-kestose como um doador de frutose, transferindo a frutose para o resíduo de glicose de sacarose através de uma ligação β (2-6), formando assim a neo-kestose (BATISTA, 2018; PICAZO et al., 2019). A Figura 3 representa a estrutura molecular desses oligossacarídeos.

Figura 3: Fórmula estrutural dos frutooligossacarídeos: (A) kestose, (B) nistose e (C) β -frutofuranosilnistose. Fonte: CUNHA, 2017.



A razão entre Unidade de Atividade de Frutossiltransferase (UTF) e Unidade de Atividade de Frutofuranosidase (UF) é importante para indicar a intensidade relativa da atividade de transfrutosilação (GANAIE et al., 2017; MASO, 2019). As frutossiltransferases

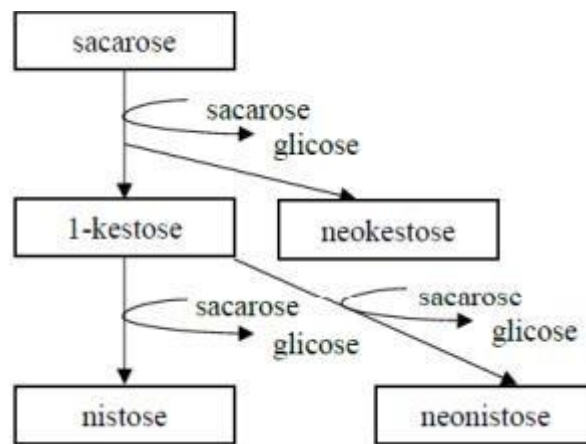
microbianas são enzimas únicas que exibem ambas as atividades de transferase e hidrolase (JITONNOM et al., 2018).

2.5 Fruto-oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são compostos por dois a 10 monômeros de sacarídeos, enquanto os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos que fazem parte do grupo dos frutanos. O termo FOS é utilizado para frutanos do tipo inulina que apresentam ou não um grupo terminal de glicose. Esses fruto-oligossacarídeos podem ser produzidos a partir da sacarose pela ação de enzimas que possuem atividade transfructosilante, sendo elas, frutosiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9) que catalisa a transferência da fração frutossil de uma molécula de sacarose para outra, rendendo unidades de FOS maiores, β -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26), que possui tanto atividade de transfrutosilação quanto atividade hidrolítica, agindo em concentrações mais elevadas de sacarose, liberando a molécula de glicose da sacarose por meio da clivagem da ligação β -1, 2, fazendo a transferência do grupo frutossil para um acceptor diferente da água como a sacarose ou um frutooligossacarídeo. Além das inulases (EC 3.2.1.7), as quais hidrolisam a inulina que é um polissacarídeo e a partir da sua hidrólise são liberadas principalmente frutose com uma fração de glicose (OLIVEIRA et al, 2020; HERNANDEZ, et al. 2018; BALI et al, 2013; VEGA; ZUNIGA-HANSEN, 2014; MACEDO, et al. 2020).

Na composição dos FOS, duas a nove unidades de frutossil estão ligadas através de ligações glicosídicas $\beta(2\rightarrow1)$, e a ligação com a glicose é do tipo $\alpha(1\rightarrow2)$, como ocorre na sacarose. Os FOS são encontrados, principalmente, nas formas de 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4), o trissacarídeo 1-kestotriose (1-kestose, GF₂) tem efeito estimulante de bífido superior e tem sabor mais adocicado que o tetrassacarídeo 1,1-kestotetraose (nistose, GF₃) e o pentassacarídeo 1,1,1-kestopentaose (frutossil-nistose, GF₄) (SPOHNER e CZERMAK, 2016).

Figura 4: Rota da produção de FOS. Fonte: SHINOHARA, 2001.



Os FOS são considerados prebióticos e fibras solúveis, ou seja, são ingredientes alimentares que não sofrem hidrólise pelas enzimas no trato digestivo (não digeríveis), chegando intactos ao intestino grosso. Posteriormente, são fermentados, levando à produção de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta. Esses prebióticos estimulam o crescimento de bactérias no cólon, e são recomendados para o aumento rápido e durável de bactérias prebióticas intestinais. FOS possuem cerca de um terço do poder adoçante da sacarose, não são calóricos, nem considerados açúcares ou carboidratos e também não usados como fonte de energia. São amplamente utilizados na fabricação de alimentos com baixo ou nenhum teor de açúcar adicionado, com comprovados efeitos na promoção da saúde em humanos e animais. Também demonstram uma não carcinogenicidade, segurança para diabéticos, proteção contra o câncer de cólon, estimulação da absorção de Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e outros íons e redução do colesterol no sangue, além de demonstrar grande potencial econômico para indústria açucareira (HERNANDEZ et al, 2018; KUMAR et al, 2018; MACEDO et al, 2020).

O adoçante a partir de FOS é visado para substituir diversos adoçantes da indústria de alimentos e bebidas, como xilitol, aspartame e sucralose, devido à sua relação custo-benefício, propriedades superiores e por ser considerado menos prejudicial quando adicionado a vários produtos em comparação com os seus outros homólogos. O uso dos FOS está cada vez mais ligado ao setor de alimentos e bebidas, suplementos dietéticos, fórmulas infantis, ração animal e produtos farmacêuticos atingindo também outros setores, como nas gomas, laticínios, sopas e carnes processadas. A demanda de FOS aumenta cerca de 15% ao ano e constitui certa de

10% dos adoçantes naturais do mercado, portanto é desejável encontrar maneiras industriais de baixo custo para produzi-los. A produção de FOS tem sido principalmente através de produtos químicos, hidrólise enzimática de inulinas, ou por métodos enzimáticos utilizando invertases e frutossiltransferases (CREDENCE RESEARCH, 2016; TOLEDO et al, 2019; PANESER e BALI 2016).

A produção em escala industrial desses prebióticos é realizada preferencialmente através de processos biotecnológicos, devido a estes processos proporcionarem maiores rendimentos em termos de produção. Os processos enzimáticos são preferidos na indústria de alimentos para a produção tendo em vista que a estereoseletividade e a regioseletividade das enzimas são necessárias para a síntese de oligossacarídeos estruturalmente bem definidos e estáveis (WANG, 2015). As enzimas são produtos biotecnológicos bem estabelecidos que frequentemente são usados com sucesso em setores variados se tornando um mercado multimilionário que continua em crescimento principalmente na indústria alimentícia. Nas últimas décadas é crescente o interesse dos indivíduos na melhoria da saúde fazendo com que alimentos nutracêuticos ou funcionais recebam maior atenção no seu desenvolvimento, como os frutooligossacarídeos que são considerados um dos prebióticos mais explorados na indústria (TOLEDO et al, 2019).

2.5.1 Ocorrência de fruto-oligossacarídeos a partir da frutossiltransferase

2.5.1.1 Plantas

Os FOS são compostos de origem natural e podem ser encontrados em mais de 36 mil espécies de plantas, entre elas a *Agave americana* ou *vera cruze agave*, *Asparagus officinalis* (raiz do aspargo), *Allium intybus* (cebola), *Cichorium intybis* (chicória), *Crinum longifolium* (folhas de beterraba), *Helianthus tuberosus* (Alcachofra de Jerusalém), *Lactuca sativa L.* (alface), e *Taraxacum officinale* (dente-de-leão), *Ipomoea batatas* (batata doce) e *Ananas comosus* (abacaxi egípcio) (IBRAHEM et al., 2021; MACEDO et al., 2020; SINGH; et al, 2017)

Entretanto, apesar do processo de obtenção ser considerado mais simples, contendo um menor número de etapas, para a aplicação industrial, é tecnicamente difícil extrair FOS das

plantas, devido problemas relacionados à disponibilidade, sazonalidade e pequena concentração, sendo preferíveis aquelas de origem microbianas (MUTANDA et al., 2014).

2.5.1.2 Microrganismos

As enzimas de origem microbiana geralmente são preferíveis para produção de FOS, por serem mais termoestáveis quando comparadas com as provenientes das plantas, apresenta uma maior massa molecular e se controlados os parâmetros do processo podem ser produzidas em qualquer lugar, independe de um período específico para obtenção, o que resulta em biocatalisadores com maiores atividades hidrolíticas e de transfrutossilagem e conseqüentemente maiores rendimentos na produção de FOS (BATISTA et al., 2018; GANAIE et al., 2014).

2.5.1.3 Fungos e leveduras

Diversos microrganismos são reportados como produtores de frutooligossacarídeos, dentre eles fungos como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus tamarii*, *Penicillium citrinum*, entre outros, são explorados para a produção de FOS. Aguiar et al. (2012) após a otimização da enzima frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. através de planejamento experimental relatou um significativo aumento da quantidade de nistose (GF3) na mistura de FOS, aumentando sua produção de 2,86 g/L.h para 12,05 g.L.h. Ganaie et al. (2013) atingiu uma produção de 33,73 U/mL de frutossiltransferase utilizando *Aspergillus flavus* e 35,64 U/mL através do *Aspergillus niger*. Em 2016, Nascimento e colaboradores reportaram uma atividade de invertase de 227,56 U/mL, empregando *Penicillium citreonigrum*, após otimização obtiveram valor da invertase de 301,84U/mL utilizando-o para produção de FOS.

Frutossiltransferases fúngicas podem ser encontradas tanto na forma extracelular como também dentro das células, ao analisar a otimização de *A. oryzae* para a produção de frutooligossacarídeos Cunha et al. (2019) expuseram valores de transfrutossilagem da frutossiltransferase variando de 4,32 a 15,84 U/mL na forma extracelular da enzima e de 82.62 a 202.58 U/mL na forma micelial. Maiorano et al. (2020) realizaram a síntese de frutossiltransferase extracelular e micelial de *A. oryzae* em biorreator de 10 litros, onde relaram valores de 2100 U/g e 667 U/g respectivamente. Perna et al. (2018) utilizando o mesmo

microrganismo expuseram valores de 36 U/mL de frutossiltransferase extracelular após 40 horas de cultivo.

Resíduos agroindustriais também são utilizados como uma alternativa para produção da frutossiltransferase, diversos resíduos da agroindústria têm sido reaproveitados para obtenção de produtos por serem altamente disponíveis e com um baixo valor comercial, como a pele de café, coroa de abacaxi, melação de cana, farelo de trigo, pele de banana entre diversos outros. Estes materiais geralmente são fontes de carbono e nitrogênio, atuando como suporte para o crescimento de micro-organismos. (NASCIMENTO et al 2019; BATISTA et al 2020; GANAIE et al 2017). Alguns fungos como *P. citrinum* e *Rhodotorula* sp. podem ser utilizados como produtores de frutossiltransferase a partir do melação de cana (JAYALAKSHMY et al. 2021; AGUIAR et al 2012). Jayalakshmy et al. (2021) também utilizou o *P. citrinum* para produção de FOS a partir da casca de banana, enquanto de La Rosa et al. (2020) produziu FOS através do mesmo resíduo, porém utilizando o *A. oryzae*. Vale ressaltar que as frutossiltransferases fúngicas podem ser produzidas tanto através de cultivo submerso (SmF) como também em estado sólido (SSF), como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6: Fungos e leveduras produtores de FOS a partir da frutossiltransferase.

Fungos	Substrato	pH/Temp	Método	Produção	Referência
			de		
			produção		
<i>Aspergillus japonicus</i>	Pele de café	NR	CES	64.12 U/mL	Mussatto et al. (2013)
<i>Aspergillus tamaritii</i>	Farelo de trigo	5,0 / 60°C	CES	42.71 U/mL	Batista et al. (2020)
<i>Aspergillus carbonaius</i>	Coroa de abacaxi	6,0/NR	Csm	14.60 U/mL	Nascimento et al. (2019)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Sacarose	5,5 / 60°C	Csm	77.77 U/mg	Xu et al. (2015)
Leveduras					
<i>Zalarya sp.</i>	Sacarose	NR/ 30°C	Csm	5,51 U/mL	Yoshikawa et al. (2022)
<i>Candida sp.</i>	Sacarose	5,5/ 25 °C	Csm	16.5 U/mL	Maugeri et al. (2007)
<i>Rhodotorula sp.</i>	Sacarose	5,5/ 25 °C	Csm	2.9 U/mL	Maugeri et al. (2007)

Legenda: (NR): não relatado; CES: cultivo em estado sólido; Csm: cultivo submerso.

2.5.1.4 Bactérias

Existem diversos estudos quanto a cinética, termodinâmica, aplicações e propriedades físico-químicas de frutossiltransferases microbianas, entretanto os trabalhos sobre ocorrência, produção e propriedades bioquímicas de FOS a partir de linhagens bacterianas são mais escassos. Algumas bactérias utilizam frutossiltransferases na produção de camada viscosa de frutanos em suas cápsulas ao redor de sua parede celular para formação de filme e fixação à célula hospedeira, enquanto algumas bactérias produzem FOS como fonte de energia (CHOUKADE et al., 2021). Alguns exemplos de frutossiltransferases bacterianas estão citados na Tabela 7.

Tabela 7: Bactérias produtoras de FOS a partir da frutossiltransferase.

Bactéria	Substrato	pH/Temp	Método de produção	Produção	Referência
<i>Bacillus macerans</i>	Sacarose	7,0 /37°C	Csm	9,3 U/mg	Park et al. (2001)
<i>Cryptococcus</i> sp.	Sacarose	NR/30°C	Csm	16,2 U/mL	Hernalsteens et al. (2008)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Sacarose	6,0/37°C	Csm	1,8 U/mg	Porraz-Domínguez et al. (2014)

Legenda: (NR): não relatado; CES: cultivo em estado sólido; CSm: cultivo submerso

2.6 Aplicação

2.6.1 Invertase

Atualmente, a invertase é amplamente utilizada para fins comerciais em diversas indústrias, incluindo alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos e biossensores. A enzima converte a sacarose e outros glicosídeos nos carboidratos comerciais mais simples. *Saccharomyces* sp. é o microrganismo mais utilizado para produção dessa enzima em fins comerciais. Apesar de serem conhecidos dois tipos de invertase, diferindo no seu modo de ação, sendo uma que hidrolisa a sacarose na extremidade da frutose (β -frutosidase), enquanto a outra realiza essa hidrólise na extremidade da glicose (α -glicosidase), ambas as reações resultam em uma mistura de glicose e frutose, conhecida como xarope invertido (Chaudhary et al., 2015).

O xarope invertido é mais doce que a sacarose devido à alta doçura da frutose. A frutose é mais indicada que a glicose para pacientes diabéticos além de levar a uma maior absorção de ferro em crianças. Devido essa característica altamente adoçante da frutose, a quantidade de açúcar pode ser aumentada sem a cristalização do material, fazendo com que uma das maiores aplicações da invertase seja a fabricação de xarope com açúcar não cristalizável a partir da sacarose, amplamente utilizado para produção e preparação de mel artificial, biscoitos, marshmallows, cremes, balas, geleias, chocolates, leite em pó para bebês, entre outros usos (ANDJELKOVIC et al., 2015; OLCER et al., 2013; VEANA et al., 2014)

Sempre que a sacarose for exposta à fermentação para produção de ácido lático, bebidas alcoólicas, glicerol, ou em produtos de panificação a presença de invertase é obrigatória. A fabricação de cerveja é uma das aplicações onde a invertase se faz mais presente, os açúcares do amido são fermentados em etanol pela ação de diversas enzimas, entre elas a invertase. (GOMAA., 2018; VAN DONKELLAR et al., 2016). Além da indústria alimentícia, a invertase é utilizada em outras indústrias, como na produção de ração para gado e abelhas, na indústria farmacêutica, onde é empregada na formulação de xarope para tosse, medicamentos, alimentos nutracêuticos, entre outros. Além de ser empregada também na fabricação de biocombustíveis e na produção de materiais plastificantes e indústrias de papel. A enzima possui também atividade de inulinase, fazendo com que possa ser utilizada na hidrólise de compostos de polifrutose em frutose (BHALLA et al., 2017; TALEKAR et al., 2010; VENESHKUMAR et al., 2011).

2.6.2 Frutosiltransferase

A procura e o desenvolvimento de alimentos que possam proporcionar algum tipo de benefício à saúde é crescente e afirma a aceitação do papel da dieta na prevenção e tratamento de doenças além de proporcionar o bem-estar pessoal. A procura por alimentos funcionais reflete a preocupação dos consumidores com a saúde. Com essa mudança na visão pelo desenvolvimento de produtos benéficos à saúde as indústrias têm sido forçadas a desenvolverem produtos que atendam esse mercado. Dentre os alimentos funcionais, os frutooligossacarídeos se destacam por apresentarem exatamente essas características funcionais desejadas (KUMAR et al., 2018; RAJENDRAN et al., 2017; WITSCHINSKI et al., 2018; GUERREIRO et al., 2016).

Panezer et al. (2016) e Bali et al. (2015) relatam que a frutosiltransferase é amplamente empregada na produção de frutooligossacarídeos, que são oligômeros de frutose, com baixas calorias e não são metabolizados pelo organismo humano. Por possuírem excelentes características benéficas como propriedades não carcinogênicas, estimulação do aumento das bifidobactérias do cólon, não serem hidrolisados pelas enzimas do trato digestivo, possuírem atividades funcionais prebióticas, aumentam o aumento da absorção de cálcio e magnésio, além de atuarem na redução do colesterol e fosfolipídeos no sangue, os FOS acabam sendo mais atrativos por essa característica do que pela sua doçura.

Os FOS são altamente visados para a produção de bebidas funcionais como sucos e néctares, sorvetes, biscoitos, molhos, iogurtes entre outros, pelo fato de ser altamente higroscópico e quando em solução demonstra uma viscosidade relativamente maior que aquelas de sacarose na mesma concentração (BALI et al., 2015; SINGH et al., 2017). Quando utilizados como suplementos alimentares os FOS aumentam o conteúdo de fibras nos alimentos, sem provocar o aumento da viscosidade ou alterar suas características organolépticas, além da utilização de FOS em barras de cereais, balas, ou em alimentação animal visando sua função prebiótica (DOMINGUEZ et al., 2014; CHOUKADE et al., 2019; ROMANO et al., 2016). Devido essas diversas possibilidades de aplicações dos FOS, a necessidade de tornar viável sua produção em larga escala se torna evidente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar o potencial de linhagens microbianas isoladas dos frutos pupunha e tucumã para a síntese de invertase e frutossiltransferases, bem como caracterizar as condições de cultivo e as propriedades bioquímicas das enzimas sintetizadas.

3.2. Objetivos específicos

Realizar a triagem dos microrganismos produtores de invertase a partir dos frutos amazônicos pupunha e tucumã;

- Realizar a caracterização morfológica e bioquímica dos microrganismos isolados;
- Avaliar o potencial de síntese de invertase e frutossiltransferase das linhagens selecionadas em cultivos submersos, mediante estudos de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, pH do meio de cultivo e adjuvantes para suplementação;
- Realizar a identificação dos microrganismos isolados produtores de invertase e frutossiltransferase mais promissores, a partir de técnicas de biologia molecular;
- Avaliar a influência da temperatura e do pH do meio reacional nas atividades das enzimas invertase e frutossiltransferase;

- Avaliar os efeitos térmicos e de pH na estabilidade das enzimas invertase e frutossiltransferase;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido como parte do Projeto PROCAD-AM 1707/2018 (Processo nº 88881.200497/2018-01).

4.1. Microrganismos e manutenção

Os microrganismos estudados neste projeto foram isolados dos frutos de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart) por meio de fermentação espontânea. A coleta dos frutos para fermentação (25 g de amostra) se realizou de forma asséptica (hipoclorito) e, em seguida, foi transferida para frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 225 mL de solução salina peptonada estéril 0,85 % (m/v) de cloreto de sódio e 0,1 % (m/v) de peptona bacteriológica. As amostras foram submetidas a agitação em mesa agitadora orbital durante 15 minutos, 130 rpm e 30 °C. Posteriormente, sucessivas diluições seriadas ($10^1 - 10^{-10}$) foram realizadas e alíquotas de 100 µL de amostra foram inoculadas por espalhamento em superfície em placas de Petri (200 x 15 mm) contendo caldo lisogênico (LB) sólido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl e 20 g/L de ágar bacteriológico). O isolamento ocorreu em intervalos de 0, 72, 144, 216, 288 e 360 horas de fermentação. Após completo isolamento, os microrganismos foram preservados em criotubos contendo glicerol a 20 % (m/v). Os isolados foram mantidos em ultrafreezer a -80 °C até o momento da reativação, a qual foi feita retirando a amostra do criotubo com o auxílio de uma alça descartável estéril inoculando-a em placa de Petri, contendo LB sólido. Os isolados permaneceram incubados a 30 °C por 48 horas.

4.2. Seleção de microrganismos produtores de enzimas

4.2.1. Triagem em placa de linhagens microbianas potenciais produtoras de invertase

O método utilizado para o isolamento foi adaptado de Reddy et al. (2010). Os cultivos foram realizados utilizando meio mineral (MM) sólido contendo: 20 g/L de sacarose, 3 g/L de sulfato de amônio, 1,5 g/L de fosfato monopotássico, 3,5 g/L de fosfato dissódico, 0,2 g/L de sulfato de magnésio, e 20 g/L de ágar para solidificação. O meio de cultivo foi submetido a esterilização a 121 °C e 2 atm por 15 minutos, e os cultivos foram incubados em estufa a 30 °C por 48 horas. A revelação das linhagens produtoras de invertase foi realizada com a aplicação de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) 0,1 % ($m v^{-1}$) em NaOH 0,5 mol/L sobre as colônias, cobrindo-as completamente (REDDY et al., 2010). A solução reveladora permaneceu de 10-15 min recobrando a placa. Após esse tempo, foi feita a lavagem da placa com auxílio de água destilada para melhor leitura dos resultados. As colônias com reação positiva se apresentaram em uma tonalidade rosa ou com halos de coloração rosa, enquanto as negativas permaneceram com suas colorações inalteradas. As linhagens com resultado positivo (coloração rosa) foram submetidas à cultivos submersos para serem caracterizadas quanto ao potencial de produção de invertase.

4.2.2. Triagem em cultivos submersos de linhagens microbianas potenciais produtoras de invertase e frutossiltransferase

Os cultivos submersos ocorreram em frascos Erlenmeyers (125 mL). Culturas estoques das linhagens potenciais produtoras de invertase foram transferidas para placas de Petri contendo LB sólido, por até 48 h. Colônias isoladas posteriormente foram transferidas para 20 mL de LB durante 24 h, a uma agitação de 150 rpm e 30 °C, para que fosse atingida uma densidade óptica mínima de 0,60, em um comprimento de onda de 610 nm, o qual corresponde a um mínimo de 10^7 UFC /mL. Alíquotas de 2 mL deste pré-inóculo foram utilizadas para inocular 18 mL de MM. Os cultivos submersos foram realizados em incubadora refrigerada com agitação orbital a 150 rpm, 30 °C por 48 horas. Após o tempo de cultivo, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 minutos a 10 °C para obtenção do sobrenadante, o qual foi utilizado para análise da atividade enzimática. Os meios de cultivo utilizados foram ajustados

para o pH 7,0, com adição de HCl ou NaOH 1 mol/L, sendo esterilizados a 121 °C, 2 atm por 15 minutos.

4.3. Caracterização dos microrganismos produtores de invertase e frutossiltransferase

4.3.1. Caracterização morfológica e bioquímica

As linhagens isoladas com a capacidade de produção de invertase e frutossiltransferase foram caracterizadas pela técnica de coloração de Gram, morfologia celular e testes de catalase e oxidase. As linhagens isoladas foram incubadas em placas de Petri, contendo meio LB sólido, a 30 °C por 48 horas.

4.3.2. Coloração de Gram

Para a aplicação do protocolo, foram fixados esfregaços de células em uma lâmina em que se adicionou uma solução de cristal violeta, a qual permaneceu em contato com a lâmina por 60 segundos, seguido da adição do reagente lugol por também 60 segundos. Depois, lavou-se a lâmina com água destilada e em seguida com uma solução de álcool-acetona. Após lavar-se com água corrente, adicionou-se uma solução de safranina por 30 segundos. Por fim, retirou-se o excesso de corante com água e a lâmina foi seca com papel filtro, imersa em óleo de imersão puro e submetida à análise por microscopia óptica. Microrganismos com coloração azulada foram considerados gram-positivos, enquanto aqueles com coloração avermelhada gram-negativos (PELCZAR, 1996).

4.3.3. Morfologia celular

Os microrganismos foram submetidos a análise segundo a morfologia celular para a determinação de sua forma, seguindo Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994).

4.3.4 Teste de Catalase

O teste de catalase foi realizado com a adição de uma gota de peróxido de hidrogênio sobre colônias isoladas após 24 a 48 h de incubação. As linhagens bacterianas que liberam

bolhas foram consideradas catalase positivas e as outras, cuja liberação não foi evidenciada foram consideradas catalase negativa (MAC FADIN, 1976).

4.3.5. Teste de Oxidase

O teste de oxidase, o qual verifica a presença da enzima citocromo oxidase, foi determinado por meio da transferência das colônias, com o auxílio de uma alça estéril, para uma tira de papel imersa no reagente tetrametil-p-fenilenodiamina. As linhagens oxidase-positivas apresentam cor púrpura-azulada, enquanto linhagens oxidase-negativas não se coraram ou apresentaram cor amarelada (MAC FADIN, 1976).

4.3.6. Identificação molecular

A extração de DNA foi realizada usando o kit de extração de DNA illustra™ PHYTOPURE™ de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR foi realizada utilizando o kit PCR Master Mix (Ludwig Biotec, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador automático (Bio-rad T100 Thermal Cycler, Estados Unidos). Os primers usados para identificar os isolados bacterianos por sequenciamento do gene 16S rRNA foram 27 f (5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') e 1512r (5' - ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT - 3') (WANG et al., 2006). A desnaturação inicial do DNA foi realizada a 95 ° C por 10 min, seguida por 25 ciclos de desnaturação a 93 ° C por 1 min, anelamento a 50 ° C por 1 min, alongamento a 72 ° C por 1 min 30 s e, então, uma etapa de alongamento final a 72 ° C por 5 min.

Os primers usados para identificar os isolados levedura por sequenciamento da região ITS1–5.8S rDNA – ITS2 foram ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (MASOUD et al., 2004). A desnaturação inicial do DNA foi realizada a 95 ° C por 3 min, seguida por 35 ciclos a 95 ° C por 30s, anelamento a 56 ° C por 30 s, alongamento a 72 ° C por 30 s e um alongamento final a 72 ° C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2 % (Ludwig Biotec, Brasil) a 80 V por 1 h. O marcador molecular HighRanger 1 kb DNA Ladder (NORGEN Biotek Corporation, Canadá) foi utilizado como padrão para reconhecimento da massa molecular das bandas obtidas. Os fragmentos amplificados foram visualizados pelo corante Safer Dye 6x Loading Buffer (KASVI, Brasil) e transiluminação UV (L.PIX Loccus Biotecnologia, Brasil).

Os produtos amplificados foram purificados usando o kit PCR Products Purification Kit (MEBEP Bioscience, China). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados por ACTGene (Brasil) usando um sequenciador Applied Biosystems® Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzers (ThermoFischer Scientific, Estados Unidos). As sequências parciais obtidas do gene 16S rRNA e região intergênica ITS1 –5.8S rDNA – ITS2 foram analisadas por meio do software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5.3. As sequências obtidas para cada linhagem foram comparadas com o banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando a ferramenta BLASTn para a identificação das linhagens bacterianas e de leveduras.

4.3.7. Produção de invertase e frutossiltransferase em cultivos submersos

Os cultivos da linhagem selecionada foram realizados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 18 mL de MM adicionado de 2 mL de pré-inóculo, sendo os parâmetros de cultivo como descritos no item 4.2.2. Após o tempo de cultivo, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 minutos a 10 °C para obtenção do sobrenadante, o qual foi utilizado para análise da atividade enzimática. Foram realizadas as análises de massa seca celular (MSC) obtida nos cultivos e a determinação dos valores de pH do meio de cultivo ao final do tempo de incubação.

4.3.8. Seleção de fontes de carbono

Os cultivos submersos foram realizados em substituição da sacarose por outras fontes de carbono na concentração de 20 g/L. As fontes de carbono estão listadas na Tabela 5.

Tabela 8: Fontes de carbono utilizadas na caracterização dos cultivos de invertase e frutossiltransferase.

Fonte de Carbono	
Monossacarídeos	Glicose
	Frutose
	Xilose
	Galactose
Dissacarídeos	Sacarose
	Lactose
Polissacarídeos	Inulina
	Amido

	Pectina
Álcool/Poliálcool	Glicerol Sorbitol Inositol

4.3.9. Seleção de fontes de nitrogênio

Os cultivos submersos foram realizados adicionando diferentes fontes de nitrogênio, individualmente, em cada cultivo na concentração de 3 g/L. As fontes de nitrogênio utilizadas estão listadas na Tabela 9.

Tabela 9: Fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio utilizadas na caracterização dos cultivos de invertase e frutossiltransferase.

Fontes de Nitrogênio	
Orgânicas	Extrato de levedura Tryptona Peptona Milhocina
Inorgânicas	Sulfato de Amônio Fosfato de Amônio Cloreto de Amônio

4.3.10. Variação das concentrações de sacarose no meio de cultivo

Os cultivos submersos foram realizados variando a concentração de sacarose presente no meio de cultivo anteriormente (20 g/L), adicionando ao meio de cultivo concentrações de sacarose de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 g/L.

4.3.11. Cultivo submerso em diferentes valores de pH

Os cultivos submersos foram realizados com os mesmos parâmetros já descritos, entretanto cada cultivo teve seu pH inicial ajustado, cujo faixa de valores de pH ocorreu entre 3,0 a 8,0 com intervalos de 0,5 ($3,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$, com $\Delta = 0,5$).

4.3.12. Seleção de adjuvantes para suplementação do meio de cultivo

Os cultivos submersos foram realizados adicionando os adjuvantes, individualmente, em cada cultivo na concentração de 1 g/L e estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Adjuvantes utilizados na análise

<u>Adjuvantes</u>
<u>.Sorbitol</u>
<u>Glicerol</u>
<u>Tween 80</u>

4.3.13. Cinética da síntese de invertase e frutossiltransferase a partir de sacarose pela linhagem PP6

Culturas estoque da linhagem isolada de pupunha PP6 foram estriadas em LB sólido por até 48 h, sendo transferidas colônias isoladas para 25 mL de LB e incubadas a 30 °C e 150 rpm, por 24 h. Um volume de 10 mL foi transferido para 40 mL de LB, sendo novamente incubados a 30 °C e 150 rpm, por 24 h. Deste último cultivo, foram utilizados 25 mL para inocular 225 mL de MM, totalizando um volume de 250 mL de cultivo em Erlenmeyer de 1 L. O cultivo foi conduzido em agitador orbital do tipo shaker a 30 °C e 150 rpm, pH 6,0 ao decorrer de 72 h de processo, com 32 coletas de amostras sendo efetuadas em intervalos de tempo pré-definidos (2-4 horas). As amostras foram submetidas a centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para realização da atividade enzimática e, os precipitados de biomassa, diluídos em água destilada para acompanhamento do crescimento microbiano por densidade óptica. As leituras foram efetuadas em um espectrofotômetro UV-VIS a 610 nm. Quando as amostras para controle do crescimento microbiano ultrapassavam 800 nm foi realizada diluição ½ das amostras.

4.4 Métodos Analíticos

4.4.1. Determinação da atividade da enzima invertase

A atividade enzimática de invertase ocorreu adicionando 800 µL de uma solução de sacarose a 2 % (m/v) em tampão McIlvaine pH 5,0 em tubos de ensaio. Os tubos se mantiveram a 50 °C por 5 minutos. O início da reação ocorreu com a adição de 200 µL do extrato enzimático e, em diferentes intervalos de tempo (0 e 5 minutos), retirou-se 200 µL da reação, adicionando-

os em tubos contendo 200 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Então, os tubos foram levados para fervura em banho maria a 100°C onde permaneceram por 5 minutos. Finalmente, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e, em seguida, 2 mL de água foram adicionados em cada tubo para posterior leitura. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm. O branco da reação foi realizado nas mesmas condições experimentais com a adição de água destilada em substituição do extrato enzimático. Esta análise, utilizando o DNS, identifica a presença do grupo carbonila livre ($\text{C} = \text{O}$), os chamados açúcares redutores (MILLER, 1959). Segundo Deshavath et al. (2020) e Silva et al. (2003) esse ensaio envolve a oxidação do grupo funcional aldeído presente no ácido correspondente, enquanto o DNS é simultaneamente reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico em condições alcalinas (Figura 5). Uma unidade de atividade de invertase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de frutose, por mililitro, por minuto sob condições experimentais definidas.

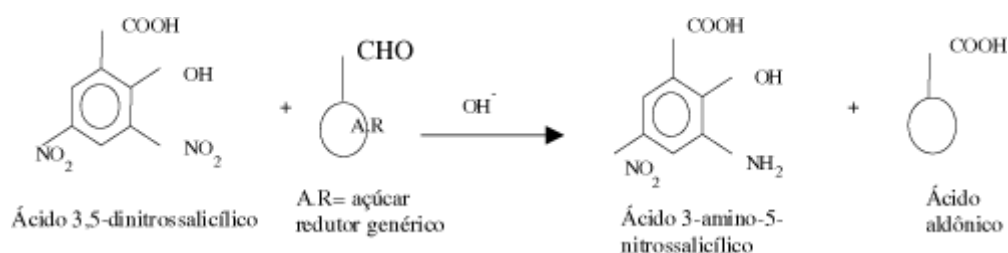


Figura 5: O ácido dinitrosalicílico é reduzido pelo açúcar redutor, formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, dando origem ao ácido aldônico. Fonte: Silva et al. (2003). O cálculo para determinação da atividade está exposto na equação 1.

$$\text{AbsF} - \text{AbsI} / \text{Coef. Ext. Mol.} \times (1/\text{VI}) \times 1000 \times \text{VF} \times (1/5) \times \text{Diluição} \quad (1)$$

Onde:

AbsF: Absorbância final

AbsI: Absorbância inicial

ϵ : Coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

VI: Volume inicial

VF: Volume final

4.4.2. Determinação da atividade da enzima frutossiltransferase

A atividade de frutossiltransferase foi determinada conforme o método descrito por Rawat et al. (2015). Primeiramente, 800 μL de uma solução de sacarose 20 % (m/v) em tampão McIlvaine (pH 5,0) foram transferidos para tubos de ensaio, onde permaneceram por 5 minutos no banho-maria a 50 $^{\circ}\text{C}$. A reação se iniciou com a adição de 200 μL do extrato proteico, onde 100 μL foram retirados no mesmo momento, correspondente ao tempo 0 minutos. A paralisação da reação ocorreu por meio de aquecimento durante 5 minutos em temperatura de 100 $^{\circ}\text{C}$. A reação permaneceu em banho maria a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos, onde em seguida se realizou o mesmo procedimento para paralisar a reação. Após resfriamento, 10 μL da solução reagida foram transferidos para tubos contendo 1 mL da solução GOD-POD (glicose oxidase peroxidase) (Labtest Diagnóstica S/A, Lagoa Santa, MG, Brasil). A reação se manteve em banho maria a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Os valores de concentração de glicose ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) foram obtidos a partir de leitura de absorbância das amostras obtidas a um comprimento de onda de 510 nm, segundo especificações do fabricante. Para quantificar os açúcares redutores no final da reação, foi adicionado em 800 μL de tampão McIlvaine pH 5,0, 200 μL do extrato proteico e, em diferentes intervalos de tempo (0 e 60 minutos), retirou-se 200 μL da reação, adicionando-os em tubos contendo 200 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), cujas leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade frutossiltransferase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicose, por mililitro, por minuto. O cálculo para determinação da atividade segue o mesmo exposto na equação 1.

A enzima frutossiltransferase é descrita por UTF (unidade de atividade de frutossiltransferase), que representa a quantidade de frutose transferida por unidade de tempo e volume, sendo expressa em $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$. Para esse cálculo é necessário determinar a concentração em $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$ de glicose presente no meio reacional (UF), visto que a glicose é um dos produtos da hidrólise da sacarose (Equação 1).

$$UF = G \quad (2)$$

Tem-se que a frutose presente no meio reacional (F_{meio}) é definida conforme equação 2, em que AR é a concentração de açúcares redutores ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) presentes na amostra após 60 minutos de reação; e G é a concentração de glicose.

$$F_{meio} = AR - G \quad (3)$$

Já a frutose transferida (F_t) é a diferença entre a concentração de glicose (G) e a frutose do meio (F_{meio}) (Equação 3):

$$F_t = G - F_{meio} \quad (4)$$

Substituindo a Equação (3) em (4), tem-se a equação final que representa a quantidade de frutose transferida, equivalendo com a atividade de transfrutossilação (Equação 5).

$$UTF = 2G - AR \quad (5)$$

Em que $2G$ indica a quantidade teórica de açúcar redutor e AR a quantidade real de açúcar redutor presente no meio, de modo que a diferença entre ambos indica a frutose que foi transferida.

4.4.3 Determinação da concentração de massa seca celular

Para quantificação da concentração de massa seca celular (MSC), uma alíquota de 10 mL do caldo do cultivo submerso foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos ($3.800 \times g$). O sobrenadante foi separado para determinação da atividade enzimática e a massa celular precipitada (“pellet”) foi diluída em água destilada, sendo transferidos para recipientes pré-tarados e acondicionados em estufa de secagem a $100-105 \text{ }^\circ\text{C}$, até atingir peso constante. Os valores de massa celular (biomassa centrifugada) foram determinados gravimetricamente a partir da pesagem dos precipitados, sendo expressos em gramas por litro de MSC. O cálculo da concentração de massa seca celular (em g/L) foi realizado por meio da Equação 5.

$$\frac{MSC \left(\frac{g}{L}\right)}{V} = \frac{(MRB - MRV) \times 1000}{V} \quad (5)$$

Em que:

MSC é igual ao valor da concentração de massa seca celular (g/L);

MRB é igual a massa do recipiente com biomassa (g/L);

MRV é igual a massa do recipiente vazio (g/L);

V é igual ao volume de amostra de cultivo centrifugado (mL).

4.4.4. Monitoramento do pH do meio de cultivo

O monitoramento do pH, inicial e final, dos meios de cultivo foi realizado com o uso de pHmetro eletrônico digital, marca QUIMIS, modelo Q400A. As amostras foram submetidas à leitura direta no aparelho, após sua calibração.

4.5. Caracterização bioquímica da invertase e frutossiltransferase

4.5.1. Influência da temperatura e pH do meio reacional na atividade enzimática

A temperatura do meio reacional foi avaliada para uma faixa compreendida entre 20 e 70 °C, com intervalos de 5 °C, em pH 5,0. Por sua vez, o pH do meio reacional foi determinado em diferentes tampões, Mc Ilvaine (3,0-8,0) e Tris-HCL (1,5-2,5) para uma faixa compreendida entre 1,0 e 8,0, com intervalos de 0,5, a 50 °C. A determinação da atividade se realizou conforme descrito nos itens 4.4.1 e 4.4.2.

4.5.2. Estabilidade térmica e frente ao pH de incubação

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada pela incubação das amostras em diferentes temperaturas (40, 50, 55 e 60 °C), na ausência do substrato, para análise da atividade de Invertase e para as temperaturas de 35, 45, 50 e 55 °C para verificação da atividade transfrutossilativa. Alíquotas de 2mL foram retiradas em intervalos de tempo pré-definidos (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, e 150 minutos) e transferidas para banho de gelo e então utilizadas para a determinação da atividade residual.

A estabilidade frente ao pH foi determinada em diferentes intervalos ($1,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$, com $\Delta = 1,0$). As amostras foram incubadas a 10 °C por 24 h e a atividade foi determinada conforme descrito nos itens 4.4.1 e 4.4.2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por possuírem uma alta concentração de açúcares e baixo pH, os frutos são considerados um habitat propício para o crescimento microbiano onde são encontrados microrganismos epifíticos e endofíticos, onde esse segundo atua até mesmo na defesa das plantas contra ameaças externas. A floresta amazônica é palco de uma vasta gama de microrganismos autóctones, os quais podem apresentar diversas aplicações biotecnológicas, dentre elas a produção de enzimas, despertando o interesse das áreas científica e tecnológica. Essa riqueza de microrganismos acarreta maior visibilidade para região amazônica e suas matérias primas, aumentando o valor agregado de seus produtos e gerando renda para população local (CUNHA JUNIOR et al., 2020; SEBASTIENES et al., 2017). No processo de fermentação espontânea deste trabalho foram isoladas 481 linhagens de microrganismos provenientes dos frutos amazônicos (Tabela 11).

Tabela 11. Linhagens de microrganismos isoladas dos frutos pupunha e tucumã durante fermentação espontânea.

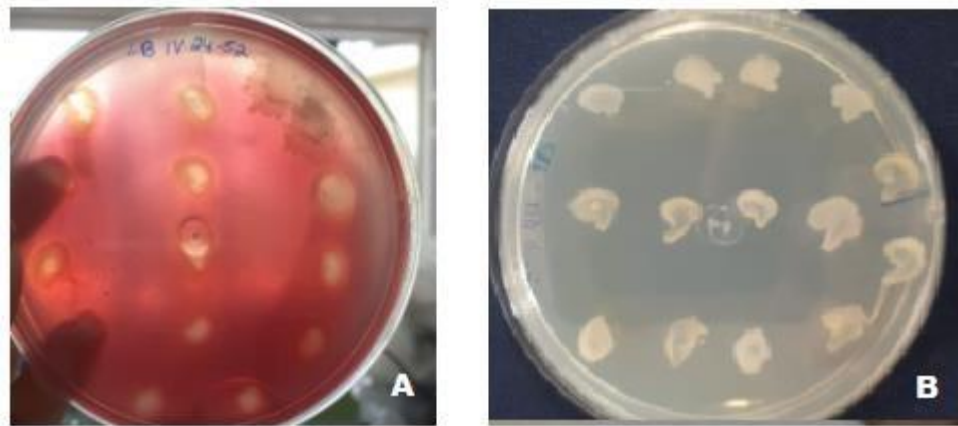
Fruto amazônico	Linhagem
Pupunha	184
Tucumã	297

5.1. Triagem de microrganismos produtores de invertase

5.1.1. Seleção em placa de linhagens produtoras de invertase com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

Inicialmente, as linhagens isoladas dos frutos amazônicos pupunha e tucumã foram submetidos a uma primeira seleção para identificar os potenciais produtores de invertase utilizando meio de cultivo sólido e revelação com TTC (Figura 6).

Figura 6: Avaliação da presença de açúcar redutor em linhagens isoladas dos frutos pupunha e tucumã



Legenda: (A): Resultado positivo para presença de açúcar redutor; (B): Resultado negativo para a presença de açúcar redutor.

Conforme exposto por Isejima et al. (2002), quando uma solução contém açúcar redutor e é tratada com TTC (Cloreto de Trifeniltetrazólio) ocorre o desenvolvimento de cor, em função de sua reação com os açúcares invertidos. Na presença de açúcares redutores, o TTC se reduz a trifenilformazona, que é um composto vermelho insolúvel em água, e a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional à quantidade de açúcares redutores presentes (REDDY et al., 2010).

Dentre os 481 microrganismos avaliados, 181 microrganismos (37,62 %) apresentaram a coloração avermelhada, sendo selecionados como possíveis produtores de invertase, como pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12: Triagem de linhagens microbianas isoladas de frutos pupunha e tucumã com potencial para a produção de invertase.

Amostra	IE	Amostra	IE	Amostra	IE	Amostra	IE	Amostra	IE	Amostra	IE	Amostra	IE	Amostra	IE
PPLB1	+	PPLB45	+	PPLB161	-	TCLB44	-	TCLB129	-	TCMK8	-	TCMK39	-	TCMK84	-
PPLB2	+	PPLB48	+	PPLB164	-	TCLB45	-	TCLB138	-	TCMK10	-	TCMK40	-	TCMK87	-
PPLB3	+	PPLB58A	+	PPLB165	-	TCLB57	-	TCLB148	-	TCMK11	-	TCMK41	-	TCMK88	-
PPLB4	+	PPLB58B	+	PPLB168	-	TCLB58	-	TCLB150	-	TCMK12	-	TCMK45	-	TCMK89	-
PPLB5	+	PPLB58C	+	PPLB169	-	TCLB59	-	TCLB154	-	TCMK13	-	TCMK46	-	TCMK90	-
PPLB6	+	PPLB59	+	PPLB177	-	TCLB62	-	TCLB155	-	TCMK15	-	TCMK48	-	TCMK91	-
PPLB7	+	PPLB76	-	PPLB187	-	TCLB63	-	TCLB156	-	TCMK16	-	TCMK49	-	TCMK192	-
PPLB8	+	PPLB103	-	PPLB192	-	TCLB65	-	TCLB161	-	TCMK18	-	TCMK50	-	TCMK97	-
PPLB8B	+	PPLB112A	+	TCLB1	-	TCLB66	-	TCLB164	-	TCMK20	-	TCMK51	-	TCMK99	-
PPLB9	-	PPLB112B	+	TCLB2	-	TCLB69	-	TCLB165	-	TCMK21	-	TCMK52	-	TCMK101	-
PPLB12	-	PPLB113	-	TCLB4	-	TCLB72	-	TCLB168	-	TCMK22	-	TCMK53	-	TCMK102	-
PPLB14	-	PPLB114	-	TCLB5	-	TCLB77	-	TCLB170	-	TCMK23	-	TCMK59	-	TCMK103	-
PPLB15	-	PPLB115	-	TCLB6	-	TCLB78	-	TCLB171	-	TCMK24	-	TCMK60	-	TCMK104	-
PPLB16	-	PPLB116	-	TCLB9	-	TCLB79	-	TCLB172	-	TCMK25	-	TCMK65	-	TCMK105	-
PPLB19	-	PPLB117	-	TCLB14	-	TCLB80	-	TCLB174	-	TCMK27	-	TCMK67	-	TCMK106	-
PPLB22	-	PPLB118	-	TCLB17	-	TCLB89	-	TCLB175	-	TCMK30	-	TCMK68	-	TCMK108	-
PPLB23	-	PPLB135	-	TCLB19	-	TCLB90	-	TCLB176	-	TCMK31	-	TCMK69	-	TCMK109	-
PPLB24	-	PPLB140	-	TCLB20	-	TCLB91	-	TCMK1	-	TCMK32	-	TCMK70	-	TCMK110	-
PPLB29	-	PPLB143	+	TCLB22	-	TCLB92	-	TCMK2	-	TCMK33	-	TCMK73	-	TCMK111	-
PPLB30	-	PPLB146	-	TCLB23	-	TCLB99	-	TCMK3	-	TCMK34	-	TCMK74	-	TCMK112	-
PPLB32	-	PPLB149	-	TCLB25	-	TCLB107	-	TCMK4	-	TCMK36	-	TCMK75	-	TCMK114	-
PPLB39	-	PPLB150	-	TCLB26	-	TCLB109	-	TCMK5	-	TCMK37	-	TCMK79	-	TCMK126	-
PPLB41	+	PPLB151	-	TCLB30	-	TCLB128	-	TCMK6	-	TCMK38	-	TCMK81	-		

Condições de cultivo: O meio de cultura utilizado continha 10 g/L Sacarose, 2 g/L Sulfato de Amônio, 1,5 g/L Fosfato Monopotássico, 3,5 g/L Fosfato dissódico, 0,2 g/L Sulfato de Magnésio, 20 g/L Ágar, sendo os cultivos incubados em estufa a 30°C por 48 horas, seguindo para revelação com Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) 0,1 % (m v⁻¹) em NaOH 0,5 mol/L. Legenda: IE = índice enzimático

Pode-se observar que todas as linhagens que apresentaram potencial para produção de invertase são provenientes do fruto pupunha. As linhagens isoladas do fruto tucumã não apresentaram redução do TTC, não possuindo potencial para hidrolisar a sacarose do meio de cultura. Esse fato pode ser esclarecido devido o fruto da pupunha conter em sua composição um valor mais elevado de carboidratos quando comparado com o tucumã. Redondo et al. (2019), após a realização da composição centesimal da polpa da Pupunha, encontrou 41,7% (m/m) de carboidratos. Os autores reportam que a percentagem expressiva de carboidratos do fruto, mostra que a pupunha, ou subprodutos obtidos a partir do seu processamento, apresentam-se como mais uma alternativa para a alimentação humana ou para a fabricação de rações a serem utilizadas na criação de animais. Basto et al. (2016) expuseram em seu trabalho um valor de 38,8% (m/m) de carboidratos quando analisaram o fruto da pupunha e quando os dados são comparados aos valores presentes no fruto tucumã, observa-se essa distinção. Yuyama et al. (2008) realizaram a análise da composição centesimal da polpa do tucumã, estabelecendo em 13,99% (m/m) o valor dos carboidratos totais presente no fruto, enquanto Silva et al. (2018) determinou o valor de sua análise em 14,48% (m/m).

É relevante enfatizar que as linhagens que não demonstraram potencial enzimático ainda assim podem ser produtoras, porém a metodologia utilizada, os meios de cultivo e as condições nas quais foram submetidas podem não ter induzido a produção da enzima. Conforme exposto por Uday et al. (2015), não é evidente que nenhum meio de cultivo seja definido para a melhor produção das enzimas a partir de diferentes fontes, pois cada microrganismo tem o seu próprio requisito nutricional, exigindo diferentes insumos. Com isso, é provável que a não apresentação de índice enzimático por algumas linhagens seja por decorrência das condições experimentais adotadas para a seleção das linhagens produtoras de invertase.

5.1.2. Seleção de linhagens produtoras de invertase e frutossiltransferase em cultivos submersos

As linhagens selecionadas com potencial para a produção de invertase foram cultivadas em condições submersas para a produção de invertase e frutossiltransferase (Tabela 13). Entre as linhagens produtoras de invertase, PP6 e PP112A apresentaram os maiores valores de atividade enzimática (1,86 U/mL e 1,05 U/mL, respectivamente). Para a atividade transfrutossilativa, as linhagens PP6 e PP8B apresentaram 0,83 U/mL e 0,79 U/mL, respectivamente.

Tabela 13: Atividades de invertase e transfrutossilativa de linhagens microbianas isoladas de frutos de pupunha.

Linhagens	Atividade invertase (U/mL)	Atividade de transfrutossilação (U/mL)
PP1	0,66 ±0,02	0,35±0,08
PP3	0,54±0,05	0,26±0,04
PP4	0,38±0,02	0,58±0,04
PP5	0,43±0,09	0,55±0,06
PP6	1,86±0,04	0,83±0,05
PP7	0,25±0,02	0,15±0,02
PP8A	0,23±0,05	0,02±0,09
PP8B	0,36±0,09	0,79±0,09
PP41	0,35±0,09	0,29±0,08
PP45	0,48±0,04	0,33±0,05
PP48	0,51±0,03	0,37±0,04
PP58A	0,49±0,05	0,44±0,09
PP58B	0,32±0,08	0,37±0,03
PP58C	0,30±0,06	0,02±0,05
PP59	0,51±0,05	0,04±0,03
PP112A	1,05±0,04	0,36±0,06
PP112B	0,56±0,04	0,01±0,02
PP143	0,76±0,06	0,65±0,02

Condições de cultivo: cultivos realizados em MM inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha.

Anteriormente, os materiais vegetais e animais eram preferidos como fonte de enzimas. Contudo, as enzimas microbianas apresentam vantagens, como grande variedade de atividades catalíticas, manipulação genética mais fácil, fornecimento regular por não apresentar flutuações sazonais e, como os microrganismos são de crescimento rápido, o rendimento é maior, além de serem mais estáveis e suas produções mais seguras (NADEEM et al., 2015).

De acordo com Lincoln e More (2017), dentre as cepas microbianas, as leveduras têm sido exaustivamente pesquisadas para a produção, caracterização e aplicações de invertase em diferentes tipos de indústrias, enquanto a literatura sobre invertases de cepas bacterianas ainda é limitada. Manoochehri et al. (2020) esclarecem que a invertase bacteriana é ativa em ampla faixa de pH. Como alguns exemplos dessas bactérias capazes da produção de invertase, os autores citaram *Arthrobacter* sp., *B. cereus* e *B. macerans* e reportaram que as invertases de bactérias têm mostrado atributos promissores e muitas de suas características precisam ser exploradas. Canli et al. (2011) afirma que algumas invertases com atividade frutossiltransferase

são utilizadas para a produção de frutooligossacarídeos. Entretanto, de acordo com Ganaie et al. (2013), poucas invertases capazes de realizar transfrutossilatação são provenientes de bactérias, surgindo um grande interesse em encontrar bactérias capazes de coproduzir as enzimas invertase e frutossiltransferase.

Diante disso, a linhagem PP6 foi previamente caracterizada como uma bactéria e selecionada para as próximas etapas de cultivo.

5.2. Caracterização dos microrganismos produtores de invertase e frutossiltransferase

Na Tabela 14 são apresentadas as características macromorfológicas dos 18 microrganismos selecionados como produtores de invertase. Em relação a forma dos isolados, 11 (61,11 %) apresentaram-se no formato circular, 5 (27,78 %) irregular e 1 (5,56 %) filamentosa. Se referindo a elevação das colônias, 15 delas (83,33 %) foram vistas como elevadas, 2 (11,11 %) protuberantes, e 1 (5,56 %) foi considerada plana. Sobre as margens, 15 (83,33 %) apresentaram a margem inteira, 3 (16,67 %) ondulada, e 1 (5,56 %) lobada. No que diz respeito ao tamanho, 11 (61,11 %) foram definidas como pequenas, 6 (33,33 %) como médias e 1 (5,56 %) foi considerada grande. Se tratando da superfície, 15 (83,33 %) foram estipuladas lisas e 3 (16,67 %) rugosas. Quanto a aparência 10 (55,56 %) foram classificadas como brilhantes e 8 (44,44 %) sem brilho. Já no quesito opacidade, 14 (77,78 %) apresentaram-se opacas e 4 (22,22 %) translúcidas. Em relação a pigmentação, 16 (88,89 %) foram deliberadas brancas, 1 (5,56 %) exibiu uma coloração rosa e 1 (5,56 %) coloração creme.

Tabela 14: Caracterização das linhagens microbianas com potencial para produção de invertase e frutossiltransferase.

Linhagem	Forma	Elevação	Margem	Tamanho	Superfície	Aparência	Opacidade	Pigmentação
PP1	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Sem brilho	Opaca	Branca
PP3	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Sem brilho	Opaca	Branca
PP4	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Sem brilho	Opaca	Branca
PP5	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Sem brilho	Opaca	Branca
PP6	Irregular	Protuberante	Ondulada	Médio	Rugosa	Sem brilho	Opaca	Branca
PP7	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Brilhante	Opaca	Branca
PP8A	Irregular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Sem brilho	Opaca	Creme
PP8B	Irregular	Protuberante	Ondulada	Médio	Lisa	Brilhante	Opaca	Branca
PP41	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Brilhante	Opaca	Branca
PP45	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Brilhante	Translúcida	Branca
PP48	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Brilhante	Translúcida	Branca
PP58A	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Brilhante	Translúcida	Branca
PP58B	Irregular	Elevada	Inteira	Médio	Rugosa	Brilhante	Opaca	Cor Rosa
PP58C	Filamentosa/Rizóide	Plana	Lobada	Médio	Lisa	Sem brilho	Opaca	Branca
PP59	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Pequena	Lisa	Brilhante	Opaca	Branca
PP112A	Puntiforme/Circular	Elevada	Inteira	Médio	Lisa	Brilhante	Opaca	Branca
PP112B	Circular	Elevada	Inteira	Médio	Lisa	Brilhante	Translúcida	Branca
PP143	Irregular	Protuberante/Elevada	Ondulada	Grande	Rugosa	Sem brilho	Opaca	Branca

Na Tabela 15 são apresentados os grupos e morfologia celular das linhagens isoladas. Em relação ao grupo, 9 (50 %) dos microrganismos foram classificados como leveduras e 9 (50 %) como bactérias. Com relação à morfologia celular, 8 linhagens (44,44%) foram classificados como ovais, sendo estas leveduras, e 10 linhagens bacterianas (55,56%) apresentaram morfologia de bastonetes.

Tabela 15: Grupo e morfologia celular das linhagens microbianas isoladas de frutos amazônicos.

Linhagem	Grupo	Morfologia Celular
PP1	Levedura	Oval
PP3	Levedura	Oval
PP4	Levedura	Oval
PP5	Levedura	Oval
PP6	Bactéria	Bastonete
PP7	Levedura	Oval
PP8A	Bactéria	Bastonete
PP8B	Bactéria	Bastonete
PP41	Bactéria	Bastonete
PP45	Levedura	Oval
PP48	Levedura	Oval
PP58A	Levedura	Oval
PP58B	Bactéria	Bastonete
PP58C	Bactéria	Bastonete
PP59	Bactéria	Bastonete
PP112A	Bactéria	Bastonete
PP112B	Bactéria	Bastonete
PP143	Bactéria	Bastonete

Os resultados obtidos no teste da Coloração de Gram podem ser observados na Tabela 16, em que 17 (94,44 %) amostras se revelaram Gram positivas e somente 1 (5,56 %) se revelou Gram negativo. Em contrapartida, na análise da catalase, os 18 isolados (100 %) foram determinados catalase positiva. Em referência a oxidase, 10 (55,56 %) apresentaram oxidase positiva e 8 (44,44 %) como oxidase negativa. Embora muitas vezes essa análise de caracterização seja considerada de importância secundária e utilizada apenas na identificação preliminar, em muitos casos elas são essenciais e, às vezes, representam a única característica que permite a distinção e a identificação das espécies (SACCO et al., 2013).

Tabela 16: Testes bioquímicos das linhagens microbianas isoladas de frutos amazônicos.

Linhagem	Gram	Catalase	Oxidase
PP1	+	+	-
PP3	+	+	+
PP4	+	+	+
PP5	+	+	+
PP6	+	+	+
PP7	+	+	+
PP8A	+	+	-
PP8B	+	+	-
PP41	+	+	-
PP45	+	+	+
PP48	+	+	+
PP58A	+	+	+
PP58B	+	+	-
PP58C	+	+	-
PP59	-	+	-
PP112A	+	+	-
PP112B	+	+	+
PP143	+	+	+

Segundo Basto et al. (2016), a pupunha é especialmente rica em carboidratos, porém, poucos são os trabalhos na literatura que reportam o seu potencial. Contudo, trabalhos de Lincoln e More (2017), Nadeem et al. (2015), Maso (2019) e Novaki (2009) relataram linhagens de leveduras e bactérias consideradas produtoras das enzimas invertase e frutossiltransferase (Tabela 17).

Tabela 17: Cepas produtoras de invertase e frutossiltransferase

Leveduras	Bactérias
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>Arthrobacter</i> sp
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Candida utilis</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Leucosporidium antarcticum</i>	<i>Streptomyces</i> sp.
<i>Hansenula polymorpha</i>	<i>Bacillus cereus</i>

Fonte: Lincoln e More (2017), Nadeem et al. (2015), Maso (2019).

As bactérias podem produzir invertases intracelulares e extracelulares, sendo muito diversas e, como resultado, provavelmente apresentam diferentes fatores de glicosilação e diferentes graus de polimerização de subunidades de glicoproteína (MANOOCHEHRI et al., 2020). As invertases produzidas por leveduras, consideradas como a principal fonte de invertase industrial, são 80 % compostas de enzimas extracelulares e os 20 % restantes são enzimas intracelulares (CABRAL, 2012). De acordo com Lincoln e More (2017), as invertases extracelulares são glicoproteínas por natureza contendo carboidratos (50 %), manose (5 %) e glucosamina (3 %), enquanto as invertases intracelulares provavelmente não possuem carboidratos.

5.2.1. Análise Molecular

O DNA de todos os isolados foi extraído nas razões A260/A280 e A260/A230 de 1,8 a 2,0 e 2,0 a 2,2 respectivamente. A concentração de DNA puro variou de 32,1 ng μL^{-1} a 598,8 ng μL^{-1} . Dentre os 18 isolados, 10 linhagens bacterianas foram submetidas à amplificação do gene 16S rRNA, enquanto o material genético extraído de 8 linhagens de leveduras foi submetido à amplificação da região intergênica ITS1–5.8S rDNA – ITS2.

Tabela 18: Análise da extração de DNA das linhagens produtoras de invertase.

Isolado	Concentração de DNA (ng/ μL)	Microrganismo	Concentração do produto de PCR (ng/ μL)
PP 1	60,3	Levedura	5,7
PP 3	51,8	Levedura	7,6
PP 4	47,8	Levedura	6,2
PP 5	70,8	Levedura	7,9
PP 6	51,8	Bactéria	17,7
PP 7	71,7	Levedura	5,6
PP 8A	39,2	Bactéria	11,4
PP 8B	40,8	Bactéria	6,8
PP 41	78,1	Bactéria	10,8
PP 45	70,5	Levedura	8,3
PP 48	64,2	Levedura	9,8
PP 58A	32,1	Levedura	7,2
PP 58B	226,8	Bactéria	45,7
PP 58C	248,5	Bactéria	16,9
PP 59	598,3	Bactéria	24,8
PP 112A	51,7	Bactéria	46,5
PP 112B	38,6	Bactéria	40,0
PP 143	59,5	Bactéria	18,0

Após análise das sequências parciais obtidas, as mesmas foram comparadas com o banco de dados do NCBI por meio da ferramenta BLASTn. Para melhor visualização, os mesmos foram divididos em dois grupos, sendo eles leveduras e bactérias.

Tabela 19: Identificação de Leveduras amplificadas pela região intergênica ITS1–5.8S rDNA – ITS2.

Isolado	Grupo taxonômico / Similaridade (%)	Isolado	Grupo taxonômico/ Similaridade (%)
PP1	<i>Meyerozyma carpophila</i> - 100% <i>Meyerozyma Caribbica</i> CBS 9966 – 99.7%	PP7	<i>Meyerozyma caribbica</i> – 100% <i>Meyerozyma carpophila</i> – 100 % <i>Meyerozyma Smithsonianii</i> – 99.5% <i>Meyerozyma guilliermondii</i> – 99.5%
PP3	<i>Meyerozyma caribbica</i> - 98.51% <i>Meyerozyma Carpophila</i> – 98.5%	PP45	<i>Meyerozyma caribbica</i> – 100% <i>Meyerozyma carpophila</i> – 100% <i>Meyerozyma smithsonii</i> – 99.5% <i>Meyerozyma guilliermondii</i> – 99.5%
PP 4	<i>Meyerozyma carpophila</i> – 99.7% <i>Meyerozyma caribbica</i> – 99.4%	PP48	<i>Meyerozyma caribbica</i> - 99.5 <i>Meyerozyma carpophila</i> – 99.5% <i>Meyerozyma smithsonii</i> – 99.02% <i>Meyerozyma guilliermondii</i> – 99.02%
PP5	<i>Meyerozyma caribbica</i> – 100% <i>Meyerozyma carpophila</i> – 100%	PP58A	<i>Meyerozyma carpophila</i> – 100% <i>Meyerozyma caribbica</i> – 99.7%

No grupo das leveduras, todos os isolados mostraram pertencer ao gênero *Meyerozyma*, sendo predominante em todos os isolados a *Meyerozyma carpophila* e *Meyerozyma caribbica*, porém, em diferentes porcentagens de compatibilidade. Os isolados, antes conhecidos como PP 1 e PP 58A mostraram ser 100 % compatível com a cepa *Meyerozyma carpophila*, enquanto para *Meyerozyma caribbica*, os mesmos demonstraram 99,7 % de similaridade, o que ainda é

considerado um alto índice de similaridade. Alguns isolados obtiveram a mesma porcentagem para as duas cepas, como o isolado PP 3, que demonstrou uma menor compatibilidade (98,5 %), enquanto as amostras PP 5 e PP 7 se revelaram 100 % compatíveis para ambas.

O gênero *Meyerozyma* compreende leveduras com várias características e fisiologia únicas, como o diverso aspecto de substratos e capacidade de síntese de vários produtos químicos. Ainda podem utilizar várias fontes de carbono, incluindo fontes hidrofílicas e hidrofóbicas, podem ser aplicadas na produção de enzimas industriais, síntese de metabólitos e apresentam vantagens no processo biotecnológico, como a alta capacidade de secreção para proteínas com baixa modificação de glicosilação (YAN et al., 2021). Kurtzman (2011) relatou que cepas do gênero *Meyerozyma* podem ser isoladas em uma variedade de substratos que incluem folhas e frutos, solo, cana-de-açúcar, entre outros. Saeed et al. (2021) utilizaram a cepa de *Meyerozyma carpophila*, isolada da folha de Palmeira de óleo para produção de etanol, enquanto Moremi (2020) obteve a produção de etanol a partir de *Meyerozyma caribbica*. Entretanto, Tadioto et al. (2022), Trichez et al. (2019) e Nagarajan et al. (2019) fizeram a utilização dessa cepa para produção de xilitol. Araújo (2015) isolou uma linhagem de *Meyerozyma caribbica* a partir de frutos do cerrado (pinha) utilizando-a para a produção de invertase, cujo isolado atingiu um valor de 15,83 U/mL.

Tabela 20: Identificação de bactérias a partir da amplificação do gene 16S rRNA.

Isolado	Grupo taxonômico / Similaridade (%)	Isolado	Grupo taxonômico / Similaridade (%)
PP6	<i>Bacillus tequilensis</i> – 100 % <i>Bacillus subtilis</i> – 99.7% <i>Bacillus halotolerans</i> – 99.7%	PP58C	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> – 100% <i>Bacillus aerius</i> – 99.6% <i>Bacillus sonorensis</i> – 99.3% <i>Bacillus haynesii</i> – 99.05%
PP8A	<i>Bacillus</i> <i>thermozeamaize</i> – 100 % <i>Streptomyces</i> <i>gancidicus</i> – 100% <i>Klenkia brasiliensis</i> – 100%	PP59	<i>Enterobacter</i> <i>hormaechei</i> – 100% <i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> – 100 % <i>Enterobacter</i> <i>bugandensis</i> – 99.5% <i>Klebsiella grimontii</i> – 99.0%
PP8B	<i>Corynebacterium</i> <i>flavescens</i> – 100 % <i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i> – 99.5% <i>Corynebacterium</i> <i>uterequi</i> – 99.5% <i>Corynebacterium</i> <i>afermentans</i> – 99.5%	PP112A	<i>Bacillus litoralis</i> – 99.0% <i>Bacillus alkalitolerans</i> – 99.0%
PP41	<i>Microbacterium indicum</i> – 100%	PP112 B	<i>Bacillus</i> <i>herbersteinensis</i> – 98.6% <i>Bacillus malikii</i> – 98.6%
PP58B	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> – 99.5% <i>Bacillus aerius</i> – 99.1% <i>Bacillus sonorensis</i> – 99.1%	PP143	<i>Bacillus tequilensis</i> – 100% <i>Bacillus subtilis</i> – 99.7% <i>Bacillus mojavensis</i> – 99.7%

De maneira oposta ao que foi descrito na identificação das leveduras, onde foi observado que todas as cepas pertenciam ao mesmo gênero, a identificação bacteriana demonstrou variação de linhagens. Os isolados PP 6 e PP 143, após amplificação tiveram suas sequências 100 % compatíveis com *Bacillus tequilensis*, seguido por 99,7 % de similaridade com *B. subtilis*. Este último ao ser estudado por Lincoln e More (2018), mostrou-se eficaz para produção de invertase, sendo a cepa proveniente do solo de cultivo de cana de açúcar. Kaur e Teotia (2021) utilizaram uma cepa de *B. subtilis* para produção de invertase e utilizando sacarose como fonte

de carbono relataram uma atividade de $0,09 \text{ U mg}^{-1}$. Uma vez que a linhagem mais promissora deste estudo apresentou e 99-100 % de similaridade de sua sequência parcial com espécies de *Bacillus*, a mesma passou a ser referida como *Bacillus* sp. PP6.

A maioria dos isolados submetidos à amplificação do gene 16S rRNA apresentaram familiaridade com variados tipos de *Bacillus*, entre eles *Bacillus thermozeamaize* (PP8A), *Bacillus licheniformis* (PP58B e 58C), *Bacillus litoralis* (PP112A), *Bacillus herbersteinensis* (PP112B). Lincoln e More (2017) relatam que espécies de *Bacillus* são considerados uma fonte ideal para produção de invertase, por serem uma espécie considerada segura e aprovada pela Food and Drug Administration (FDA). Cepas de *Bacillus* são relatadas na indústria, com maior taxa de crescimento e um processo de fermentação mais breve.

Em contrapartida, o isolado PP41 apresentou 100 % de identificação com *Microbacterium indicum*, cujo gênero pertence à família *Microbacteriaceae* e é composto por 97 espécies (MENG et al., 2016), enquanto PP59 foi caracterizado como *Enterobacter hormaechei* ou *Enterobacter cloacae* (100%). Zhao et al. (2015) relataram uma invertase de *Enterobacter cloacae* que é uma beta-frutofuranosidade na faixa de pH neutro, a mesma possui apenas atividade de hidrólise, sem atividade de transglicosilação. A presença de uma bactéria residente do trato gastrointestinal se distinguiu das demais cepas encontradas. Porém, Dias et al. (2015) encontraram esse gênero em frutos do cerrado como Araçá, Murici do cerrado, Jatobá e Pimentinha do mato. Entretanto, nas buscas em banco de dados efetuadas pelo grupo de pesquisa deste estudo, não foram encontrados relatos na literatura, para a presença gênero nos frutos analisados neste trabalho.

Microrganismos endofíticos são capazes de viver no interior de uma planta sem causar danos à mesma, podendo favorecer seu hospedeiro. Ao analisar os microrganismos endofíticos presentes na pupunha, Almeida et al. (2005) relataram a presença de variados fungos como, *Fusarium* sp., *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria gaisen*, *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum*. Similarmente, o estudo realizado por Jarek et al. (2018) também reportou a presença de diversos fungos do gênero *Fusarium* para este fruto. Estudos relatando a presença de bactérias presentes nesses frutos são escassos, entretanto, Costa (2002) expõe também a sua presença na pupunha, encontrando cerca de 61 isolados bacterianos na realização do estudo.

5.3. Cultivos de produção de invertase e frutossiltransferase pela linhagem *Bacillus* sp. PP6

Nadeem et al. (2015) reportaram que a otimização das variáveis de cultivo pode melhorar ainda mais a eficiência da fermentação. A produção de frutossiltransferase e invertase por microrganismos pode ser influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono que serão utilizados como substratos, nitrogênio e outros componentes minoritários do meio de cultivo, pela temperatura, pH inicial do meio de cultivo e tempo de crescimento microbiano. A caracterização desses parâmetros para a síntese enzimática pode ser feita testando-se individualmente cada uma das condições (RIUL et al, 2013). Os cultivos para a síntese de invertase e frutossiltransferase, testando diferentes variáveis do meio de cultivo, foram realizados com a linhagem *Bacillus* sp. PP6, utilizando o método de “uma-variável-por-vez” (“one-factor-at-a-time”).

5.3.1. Efeito de fontes de carbono sobre a produção de invertase e frutossiltransferase

Na Tabela 21 são apresentados os resultados para a atividade enzimática de invertase e frutossiltransferase da linhagem *Bacillus* sp. PP6, após submetida aos novos parâmetros de cultivo, com diferentes fontes de carbono. As variações da fonte de carbono foram analisadas de acordo com o meio proposto para o cultivo submerso, utilizando o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Tabela 21: Produção de invertase e atividade transfrutossilativa de *Bacillus* sp. PP6 em diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono (20 %)	pH final	Concentração celular (g/L)	Atividade Invertase (U/mL)	Atividade Transfrutossilativa (U/mL)
Monossacarídeos				
Glicose	5,72	1,33	0,70±0,09	0,75±0,17
Frutose	5,71	1,10	0,73±0,12	0,05±0,08
Xilose	5,96	2,21	0,57±0,04	0,13±0,05
Galactose	6,08	1,33	0,47±0,02	0,14±0,01
Dissacarídeos				
Sacarose	5,95	1,33	1,92±0,11	0,89±0,04
Lactose	6,06	0,83	0,74±0,09	0,16±0,01
Polissacarídeos				
Inulina	5,93	4,00	0,10±0,10	0,08±0,05
Amido	5,15	1,10	0,10±0,08	0,32±0,03
Pectina	3,64	1,83	0,22±0,04	0,10±0,05
Álcool/Poliálcool				
Sorbitol	6,01	1,22	0,12±0,06	0,16±0,07
Inositol	5,83	0,88	0,07±0,06	0,03±0,05
Glicerol	6,87	1,97	0,07±0,09	0,09±0,05

Condições de cultivo: Cultivos realizados em MM com 20 % das fontes de carbono, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha.

Como pode ser observado, a sacarose foi definida como a melhor fonte de carbono para a produção enzimática (1,92 U/mL), sendo considerada a principal fonte de carbono para a indução de invertase por diferentes linhagens de fungos filamentosos, leveduras e bactérias (NADEEM et al., 2015). A produção de invertase por uma linhagem do fungo *Cladosporium cladosporioides* atingiu 17,50 U/mL, utilizando 20 g/L de sacarose, enquanto a produção com a levedura *S. cerevisiae* GCA-II foi observada uma atividade de 107,4 U/mL (NADEEM et al., 2015). A maioria das bactérias são heterotróficas, sendo capazes de utilizar uma vasta variedade de compostos orgânicos e sintéticos. Essa versatilidade é de grande importância, permitindo o emprego de microrganismos em uma extensa área (DETTMER, 2012). Ryan et al. (2005) com o objetivo de produzir invertase utilizando a linhagem bacteriana de *Bifidobacterium breve* e 1 % de sacarose atingiu 24 U/mL de produção, enquanto Yoon et al. (2007) também utilizando 1 % de sacarose, porém com uma linhagem de *B. cereus*, alcançou 3,0 U/mL.

Nobre et al. (2012) afirmam que numerosas fontes de carbono podem ser citadas para o cultivo de microrganismos com a finalidade de produção enzimática, dentre elas fontes puras

como a glicose, xilose, maltose, lactose, sacarose, carboximetilcelulose, e subprodutos como o bagaço de cana, farelo de aveia, farelo de trigo, entre outras. Lincoln e More (2017) apresentaram em seu estudo diversas condições para a otimização da produção de invertases. Dentre as fontes de carbono expostas 72,72 % delas se referiam a sacarose. Entretanto, Vásquez-Bahena et al. (2006) utilizaram a glicose como fonte de carbono para produção melhorada de invertase de *Zymomonas mobilis*. Warcho et al. (2002) reportaram o uso da frutose, como fonte de carbono, para produção favorável de invertase a partir da *Bifidobacterium infantis*. De acordo com Roveda et al. (2005) e Queiroz et al. (1999), as enzimas podem ser indutivas, ou seja, produzidas pelos microrganismos na presença de um indutor, que pode ser o próprio substrato ou o produto da sua hidrólise, o qual pode ser adicionado ao meio de cultivo com o objetivo de estimular a produção, enquanto as constitutivas estão normalmente presentes nas células e podem ser produzidas na ausência do substrato indutor.

Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que a linhagem *Bacillus* sp. PP6 produz uma enzima constitutiva, já que foi possível a sua síntese em diferentes fontes de carbono, mesmo que em valores mais baixos de atividade. O fato da xilose e inulina falharem em induzir a síntese de invertase, sugere que elas não estão envolvidas no mecanismo de indução da síntese de invertase para a linhagem *Bacillus* sp. PP6, entretanto, apresentaram o maior valor encontrado de massa celular (2,21 e 4,00 g/L) respectivamente, sugerindo que foram utilizadas como fonte de carbono, favorecendo o crescimento microbiano.

5.3.2. Efeito de fontes nitrogênio sobre a produção de invertase e frutossiltransferase

Na Tabela 22 são apresentados os resultados para a produção de invertase e frutossiltransferase com diferentes fontes de nitrogênio utilizadas para o cultivo da linhagem *Bacillus* sp. PP6. O emprego de sulfato de amônio resultou em uma maior indução da produção das enzimas (2,01 U/mL), seguido pelo extrato de levedura, sendo 1,54 U/mL para invertase e 0,78 U/mL para atividade transfrutossilativa. Segundo Novaki (2009), a escolha da fonte de nitrogênio utilizada para o cultivo depende do produto que se deseja obter. Vitti et al. (2002) reportaram que o sulfato de amônio contém dois nutrientes importantes para o crescimento e indução de metabólitos, sendo eles o nitrogênio (21 unidades na forma amoniacal) e enxofre (24 unidades na forma de sulfato), formando um total de 45 unidades de nutrientes, enfatizando também que o sulfato de amônio não sofre volatilização de nitrogênio amoniacal (N-NH₃),

quando o pH é inferior a 7,0, além de ser uma fonte de nitrogênio inorgânica, demandando menores custos de investimento comparada a fontes de carbono orgânicas e mais complexas, como o extrato de levedura, triptona e peptona.

Tabela 22: Produção de invertase e frutossiltransferase por *Bacillus* sp. PP6 em diferentes fontes de nitrogênio.

Fonte de Nitrogênio (3 %)	pH final do meio de cultivo	Concentração celular (g/L)	Atividade Invertase (U/mL)	Atividade de Transfrutossilatação (U/mL)
Peptona	6,20	0,88	0,83±0,11	0,12±0,04
Triptona	6,31	0,87	0,42±0,18	0,39±0,09
Extrato de Levedura	6,40	1,32	1,54±0,09	0,68±0,06
Milhocina	6,92	1,38	0,90±0,22	0,28±0,02
Cloreto de Amônio	6,03	1,16	0,77±0,04	0,57±0,15
Sulfato de Amônio	6,13	1,66	2,01±0,04	0,78±0,03
Fosfato de amônio	7,0	1,33	0,61±0,13	0,36±0,09

Condições de cultivo: Cultivos realizados em MM com 3 % das fontes de nitrogênio, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha.

Conforme reportado por Farinas (2015), a seleção apropriada e concentração da fonte de nitrogênio é de suma importância para atingir o máximo crescimento dos microrganismos e rendimento enzimático. De acordo com Nascimento et al. (2019), existe uma diferença entre o modo de ação das fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico. Ambos desempenham um papel importante na síntese das enzimas, entretanto as fontes de nitrogênio inorgânico podem ser usadas rapidamente, enquanto as fontes orgânicas podem fornecer muitos fatores de crescimento celular e aminoácidos necessários para o metabolismo celular e produção de enzimas. O sulfato de amônio resultou no maior valor de concentração celular obtida (1,66 g/L), levando a acreditar que por ele ser uma fonte de nitrogênio inorgânica, foi rapidamente consumido, resultando no maior crescimento microbiano.

Entretanto outras fontes de nitrogênio também podem ser utilizadas no cultivo dessas enzimas, para produção de invertase bacteriana de *B. Cereus*. Yoon et al. (2007) utilizou como fonte de nitrogênio 0,6 % (m/v) de extrato de levedura produzindo 3,0 U/mL da enzima. Vásquez-Bahena et al. (2006), para produção de uma invertase extracelular de *Zymomonas*

mobilis, utilizou 0,7 % de extrato de levedura e 0,16 % de sulfato de amônio, produzindo 1,63 U de invertase.

5.3.3 Influência de diferentes adjuvantes

Segundo Vargas et al. (2006), adjuvantes são substâncias adicionados na formulação do meio de cultura visando aumentar a eficiência ou modificar determinadas propriedades da solução. Na Tabela 23 são apresentados os resultados para a produção de invertase e frutossiltransferase utilizando diferentes adjuvantes para verificar seu potencial no crescimento microbiano e a interferência da atividade enzimática.

Tabela 23: Influência de adjuvantes sobre a produção de invertase e frutossiltransferase de *Bacillus* sp. PP6.

Adjuvante (1 g/L)	Concentração celular (g/L)	Invertase (U/mL)	Atividade de transfrutossilatão (U/mL)
Sacarose	1,33	1,92±0,18	0,89±0,04
Sorbitol	1,21	2,02±0,09	0,92±0,12
Glicerol	0,95	1,51±0,04	0,72±0,05
Tween 80	1,09	1,64±0,04	0,68±0,02

Condições de cultivo: Cultivos realizados em MM com adição de 1 g/L dos adjuvantes, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha.

Ao adicionar 1 g/L de sorbitol, observou-se um aumento de 7,92 % na síntese de invertase quando comparada a sua atividade inicial (1,86 U/mL). Entretanto, nos meios de cultivo com a adição de glicerol e Tween 80 a produção sofreu, respectivamente, uma queda de 18,82 % e 11,83 %, comparados a sua atividade inicial. O sorbitol foi mais satisfatório também para atividade transfrutossilativa, aumentando em 9,78 % sua atividade inicial (0,83 U/mL), e assim como na atividade de invertase, a adição de glicerol e Tween 80 resultou em uma diminuição de 13,25 % e 18,07 %, respectivamente, da atividade transfrutossilativa inicial. Esse resultado pode estar relacionado ao glicerol e Tween 80 serem fluidos viscosos, e devido a isso a transferência de nutrientes e oxigênio no meio de cultura podem ter sido afetados, interferindo no crescimento celular. Em contrapartida, Taccari et al. (2012) ao analisarem o crescimento de

leveduras em glicerol bruto relataram resultados positivos e sugeriram que o glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono no cultivo de leveduras para produção de células microbianas.

Como o sorbitol demonstrou o maior valor de atividade encontrado entre as análises, foram realizados cultivos adicionando-o ao meio de cultivo em diferentes concentrações, sendo seus resultados expostos na Tabela 24.

Tabela 24: Diferentes concentrações de sorbitol adicionados ao meio de cultivo.

Concentração Sorbitol (g/L)	Concentração celular (g/L)	Invertase (U/mL)	Atividade de transfrutossilatação (U/mL)
0,5 g/L	1,04	1,25±0,04	0,67±0,09
1,0 g/L	1,21	1,99±0,02	0,83±0,11
1,5 g/L	1,19	2,15±0,09	0,79±0,02
2,0 g/L	1,21	2,15±0,14	0,88±0,05

Condições de cultivo: Cultivos realizados em MM com adição de diferentes concentrações dos adjuvantes (0,5, 1,0 1,5, 2,0 g/L) inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha.

Pode-se perceber a relação entre a quantidade de sorbitol e a atividade enzimática. Conforme o aumento da sua concentração, foi observado um aumento proporcional dos valores de atividade da enzima invertase. Com a adição de 1,5 g/L de sorbitol ao meio de cultivo, a atividade enzimática inicial de 1,86 U/mL, o maior valor de atividade encontrado, aumentou para 2,15 U/mL. Por outro lado, os resultados observados na atividade da frutossiltransferase com a adição de sorbitol não evidenciaram uma melhora dos valores de atividade comparados a experimentos anteriores sem adição deste adjuvante.

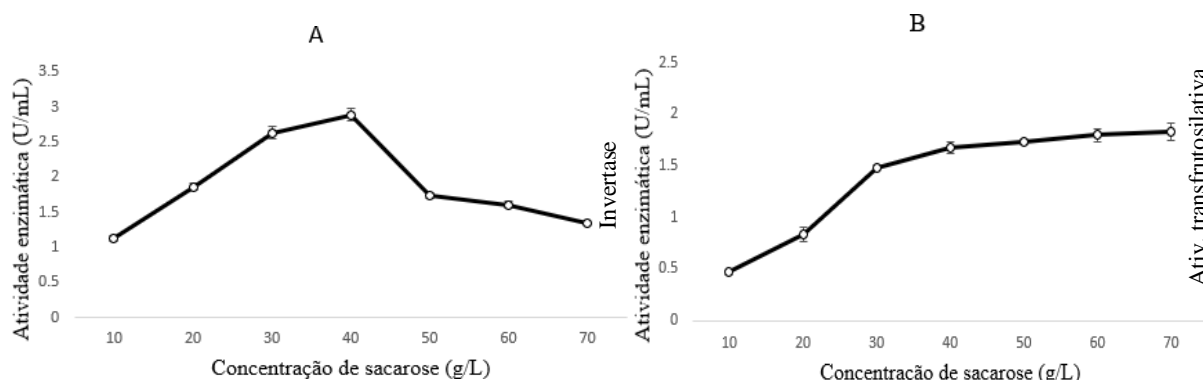
Não há relatos da atuação do sorbitol sobre as enzimas estudadas, entretanto, como explicado por Nascimento et al. (2019) as enzimas constitutivas podem ser produzidas na ausência do substrato indutor e a fonte de carbono presente no meio de cultivo pode ser utilizada como adjuvante para aumentar a produção da enzima, o que pode ser o caso do sorbitol nesse trabalho, sugerindo que a enzima da linhagem *Bacillus* sp. PP6 não necessita do sorbitol para ser produzida, entretanto o utiliza como adjuvante para sua produção. Chi et al. (1997) ao estudarem o mecanismo de desrepressão de uma invertase de *Saccharomyces* sp. em resposta ao inositol descreveram um maior crescimento celular no meio de cultivo contendo inositol, e

ao utilizarem sacarose como fonte de carbono observaram um aumento na atividade de invertase. Os autores sugerem que a desrepressão da secreção de invertase mediada pelo inositol está relacionado ao mRNA das células da levedura.

5.3.4 Influência da concentração de sacarose no meio de cultivo

Para analisar a síntese de invertase e frutossiltransferase a partir de diferentes concentrações de substrato, foram realizados cultivos submersos utilizando concentrações de sacarose de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 g/L. Na Figura 7 são apresentados os resultados da síntese das enzimas.

Figura 7: Produção de invertase (A) e frutossiltransferase (B) por *Bacillus* sp. PP6 em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo.



Condições de cultivo: Cultivos realizados em MM com adição de diferentes concentrações de sacarose (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 g/L) inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha. Legenda: (A) atividade de invertase; (B) atividade transfrutossilativa. As atividades máximas de invertase e de transfrutossilativa foram 2,89 U/mL e 1,83 U/mL, respectivamente, e definidas como 100 % da atividade relativa.

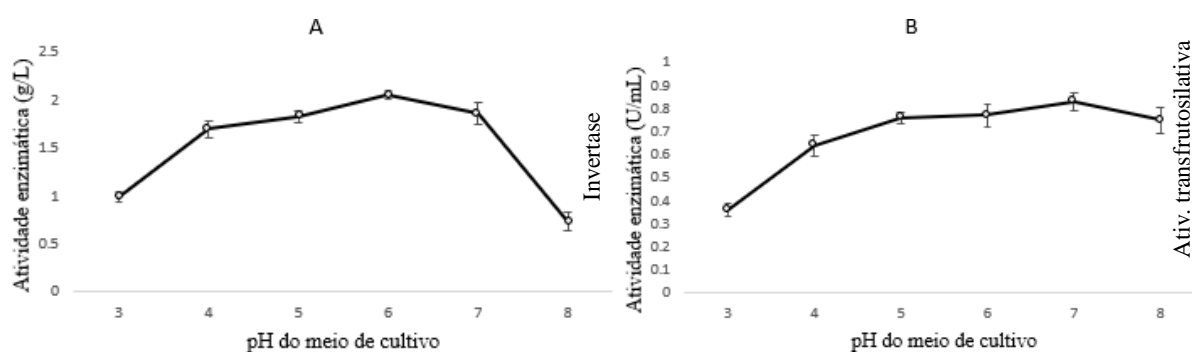
Conforme a concentração de sacarose foi aumentado, a atividade enzimática de invertase (A) se elevou proporcionalmente, atingindo o maior valor encontrado entre as análises, 2,89 U/mL quando adicionado 40 g/L do substrato. Entretanto, nas concentrações acima de 40 g/L de sacarose ocorreram uma queda de 44,64 % da atividade, atingindo 1,60 U/mL na concentração de 60 g/L de sacarose, sendo que na concentração de sacarose de 70 g/L observou-se uma redução de invertase de 46,71 % comparado à produção máxima. Na atividade transfrutossilativa (B) em sentido oposto ao da produção de invertase ocorreu um aumento

contínuo da atividade até a concentração de 30 g/L de sacarose (1,48 U/mL), havendo uma inclinação para um patamar entre as concentrações de sacarose de 40 a 70 g/L (1,67 U/mL a 1,83 U/mL, respectivamente). Esse aumento de atividade proporcionalmente à quantidade de sacarose no meio de cultivo foi relatado também por Maso et al. (2021) que, para verificar a influência da sacarose na síntese de invertase e frutossiltransferase a partir de uma linhagem de *Aspergillus niger*, realizaram o cultivo utilizando 2 e 20 % de sacarose, em que se atingiu respectivamente 0,83 U/mL e 6,26 U/mL para invertase e 0,97 U/mL e 7,01 U/mL para frutossiltransferase. Enquanto Yoon et al. (2007) fizeram o uso de uma concentração ainda mais baixa de sacarose (1 %), alcançando uma produção de 13,5 U/mL de invertase de *B. cereus*. Como exposto por Manoochchri et al. (2020) e Lincoln e More (2017), em concentrações mais altas ou crescentes de sacarose, a invertase passa a exibir atividade de transferase, o que explica a queda da atividade de invertase enquanto a atividade transfrutossilativa se manteve em ascensão. Autores como Hidaka et al. (1988) e Jung et al. (1989) reportaram que para ocorrência de atividade de frutossiltransferase se faz necessário ter concentrações de sacarose acima de 50% (m/v) no meio reacional.

5.3.5 Influência dos valores de pH inicial do meio de cultivo na síntese de enzimas

A Figura 8 retrata como os valores de pH inicial do meio de cultivo afeta a síntese de invertase e frutossiltransferase de *Bacillus* sp. PP6.

Figura 8: Influência do pH do meio de cultivo sobre a produção de invertase (A) e frutossiltransferase (B) por *Bacillus* sp. PP6.



Condições de cultivo: Cultivos realizados em MM, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. O pH do meio variou entre 3-8. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha. Legenda: (A) atividade de invertase; (B) atividade transfrutossilativa. As atividades máximas

de invertase e de transfrutossilatação foram 2,05 U/mL e 0,83 U/mL, respectivamente, e definidas como 100 % da atividade relativa.

Segundo Lincoln e More (2017) a atividade enzimática é influenciada diretamente pelo pH inicial do meio de cultivo, além de outros fatores, como tempo de incubação e temperatura. A produção de invertase e frutossiltransferase apresentaram comportamento semelhante até o pH 6,0, demonstrando aumento de produção conforme aumento da alcalinidade do meio. Contudo a partir do pH 6,0 os perfis de atividade para as enzimas não são similares, o que sugere a presença de duas enzimas distintas, entretanto não é possível afirmar sem realização da purificação enzimática. A invertase sofreu uma queda de 9,29 % e 64,39 % em pH 7,0 e 8,0, respectivamente, quando comparado ao pH 6,0, que foi considerado o melhor valor de pH nas condições experimentais avaliadas, produzindo 2,05 U/mL de invertase. De acordo com Lincoln e More (2017) as invertases são eficientes em diferentes faixas de pH. Para processos enzimáticos, em larga escala, é excelente essa condição para aplicação industrial e armazenamento do biocatalisador (Xu et al., 2015). Alves et al. (2013) ao estudarem uma invertase de *Aspergillus nidulans* observaram seu pH ótimo variando entre 4,8-5,6, produzindo 66,7 U mg⁻¹ da enzima. Zhou et al. (2016) expuseram uma invertase alcalina de *Bacillus sp.* onde seu pH variou entre 7,0-9,5, estabelecendo 8,0 como seu pH ótimo, onde produziu em torno de 62,9 U mg⁻¹.

Para a frutossiltransferase, a atividade transfrutossilativa se manteve estável em ampla faixa de pH (5,0-8,0), decaindo somente 9,64 % de sua atividade quando atingiu o pH mais alcalino (8,0) produzindo 0,75 U/mL. Xu et al. (2019) atingiu 77,77 U/mL de atividade transfrutossilativa para uma frutossiltransferase de *Penicillium oxalicum*. A síntese ocorreu em pH 5,5 considerado o pH ótimo da enzima estudada. Resultados semelhantes foi reportado por Park et al. (2001) quando avaliou a atividade de uma frutossiltransferase bacteriana de *B. macerans*, em que se obteve melhor atividade (9,3 U mg⁻¹) em pH 5,0 na temperatura de 50 °C.

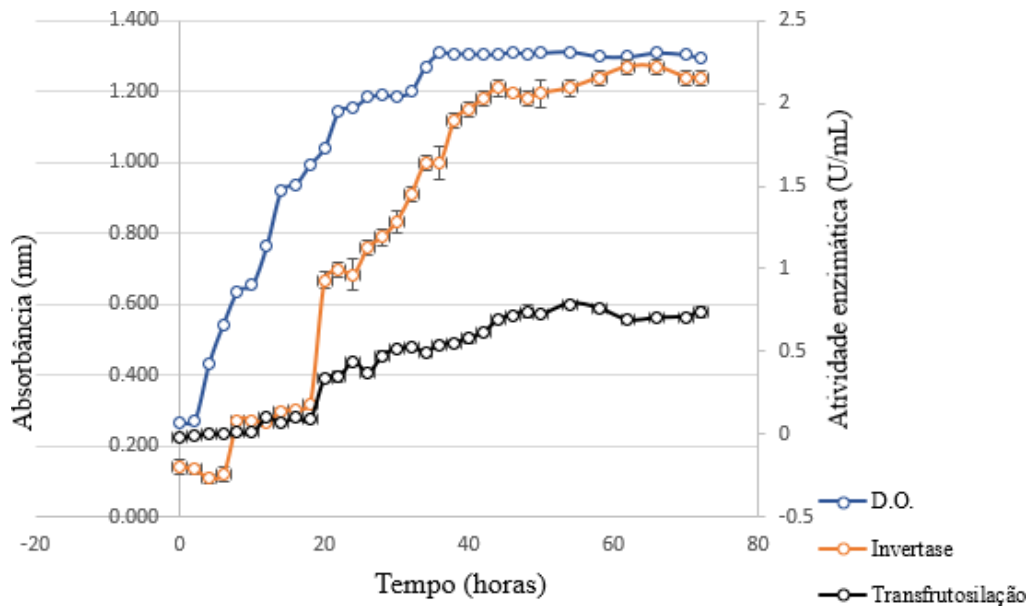
5.3.6 Produção de invertase e frutossiltransferase em diferentes tempos de cultivo

Na Figura 9 são apresentados os resultados da cinética de crescimento, síntese de invertase e atividade transfrutossilativa para a linhagem *Bacillus sp.* PP6. Observa-se que houve

uma correlação entre o crescimento microbiano e a síntese das enzimas. A densidade óptica sugere que o microrganismo atingiu sua fase de crescimento exponencial entre 4 e 36 horas. Após esse período, o crescimento microbiano entrou na fase estacionária até 72 horas de cultivo. Essa duração da fase estacionária se assemelha ao observado por Cortés-Camargo et al. (2021) que analisaram o crescimento de uma linhagem de *B. tequilenses* por 8 dias a 40 °C, em agitação de 120 rpm, cujo crescimento bacteriano permaneceu constante do dia 1 ao dia 8 (fase estacionária). Abid et al. (2019) também acompanharam a cinética do crescimento celular de *B. tequilensis*, entretanto a análise durou 60 horas e o cultivo foi realizado a 37 °C. Os autores relataram seu crescimento exponencial até 29 horas de cultivo, havendo declínio após 46 horas. Anvari et al. (2015), ao analisar o crescimento da mesma linhagem a 31 °C e 180 rpm por 5 dias, retratou que a fase estacionária continuou por cerca de 40 horas, atingindo a fase de morte após cerca de 60 horas.

As atividades das enzimas demonstraram ser associados ao crescimento microbiano, havendo um aumento das produções até 36-40 horas, 1,96 U/mL e 0,51 U/mL para invertase e frutossiltransferase, respectivamente, permanecendo constantes após esse período de cultivo. Após 72 h de cultivo, a produção das enzimas atingiu a maior atividade encontrada de 2,15 U/mL e 0,73 U/mL para invertase e frutossiltransferase, respectivamente. As enzimas são metabólitos primários, sendo a sua síntese associada à fase exponencial de crescimento microbiano, especialmente a invertase, cuja hidrólise da sacarose resulta nos monossacarídeos glicose e frutose, assimilados por vias glicolíticas na geração de energia necessária à manutenção e reprodução microbianos (VEANA et al., 2011).

Figura 9: Cinética de produção de invertase, atividade transfrutosilativa e crescimento microbiano da linhagem *Bacillus* sp. PP6.



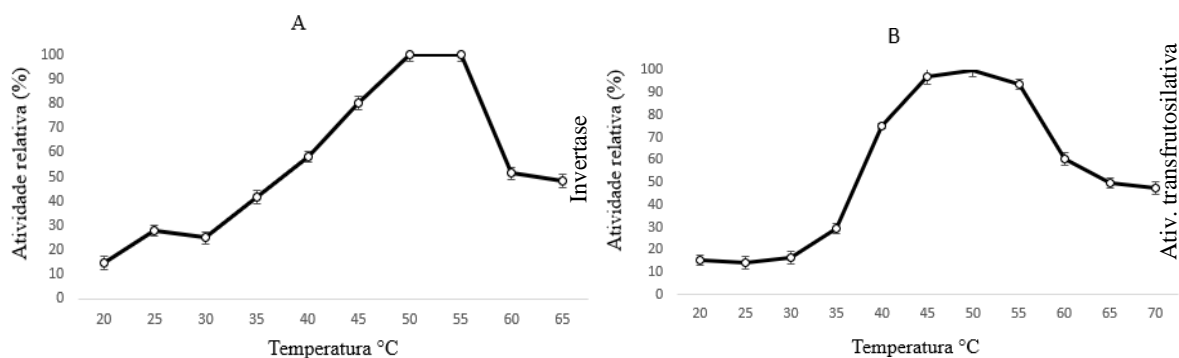
Condições de cultivo: cultivos realizados em frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 250 mL do meio de cultivo líquido MM, 20 % sacarose, 0,2 g/L sulfato de amônio, pH 6,0 a 30 °C e 150 rpm por 72 h. Os cultivos foram inoculados com 10 % de pré-inóculo. A absorbância da densidade ótica a 610 nm e atividade enzimática 540 nm.

5.4. Propriedades Bioquímicas da invertase e frustosiltransferase de *Bacillus* sp. PP6

5.4.1. Influência da temperatura do meio reacional na atividade enzimática

Na Figura 10 são apresentados os resultados para o efeito da temperatura sobre a atividade de invertase e frustosiltransferase de *Bacillus* sp. PP6. Para avaliação da influência da temperatura na atividade de invertase, a temperatura estudada variou de 20 a 65 °C, enquanto para análise da atividade transfrutosilativa a variação estudada foi de 20 a 70 °C.

Figura 10: Influência da temperatura do meio reacional nas atividades de invertase e frutossiltransferase de *Bacillus* sp. PP6.



Condições de cultivo: Cultivos realizados em MM, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha. Legenda: (A) atividade de invertase; (B) atividade transfrutossilativa. As atividades máximas de invertase e de transfrutossililação foram 1,92 U/mL e 0,73 U/mL, respectivamente, e definidas como 100 % da atividade relativa.

A maior atividade de invertase (Figura 10A) encontrada foi de 1,92 U/mL (100,00 %) nas temperaturas entre 50-55 °C. Observou-se um aumento gradativo com o aumento da temperatura de 25 °C até 50 °C, entretanto na temperatura de 60 °C e 70 °C a atividade enzimática caiu 51,56 % (0,93 U/mL), reforçando o que foi descrito por Kulshrestha et al. (2013) em sua revisão sobre invertase, onde afirmam que a enzima atinge um máximo a 55 °C. Contudo, Kaur e Teotia (2015) analisaram uma invertase proveniente de *B. subtilis*, onde a mesma também se mostrou bastante estável em temperaturas mais baixas variando de 35 a 50 °C, entretanto 37 °C foi estabelecida como a temperatura que expressou maior valor de atividade. Assim como Win et al. (2004) determinaram a temperatura ótima de uma invertase de *Arthrobacter globiformis* em 37 °C. O melhor valor de temperatura de frutossiltransferase encontrada entre as análises (Figura 10B) foi observada a 50 °C (0,73U/mL, 100,00 %), mantendo 95,89 % a 45 °C e 93,15% a 55 °C. Nas temperaturas de 20 °C a 30 °C observou-se baixa atividade transfrutossilativa (~15,00 %), sugerindo que para as reações de transfrutossililação são necessárias temperaturas mais elevadas que favoreçam a ativação da enzima e do seu substrato para ocorrer a reação. Em temperaturas acima de 55 °C foram observadas reduções na atividade enzimática, atingindo 46,60 % da atividade a 70 °C. Campestrini et al. (2005) explicam que com o aumento da temperatura, ocorre também um aumento da velocidade da

reação em virtude da energia cinética aumentada das moléculas com o substrato. Em temperaturas ótimas, a velocidade de desnaturação das enzimas pelo calor é equilibrada pelo aumento na reatividade enzima-substrato e a velocidade de reação é máxima, entretanto, temperaturas excessivas têm efeitos letais nas estruturas das enzimas. De acordo com Nelson e Cox (2005), o aumento da temperatura acarreta maior agitação das moléculas, aumentando a possibilidade de colisão entre elas para reação. Contudo, se a temperatura continua em ascensão essa agitação se torna mais intensa e as ligações que estabilizam a estrutura da enzima se rompem, gerando sua desnaturação.

5.4.2 Influência do pH do meio reacional na atividade enzimática

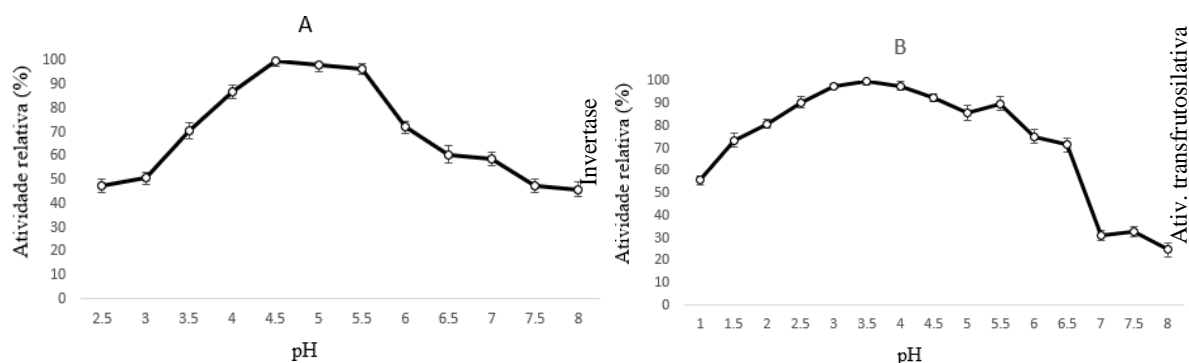
Na Figura 11 são apresentados os resultados para a atividade enzimática de invertase e frutossiltransferase para diferentes valores de pH do meio reacional.

A invertase de *Bacillus* sp. PP6 apresentou maior atividade enzimática em pH 4,5 (1,96 U/mL, 100,00%), mantendo 97,95 % da atividade em pH 5,5. Uma característica importante observada para a invertase foi a manutenção da atividade enzimática em 45,92 % em pH 2,5 e de 45,92 % em pH 8,0. Para a frutossiltransferase, o maior valor de atividade (0,78 U/mL, 100,00%), foi observado em pH 3,5, permanecendo em ~0,75 U/mL (96,15%). No pH 1,0, a enzima frutossiltransferase apresentou a atividade transfrutossilativa de 0,43 U/mL (56,58 %), se elevando para 0,63 U/mL em pH 2,0 (82,90 %). Nos pH alcalinos a enzima perdeu sua atividade enzimática, mantendo 27,33 % da atividade em pH 8,0. Um dos fatores importantes para estrutura proteica e atividade das enzimas é o pH pelo fato de interferir rigorosamente no estado de ionização das cadeias laterais dos aminoácidos. De acordo com Campestrini et al. (2005), extremos de pH podem levar a desnaturação enzimática, e essa mudança no pH afeta diretamente a ionização dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo, os quais afetam a ligação do substrato e sua transformação em produto, portanto, as enzimas possuem um pH ótimo ou uma faixa de pH ideal para que possam desenvolver sua atividade catalítica, sendo que em valores de pH superior ou inferior podem suprimir ou desnaturar as enzimas.

Durante o processo industrial a produção de determinado produto passa por variadas faixas de pH, tornando necessário a estabilidade da enzima utilizada naquele processo, como por exemplo a produção da cerveja onde processo de brassagem o pH ideal está entre 5,2 e 5,6,

enquanto na lavagem o pH desejável é de 4,0 a 6,0 (ROSA et al., 2015). Do ponto de vista industrial, a ampla faixa operacional em pH da invertase e frutossiltransferase produzidas por *Bacillus* sp. PP6 permite maior estabilidade em processos de transformação de sacarose em açúcar invertido e frutooligossacarídeos. Raveendran et al. (2018) relataram que nos processos industriais, a medida do pH monitora reações químicas e pode determinar a qualidade do produto, e na indústria alimentícia a variação do pH pode alterar o sabor, e até mesmo a validade do produto, além de regular o crescimento de microrganismos indesejados.

Figura 11: Influência do pH do meio reacional nas atividades de invertase e frutossiltransferase de *Bacillus* sp. PP6.



Condições de cultivo: Cultivos realizados em MM, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha. Legenda: (A) atividade de invertase; (B) atividade transfrutossilativa. As atividades máximas de invertase e de transfrutossilatação foram 1,96 U/mL e 0,78 U/mL, respectivamente, e definidas como 100 % da atividade relativa.

Oyedeji et al. (2017), ao analisarem uma invertase de *A. niger*, obtiveram seu pH ótimo em 4,5. Tal resultado se assemelha àqueles reportados por Almeida et al. (2018), ao estudar duas invertases intracelulares de *A. terreus*, sendo verificada uma atividade ideal em pH 3,0, e em pH 4,6, nas invertases 1 e 2, respectivamente, sendo a segunda em condições semelhantes aos resultados aqui demonstrados, onde a invertase de *Bacillus* sp. PP6 apresentou maior atividade em uma faixa pH compreendida entre 4,5 e 5,5. Lincoln e More (2017), ao realizar um estudo sobre invertases bacterianas, reportaram que estas são mais ativas em faixas de pH neutro. Yamamoto et al. (1986), que ao analisar uma invertase proveniente de *Brevibacterium divaricatum*, relataram o pH ótimo da mesma 6,8 e uma instabilidade em pH

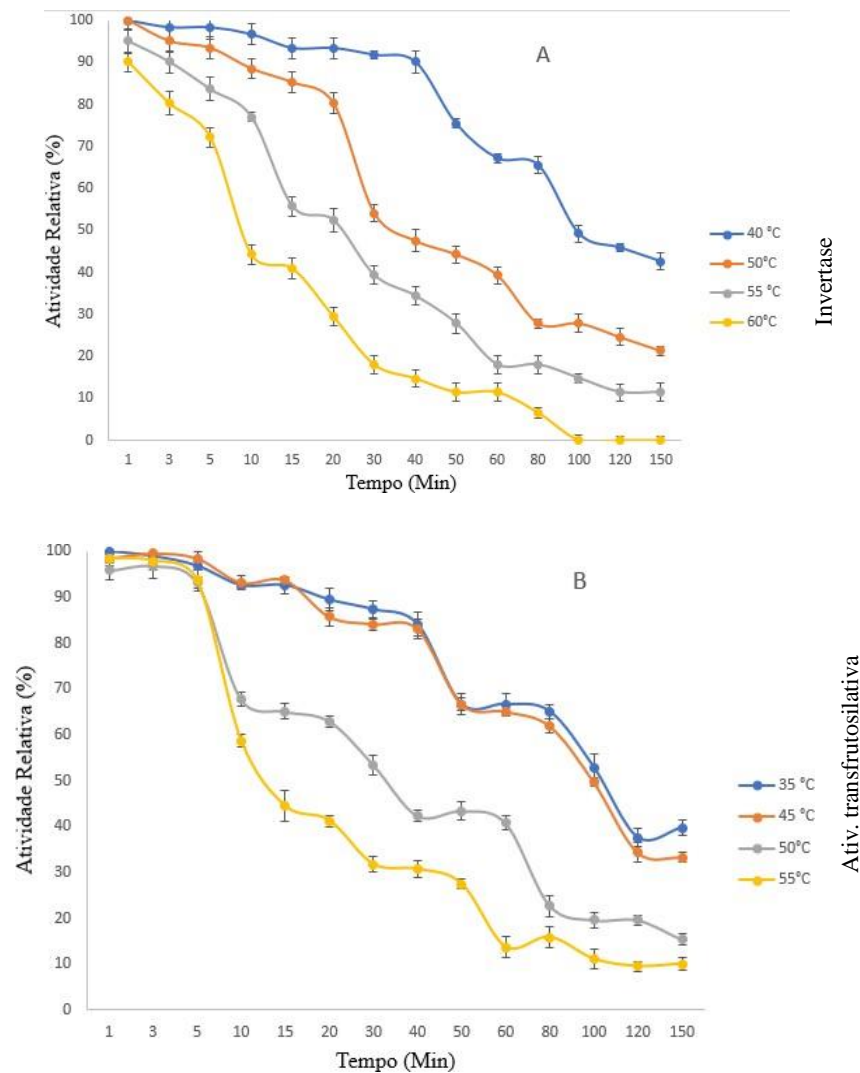
ácido. Cunha et al. (2019) realizaram a produção e caracterização da enzima frutossiltransferase por *A. oryzae*, observando a melhor performance da enzima em uma zona de pH entre 6,0 e 7,0, resultado distinto ao encontrado neste estudo onde a atividade de transfrutossililação foi maior relatada em pH ácido.

Assim como encontrado neste trabalho, Park et al. (2001) analisaram a atividade de transfrutossililação de *B. macerans*, onde sua melhor atividade ($9,3 \text{ U mg}^{-1}$) foi na temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, em pH 5,0. Posteriormente, Yoon et al. (2007) descreveram uma invertase neutra de *B. cereus*, onde a enzima foi ótima em pH 7,0 e estável de pH 6,0-8,0 mantendo 60 % de atividade em pH 8,0, enquanto em condições ácidas (pH 5,0) apenas 20 % de atividade permaneceu. Cada tipo de microrganismo apresenta suas peculiaridades e de acordo com essas particularidades a invertase e frutossiltransferase diferem quanto ao seu pH ótimo de atividade, podendo ser assim alcalinas, neutras e ácidas (SHAHEEN et al., 2008). Invertases neutras são geralmente relatadas em plantas, alguns fungos e poucas leveduras, pois as cepas são predominantemente ativas em pH ácidos (Lincoln e More, 2018).

5.4.3. Estabilidade térmica da invertase e frutossiltransferase

Na Figura 12 são apresentados os resultados para a estabilidade térmica de invertase e frutossiltransferase de *Bacillus* sp. PP6 em temperaturas que variaram de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ para invertase e de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ para frutossiltransferase. A invertase reteve 89,20 % da sua atividade em temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, apresentando tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) após 120 min (54,10 %) (Figura 12A). Na temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ a invertase reteve 80,10 % da sua atividade após 20 minutos, sendo que o tempo de meia-vida foi observada aos 50 min (43,88 %). Nas temperaturas de 55 e $60 \text{ }^\circ\text{C}$ a invertase reteve 77,04 % e 56,12 % da sua atividade após 10 e 5 min, respectivamente. O tempo de meia-vida da enzima, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, foi observada a 40 min e para $60 \text{ }^\circ\text{C}$ após 10 min. Após 100 min a invertase foi totalmente desnaturada a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Figura 12: Estabilidade térmica da invertase (A) e frutossiltransferase (B) de *Bacillus* sp. PP6



Condições de cultivo: Cultivos realizados em MM, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha. Legenda: (A) atividade de invertase; (B) atividade transfrutossilativa. Legenda: (A) atividade de invertase; (B) atividade transfrutossilativa.

Resultados distintos foram apresentados por Das et al. (2016) para uma invertase termoestável proveniente de *Cryptococcus laurentii*, a qual foi submetida a temperaturas de 4-80 °C e conseguiu reter 100 % da atividade mesmo após incubação a 60 °C por 1 hora, restando ainda 70 % e 50 % de atividade a 70 °C e 80 °C respectivamente. Giraldo et al. (2014) relataram uma invertase de *A. terreus* onde constatou a estabilidade da atividade total a 55 °C por até 1

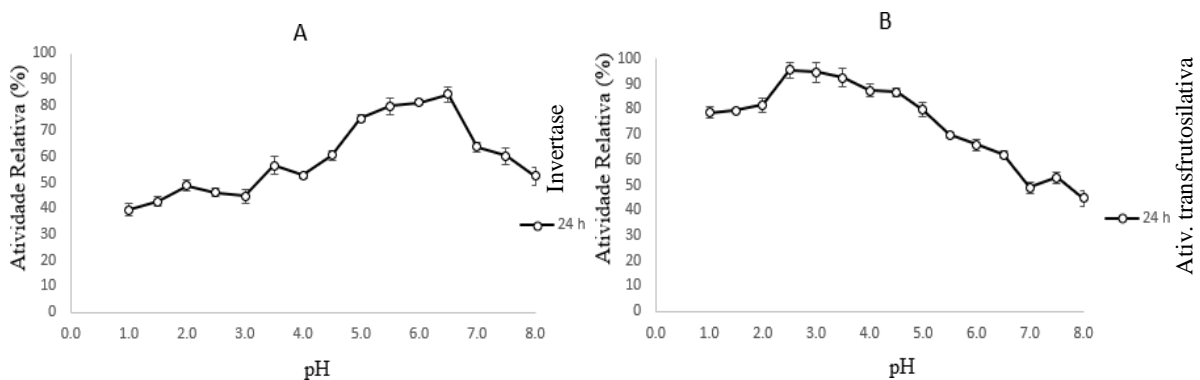
hora. Dispasquale et al. (2009) quando realizaram a caracterização da invertase de *Thermotoga neapolitana* relataram que em temperaturas de 80-85 °C a enzima reteve pelo menos 50 % da sua atividade após 6 horas de incubação. Yamamoto et al. (1986) descreveu que uma invertase de *B. divaricatum* manteve 95 % de sua atividade após 15 a 30 °C, entretanto aos 50 °C manteve somente 15 % da atividade.

Para a termoestabilidade da frutossiltransferase foram observados resultados distintos da invertase, sendo submetida a temperatura de incubação entre 35 °C e 55 °C (Figura 12B). A enzima manteve um perfil semelhante para as temperaturas de 35 °C e 45 °C, retendo 83,12 % da sua atividade após 40 min. A meia-vida da enzima foi observada após 100 min. Contudo, quando a temperatura foi elevada para 50 °C, aos 40 min a enzima reteve 43,24 % da sua atividade. Em 55 °C a atividade enzimática apresentou perda de 54,29 % da sua atividade após 20 min de incubação, sendo que aos 40 min houve redução da atividade em 69,74 % e de 90,79 % aos 120 min. Esse declínio na estabilidade térmica também foi descrito por Li et al. (2018) ao analisar uma frutossiltransferase de *Aspergillus sp.* submetida à 30-60 °C por 60 min. Os autores observaram que conforme o aumento da temperatura menor a estabilidade, sendo que a meia-vida da enzima foi encontrada após 60 minutos a 45 °C, e inativada a 60 °C. Uma maior estabilidade foi relatada por Maso et al. (2020) ao utilizar invertase derivada de *A. niger*, em que após incubação entre 30-100 °C por 60 minutos apresentou diminuição de cerca de 50 % da atividade enzimática em relação à atividade inicial. Adedeji et al. (2019) ao estudarem a termoestabilidade da frutossiltransferase uma linhagem de *Aerobasidium pullulans* melhorada descreveram que a mesma permaneceu estável por 6 horas retendo mais de 130 % da atividade residual, porém perdeu mais de 60 % da atividade após 8 h de incubação. Silva et al. (2021) analisaram a termoestabilidade de uma frutossiltransferase solúvel de *A. oryzae* IPT-301 na faixa de 30 °C e 60 °C durante 8 horas, sua atividade inicial foi de $13,15 \pm 1,47$ U/mL (100%) e a maior retenção de atividade ocorreu em 30 °C onde após 8 horas a enzima reteve 80% de sua atividade e nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C a enzima reteve 40%, 38%, 27% de atividade residual respectivamente. Os autores ainda esclareceram que as frutossiltransferases são enzimas industrialmente importantes e a estabilidade térmica é uma das propriedades bioquímicas mais desejadas pelo fato da maioria das biocatálises industriais ocorrer em temperaturas muito altas.

5.4.4 Estabilidade frente ao pH de incubação

Na Figura 13 são apresentados os resultados para a estabilidade em pH de invertase e frutossiltransferase por *Bacillus* sp. PP6. As enzimas foram avaliadas de acordo com suas atividades de hidrólise e transfrutossilatação, para uma faixa de pH compreendida entre 1,0 e 8,0 após incubação por 24 horas a 10 °C.

Figura 13: Estabilidade frente ao pH de incubação de invertase e frutossiltransferase produzida por *Bacillus* sp. PP6.



Condições de cultivo: Cultivos realizados em MM, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: PP linhagens isoladas do fruto pupunha. Legenda: (A) atividade de invertase; (B) atividade transfrutossilativa.

A estabilidade em diferentes pHs se mostrou distinta para invertase e frutossiltransferase. Em pH 1,0, a invertase reduziu em 60,40 % da sua atividade inicial. Entretanto, conforme o aumento da alcalinidade, observou-se aumento da estabilidade da enzima, sendo que em pH 3 a enzima reteve 43,92 % da sua atividade, enquanto em pH 5,5 a enzima manteve 79,90 %. Em pH 6,5 a invertase reteve 84,15 % da sua atividade, demonstrando que esse foi o melhor pH para estabilidade da enzima. Entretanto, entre os pH 7,0 e 8,0 houve redução da atividade enzimática atingindo 42,46 % em pH 8,0.

Em contrapartida, a frutossiltransferase apresentou maior estabilidade em pH ácidos, sendo que em pH 1,0 a enzima reteve 79,00 % da atividade enzimática. As maiores estabilidades

da frutossiltransferase foram observadas entre os pH 2,5, 3,0 e 3,5 (99,67 %, 94,81 % e 93,51 %, respectivamente). Contudo, assim como a invertase, conforme o aumento da alcalinidade, houve uma queda na estabilidade, onde em pH 8,0 a enzima manteve 44,64% da sua atividade inicial. Ambas as enzimas produzidas por *Bacillus* sp. PP6 apresentaram maior estabilidade em valores de pH ácidos, confirmando o perfil para meios reacionais e aplicações de natureza ácida. Yoon et al. (2007) relataram uma invertase de *B. cereus* onde a enzima foi estável de pH 6,0-8,0 mantendo 60% de atividade em pH 8,0, enquanto em condições ácidas (pH 5,0) apenas 20% de atividade permaneceu. Hernalsteens et al. (2008), ao analisar uma frutossiltransferase produzida por *Cryptococcus* sp. relataram que sua maior estabilidade ocorreu em pH 4,5. Van Hijum (2003) relata uma frutossiltransferase oriunda de *Lactobacillus reuteri* a qual se manteve estável entre pH 3,7 – 6,5. Quando Silva et al. (2021) para analisarem a estabilidade frente ao pH de uma frutossiltransferase solúvel de *A. oryzae* IPT-301, armazenaram a enzima por 24 horas a 4 °C em seis diferentes soluções tampão tris-acetato, com valores de pH variando de 3,5 a 8,5, os autores relataram maior estabilidade da enzima em pH 4,5, onde atingiu $8,87 \pm 1,45$ U/mL de atividade, em pH 6,5 a enzima manteve 65% da sua atividade, já sob condições extremas de pH a atividade relativa foi inferior a 25% da atividade inicial. Cunha et al. (2019) utilizando o mesmo microrganismo descreveram a maior atividade de transfrutossilção da enzima extracelular em pH 6,0 ($14,96 \pm 1,62$ U/mL), enquanto a maior estabilidade da frutossiltransferase micelial ocorreu entre pH 5,0-8,0 ($189,23 \pm 37,82$ U/g).

6. CONCLUSÃO

- A região amazônica oferece uma ampla diversidade microbiana para contribuir com estudos enzimáticos, e a partir dos frutos pupunha e tucumã foi possível analisar o potencial dos microrganismos isolados para produção da enzima invertase e frutossiltransferase.
- A linhagem *Bacillus* sp. PP6 derivada da pupunha se apresentou como a mais promissora para produção de invertase e frutossiltransferase.
- Sacarose foi considerada a fonte de carbono mais favorável para ambas as enzimas, enquanto sulfato de amônio foi determinado como a melhor fonte de nitrogênio.
- A partir do aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo houve proporcional aumento da atividade enzimática das enzimas. Entretanto, com o aumento extremo dessa fonte de carbono foi observado um decaimento na atividade da enzima invertase, enquanto a atividade transfrutossilativa continuou em ascensão.
- Em relação ao cultivo das amostras a enzima invertase teve melhor desempenho nos cultivos realizados em pH 5,0 e 6,0 enquanto a frutossiltransferase manteve seus valores de atividade estáveis entre pH 5,0-8,0.
- A enzima invertase teve maior produção entre pH 4,5-5,0 a 50-55 °C enquanto a frutossiltransferase estabeleceu seu pH ótimo dentro da faixa de 2,5-4,5 a 50 °C.
- Quando avaliada a estabilidade térmica das enzimas frente as diferentes temperaturas, a invertase manteve com mais eficiência sua estabilidade a 40 °C, onde durante 40 minutos teve queda de somente 10,20% da sua atividade inicial, entretanto com o aumento da temperatura esse declínio ocorreu mais rapidamente onde a 60 °C essa estabilidade só se manteve por 5 minutos. A frutossiltransferase quando submetida da 35-45 °C manteve 50% da sua atividade inicial por 100 minutos, contudo essa atividade decaiu 90,79% após 2 horas em 55 °C.
- A frutossiltransferase permaneceu com maior estabilidade de pH ácido (2,5-3,5), enquanto a invertase demonstrou ser mais estável em pH neutro (5,0-7,0).

- As atividades de invertase e frutotransferase demonstraram ser proporcionais ao crescimento microbiano, onde revelaram uma maior atividade após 36 h de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID, Y.; AZABOU, S.; JOULAK, I.; CASILLO, A.; LANZETTA, R.; CORSARO, M. M.; ATTIA, H. Potential biotechnological properties of an exopolysaccharide produced by newly isolated *Bacillus tequilensis*-GM from spontaneously fermented goat milk. **Lwt**, v. 105, p. 135-141, 2019.

ADEDEJI, N. A.; AGBOOLA, F. K. Some biochemical, catalytic, thermodynamic and kinetic properties of purified fructosyltransferase from wild and improved mutant-type *Aureobasidium pullulans* NAC8. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 4, p. 241-252, 2020.

AHMED, S. A. Production of invertase by *Bacillus macerans* immobilized on calcium alginate beads. **J Appl Sci Res**, v. 4, n. 12, p. 1777-1781, 2008.

ALMEIDA, C. V. D.; YARA, R.; ALMEIDA, M. D. Endophytic fungi in shoot tip of the peijibaye cultivated in vivo and in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 467-470, 2005.

ANDJELKOVIC, U.; MILUTINOVIC-NIKOLIC, A.; JOVIC JOVICIC, N.; BANKOVIC, P.; BAJT, T.; MOJOVIC, Z.; VUJICIC, Z.; JOVANOVIC, D. Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilisation on modified beidellite nanoclays. **Food chemistry**, v. 168, p. 262-269, 2015.

ANDJELKOVIĆ, U.; MILUTINOVIĆ-NIKOLIĆ, A.; JOVIĆ-JOVIČIĆ, N.; BANKOVIĆ, P.; BAJT, T.; MOJOVIĆ, Z.; JOVANOVIĆ, D.; Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilisation on modified beidellite nanoclays. **Food chemistry**, 2015.

ANISZEWSKI, E.; PEIXOTO, R. S.; MOTA, F. F.; LEITE, S. G. F.; ROSADO, A. S. Bioemulsifier production by *Microbacterium* sp. strains isolated from mangrove and their application to remove cadmium and zinc from hazardous industrial residue. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 235-245, 2010.

ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferase: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers—Chemické Zvesti**, v. 55, p. 350–358, 2001.

ANTOŠOVÁ, M. et al. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 58–63. 2008.

ANVARI, S.; HAJFARAJOLLAH, H.; MOKHTARANI, B.; NOGHABI, K. A. Physicochemical and thermodynamic characterization of lipopeptide biosurfactant secreted by *Bacillus tequilensis* HK01. **RSC advances**, v. 5, n. 111, p. 91836-91845, 2015.

ANWAR, M. A.; KRALJ, S.; VAN DER MAAREL, M. J.; DIJKHUIZEN, L. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 11, p. 3426-3433, 2008.

ARAÚJO, M. A.; **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado**. 2015. 67 f. Dissertação (Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.

ARISE, R. O.; OLAWOYE, D. O.; ACHO, M. A.; OLUFEMI, O.; ADEWALE, A. A.; ALEJOLOWO, O.; NWONUMA, C. Kinetic characteristics of partially purified invertase from *Citrullus lanatus* Rind. **Ceylon Journal of Science**, v. 49, n. 1, p. 61-69, 2020.

ASTOLFI FILHO, S.; SILVA, C. G. N.; BIGI, M. F. M. A. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, p. 45-80, 2015.

AWAD, G. E. A.; AMER, H.; GAMMAL, E. W. E.; HELMY, W. A. Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 2, p. 740-746, 2013.

AWAD, G. E. A.; AMER, H.; GAMMAL, E. W. E.; HELMY, W. A. Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 2, p. 740-746, 2013.

AZEVEDO, J. S. M.; CORREIA, A.; HENRIQUES, I.; Molecular analysis of the diversity of genus *Psychrobacter* present within a temperature estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84, p. 451-460, 2013.

BAHENA, J. M. V.; ESTRADA, J.V.; HERNANDEZ, J. A. S.; LOPEZ, J. O. Expression and improved production of the soluble extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, n. 1, p. 61-66, 2006..

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; DOLESKI, P. H.; GRANDO, T. H.; SAGRILLO, M. R.; SILVA, A. S.; LEAL, D. B.; MONTEIRO, S. G.; Treatment with tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) for diabetic mice prevents changes in seric enzymes of the purinergic system: Improvement of immune system. **Biomedicine e Pharmacoteraphy**, v. 94, p. 374-379, 2017.

BALI, V.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B.; PANESAR, R. Fructo-oligosaccharides: production, purification and potential applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1475-1490, 2015.

BARBOSA, P. M.; DE MORAIS, T. P.; ANDRADE-SILVA, C. A.; DA SILVA-SANTOS, F. R.; GARCIA, N. F.; FONSECA, G.; LEITE, R. S.; DA PAZ, F. F. Biochemical characterization and evaluation of invertases produced from *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Rhodotorula mucilaginosa* for the production of fructooligosaccharides. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 6, p. 506-513, 2018.

BASTO, G. J.; CARVALHO, C. W. P.; SOARES, A. G.; COSTA, H. T. G. B.; CHÁVEZ, D. W. H.; OLIVEIRA, G. R. L.; PACHECO, S. Physicochemical properties and carotenoid content of extruded and non-extruded corn and peach palm (*Bactris gasipaes*, Kunth). **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 312-318, 2016.

BATISTA, B. D.; LACAVAL, P. T.; FERRARI, A.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; BONATELLI, M. L.; TSUI, S.; MONDIN, M.; KITAJIMA, E. W.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 206, p. 33-42, 2018.

BECKER, M. M.; MANDAJI, C. M.; CATANANTE, G.; MARTY, J. L.; NUNES, G. S. Mineral and bromatological assessment and determination of the antioxidant capacity and bioactive compounds in native Amazon fruits. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

BERGARECHE, D.; ROYO, J.; MUNIZ, L. M.; HUEROS, G. Cell wall invertase activity regulates the expression of the transfer cell-specific transcription factor ZmMRP-1. **Planta**, v. 247, n. 2, p. 429-442, 2018.

BHALLA, T. C.; THAKUR, B. N.; THAKUR, N.; Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides. **LWD - Food Science and Tecnology**, V, 77. P 178-185. 2017.

BHALLA, T. C.; THAKUR, N.; THAKUR, N. Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides. **LWT**, v. 77, p. 178-185, 2017

BLOMBACH, B.; RIESTER, T.; WIESCHALKA, S.; ZIERT, C.; YOUN, J. W.; WENDISCH, V. F.; EIKMANN, B. J. *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3300-3310, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Saúde. Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J.; Evaluation of the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Naturally Contained in By-products of the Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 902-908, 2007.

BUJACZ, A.; JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA, M.; BIELECKI, S.; REDZY尼亚, I.; BUJACZ, G. Crystal structures of the apo form of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose. **The FEBS journal**, v. 278, n. 10, p. 1728-1744, 2011.

CABAJ, J.; SOLODUCHO, J.; JEDRYCHOWSKA, A.; ZAJAC, D.; Biosensing invertase-based Langmuir-Shaefer films: Preparation and characteristic. **Sensors and Actuators B: Chemical**, n. 166-167, p 75-82, 2012.

CABRAL, B. V. **Hidrólise de sacarose por invertase imobilizada em duolite A-568 por adsorção e ligação cruzada**. 2012. 143 f. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 254-267, 2005.

CHAUDHARY, S.; SAGAR, S.; KUMAR, M.; SENGAR, R. S.; TOMAR, A. The use of enzymes in food processing: A review. **South Asian J Food Technol Environ**, v. 1, n. 3&4, p. 190-210, 2015.

CHI, Z.; LIU, Z. Inositol-mediated invertase secretion in *Saccharomyces* sp. W4. **Enzyme and microbial technology**, v. 21, n. 6, p. 463-467, 1997.

CLEMENT, C. R.; CRISTO-ARAÚJO, M.; COPPENS, E. G.; PEREIRA, A. A.; PICANÇO, D. Origin and domestication of native Amazonian crops. **Diversity**, v. 2, n. 1, p. 72-106, 2010.

CORTÉS-CAMARGO, S.; ACUÑA-AVILA, P. E.; ARRIETA-BÁEZ, D.; MONTAÑEZ-BARRAGÁN, B.; MORATO, A. I.; SANZ-MARTÍN, J. L.; BARRAGÁN-HUERTA, B. E. Biosurfactant Production by *Bacillus tequilensis* ZSB10: Structural Characterization, Physicochemical, and Antifungal Properties. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2021.

CORTES-ROMERO, C.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; MELLADO-MOJICA, E.; LOPEZ, M. G.; SIMPSON, J. Molecular and functional characterization of new fructosyltransferases and invertases from *Agave tequilana*. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. 35878, 2012.

CUNHA, J. S.; OTTONI, C. A.; MORALES, S. A.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 657-668, 2019.

CUNHA JUNIOR, R. M.; DOMINGUES, P. B. A.; AMBRÓSIO, R. O.; MARTINS, C. A. F.; SILVA, J. G. B. P. C. P.; PIERI, F. A. Brazilian amazon plants: an overview of chemical composition and biological activity. **Natural Resources Management and Biological Sciences**, p. 339-346, 2020.

DA COSTA, J. R.; LEEUWEN, J. VAN; COSTA, J. A. In SHANLEY, P.; CYMERYYS, M.; SERRA, M.; MEDINA, G. **Tucumã de Amazonas *Astrocaryum aculeatum* G. Mey.** 2012.

DAL MASO, S. S. S.; COLET, R.; DA SILVA, L. M.; COMIN, T.; VENDRUSCOLO, M. D.; HASSEMER, G.; BUSTAMANTE, C. E. Investigation of Optimal Conditions for Production, Characterization, and Immobilization of Fructosyltransferase and β -fructofuranosidase by Filamentous Fungi. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 4, p. 11187-11201, 2020.

DAS, D.; BOSE, A.; CHATTOPADHYAY, P.; RAY, L.; Production and Characterization of a Crude Thermostable Invertase from *Cryptococcus laurentii* S23. **Indian Chemical Engineer**, v. 58, n. 2, p. 118-135, 2016.

DE ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M.; FALKOSKI, D. L.; DE CAMARGO, B. R.; FONTES-SANT'ANA, G. C.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; DE REZENDE, S. T. Purification and characterization of an invertase and a transfructosylase from *Aspergillus terreus*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. e12551, 2018.

DESHAVATH, N. N.; MUKHERJEE, G.; GOUD, V. V.; VEERANKI, V. D.; & SASTRI, C. V. Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. **International journal of biological macromolecules**, v. 156, p. 180-185, 2020.

DETTMER, A. **Seleção, isolamento e otimização dos meios de cultivo de microorganismos produtores de enzimas para aplicação ao processamento de peles na etapa de depilação/caleiro.** 2012. 126 f. Tese (Doutorado em engenharia química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DEWAN, S.S. **Global Markets for enzymes in industrial applications.** BCC Research: Wellesly, MA, USA, 2017.

DIAS, M.; MIGUEL, M. G. D. C. P.; DUARTE, W. F.; SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F. Epiphytic bacteria biodiversity in Brazilian Cerrado fruit and their cellulolytic activity potential. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 2, p. 851-864, 2015.

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

- DISPASQUALE, L.; GAMBACORTA, A.; SICILIANO, R. A.; MAZZEO, M. F. Purification and biochemical characterization of a native invertase from the hydrogen-producing *Thermotoga neapolitana* (DSM 4359). **Extremophiles**, v. 13, n. 2, p. 345, 2009.
- DOMINGUEZ, A. L.; RODRIGUES, L. R.; LIMA, N. M.; TEIXEIRA, J. A. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 2, p. 324-337, 2014.
- JUNG, K. H.; YUN, W. J.; KANG, K. R.; LIM, J. Y.; LEE, J. H. Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme Microb Technol** 11:491-494, 1989.
- FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos: Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.
- FLORES-MALTOS, D. A.; MUSSATTO, S. I.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; TEIXEIRA, J. A.; AGUILAR, C. N.; Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 259-267, 2016.
- FONSECA MACHADO, A. P.; NASCIMENTO, R. D. P.; ROCHA ALVES, M.; REGUENGO, L. M.; JUNIOR, M. R. M. Brazilian tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare*) fruits: bioactive composition, health benefits, and technological potential. **Food Research International**, p. 110902, 2021.
- FORTES, A. C. R.; DE OLIVEIRA, M. D. S. P.; DE OLIVEIRA, N. P.; SANCHES, E. D. N. M.; CUNHA, E. F. M.; Transferibilidade de locos microssatélites desenvolvidos em outras espécies de palmeiras para *Astrocaryum vulgare* Mart. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, 80-86. 2016.
- GANAIÉ, M. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 12-17, 2013.
- GINES, S. C. D.; MALDONADO, M. C.; VALDEZ, G. F. D. Purification and characterization of invertase from *Lactobacillus reuteri* CRL 1100. **Current Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 181, 2000.
- GIRALDO, M. A.; GONÇALVES H, B.; FURRIEL, R. D. P. M.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of the co-purified invertase and β -glucosidase of a multifunctional extract from *Aspergillus terreus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 1501-1510, 2014.
- GOLÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R.; GUIMARÃES, L. H. Extracellular β -fructofuranosidase from *Fusarium graminearum*: stability of the spray-dried enzyme in the presence of different carbohydrates. **Journal of microencapsulation**, v. 30, n. 7, p. 624-631, 2013.
- GOMAA, A.; Application of enzymes in brewing. **J. Nutr. Food Sci. Forecast**, v. 1, n. 5, 2018.

GRAEFE, S.; DUFOUR, D.; VAN ZONNEVELD, M.; RODRIGUEZ, F.; GONZALEZ, A. Pupunheira (*Bactris gasipaes*) na América Latina tropical: implicações para a conservação da biodiversidade, gestão de recursos naturais e nutrição humana. **Biodiversidade e conservação**, v. 22, p. 269-300, 2013.

GUERREIRO, I.; COUTO, A.; MACHADO, M.; CASTRO, C.; POUSÃO-FERREIRA, P.; OLIVATELES, A.; ENES, P.; Prebiotics effect on immune and hepatic oxidative status and gut morphology of white sea bream (*Diplodus sargus*). **Fish & shellfish immunology**, v. 50, p. 168-174, 2016.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCEZI, K. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Produção e caracterização de uma β - D-frutofuranosidase extracelular termoestável produzida por *Aspergillus ochraceus* com resíduos agroindustriais como fontes de carbono. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 42, p. 52-57, 2007.

HANADA, R. E.; POMELLA, A. W.; COSTA, H. S.; BEZERRA, J. L.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v. 114, n. 11-12, p. 901-910, 2010.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Properties of thermostable extracellular FOS-producing fructofuranosidase from *Cryptococcus* sp. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 2, p. 213-221, 2008.

HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A. fructooligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agric Biol Chem** 52(5):1181–1187, 1988.

HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a β -frutofuranosidase producing fructooligosaccharide from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agric Biomol. Chem.** v. 53, p. 663-667, 1989

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STANLEY, J.T. AND WILLIAM, S.T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. **Williams and Wilkins**, Baltimore, p. 786-788, 1994.

ISEJIMA, E. M.; COSTA, J. A. B.; & SOUZA JUNIOR, D. I. D.; Método de determinação de açúcares redutores aplicável no sistema de pagamento de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 729-734, 2002.

JADHAV, M.; KAGALKAR, A.; JADHAV, S.; GOVINDWAR, S. Isolation, characterization, and antifungal application of a biosurfactant produced by *Enterobacter* sp. MS16. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 11, p. 1347-1356, 2011.

JAREK, T. M.; SANTOS, Á. F. D.; TESSMANN, D. J.; VIEIRA, E. S. N. Inoculation methods and aggressiveness of five *Fusarium* species against peach palm. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.

JESUS, M. A.; ABREU, R. L. S.; Durabilidade natural da madeira de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), **Acta Amazonica**, v.32, n.4, p.663-675, 2002.

JOBIM, M. L.; SANTOS, R. C. V.; ALVES, C. F. S.; OLIVEIRA R. M.; MOSTARDEIRO, C. P.; SARGRILLO, M, R.; FILHO, O, C, S.; GARCIA, L, F, M.; MANICA-CATTANI, M, F.; RIBEIRO, E. E.; CRUZ, I. B. M.; Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. **Microbiological Research**, v. 169, p. 314-323, 2014.

- KAUR, M.; TEOTIA, P. Isolation, characterization and strain improvement of soil bacteria *Bacillus subtilis* for invertase production. **Uttar Pradesh Journal of Zoology**, v. 42, n. 18, p. 97-104, 2021.
- KAUR, N.; SHARMA, A. D. Production, optimization and characterization of extracellular invertase by an actinomycete strain. **J Sci Ind**, v. 64, p. 9, 2005.
- KOLI, A. C.; GAIKAR, V. G.; Continuous cane sugar inversion process using immobilized invertase. **Chem. Technol. Biotechnol**, v. 92, p. 787-792. 2017.
- KUEBUTORNYE, F. K.; ABARIKE, E. D.; LU, Y. A review on the application of Bacillus as probiotics in aquaculture. **Fish & shellfish immunology**, v. 87, p. 820-828, 2019.
- KULSHRESTHA, S.; TYAGI, P.; SINDHI, V.; & YADAVILLI, K. S.; Invertase and its applications—a brief review. **Journal of Pharmacy Research**, 7(9), 792-797. 2013.
- KULSHRESTHA, S.; TYAGI, P.; SINDI, V.; YADAVILLI, K. S. Invertase and its applications—a brief review. **Journal of pharmacy research**, v. 7, n. 9, p. 792-797, 2013.
- KUMAR, C. G.; SRIPADA, S.; POORNACHANDRA, Y. Status and future prospects of fructooligosaccharides as nutraceuticals. In: **Role of materials science in food bioengineering**, p. 451-503, e. 1, 2018.
- KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera Babjeviella, Meyerozyma, Millerozyma, Priceomyces, and Scheffersomyces. **Mycoscience**, v. 51, n. 1, p. 2-14, 2010.
- LA SCOLA, B.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; JUNGANG, L.; DE LAMBALLERIE, X.; DRANCOURT, M.; BIRTLES, R.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D.; A giant virus in amoebae. **Science**, v. 299, p. 2033, 2003.
- LAMARÃO, C. V.; SOUZA-GOMES, M. L.; MARTINS, G. A. S.; SANTOS-ROLIM, C. S.; YAMAGUCHI, K. K.; BONATTO, E. C. S.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. Antioxidantes inorgânicos em frutos amazônicos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 12237-12253, 2020.
- LI, Q.; ZHANG, X.; GUO, X.; YAO, P.; WEI, Y. Enzymatic Synthesis of Sucrose-6-acetate by a Novel Immobilized Fructosyltransferase From *Aspergillus* sp. GX-0010. **Iranian journal of biotechnology**, v. 16, n. 2, 2018.
- LIMA, A. C. M.; SANTOS, I. L.; BASTOS, L. T. A. DE ALMEIDA, A. F. in: DE ALMEIDA, A. F.; DO AMARAL C. C. A. Frutos Amazônicos: Biotecnologia e Sustentabilidade. **EDUFT**, v. 1, n. 24, p. Lv24-Lv24, 2020.
- LINCOLN, L.; MORE, S. Bacterial invertases: occurrence, production, biochemical characterization, and significance of transfructosylation. **Journal of basic microbiology**, v. 57, n. 10, p. 803-813, 2017.
- LINCOLN, L.; MORE, S. S. Comparative evaluation of extracellular β -d-fructofuranosidase in submerged and solid-state fermentation produced by newly identified *Bacillus subtilis* strain. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 2, p. 441-456, 2018.
- LINCOLN, L.; MORE, S. S. Bacterial invertases: occurrence, production, biochemical characterization, and significance of transfructosylation. **Journal of basic microbiology**, v. 57, n. 10, p. 803-813, 2017.

- LIU, S.; LAN, J.; ZHOU, B.; QIN, Y.; ZHOU, Y.; XIAO, X.; YANG, J.; GOU, J.; QI, J.; HUANG, Y. HbNIN2, an alkaline/neutral cytosolic invertase, is responsible for sucrose catabolism in rubber-producing laticifers of *Hevea brasiliensis* (for rubber trees). **New Phytologist**, v. 206, n. 2, p. 709-725, 2015.
- LORENZONI, A. S.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Synthesis of fructooligosaccharides by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate polymers**, v. 103, p. 193-197, 2014
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAC FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore: **Williams & Wilkins**, p. 312, 1976.
- MAIORANO, A. E.; DA SILVA, E. S.; PERNA, R. F.; OTTONI, C. A.; PICCOLI, R. A. M.; FERNANDEZ, R. C.; DE ANDRADE RODRIGUES, M. F. Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 12, p. 2619-2629, 2020.
- MANOOCHEHRI, H.; HOSSEINI, N. F.; SAIDIJAM, M.; TAHERI, M.; REZAEI, H.; NOURI, F.; A review on invertase: Its potentials and applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 101599, 2020.
- MARGETIC, A.; VUJCIC, Z. Comparative study of the stability of soluble invertase and cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 305-311, 2017.
- MASO, S. S. S. **Produção de Frutossiltransferase e β -Frutofuranosidase por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em Cultivo Submerso**. 2019. 48 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade regional integrada do alto uruguai e das missões – Urechim, Rio Grande do Sul. 2019.
- MATEI, G. M.; MATEI, S.; PELE, M.; DUMITRESCU, F.; MATEI, A. Production of invertase by fungi, characterization of enzymatic activity and kinetic parameters. **Rev. Chim.(Bucharest)**, v. 68, p. 2205-2208, 2017.
- MAUGERI, F.; HERNALSTEENS, S.; Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, n. 1-4, p. 43-49, 2007.
- MENDOZA-ARROYO, G. E.; CHAN-BACAB, M. J.; AGUILA-RAMÍREZ, R. N.; ORTEGA-MORALES, B. O.; CANCHÉ SOLÍS, R. E.; CHAB-RUIZ, A. O.; CAMACHO-CHAB, J. C. Inorganic phosphate solubilization by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and its application potential as biofertilizer. **Agriculture**, v. 10, n. 9, p. 383, 2020.
- MENG, Y. C.; LIU, H. C.; YANG, L. L.; KANG, Y. Q.; ZHOU, Y. G.; CAI, M. *Microbacterium sorbitolivorans* sp. nov., a novel member of Microbacteriaceae isolated from fermentation bed in pigpen. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5556-5561, 2016
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOREMI, M. E.; VAN RENSBURG, E. L. J.; LA GRANGE, D. C. (2020) The improvement of bioethanol production by pentose-fermenting yeasts isolated from herbal preparations, the gut of dung beetles, and marula wine. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020.

- MUSSATTO, S. I.; AGUIAR, L. M.; MARINHA, M. I.; JORGE, C., FERREIRA, E. C.; Economic analysis and environmental impact assessment of three different fermentation processes for fructooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 673-681, 2015.
- NADEEM, H.; RASHID, M. H.; SIDDIQUE, H.; AZEEM, F.; MUZAMMIL, S.; JAVED, M. R.; ALI, M. A.; RASUL, I.; RIAZ, M.; Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. **Process Biochemistry**. v. 50, n. 8, p. 1202-1210, 2015.
- NADKARNI, M. A.; PANDEY, V. N.; PRADHAN, D. S. An invertase with unusual properties secreted by sucrose-grown cells of *Corynebacterium murisepticum*. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 30, n. 3, p. 156-159, 1993.
- NAGARAJAN, A.; THULASINATHAN, B.; ARIVALAGAN, P.; ALAGARSAMY, A.; MUTHURAMALINGAM, J. B.; THANGARASU, S. D.; THANGAVEL, K. Particle size influence on the composition of sugars in corncob hemicellulose hydrolysate for xylose fermentation by *Meyerozyma caribbica*. **Bioresource Technology**, v. 340, p. 125677, 2021.
- NASCIMENTO, G. C. D.; BATISTA, R. D.; SANTOS, C. C. A. D. A.; SILVA, E. M. D.; DE PAULA, F. C.; MENDES, D. B.; ALMEIDA, A. F. D.; β -Fructofuranosidase and β -D-Fructosyltransferase from New *Aspergillus carbonarius* PC-4 Strain Isolated from Canned Peach Syrup: Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Enzyme Production. **The Scientific World Journal**, v. 2019, 2019.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzimas. In: Princípios da Bioquímica de Lehninger: princípios de bioquímica. Sarvier, v. 8, p. 189-224, 2005.
- NOBRE, F. S. **Atividade lipolítica e biodiversidade de fungos filamentosos derivados da Antártica**. 69 f. 2012. Tese (Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- NOVAKI, L. **Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus caseiellus***. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Toledo – Paraná. 2009.
- OLCER, Z.; OZMEN, M. M.; SAHIN, Z. M.; YILMAZ, F.; TANRISEVEN, A. Highly efficient method towards in situ immobilization of invertase using cryogelation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 2142-2152, 2013.
- ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzymes of industrial interest: production by fungi and applications. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.
- OYEDEJI, O.; BAKARE, M. K.; ADEWALE, I. O.; OLUTIOLA, P. O.; OMOBOYE, O. O. Optimized production and characterization of thermostable invertase from *Aspergillus niger* IBK1, using pineapple peel as alternate substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 218-223, 2017.
- PAIVA, C. F.; **Seleção de microrganismos amazônicos produtores de Invertase**. 2010. 30 f. Relatório de Pesquisa. Universidade Federal do Amazonas – Manaus. 2010.
- PANESAR, P. S.; BALI, V. Prebiotics. Reference Module in food Science. **Food and Health**, p.464-471, 2016.

PANG, W. C.; RAMILI, A. N. M.; JOHARI, N. D.; Structural Properties, Production, and Commercialisation of Invertase (Sifat Struktur, Pengeluaran dan Pengkomersialan Invertase). **Sains Malaysiana**, v. 48, n. 3, p. 523-531, 2019.

PARK, J. P.; OH, T. K.; YUN, J. W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 471-476, 2001.

PERNA, R. F.; CUNHA, J. S.; GONÇALVES, M. C. P.; BASSO, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. Microbial fructosyltransferase: production by submerged fermentation and evaluation of pH and temperature effects on transfructosylation and hydrolytic enzymatic activities. **International Journal of Engineering Research and Science**, v. 4, n. 3, 2018.

PLASCENCIA-ESPINOSA, M.; SANTIAGO-HERNANDEZ, A.; PAVON-OROZCO, P.; VALLEJO-BECERRA, V.; TREJO-ESTRADA, S.; SOSA-PEINADO, A.; BENITEZ-CARDOZA, C. G.; HIDALGO-LARA, M. E. Effect of deglycosylation on the properties of purified thermophilic invertase from *Candida guilliermondii* MpIIIa yeast. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1480-1487, 2014.

POLITZER, K.; BOM, E. P. S. Documento elaborado no âmbito do convênio 143/2005 CGEE – IQ/UFRJ – FUJB, relativo ao Termo de Referência Fórum de Biotecnologia 03, 2005.

PORRAS-DOMÍNGUEZ, J. R.; ÁVILA-FERNÁNDEZ, Á.; RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M. E.; MIRANDA-MOLINA, A.; ESCALANTE, A.; GONZÁLEZ-CERVANTES, R.; MUNGUÍA, A. L. Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 783-790, 2014.

QIAN, W.; YUE, C.; WANG, Y.; CAO, H.; LI, N.; WANG, L.; HAO, X.; WANG, X.; XIAO, B.; YANG, Y. Identification of the invertase gene family (INVs) in tea plant and analysis of its expression under abiotic stress. **Plant cell reports**, v. 35, n. 11, p. 2269-2283, 2016.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 584-590, 1999.

RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHUSELVAM, M. Microbial biotech - nology Rapid Advances in an area of Massive impact. **Life Sciences Industries News**, 2008. RAJENDRAN, S. R. C. K.; OKOLIE, C. L.; UDENIGWE, C. C.; MASON, B. Structural features underlying prebiotic activity of conventional and potential prebiotic oligosaccharides in food and health. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 5, 2017.

RAMOS, S.; SALAZAR, M.; NASCIMENTO, L.; CARAZZOLLE, M.; PEREIRA, G.; DELFORNO, T.; NASCIMENTO, M.; DE ALELUIA, T.; CELEGHINI, R.; EFRAIM, P. Influence of pulp on the microbial diversity during cupuassu fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 318, 2020.

RAPP, P.; BACKHAUS, S.; Formation of cellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 938-943, 1992.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16, 2018.

RAWAT, H. K.; GANAIE, M. A.; KANGO, N.; Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrase from fungi on low-value inulin-rich substrates and their use in generation of fructose and fructo-oligosaccharides. **Antonie Van Leeuwenhoek**, p. 799-811, 2015.

- RAWAT, H. K.; GANAIE, M. A.; KANGO, N. Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrose from fungi on low-value inulin-rich substrates and their use in generation of fructose and fructo-oligosaccharides. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 3, p. 799-811, 2015.
- REDDY, P. P.; REDDY, G.S.N.; SULOCHANA, M.B. Screening of β -fructofuranosidase producers with high transfructosylation activity and its 3 experimental run studies on reaction rate of enzyme. **Journal of Biological Sciences**, vol. 10, n.3, p. 237-241, 2010.
- REDONDO, M. G.; V, Z, R.; CARAZO B, G.; RAMÍREZ, A, N. A.; BALTODANO, V.; E., BLANCO, B, J.; PORRAS, N, M.; Phytochemical characterization of extracts of the mesocarp of *Bactris gasipaes* and evaluation of its antioxidant power for pharmaceutical dermal formulations. **International journal of Herbal Medicine**, v. 7, p. 56-67, 2019.
- RIUL, A. J.; GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85/86, p. 126-133, 2013.
- ROMANO, N.; SANTOS, M.; MOBILI, P.; VEGA, R.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-oligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. **Food chemistry**, v. 202, p. 467-475, 2016.
- ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A química da cerveja. **Revista Química Nova. São Paulo**, v. 37, p. 98-105, 2015.
- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, M. L. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 126-131, 2010.
- RUSTIGUEL, C. B.; OLIVEIRA, A. H. C.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Biochemical properties of an extracellular β -D-fructofuranosidase II produced by *Aspergillus phoenicis* under solid state fermentation using soybean meal as substrate. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 2-2, 2011.
- SACCO, L. P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos**. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal – São Paulo. 2013.
- SAEED, Z.; PALAMAE, S.; INTHARAPAT, P.; KHUNDAMRI, N.; TANRATTANAKUL, V.; TIRAWANICHAKUL, Y.; SUTTINUN, O. Enhanced ethanol production from lignocellulosic hydrolysate using *Meyerozyma caribbica* biofilm immobilized on modified epoxy foam. **Biomass and Bioenergy**, v. 154, p. 106267, 2021.
- SAGRILLO, M. R.; GARCIA, L. F. M.; SOUZA FILHO, O. C.; DUARTE, M. M. M. F.; RIBEIRO, E. E.; CADONÁ, F. C.; CRUZ, I. B. M. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**, v. 173, p. 741-748, 2015
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, MANIATIS, T.; **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
- SANTOS, M. M. R.; FERNANDES, D. S.; CÂNDIDO, C. J.; CAVALHEIRO, L. F.; DA SILVA, A. F.; DO NASCIMENTO, V. A.; HIANE, P. A.; Physical-chemical, nutritional, and

antioxidant properties of tucuman (*Astrocaryum huaimi* Mart.) **Ciências Agrárias**, v. 39, n. 4, p. 1517-1531, 2018.

SEBASTIANES, F.L.S.; AZEVEDO, J.L.; LACAVA, P.T. Diversity and biotechnological potential of endophytic microorganisms associated with tropical mangrove forests. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Cham, 2017. p. 37-56.

SERRA, J. L.; MOURA, F. G.; PEREIRA, G. V. D. M.; SOCCOL, C. R.; ROGEZ, H.; DARNETA, S. Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. **LWT- Food Science and Technology**, v. 106, p. 229-239, 2019.

SHAHEEN, I.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, T. Production, purification and thermal characterization of invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. Under solidstate fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p.1152- 1158, 2008.

SILVA, J. B. F.; CLEMENT, C. R. Wild pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth var. *chichagui*) in Southeastern Amazonia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 281-284, jun. 2005.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. **Food Research International**, v. 66, p. 493-500, 2014.

SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 859–865, 2005.

SILVA, M. B. P. D. O.; ABDAL, D.; PRADO, J. P. Z.; DIAS, G. D. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. D. C. A.; PERNA, R. F. Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, 2021.

SILVA, R. D. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R.; Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos (Brazil)**, v. 23, p. 337-341, 2003.

SILVA, R. S.; SANTOS, C. D. L.; MAR, J. M.; KLUCZKOVSKI, A. M.; FIGUEIREDO, J. D. A.; BORGES, S. V.; CAMPELO, P. H. Physicochemical properties of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) powders with different carbohydrate biopolymers. **LWT**, v. 94, p. 79-86, 2018.

SINGH, S. P.; JADAUN, J. S.; NARNOLIYA, L. K.; PANDEY, A. Prebiotic oligosaccharides: special focus on fructooligosaccharides, its biosynthesis and bioactivity. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 183, n. 2, p. 613-635, 2017.

SNELL-CASTRO, R.; GODON J. J.; DELGENÈS, J. P.; DABERT P.; Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 52, p. 229-242, 2005.

SOARES, S. A.; AUGUSTO, P. E. D.; JUNIOR, B. R. C. L.; NOGUEIRA, C. A.; VIEIRA, E. N. R.; BARROS, F. A. R.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. **LWD - Food Science and Technology**. v. 107, p. 164-170, 2019.

SWAISGOOD, H. E.; Use of immobilized enzymes in the food industry. **Handbook of Food Enzymology**, p.359-366. 2003.

TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresource Technology*, p. 110, 488-495, 2012.

TADIOTO, V.; MILANI, L. M.; BARRILLI, É. T.; BAPTISTA, C. W.; BOHN, L.; DRESCH, A.; ALVES, S. L. (2022). Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 38, n. 2, p. 1-14, 2022.

TALEKAR, S.; GHODAKE, V.; KATE, A.; SAMANT, N.; KUMAR, C.; GADAGKAR, S. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, v. 4, n. 10, p. 4760-4765, 2010.

TAUZIN, A. S., SULZENBACHER, G.; LAFOND, M.; DESSEAUX, V.; RECA, I. B.; PERRIER, J.; BELLINCAMPI, D.; FOURQUET, P.; LEVEQUE, C.; GIARDINA, T. Functional characterization of a vacuolar invertase from *Solanum lycopersicum*: Post-translational regulation by N-glycosylation and a proteinaceous inhibitor. *Bioquímie*, v. 101, p. 39-49, 2014.

THAPA, S.; PRASANNA, R.; RANJAN, K.; VELMOUROUGANE, K.; RAMAKRISHNAN, B. Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice. *Microbiology Research*, v. 204, p. 55–64, 2017

TIMERMAN, A. P. The isolation of invertase from baker's yeast—an introduction to protein purification strategies. *Protein Purif.*, p. 29-52, 2012.

TRICHEZ, D.; STEINDORFF, A. S.; SOARES, C. E.; FORMIGHIERI, E. F.; ALMEIDA, J. R. (2019). Physiological and comparative genomic analysis of new isolated yeasts *Spathaspora* sp. JA1 and *Meyerozyma caribbica* JA9 reveal insights into xylitol production. *FEMS yeast research*, v. 19, n. 4, p. 0-34, 2019.

TRINDADE, R. C.; RESENDE, M. A.; SILVA, C. M.; ROSA, C. A. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 25, n. 2, p. 294-300, 2002.

UDAY, U. S. P.; CHOUDHURY, P.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. *International journal of biological macromolecules*, v. 82, p. 1041-1054, 2016.

VAN DONKELAAR, L. H.; MOSTERT, J.; ZISOPOULOS, F. K.; BOOM, R. M.; VAN DER, A. J. The use of enzymes for beer brewing: Thermodynamic comparison on resource use. *Energy*, v. 115, p. 519-527, 2016.

VAN HIJUM, S. A.; VAN DER MAAREL, M. J.; DIJKHUIZEN, L. Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS Letters*, v.534. p.207-210, 2003.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. Conceitos e aplicações dos adjuvantes. *Embrapa Trigo*, 10 f. 2006.

VARGAS, W.; CUMINO, A.; SALERMO, G. L. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol?. *Planta*, v. 216, n. 6, p. 951-960, 2003.

VÁSQUEZ-BAHENA, J. M.; VEGA-ESTRADA, J.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, J. A.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; FLORES-COTERA, L. B.; MONTES-HORCASITAS, M. C.; & HIDALGO-LARA, M. E.; Expression and improved production of the soluble extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, n. 1, p. 61-66, 2006.

VEANA, F.; AGUILAR, C. N.; HERRERA, R. R.. Kinetic studies of invertase production by xerophilic *Aspergillus* and *Penicillium* strains under submerged culture. **Micología Aplicada Internacional**, v. 23, n. 2, p. 37-45, 2011.

VEANA, F.; FLORES-GALLEGOS, A. C.; GONZALEZ-MONTEMAYOR, A. M.; MICHEL-MICHEL, M.; LOPEZ-LOPEZ, L.; AQUILAR-ZARATE, P.; RODRIGUEZ-HERRERA, R. Invertase: An enzyme with importance in confectionery food industry. **Enzymes in Food Technology**, p. 187-212, 2018.

VEANA, F.; FUENTES-GARIBAY, J. A.; AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ HERRERA, R.; GUERRERO OLAZARAN, M.; VIADER SALVADO, J. M. Gene encoding a novel invertase from a xerophilic *Aspergillus niger* strain and production of the enzyme in *Pichia pastoris*. **Enzyme and microbial technology**, v. 63, p. 28-33, 2014.

VENESHKUMAR, R.; VIJAYAKUMAR, R.; JAGANNATHAN, S.; SRINIVASAN, P.; ASSALAM, K.; SUGANYA, K. Comparative analysis of invertase activity by *Saccharomyces cerevisiae* isolated from sugarcane juice with a standard industrial strain. **Food Science**, v. 17, p. 7-8, 2011.

VITTI, G. C.; TAVARES, J. J. E.; LUZ, P. H. C.; FAVARIN, J. L.; COSTA, M. C. G.; Influência da mistura de sulfato de amônio com uréia sobre a volatilização de nitrogênio amoniacal. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 3, p. 663-671, 2002.

WAN, H.; WU, L.; YANG, Y.; ZHOU, G.; RUAN, Y. L. Evolution of sucrose metabolism: the dichotomy of invertases and beyond. **Trends in plant science**, v. 23, n. 2, p. 163-177, 2018.

WARCHOL, M.; PERRIN, S.; GRILL, J. P.; SCHNEIDER, F. Characterization of a purified β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 462-467, 2002.

WARCHOL, M.; PERRIN, S.; GRILL, J. P.; SCHNEIDER, F. Characterization of a purified β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 462-467, 2002.

WENDISCH, V. F.; JORGE, J. M.; PÉREZ-GARCÍA, F.; SGOBBA, E. Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 105, 2016.

WIN, T. T.; ISONO, N.; KUSNADI, Y.; WATANABE, K. Enzymatic synthesis of two novel non-reducing oligosaccharides using transfructosylation activity with β -fructofuranosidase from *Arthrobacter globiformis*. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 6, p. 499-503, 2004.

WITSCHINSKI, F.; DEMARTINI, D.; KILIAN, J.; DALLAGO, R. M.; ROSA, C. D.; CANSIAN, R. L. Development and characterization of light yoghurt elaborated with *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb-12 and fructooligosaccharides. **Ciência Rural**, v. 48, n. 3, 2018.

WORKMAN, W.E.; DAY, D. F.; Purification and properties of the β -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **FEBS letters**, v. 160, p.16-20, 1983.

- XU, Q.; ZHENG, X.; HUANG, M.; WU, M.; YAN, Y.; PAN, J.; FENG, J. X. Purification and biochemical characterization of a novel β -fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1237-1246, 2015
- YAMAMOTO, K.; KITAMOTO, Y.; OHATA, N.; ISSHIKI, S.; ICHIKAWA, Y. Purification and properties of invertase from a glutamate-producing bacterium. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, n. 4, p. 285-291, 1986.
- YAN, W.; GAO, H.; QIAN, X.; JIANG, Y.; ZHOU, J.; DONG, W.; JIANG, M. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Biotechnology Advances**, v. 46, p. 107674, 2021.
- YAN, W.; GAO, H.; QIAN, X.; JIANG, Y.; ZHOU, J.; DONG, W.; JIANG, M. Biotechnological applications of the unconventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Biotechnology Advances**, v. 46, p. 107674, 2021.
- YE, M.; TANG, X.; YANG, R.; ZHANG, H.; LI, F.; TAO, F.; WANG, Z. Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. **ACS chemical biology**, v. 13, n. 3, p. 500-505, 2018.
- YI, S. H.; SONG, J. E.; LEE, J. S.; Biosynthetic regulation of intracellular invertase from alkalophilic and thermoplastic *Bacillus cereus* TA-11. **The Journal of Natural Sciences**, v. 18, n. 1, p. 29-38, 2007.
- YOON, M. H.; CHOI, W. Y.; KWON, S. J.; YI, S. H.; LEE, D. H.; LEE, J. S. Purification and properties of intracellular invertase from alkalophilic and thermophilic *Bacillus cereus* TA-11. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 196-201, 2007.
- YOSHIKAWA, J.; HONDA, Y.; SAITO, Y.; SATO, D.; IWATA, K.; AMACHI, S.; MAEHASHI, K. Isolation and identification of *Zalaria* sp. Him3 as a novel fructooligosaccharides-producing yeast. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, p. 1104-1111, 2021.
- YUYAMA, L. K. O.; MAEDA, R. N.; PANTOJA, L. A.; AGUIAR, J. P. L.; MARINHO, H. A. Processing and shelf-life evaluation of dehydrated and pulverized tucuman (*Astrocaryum aculeatum* Meyer), v. 28, p. 408-412, 2008.
- ZHAO, Y.; WU, Q.; ZHANG, Z.; WANG, Z.; WEI, Y.; HUANG, R.; DU, L. Expression and characterization of a neutral *Enterobacter cloacae* GX-3 invertase. **Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica**, v. 55, n. 4, p. 467-475, 2015.
- ZHOU, J.; HE, L.; GAO, Y.; HAN, N.; ZHANG, R.; WU, Q.; LI, L.; TANG, X.; XU, B.; DING, J. Characterization of a novel low-temperature-active, alkaline and sucrose-tolerant invertase. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016