

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS: REVIEW

RESUMO

Raquel Gomes

rgomes@uem.br

[Orcid: 0000-0001-6729-9690](https://orcid.org/0000-0001-6729-9690)

Universidade Estadual de Maringá,
Maringá, Paraná, Brasil.

Os frutooligossacarídeos são carboidratos muitas vezes considerados prebióticos, e que desempenham um papel fundamental no equilíbrio da microbiota intestinal e na saúde humana. Eles têm despertado um grande interesse pela indústria de alimentos, pois geralmente são empregados como ingredientes que alteram a designação de alimentos para alimentos funcionais. Os frutooligossacarídeos, de forma convencional, são produzidos pela reação de enzimas microbianas a partir de sacarose ou inulina como substratos. Vários estudos sobre a síntese de frutooligossacarídeos têm sido realizados, buscando a otimização dos parâmetros de produção, o desenvolvimento de processos mais eficientes, os diferentes métodos de fermentação e novas fontes microbianas produtoras de enzimas. Assim, esta revisão tem como objetivo apresentar os últimos estudos na produção biotecnológica de frutooligossacarídeos..

PALAVRAS-CHAVE: β -D-frutossiltransferase, β -frutofuranosidase, Levanasacarase, Síntese enzimática.

INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são utilizados na indústria de alimentos como fibras dietéticas em produtos alimentícios, conferindo a eles propriedades funcionais. Devido às suas propriedades prebióticas, os FOS atuam na estimulação seletiva da microbiota intestinal, contribuindo com o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, conhecido como probióticos que são microrganismos vivos que, quando são consumidos agem no trato gastrointestinal do organismo do hospedeiro melhorando o balanço microbiano intestinal (DETOFOL et al., 2015; XU et al., 2015, SANTOS-MORIANO et al., 2015, SAAD, 2006).

Os FOS são carboidratos de cadeias curtas formados por unidades de frutose, que podem ou não ter uma porção de glicose terminal. Eles são representados pela fórmula geral GF_n (glicose-frutose), onde “n” representa o número de unidades de frutose ligadas na cadeia. Os FOS podem ser do tipo inulina, comuns em plantas, e sintetizados por fungos apresentam ligações lineares β(2-1) frutose-frutose que são unidas na extremidade não redutora a um resíduo terminal de glicose por uma ligação glicosídica. E, os FOS do tipo levanas são sintetizados por fungos e bactérias, e são compostos por cadeias lineares curtas de resíduos de D-frutose com ligações β(2 - 6) frutose-frutose e podem conter ramificação β(2 - 1) (DETOFOL et al., 2015; SANTOS-MORIANO et al., 2015, WANG et al., 2016; XAVIER; RAMANA, 2016; XU et al., 2015).

A produção de FOS pode ocorrer por duas vias, a partir da hidrólise da inulina, ou a partir da síntese da sacarose. A primeira baseia-se na quebra da inulina, por meio das enzimas inulinases (INL, EC 3.2.1.7), enquanto a segunda emprega a transfrutoseilação da sacarose pelas enzimas β-D-frutoseiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9), β-frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26) ou levanasacarase (LEV E.C.2.4.1.10). A transfrutoseilação consiste na quebra de uma molécula de sacarose na ligação β(2 - 1), no caso da FTase e da FFase e β(2 - 6) no caso da LEV, e na adição de um frutose em uma molécula de sacarose diferente, reação comum às três enzimas. Os FOS mais comuns são a 1-cestose (GF2), a nistose (GF3) e a 1-frutofuranosilnistose (GF4), todos do tipo inulina e 6-cestose (6GF2), do tipo levana (XAVIER; RAMANA, 2016; ZAMBELLI et al., 2016).

Diante da importância da ingestão de prebióticos para benefícios à saúde, como absorção de cálcio, metabolismos de lipídios, modulação da composição da microbiota intestinal que atua na fisiologia gastrointestinal e na redução do risco de câncer de colon, a presente revisão propõe buscar formas de obtenção biotecnológica de FOS, com ênfase na produção enzimática, utilizando como palavras-chave β-D-frutoseiltransferase, β-frutofuranosidase, Levanasacarase, Inulinase, Síntese enzimática, sendo selecionados 25 artigos para discussão do trabalho.

METODOLOGIA

2.1 Produção de Frutooligossacarídeos por Enzimas Livres

2.1.1 β -frutofuranosidase (FFase)

A FFase é uma glicosídeo-hidrolase que faz a hidrólise e a transfrutossilacção da sacarose gerando açúcar invertido e FOS. É produzida por *Aureobasidium spp*, *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*, contudo novas cepas microbianas tem sido alvo de pesquisa para potencializar a síntese de FFase e FOS, e assim atender à crescente demanda da indústria (BHALLA et al., 2017; NASCIMENTO et al.; 2016).

Para a produção de FFase e síntese de FOS foi isolada uma cepa de *Penicillium sp. GXU20*, identificada como *Penicillium oxalicum* (XU, et al, 2015), através do sequenciamento do DNA, amplificação por PCR e pesquisa no banco de dados GenBank. Em seguida, a cepa foi cultivada para purificação enzimática. Para avaliar a atividade¹ e especificidade² da enzima foram aplicadas diversas temperaturas e valores de pH, sendo considerados ótimos os de 50°C e pH 5,5. A atividade foi de 1,23± 0,08 U/ml e houve especificidade à sacarose, GF₂, rafinose, inulina e levana.

Para a síntese de FOS, a FFase foi adicionada em solução de sacarose (500 g/L) nas condições supracitadas sob agitação de 350 rpm. A concentração máxima obtida de FOS foi 224,7 g/L, após 6 horas de reação, um rendimento de 42,3%. A produção de GF₂ e GF₃ foram 87,3g/L e 34,3g/L, respectivamente. A partir destes resultados foi feita a clonagem do gene que codifica a FFase e sua expressão em *Pichia pastoris*. Repetindo os ensaios anteriores para a enzima clonada, chegou-se à atividade enzimática de 8,28 ±0,07 U/ml, atividade 6,7 vezes maior que a da enzima bruta de *P. oxalicum GXU20*, que é de 1,23 ± 0,08 U/ ml (XU et al., 2015).

Oito cepas de *Penicillium*³ com potencial para a síntese de FFase e FOS foram avaliadas por Nascimento et al., (2016). A triagem para produção de FFase foi feita por meio da atividade de transfrutossilacção em solução de sacarose 600 g/L e pH 6, sendo o *P. citreonigrum UMR4459* selecionado, por obter a maior atividade (227,56 ± 4 U/ml)⁴, produzindo 50,7 g/L de FOS.

Para a otimização da síntese de FFase e FOS foram criados três modelos matemáticos. O primeiro modelo estudou a ação do tempo de fermentação, temperatura, pH e quantidade de extrato de levedura, obtendo atividade FFase máxima de 287,10 U/ml a 60h, 25°C, pH 6 e 2,75% (p/v) de extrato de levedura. O segundo reavaliou a ação da temperatura e do tempo de fermentação na atividade máxima, obtendo 288,17 U/ml, a 67h, 25°C e pH 6,5. Os resultados obtidos foram plotados na metodologia de superfície de resposta, para obter condições ótimas de produção de FFase pelo *P. citreonigrum*, que foram 25,5°C e 67,8h, com atividade de 301,84 U/ml (NASCIMENTO et al., 2016).

1 Atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de produto da reação em parâmetros ótimos 2 A especificidade do substrato pela enzima foi determinada pela capacidade da enzima purificada de hidrolisar vários carboidratos (sacarose, 1-cestose, rafinose, inulina, levano, lactose e maltose). 3P. aurantiogriseum URM5139, P. citrinum URM2725, P. commune URM4939, P. aurantiogriseum URM5126, P. implicatum URM5426, P. citreonigrum URM4459, P. glabrum URM4757, P. islandicum URM5073

A síntese de FFase foi conduzida em reator de tanque agitado, nas condições anteriormente descritas. A atividade máxima foi de 232,16 ±1 U/ml em 38h e produtividade de 6,11 U/ml por hora. Avaliou-se o efeito do pH, da temperatura e de diferentes íons⁵ na atividade e estabilidade da FFase. A enzima foi estável entre pH 4-10, com atividade ótima em pH 5.

A melhor temperatura foi 50°C e a enzima foi estável por 60 min, entre 25-30°C. A atividade de FFase aumentou com a adição de todos os íons, sendo que na presença de Cu⁴⁺ a 5 mM⁶ a atividade aumentou 24% e a 10mM 29%. Com concentração de 10 mM na presença de Mg⁴⁺, Zn⁴⁺ e Zn²⁺ a atividade enzimática aumentou mais de 23%. A síntese de FOS utilizou sacarose a 60% (p/v), nas condições ótimas e obteve-se 58,7 g/L de FOS, sendo 52,5 g/L de GF², 4,5 g/L de GF³ e 1,7 g/L de GF⁴ (NASCIMENTO et al., 2016).

Bhalla et al. (2017), caracterizou a FFase de *Saccharomyces cerevisiae* SAA612 isolada de uma bebida alcoólica tradicional na Índia para a síntese de FOS. Nove estirpes de leveduras⁷ foram avaliadas para a atividade de FFase, sendo que a *S. cerevisiae* SAA612 foi selecionada pela melhor atividade (15 U/ml). Para a produção da FFase, sete meios, com diferentes composições foram testados, sendo o melhor composto por sacarose (20,0 g/l), extrato de levedura (10,0 g/l), sulfato de amônio (1,0 g/l), sulfato de magnésio (0,75 g/l) e hidrogenofosfato de potássio (3,5 g/l). Aplicou-se a metodologia de superfície de resposta para obter as condições de cultura da FFase, a partir da triagem dos nutrientes. O modelo previu uma atividade de FFase de 367,65 U/ml, com meio composto por maltose 2,05%, extrato de levedura 0,55%, MgSO₄ 0,055% e tempo de incubação 27h. A otimização das condições, revelou uma atividade de 416 U/ml, em pH 6, 20 min e 40°C, um aumento de 24 vezes, sendo um grande potencial para a síntese de FOS (BHALLA et al., 2017).

2.1.2 β-D-frutossiltransferase (FTase)

A FTase, é uma glicosídeo-hidrolase, com atividade transfrutossilante. A produção escalonada de FOS a partir de sacarose é realizada por FTase fúngica de *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Fusarium* e *Penicillium*. Também há relatos de produção de FTase por bactérias (*Bacillus macerans*, *Arthrobacter* sp. K-1) e leveduras (*Rhodotorula* sp, *Candida utilis*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*). Estudos recentes têm focado na otimização da produção e FTases, uma vez que os microrganismos produtores da enzima são bem conhecidos (DETOFOL et al., 2015; SPOHNER; CZERMAK, 2016).

Os parâmetros operacionais para a otimização da síntese de FOS foram avaliados por Kashyap; Palai; Bhattacharya (2015) e Kaenpanao et al. (2016). Onde os primeiros avaliaram a concentração inicial de sacarose (ISC) (300-500 g/L), atividade enzimática (4 a 32 U/ml), temperatura (45-60°C), inibição enzimática pela glicose (IGC) (0-100 g/L) e Ph (4 e 5), da FTase de *Aspergillus aculeatus*⁸.

⁴U/ml - concentração de atividade enzimática ⁵MgSO₄, NaCl, KCl, FeCl₃, CuSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, ZnCl₂, CaCl₂. mM - MiliMol: é a milésima parte do mol ⁶*S. cerevisiae* SAA612, *Candida tropicalis* SAA613, *Pichia kudriavzevii* SAA614, *P. kudriavzevii* SAA615, *S. cerevisiae* SAA616, *S. cerevisiae* SAA617, *S. fibuligera* SAA618, *S. fibuligera* SAA619 e *S. cerevisiae* SAA620

A temperatura e pH ótimos para atividade da FTase foi 55°C e 4,5, respectivamente. Sob estas condições, a síntese de FOS foi conduzida em lotes, num reator em banho de água com agitação de 85 rpm. A produção máxima de FOS foi obtida com ISC de 500 g/L e atividade enzimática de 32 U/ml com índice de 60% de FOS (GF₂ 31%, GF₃ 26% e GF₄ 3%). A formação de FOS diminuiu de 60% para 42% com adição de 100 g/L de glicose. A partir destes experimentos, foi desenvolvido um modelo cinético, com base na teoria de Michaelis-Menten. Os resultados experimentais foram comparados com os resultados preditos pelo modelo, mostrando concordância (KASHYAP; PALAI; BHATTACHARYA, 2015).

Kaenpanao et al. (2016), avaliaram os efeitos das concentrações de sacarose (50-150 g/L), das concentrações de extrato de levedura (10-30 g/L) e velocidades de agitação (75-300 rpm) sobre a produção de FOS pela estirpe de levedura ML1, isolada a partir de caldo de cana-de-açúcar, em um fermentador de 3 litros. A produção de FOS mais elevada (65 g/L) foi obtida a partir de 150 g/L de sacarose, a 20 g/L de extrato de levedura e com agitação de 150 rpm.

A expressão heteróloga de FTase de *Aspergillus niger* em *Pichia pastoris*, para síntese de FOS por FTases recombinantes foi estudada por Yang et al. (2015). O cDNA de FTase de *A. niger* foi obtido por uma análise molecular conhecida por análise de reação de transcrição reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) e expresso em *P. Pastoris*. Investigou-se o rendimento enzimático, a atividade específica, a temperatura e pH ótimos, a estabilidade térmica e de pH, a eficiência catalítica, a inibição pela glicose, a especificidade do substrato e os efeitos dos íons metálicos, da FTase recombinante.

A temperatura ótima para a atividade da FTase recombinante foi de 55°C, o pH ideal foi 5,5. A eficiência catalítica foi de 68,8 L/g/min. A atividade de FTase foi aumentada com a presença de 5mM de Ni₂⁺ e Mg₂⁺, indicando que a atividade pode ser dependente destes íons. Nenhuma inibição ou ativação foi observada com 5 mM de K⁺, Fe³⁺ ou Mn²⁺ e Na⁺. Os íons K⁺ (0,5 mM), Mg²⁺ (0,5 mM), Li⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ (0,5 e 5 mM) tiveram efeito inibidor na atividade da enzima. O rendimento da FTase recombinante atingiu 1020,0 U/ml, 1160,4 vezes superior ao da FTase nativa de *A. niger*. A síntese de FOS foi realizada durante 12h utilizando sacarose como substrato (600 g/L) a 40°C e pH 5,5. O maior rendimento de FOS com FTase recombinante purificada foi de 343,3 g/L (p/v) às 2 h. Os rendimentos máximos de GF₂, GF₃, e GF₄ foram 246,0 g/L (p/v) a 1,5 h, 186,0 g/L (p/v) a 10 h, e 88,2 g/L (p/v) às 12 h, respectivamente (YANG et al., 2015).

2.1.3 Levanasacarase (LEV)

A LEV é uma hexosiltransferase extracelular bacteriana produzida por *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Microbacterium laevaniformans* e *Zymomonas mobilis*. A LEV hidrolisa a sacarose em glicose e frutose e realiza a transfrutossilacção da sacarose, formando FOS. Seu potencial para uso em processos industriais para a síntese de FOS a partir de sacarose vem sendo estudado recentemente (SANTOS-MORIANO et al., 2015, XAVIER; RAMANA, 2016).

A influência da aeração em reator para a síntese de FOS por LEV de *Bacillus subtilis* natto a partir da sacarose como substrato foi avaliada por Magri et al. (2015). Foram feitas duas fermentações em diferentes aerações (0,2 e 1,0 vvm) em meio com 400 g/L de sacarose, 2 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH₂PO₄

11, 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12, 0,6 g/L de $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ 13, 0,2 g/L MnSO_4 e 0,25 g/L de citrato de amônio, a 35°C, com agitação de 150 rpm, em pH 7,7 por 48 h. Com aeração de 0,2 vvm, a maior produção de FOS foi 154,94 g/L em 38h. Com aeração de 1vvm, a maior produção de FOS foi 140,24 g/L em 46 h. Quanto à produção de LEV o valor máximo observado foi 0,869 $\mu\text{mol/ml/min}$ em aeração de 0,2 vvm.

A síntese de FOS por LEV de *Bacillus amyloliquefaciens* em xaropes de bordo enriquecidos com lactose, celobiose e melibiose como substrato, foi avaliada por Li; Seo; Karboune (2015). A transfrutoseilação da sacarose foi realizada em duas temperaturas (8°C e 30°C), com duas quantidades de enzima (2 U/ml e 6 U/ml), três tempos de reação (12, 24 e 48 horas) e xarope de bordo em três concentrações diferentes (15, 30 e 66°Brix). A concentração dos produtos de transfrutoseilação (PTF) em xarope de bordo com 6U/ml de LEV a 30° e 8°C, após 48 horas a 15°Bx, foi 23,85% e 23,92% respectivamente. Nas concentrações de 30° e 66°Bx, a 30° e 8°C, obteve-se 33,10% e 31,02%, de PTF, e, 22% e 0,04% de PTF, respectivamente.

Destaca-se ainda que a 15°Bx não houve síntese de FOS com 12 e 24 h de reação. Mas, em 48 h, 30°C e concentrações de LEV a 2 U/ml e 6 U/ml, a síntese de FOS foi 70,65 e 99,65%, respectivamente. Tais resultados se devem à ativação da enzima pelos PTF. Em xarope a 30° e 60°Bx, não houve síntese de FOS. Com estes dados, a síntese de FOS foi analisada em xaropes de bordo 15° e 30°Bx acrescidos com lactose, celobiose e melibiose, a fim de verificar a especificidade da LEV na presença destes dissacarídeos. Apenas no xarope com melibiose produziu-se GF_4 (0,26 g/L) em 15°Bx, e GF_3 (2,30 g/L) em 30°Bx (LI; SEO; KARBOUNE, 2015).

A LEV de *Bacillus licheniformis* ANT179, isolado do solo da Antártica, para síntese de FOS a partir de caldo de cana-de-açúcar foi descrita por Xavier; Ramana, (2016). A temperatura e pH ótimos para a atividade de LEV foi de 60°C e pH 6. O efeito dos íons Ba_2+ , Ca_2+ , Cu_2+ , $\text{K}+$, $\text{Li}+$, Mn_2+ , Mg_2+ , $\text{Na}+$, Ni_2+ , Zn_2+ , NH_4Cl , e dos produtos químicos EDTA e acetato de sódio na atividade da LEV foi avaliado em pH 6,0 e temperatura ambiente. Em concentração de 1 mM, a atividade aumentou na presença de todos os íons e produtos químicos avaliados. Em concentração de 10 mM Ba_2+ , Cu_2+ , Ni_2+ , $\text{K}+$, $\text{Li}+$, Mg_2+ e acetato de sódio aumentaram a atividade da LEV, na mesma concentração Ca_2+ , $\text{K}+$, Mn_2+ , $\text{Na}+$, Zn_2+ , NH_4Cl e EDTA inibiram a atividade. LEV foi produzida em meio com 30% de sacarose (p/v), incubado a 60°C, por 24 e 48h em pH 6, com agitação de 200 rpm. A produção máxima ocorreu após 48h de reação a 35°C.

A metodologia de superfície de resposta foi usada para otimizar a concentração do caldo de cana-de-açúcar e peptona de caseína no meio, conservando-se os parâmetros de fermentação utilizados anteriormente para a síntese de FOS. A concentração ótima prevista foi caldo de cana-de-açúcar a 20% (v/v) e peptona de caseína a 2% (p/v). Os meios foram fermentados nas condições supracitadas para a produção de FOS e levana. O meio com caldo a 20% e peptona a 2%, pH inicial 7,0 a 35°C/48 h a 200 rpm produziu GF_2 e GF_3 , em concentrações de 60,7 e 61,3 ppm, respectivamente (XAVIER; RAMANA, 2016). Inulinasas (INL)

A inulina é um polissacarídeo de reserva comum em muitas plantas e encontrada nas raízes subterrâneas e tubérculos. A inulina é clivada por exoinulinasas, gerando xarope de frutose, e por endoinulinasas, que quebram suas ligações glicosídicas β -d-(2 \rightarrow 1), produzindo FOS.

14 Produtos da transfrutoseilação: oligolevanas, levanas e FOS em % g/L

As INL podem ser obtidas a partir de leveduras, fungos, bactérias e plantas, sendo que as principais fontes microbianas pertencem aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Atualmente, buscam-se novas estirpes produtoras de INL, para aplicações industriais (RAWAT; GANAIE; KANGO, 2015; SILVA et al., 2015, SINGH; SINGH; KENNEDY, 2016).

Rawat; Ganaie; Kango (2015) avaliaram vinte e três estirpes de fungos filamentosos e duas estirpes de levedura¹⁵ que decompõem a rizosfera de plantas ricas em inulina. Os fungos foram cultivados em três meios com substratos ricos em inulina, preparados com raiz de aspargos (ARE), raiz de dália (DRE) e raiz de dente-de-leão (DTE), previamente secas e trituradas, misturadas em água destilada a 20% (p/v), termicamente tratadas para a extração da inulina sob pressão de 15 libras a 121°C/ 20 min e filtradas. Para a atividade da INL, as estirpes foram inoculadas em 50 ml de meio a 20% (p/v) de sacarose e incubadas a 28°C/72h, pH 5 e 150 rpm. A atividade máxima da INL (12,2 U/ml) foi notada em *A. niger* GNCC2655, em DTE, seguida pela *A. awamori* MTCC2879 (8,21 U/ml) em ARE. Alguns fungos foram observados como produtores de INL pela primeira vez como *A. puccinioides* NFCCI2432 (2,27 U/ml, DTE), *A. ochraceous* GNCC1423 (0,85U/ ml, ARE), *F. oxysporum* NFCCI2429 (0,83 U/ml, ARE), *A. flavus* NFCCI2364 (0,77 U/ml, DTE) e *Penicillium* sp NFCCI2768 (3,89 U/ml, DTE) (RAWAT; GANAIE; KANGO, 2015). A hidrólise da inulina foi realizada em extrato de chicória pura (5% p/v), em pH 5, incubada com filtrado de cultura a 50°C/24 h em banho-maria. A síntese de FOS (GF2 e GF3), juntamente com, sacarose (S) glicose (G) e frutose (F) ocorreu em *A. fumigatus* GNCC1351 (GF3 0,34, GF2 1,32, G 12,3, F 7,99 e S 2,16% p/p), *P. citrinum* MTCC1256 (GF3 0,59, GF2 5,57, G 34,4, F 26,7 e S 23,9% p/p), e *Penicillium* sp. NFCCI2768 (GF3 3,57, GF2 8,32, G 29,34, F 13,9 e S 14,26% p/p), indicando ação mista de endo e exoinulinases. As demais cepas produziram apenas frutose e foram avaliadas quanto à presença de INL intracelular. A síntese de FOS ocorreu em *Penicillium* sp NFCCI2768 (GF4 0,14, GF3 0,18 e GF2 4,61%, S 9,64, G 28,16 e F 17,3%) e *P. citrinum* MTCC1256 (GF3 11,23 e GF2 5,81% e S 24,7%), pela ação mista exoinulinase intracelular e endoinulinase. Quantidades significativas de GF3 (1,12%) e GF2 (11,64%) foram produzidas por *A. niger* ATCC26011. O fungo *P. rugulosum* MTCC3487 produziu GF2 (7,59%) (RAWAT; GANAIE; KANGO, 2015). Wang et al. (2016) avaliaram um bioprocesso para a síntese de FOS, conduzido em uma etapa, a partir de inulina por estirpes recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*¹⁶. Neste estudo, um gene da endoinulinase heteróloga foi expresso e o gene da invertase para atividade exoinulinase foi interrompido. A interrupção do gene impediu a produção de monossacarídeos, resultando em maior utilização da inulina para a produção de FOS. Foi realizada uma fermentação submersa, em uma única etapa integrando a produção de endoinulinase, síntese de FOS e remoção de açúcares¹⁷ em um único reator.

¹⁵ *Arthrinium puccinoides* NFCCI2432, *Aspergillus awamori* MTCC2879, *A. ficuum* MTCC7591, *A. fischeri* MTCC150, *A. flavus* NFCCI2364, *A. fumigatus* GNCC135, *A. niger* ATCC26011, *A. niger* GNCC2613, *A. niger* GNCC1059, *A. niger* GNCC1328, *A. niger* GNCC1420, *A. niger* GNCC2655, *A. ochraceous* GNCC1423, *A. parasiticus* MTCC2796, *A. versicolor* GNCC2608, *Aspergillus* sp. GNCC2413, *Aspergillus* sp. GNCC2418, *Aspergillus* sp. GNCC2531, *A. terreus* NFCCI2347, *Fusarium oxysporum* NFCCI2429, *Kluyveromyces marxianus* MTCC3995, *Penicillium citrinum* MTCC 1256, *P. rugulosum* MTCC3487, *Penicillium* sp. NFCCI2768 e *Pichia guilliermondii* MTCC1311.

¹⁶ *Saccharomyces cerevisiae* JZH, JZHΔS, JZH-ssInuC, JZHΔS-SSC e JZHΔS-TSC

¹⁷ Glicose, frutose, sacarose e moléculas de inulina

Como substrato para a fermentação foi utilizada 200 g/L de inulina de chicória, realizada a 30°C e 40°C a 100 rpm. As estirpes JZHAS-SSC e JZHAS-TSC a 30°C produziram um máximo de FOS de 95,6 ±0,1g/L em 72h e 124,2 ±0,7g/L a 48h, respectivamente. As estirpes JZH e JZHAS-TSC produziram 180,2 ±0,8g/L e 7,51 ±0,03g/L de FOS, respectivamente, a 40°C com máximo rendimento alcançado em 24h. A produção ótima de FOS a partir de inulina foi obtida pela estirpe JZHAS-TSC a 40°C em 24h, com produção de 180,2 g/L de FOS, 18,3 g/L de sacarose, 0,37 g/L de frutose, 0,14 g/L de glicose e uma pequena quantidade de inulina, o que equivale a um rendimento de 90% de FOS (WANG et al., 2016).

2.2 2. Produção de Frutooligossacarídeos por Enzimas Imobilizadas

A imobilização de enzimas para a produção de FOS é desejável, pois apresenta uma série de vantagens sobre o uso de enzimas solúveis, como o aumento da estabilidade da enzima, recuperação facilitada do produto e a reutilização do biocatalisador, reduzindo o custo total do processo (SANTOS-MORIANO et al., 2015). A imobilização da FTase para a síntese de FOS foi descrita por Detofol et al. (2015) e Lorenzoni et al. (2015). No primeiro estudo a FTase de *Rhodotorula sp* foi imobilizada por adsorção e reticulação sobre um suporte sólido-ácido (minério de nióbio), no segundo a enzima foi imobilizada covalentemente em partículas de quitosana utilizando glutaraldeído como agente de acoplamento (DETOFOL et al., 2015; LORENZONI et al., 2015).

O potencial da FTase imobilizada de *Rhodotorula sp* foi avaliado pela síntese de FOS em reator e na construção de um modelo matemático para a otimização da produção. O modelo foi simulado computacionalmente em um reator em batelada e um reator de leito fixo, para comparação. As condições de reação utilizadas foram 500 g/L de concentração de sacarose, a 48°C, pH 6 e 22,44 U/L de FTase. O melhor rendimento de FOS previsto foi de 60,62% em 96 h no reator em batelada. Sob estas condições de reação, utilizou-se o reator em batelada para a síntese de FOS, obtendo-se um rendimento de 60%, em 96 horas, bem próximo ao previsto (DETOFOL et al., 2015). A FTase imobilizada em quitosana foi utilizada em reatores de leito fluidizado e leito fixo para verificar a influência das condições operacionais sobre a síntese do FOS, avaliando assim o melhor reator para a produção escalonada. A atividade da FTase imobilizada foi de 0,73 TU₁₈ por esfera, a 50°C e pH 5,5. A produção de FOS foi avaliada em ambos os reatores, alimentados com solução de sacarose a 600 g/L, bombeada a taxas de fluxo de 0,052, 0,082, 0,11, 0,17, 0,23, 0,29, 0,44 ml/min. Os reatores de leito fixo apresentaram rendimentos mais elevados para síntese de FOS que foi de 59%, a um fluxo de 0,08 ml/min. As concentrações de GF3 e GF2 foram 218 ±2 g/L e 133 ±1 g/L, respectivamente (LORENZONI et al., 2015).

Santos-Moriano et al. (2015), caracterizaram a LEV de *Z. mobilis* imobilizada para a síntese FOS e otimizaram a reação para uso na indústria. A imobilização foi realizada por aprisionamento da enzima em alginato de sódio, posteriormente secos por ar forçado, constituindo DALGEEs (Dry ALGinate Entrapped Enzymes). Além disso, realizou-se a reticulação da LEV com transglutaminase para comparação. A atividade e a estabilidade da LEV foi avaliada em ciclos sequenciais de reações em lote, incubadas a 40°C com solução de sacarose 600 g/L, em pH 5,6 por 20 min sob agitação de 600 rpm. Após 15 ciclos a LEV imobilizada manteve 85% da sua atividade inicial (18 U/g de enzima).

Para a síntese de FOS, 5 U/ml de LEV (solúvel, imobilizada e reticulada) foi adicionada a uma solução de sacarose de 600 g/L, incubada a 40°C, pH 5,6 sob agitação suave. Os FOS produzidos com LEV livre foram 6GF₂ (\cong 50 g/L), GF₂ (\cong 40 g/L) e GF₃ (\cong 25 g/L). Com a LEV imobilizada e reticulada, os mesmos produtos foram formados em proporções diferentes: 15 g/L e 20 g/L de 6GF₂, 32,5 g/L e 27,5 g/L de GF₂ e 18 g/L e 16 g/L de GF₃, respectivamente (SANTOS-MORIANO et al., 2015).

A síntese de FOS por INL imobilizadas e pré-tratadas de *Kluyveromyces marxianus* NRRLY7571 e *Aspergillus niger* em sistema aquoso, foi relatada por Silva et al. (2015). As INL foram imobilizadas em carvão ativado e alginato de sódio e tratadas com fluidos pressurizados a base de propano, n-butano e GPL (gás liquefeito de petróleo) a uma taxa de despressurização constante a 50°C. A síntese foi realizada com INL imobilizadas sem tratamento e pré-tratadas em reatores a 150 rpm, numa concentração enzimática de 5% (p/v), substrato com 60% (p/v) de sacarose e 20% (p/v) de inulina, num tempo de reação de 24h a 50°C.

Em relação ao *A. niger*, o melhor resultado foi com a INL imobilizada tratada em GPL, utilizando inulina como substrato (GF₂ 75,97% e GF₄ 14,97%). No entanto, valores promissores foram obtidos com a INL imobilizada tratada com n-butano (GF₂ 53,27%; GF₃ 20,95% e GF₄ 12,36%) e propano (GF₂ 59,03% e GF₃ 31,31%). Já a síntese de FOS por INL imobilizada de *K. marxianus*, apresentou um baixo rendimento. Os melhores valores para a síntese foram obtidos quando a INL foi submetida ao tratamento com GLP (GF₂ 6,4%, GF₃ 8,20% e GF₄ 6,77%) utilizando inulina como substrato (SILVA et al., 2015).

2.3 3. Produção de Frutooligossacarídeos por Células Imobilizadas

A utilização de células inteiras imobilizadas para a produção de FOS introduz vantagens tecnológicas para o bioprocessamento, melhorando os procedimentos de separação e purificação, além da possível reutilização das células, reduzindo os custos globais do processo. As células inteiras imobilizadas induzidas para sistemas enzimáticos específicos são uma alternativa barata para a síntese de FOS (CASTRO et al, 2017; OJHA; RANA; MISHRA, 2016). Zeng et al. (2016), realizou a síntese de FOS por FFase utilizando células inteiras de *Aspergillus niger* CGMCC6640. O biocatalisador de células inteiras foi preparado por liofilização das hifas e esporos. A produção de FOS incluiu duas etapas, a produção de enzima por fermentação microbiana, seguida da reação enzimática com sacarose como substrato. Para as condições ótimas de síntese de FOS e características da FFase de *A. niger* CGMCC6640 foram estudados os efeitos dos teores de sacarose (100 g/L a 600 g/L) e do biocatalisador (50 g/L a 100 g/L de FFase), o pH inicial (4,5 a 8), o conteúdo de cloreto de cálcio (1 a 3%), a temperatura (20 a 60°C) e o tempo de reação (4 a 48 h).

A concentração de FFase ótima foi 90 g/L, produzindo 142,39 \pm 3,71 g/L FOS. O teor de sacarose ideal foi de 600 g/L. Os efeitos de CaCl₂ no conteúdo de FOS foi estudado em pH 5,5, com teor de *A. Niger* CGMCC6640 a 6%. O teor de GF₃ e GF₄ aumentou gradualmente, e o teor de GF₂ diminuiu gradualmente com o aumento do conteúdo de CaCl₂. Com o teor de CaCl₂ a 3,0%, o máximo de FOS obtido foi de 57,98 \pm 3,84 g/L. O pH inicial, temperatura e tempo de reação ótimos para a síntese

de FOS foram 7, 40 h e 30°C, respectivamente, produzindo 51,11% de FOS (ZENG et al., 2015).

Ojha; Rana; Mishra (2016) utilizaram células de *Microbacterium paraoxydans* cultivadas e induzidas com inulina e sacarose e imobilizadas por liofilização para a produção de FOS. Para a síntese de FOS, a mistura reacional continha 100 mg de células liofilizadas e 10% (p/v) de sacarose em pH 7. A mistura foi incubada a 37°C durante 24 h a 220 rpm. Avaliou-se os parâmetros para a síntese de FOS como o efeito da concentração de sacarose (5 a 50% p/v) e unidades de enzima equivalente (4 a 16 U de FTase + 0,25 a 1 U de INL, correspondendo a 40-160 mg de células induzidas à concentração de sacarose de 40%).

Três sistemas celulares, não induzida (NI), induzida por inulina (II) e por sacarose (IS), foram utilizados para avaliar as atividades de FFase e de INL e também a atuação como indutores potenciais de transfrutossilacção. Em célula NI a atividade de FFase foi de 3366,9 U/g e atividade de INL de 924,3 U/g. Em célula II as atividades foram 7182,5 U/g e 6739,8 U/g, respectivamente. E na célula IS de 7147,1 U/g e 442,9 U/g, respectivamente. A síntese de FOS por célula NI foi de 23%, sendo GF₂ 21% e GF₃ 2%, nas células II, a síntese de FOS foi de 14%, sendo GF₂ 13% e GF₃ 1% e nas células IS a síntese foi de 31%, com GF₂ 29% e GF₃ %. As células II foram ineficazes para a transfrutossilacção em comparação com as células NI e IS (OJHA; RANA; MISHRA, 2016).

A seleção de um suporte para imobilização de células de *Aureobasidium pullulans* e síntese de FOS foi feita por Castro et al. (2017). Vários suportes¹⁹ não convencionais e de baixo custo, como produtos sintéticos, subprodutos agroindustriais e materiais minerais, foram avaliados para imobilização das células e posterior síntese de FOS. Foram determinados dois parâmetros físico-químicos, para a seleção do suporte, o índice de absorção de água (WAI)²⁰, os valores de ponto crítico de umidade (CHP)²¹ e posteriormente correlacionados com a quantidade de células imobilizadas e células livres no meio.

Os suportes selecionados para a síntese de FOS foram casca de noz (CN); casca de pistache (CP); casca de castanha (CC); espuma de poliuretano reticulada (EP) ($\phi=1$ mm); esponja de celulose vegetal (EC); polidor vegetal (PV); lã de fibra de vidro (LF) e polidor de fibra de poliéster (PF). As fermentações foram conduzidas em meio com 200 g/L de sacarose, 1 g de suporte, pH 5,5, 28°C e 150 rpm. A quantidade máxima de FOS foi obtida quando se utilizaram os subprodutos agroindustriais como suporte, sendo que CP obteve o maior rendimento $4,54 \pm 0,01$ g/L/h, seguido de CC $4,08 \pm 1,83$ g/L/h e CN $3,51 \pm 0,93$ g/L/h. Entre os materiais sintéticos selecionados, apenas o EP produziu uma quantidade maior de FOS ($4,33 \pm 1,53$ g/L/h) (CASTRO et al., 2017).

¹⁹Espuma de poliuretano reticulada (diâmetros de poros (ϕ)~1,5 mm), espuma de poliuretano reticulada (ϕ ~1 mm); esponja de celulose vegetal, polidor vegetal (Scotch Brite, 3M, Espanha), polidor de fibra de poliéster, argila expandida, lã de fibra de vidro ($\phi=8$ mm) e fibra de grampo de poliéster, casca de mandarina, casca de banana, casca de noz, casca de amêndoa, casca de castanha, pedra pomes (tamanho de partícula ~ 4-6 mm) e zeólita natural granular (tamanho de partícula ~ 2-5 mm).

²⁰WAI - água que pode ser absorvida pelo suporte, relacionada com os grupos hidrofílicos, que podem ligar moléculas de água que estarão disponíveis para o crescimento e desenvolvimento do microrganismo.

²¹CHP - quantidade de água ligada ao transportador, que não pode ser utilizada para o crescimento de fungos.

²²Seiva de agave, planta nativa do México, rica em açúcar (teor de sacarose 37g/L).

2.4 4. Produção de Frutooligossacarídeos por Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido (FES) aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A FES é atrativa, por ter um custo baixo, preparo simples, menor risco de contaminação e pouco uso de água. Estudos recentes apontam a FES como uma alternativa interessante para produzir FOS com produtividade e rendimento mais elevados (MUSSATO et al., 2015).

A comparação entre a FES para síntese de FOS por *A. japonicus*, e a fermentação submersa com células livres (FCF) e células imobilizadas (ICF) foi realizada por Mussato et al. (2015). Para a FES a casca de café torrado foi o material de suporte, fonte de carbono e agente umidificante, estabelecendo o teor de umidade a 60%. O meio foi distribuído em 32 bandejas com altura de 5 cm, e colocado dentro do biorreator. O reator recebeu fluxo de aeração e a fermentação ocorreu por 20 h a 26 °C. Na FCF, o processo foi feito em tanque agitado, alimentado por solução de sacarose, por 24 h, a 28 °C. Para a ICF a fermentação seguiu o procedimento anteriormente descrito, com um passo adicional que foi a imobilização em um suporte de espigas de milho, antes da fermentação. Os processos supracitados foram simulados usando um software computacional, comparando-se a produtividade, a concentração de FOS, rendimentos e impacto ambiental. Em relação ao rendimento a FES apresentou um maior índice de FOS (98,6% (p/p)), em relação a FCF (96,6% (p/p)) e ICF (98,4% (p/p)). Após a fase de fermentação, a concentração de FOS em cada processo foi de 210,9 g/L (FCF), 245,7 g/L (ICF) e 403,7 g/L (FES). Os valores de produtividade, expressos em massa por unidade de volume por hora, são 8,79 g/L/h, 11,7 g/L/h e 20,2 g/L/h em FCF, ICF e FES, respectivamente (MUSSATO et al., 2015).

Muñiz-Márquez et al. (2016), conduziram a síntese de FOS por FES com aguamiel²², como meio de cultura e FTase de *Aspergillus oryzae* DIA-MF. A atividade de FTase foi determinada em reatores de coluna com espuma de poliuretano como suporte inerte. Os parâmetros ótimos obtidos foram 70% de umidade, taxa de inóculo de 2×10^7 esporos/g de suporte, temperatura de 32°C e pH inicial 4,5. A produção enzimática foi realizada durante 28 h, obtendo-se uma máxima atividade enzimática de 1431 U/L. Em seguida, a enzima em extrato bruto foi liofilizada para posterior utilização. A síntese de FOS foi realizada em aguamiel como substrato a partir da suspensão de extrato liofilizado. A concentração de FOS obtida foi de 9 g/L em 1h de reação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os frutooligossacarídeos (FOS) são classificados em prebióticos e são benéficos para a saúde humana e de grande interesse na indústria de alimentos pelo alto valor como ingrediente funcional, estacando o uso da inulina e oligofrutose. Com o uso de técnicas biotecnológicas podemos observar que é possível realizar estudos direcionados aos processos de síntese de FOS, aprimorando os limites da sua produção. Muitos microrganismos foram estudados para a síntese de FOS, porém essa busca por novos microrganismos é constante,

já que é comprovada sua eficiência. A utilização de novos gêneros microbianos leva ao estudo de novas abordagens para melhoria da produção de FOS. Estudos que objetivam o aprimoramento da síntese enzimática de FOS, como a imobilização, o estudo de biorreatores, a otimização dos parâmetros de produção, utilização de novos substratos são proeminentes. Os avanços voltados à síntese biotecnológica de FOS são fundamentais para o progresso da produção escalonada aumentando assim o rendimento com menor custo de produção.

\

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDES: REVIEW

ABSTRACT

Fructooligosaccharides are carbohydrates often considered prebiotics that play a key role in the intestinal microbiota balance and in human health. They have aroused a great deal of interest in the food industry as they are generally employed as ingredients that change the designation of foods for functional foods. Fructooligosaccharides are conventionally produced by the reaction of microbial enzymes from sucrose or inulin as substrates. Several studies on the synthesis of fructooligosaccharides have been carried out, aiming at the optimization of production parameters, the development of more efficient processes, the different fermentation methods and new enzyme producing microbial sources. Thus, this review aims to review the latest advances in the biotechnological production of fructooligosaccharides...

KEYWORDS: β -D-fructosyltransferase, β -fructofuranosidase, Levanasacarase, Inulinase, Enzymatic Synthesis.

REFERÊNCIAS

BHALLA, Tek Chand, THAKUR, Neerja; SAVITRI; THAKUR, Navdeep; Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides. *LWT-Food Science and Technology*, v. 77, p. 178-185, 2017.

CASTRO, Cristina Cordeiro; NOBRE, Clarisse; DUPREZ, Marie Eve; DE WEIRELD, Guy; HANTSON, Anne-Lise; Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 118, p. 82-90, 2017.

DETOFOL, Maiki Roberto; OLIVEIRA, Elizama Aguiar; VARGAS, Cindy Elena Bustamante; SOARES, Alexandre Batista de Jesus; SOARES, Mónica Beatriz Alvarado; MAUGERI, Francisco; Modeling and simulation of fructooligosaccharides synthesis in a batch basket reactor. *Journal of biotechnology*, v.210, p.44-51, 2015.

HIRABAYASHI, Katsuki; KONDO, Nobuhiro; TOYOTA, Hiroshi; HAYASHI, Sachio; Production of the Functional Trisaccharide 1-Kestose from Cane Sugar Molasses Using *Aspergillus japonicus* β - Fructofuranosidase. *Current Microbiology*, v.74, n. 1, p. 145-148, 2017.

KAENPANA, P.; PIWPAN, P.; JATURAPIREE, P.; Prebiotic fructooligosaccharide production from yeast strain ML1. *International Food Research Journal*. v. 23, n. 1, p -425-428., 2016

KASHYAP, R.; PALAI, T.; BHATTACHARYA, P. K.; Kinetics and model development for enzymatic synthesis of fructo-oligosaccharides using fructosyltransferase. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 38, n.12, p. 2417-2426, 2015.

LI, Mengxi, SEO, Sooyoun, and KARBOUNE, Salwa; *Bacillus amyloliquefaciens* levansucrase-catalyzed the synthesis of fructooligosaccharides, oligolevan and levan in maple syrup-based reaction systems. *Carbohydrate polymers*, v. 133, p. 203-212, 2015.

LORENZONI, André Soibelman Glock; AYDOS, Luiza Fichtner; KLEIN, Manuela Poletto, AYUB, Marco Antônio Záchia; RODRIGUES, Rafael Costa; HERTZ, Plinho Francisco; Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: comparison between in fluidized and packed bed reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 111, p. 51-55, 2015.

MAGRI, Agnes; PAN, Nicole; OLIVEIRA, Marcos Roberto; CELLIGOI, Maria Antônia Colabone; Avaliação da Aeração Sob a Biotransformação de Sacarose em

Frutooligosacarídeos por *Bacillus subtilis* natto. Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos XX SINAFERM - XI SHEB, vol. 1, 2015.

MUÑIZ-MÁRQUEZ, Diana Beatriz; CONTRERAS, Juan C.; RODRÍGUEZ, Raúl R.; MUSSATTO, Solange I.; TEIXEIRA, José Antônio Couto; AGUILAR, Cristobal N.; Enhancement of fructosyltransferase and fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in Solid-State Fermentation using aguamiel as culture medium. *Bioresource technology*, v. 213, p. 276-282, 2016.

NASCIMENTO, A. K C; NOBRE, Clarisse; CAVALCANTI, Maria Taciana Holanda; TEIXEIRA, José Antônio Couto; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo; Screening of fungi from the genus *Penicillium* for production of β -fructofuranosidase and enzymatic synthesis of fructooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 134, p. 70-78, 2016.

OJHA, Swati; RANA, Neetu; MISHRA, Saroj Kanti; Fructo-oligosaccharide synthesis by whole cells of *Microbacterium paraoxydans*. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 27, n. 24, p. 1245-1252, 2016. RAWAT, Hemant Kumar; GANAIE, Mohd Anis; KANGO, Naveen; Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrase from fungi on low-value inulin-rich substrates and their use in generation of fructose and fructooligosaccharides. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.107, n.3, p.799-811, 2015.

SAAD, S.M.I.; Probióticos e prebióticos: o estado da arte, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SANTOS-MORIANO, Paloma; FERNÁNDEZ-ARROJO, Lucía; RODRÍGUEZ-COLINAS, Bárbara; BALLESTEROS, Antonio; PLOU, Francisco J.; Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides that stimulate the gut microbiota. *An Real Acad Farm*, v. 81, n. 1, p. 48-62, 2015.

SANTOS-MORIANO, Paloma; FE EZ-A OJO, ucía, CA A ES, Ana Poveda; JI EZA O, Jesús J.; BALLESTEROS, Antonio Ortega; PLOU, Francisco J.; Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 119, p. 18-25, 2015.

SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; GOLUNSKI, S.; KUHN, G. O.; MARCON, N. S.; DALLAGO, R.; MAZZUTTI, M. A.; TRES, M. V.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; Fructooligosaccharides production in aqueous system using commercial and home-made inulinase after treatment in pressurized fluids. *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v. 1, p 4350-4357, 2015.

SINGH, Ram Sarup; SINGH, Rupinder Pal; KENNEDY, John F.; Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *International journal of biological macromolecules*, v. 85, p. 565-572, 2016.

SPOHNER, Sebastian C.; CZERMAK, Peter; Enzymatic production of prebiotic fructo-oligosteviol glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 131, p. 79-84, 2016.

WANG, Da; LI, Fu-Li; WANG, Shi-Na, A one-step bioprocess for production of high-content fructooligosaccharides from inulin by yeast. *Carbohydrate Polymers*, v. 151, p. 1220-1226, 2016.

XAVIER, Janifer Raj; RAMANA, Karna Venkata; Optimization of Levan Production by Cold-Active *Bacillus licheniformis* ANT 179 and Fructooligosaccharide Synthesis by Its Levansucrase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 181, n. 3, p. 986–1006, 2016.

XU, Qiangsheng; ZHENG, Xiaoqun; HUANG, Meiping; WU, Min; YAN, Yusi; PAN, Jiamao; YANG, Qi; DUAN, Chengjie; LIU, Junliang; FENG, Jiaxun; 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.

YANG, Hailin; WANG, Yitian; ZHANG, Ling; SHEN, Wei; Heterologous expression and enzymatic characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *New biotechnology*, v. 33, n. 1, p. 164-170, 2016.

ZAMBELLI, Paolo; TAMBORINI, Lucia; CAZZAMALLI, Samuele; PINTO, Andrea; ARIOLI, Stefania; BALZARETTI, Silvia; PLOU, Francisco J.; FERNÁNDEZ-ARROJO, Lucía; MOLINARI, F.; CONTI, Paola; ROMANO, Diego; An efficient continuous flow process for the synthesis of a nonconventional mixture of fructooligosaccharides. *Food chemistry*, v. 190, p. 607-613, 2016.

ZENG, Xinan; ZHOU, Kang; LIU, Dongmei; BRENNAN, Charles S.; BRENNAN, Margaret Anne; ZHOU, Jinsong; YU, Shujuan; Preparation of fructooligosaccharides using *Aspergillus niger* 6640 whole-cell as catalyst for bio-transformation. *LWT-Food Science and Technology*, v.65, p.1072-1079, 2016

Recebido: 05 set 2018.

Aprovado: 05 set 2019.

DOI: 103895/recit.v10n25.8804

Como citar: GOMES, R. Produção biotecnológica de frutooligossacarídeos: review R. Eletr. Cient. Inov. Tecnol, Medianeira, v. 10, n. 25, p.1–17, jul/set, 2019 Disponível em: <<https://periodicos.utfrpr.edu.br/recit>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Raquel Gomes.

Av. Colombo, 5790 - Zona 7, Maringá - PR, 87020-900]

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0 Internacional.

