

Production of β -D-fructofuranosidases by *Aspergillus* sp. M2.4 and biochemical characterization

Produção de β -D-frutofuranosidases por *Aspergillus* sp. M2.4 e caracterização bioquímica

Article Info:

Article history: Received 2023-03-03 / Accepted 2023-06-20 / Available online 2023-06-21

doi: 10.18540/jcecv19iss5pp15943-01e



Mayanne Tatielle Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6839-8495>

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brazil

E-mail: annetatielle@yahoo.com.br

Paulo Henrique Silva Lopes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1461-0208>

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brazil

E-mail: paulo.lopes@ufvjm.edu.br

Thiago Machado Pasin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3100-1674>

University of Texas at San Antonio, Texas, United States of America

E-mail: thiago.machadopasin@utsa.edu

David Lee Nelson

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7435-3675>

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brazil

E-mail: dleenelson@gmail.com

Vivian Machado Benassi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6030-0473>

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brazil

E-mail: vivian.benassi@ict.ufvjm.edu.br

Resumo

As enzimas microbianas, como as β -D-frutofuranosidases catalisadoras da hidrólise da sacarose, são uma alternativa limpa de catalisadores para as indústrias de fabricação de bens consumíveis de melhor qualidade, pois apresentam um alto grau de especificidade, permitem a regulação da atividade e são sintetizadas em condições simples de cultivo. Neste trabalho foi estudada a produção de invertases a partir do fungo filamentososo *Aspergillus* sp. M2.4, bem como a caracterização bioquímica, uma vez que cada processo depende de parâmetros específicos, e cada micro-organismo sintetiza invertases com determinadas características. Para tal, realizou-se o isolamento de fungos filamentosos de matéria orgânica em decomposição, os quais não apresentaram como bons produtores da invertase. Dessa forma, analisou-se quatro fungos filamentosos do banco de fungos do laboratório, selecionando-se o *Aspergillus* sp. M2.4, tendo como melhores padrões o crescimento em meio de cultura submerso Carvalho-Peixoto, durante cinco dias, a 30°C, de forma estacionária, utilizando-se como fonte de carbono o farelo de trigo, e fonte de nitrogênio o extrato de levedura, assim como a própria solução de sais do meio CP, os quais proporcionaram um aumento da atividade de 35 U totais para 290 U totais, representando um aumento de 8 vezes. Além disso, a invertase produzida apresentou ponto ótimo no pH 4.5 e a 65°C, o qual proporcionou um aumento na atividade para mais de 400 U totais, superior cerca de 12 vezes. Vale citar que, a enzima apresentou boa estabilidade ao pH, mantendo atividade superior a 69% nos pH de 4.5 a 7.0, durante 120 minutos,

além de uma excelente termoestabilidade, nas temperaturas de 50°C a 55°C, com atividade residual superior a 80%. Esses resultados sugerem uma possível aplicação industrial da invertase estudada em bioprocessos, tendo como foco a redução da cristalização da sacarose na produção do etanol da cana-de-açúcar e síntese de frutooligossacarídeos.

Palavras-chave: *Aspergillus*. Bioprospecção. Enzimas. Fungos Filamentosos. Invertase.

Abstract

Microbial enzymes, such as β -D-fructofuranosidases that catalyze the hydrolysis of sucrose, are a clean alternative to catalysts for industries that manufacture better quality consumables, as they have a high degree of specificity, allow the regulation of activity and are synthesized under simple cultivation conditions. In this work, the production of invertases from the filamentous fungus *Aspergillus* sp. M2.4, as well as the biochemical characterization, since each process depends on specific parameters, and each microorganism synthesizes invertases with certain characteristics. To this end, filamentous fungi were isolated from decomposing organic matter, which were not good producers of invertase. Thus, four filamentous fungi from the laboratory's fungal bank were analyzed, selecting *Aspergillus* sp. M2.4, having as the best standards the growth in submerged culture medium Carvalho-Peixoto, for five days, at 30°C, in a stationary way, using wheat bran as a carbon source, and yeast extract as a nitrogen source, as well as the CP medium salt solution itself, which provided an increase in activity from 35 total U to 290 total U, representing an 8-fold increase. In addition, the produced invertase showed an optimal point at pH 4.5 and 65°C, which provided an increase in activity for more than 400 total U, about 12 times higher. It is worth mentioning that the enzyme showed good stability at pH, maintaining activity greater than 69% at pH 4.5 to 7.0, for 120 minutes, in addition to excellent thermostability, at temperatures from 50°C to 55°C, with activity residual greater than 80%. These results suggest a possible industrial application of the invertase studied in bioprocesses, focusing on the reduction of sucrose crystallization in the production of ethanol from sugarcane and the synthesis of fructooligosaccharides.

Keywords: *Aspergillus*. Bioprospecting. Enzymes. Filamentous fungi. Invertase.

1. Introdução

As enzimas são encontradas em todas as células desempenhando a função de catalisadores de reações que compõem as vias anabólicas e catabólicas do metabolismo celular. Em função à possibilidade da produção enzimática por meio de processos fermentativos em grande escala com eficiência na regularidade exigida, simplicidade nutricional e grande variedade de atividades catalíticas, os microrganismos são as principais fontes enzimáticas na aplicação industrial (Da Fonseca *et al.*, 2022; Wani *et al.*, 2022). A tecnologia enzimática foi uma alternativa ambientalmente correta juntamente com a busca por tecnologias mais eficientes, esta veio para substituir gradativamente os processos químicos, gerando produtos como biocombustíveis e produtos farmacêuticos (Cioni *et al.*, 2022; Da Fonseca *et al.*, 2022).

Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos são os mais utilizados na produção de enzimas interessantes em processos industriais, como alimento rico em proteínas, na produção de frutooligossacarídeos (FOS), na hidrólise de carboidratos, como a sacarose, produção de ácidos orgânicos, antibióticos, dentre diversas outras aplicações (Barzee *et al.*, 2021; Madhavan *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022). Neste contexto, fungos filamentosos dos mais variados gêneros, como o *Aspergillus*, são constituídos de hifas tubulares, as quais secretam enzimas pelas suas pontas e formam o micélio (Lübeck and Lübeck, 2022; Sakekar *et al.*, 2021). O gênero *Aspergillus* está entre os fungos filamentosos de maior importância econômica devido à diversidade de enzimas importantes sintetizadas pelos mesmos, usadas em amplos processos industriais, podendo destacar a β -D-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) ou invertase, pelo seu potencial biotecnológico (Danmek *et al.*, 2022; Taşar *et al.*, 2022).

A invertase é uma enzima que torna o açúcar não redutor em açúcar redutor ou invertido, por meio da degradação da sacarose, obtendo um xarope de glicose e frutose. A preferência da hidrólise enzimática à hidrólise ácida (química) é devido à eficácia em não resultar sabor indesejável, obtendo

um produto de maior qualidade por não gerar subprodutos (Danmek *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2022; Taşar *et al.*, 2022). Essa enzima pode ser aplicada na indústria sucroalcooleira para minimizar a cristalização da sacarose na produção do etanol da cana-de-açúcar e na síntese de FOS por meio da sacarose e unidades de frutose (Bhadra *et al.*, 2022; Kwai *et al.*, 2022).

Dessa forma, esse trabalho objetivou isolar fungos filamentosos a partir de matéria orgânica em decomposição e verificar a produção de invertase a partir dos microrganismos isolados e do banco de fungos do laboratório de Biologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri *campus* Janaúba, MG, Brasil. Por fim, realizar a padronização do cultivo do fungo para uma maior atividade enzimática e caracterizar bioquimicamente o biocatalisador visando futura aplicação em indústrias de etanol e produção de frutooligossacarídeos.

2. Material e Métodos

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia do Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia (IECT), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* Janaúba, Minas Gerais, Brasil. Os microrganismos foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número A64AD93.

2.1 Coleta de material orgânico

Coletou-se material orgânico para o isolamento dos fungos filamentosos possíveis produtores da enzima invertase. A coleta foi realizada na cidade de Serranópolis de Minas, situada na latitude 15° 48' 45" Sul e Longitude 42° 52' 11" Oeste, e na empresa Usina São Judas Tadeu na cidade de Jaíba, ambas cidades no norte de Minas Gerais (Brasil).

Para a escolha do tipo de material a ser coletado levou-se em consideração, a umidade e a temperatura do local e se o material se encontrava em contato com o solo. Portanto, o material coletado tratou-se de casca de coco em decomposição (amostra 1), ração de folha de coqueiro (amostra 2) e bagaço de cana-de-açúcar (amostra 3), conforme a Figura 1.

A coleta ocorreu sem que suas propriedades naturais fossem modificadas, para isso, utilizou-se luvas cirúrgicas estéreis; pinça metálica e um frasco de vidro, com volume aproximado de 50 mL, previamente autoclavados a 120°C, 1.0 atm, durante 30 minutos. O material coletado foi mantido a 4°C, até a sua posterior análise (Silva *et al.*, 2022 and Souza *et al.*, 2020).



Figura 1 – Material orgânico coletado para isolamento de fungos filamentosos: (A) Amostra 1, (B) Amostra 2 e (C) Amostra 3.

2.2 Isolamento, Manutenção e Caracterização das Cepas

Isolamento e caracterização: Preparou-se meios de cultura sólidos compostos por aveia Quaker® e ágar conforme Emerson (1941), sendo autoclavados a 120°C, 1 atm, durante 30 minutos, vertidos 20 mL de meio em placas de Petri, anteriormente autoclavadas. Após a solidificação do meio, as amostras coletadas foram postas sobre o meio de cultura, com o auxílio de pinças autoclavadas, e mantidos em estufa bacteriológica, a 30°C (amostras 1 e 2) e 50°C (amostra 3), no decorrer de 96 horas, sendo analisada a cada 24 horas o crescimento de fungos filamentosos, com base nas características morfológicas macroscópicas, tais como: tamanho, textura, pigmentação, superfície, borda, coloração, aspecto e fundo. À medida que os microrganismos se desenvolveram

foi realizado o isolamento pontual ao centro de outra placa de Petri contendo o mesmo meio de cultivo e mantidos nas mesmas condições (Lopes *et al.*, 2016).

Manutenção das cepas: Os fungos isolados foram mantidos em meio sólido Emerson (1941), inclinados em tubos de ensaio. Os repiques foram realizados periodicamente, sendo mantidos a 30 °C em estufa bacteriológica durante sete dias e, posteriormente, armazenados em a 4 °C (Lopes *et al.*, 2016). As amostras do fungo também foram mantidas a 4 °C em sílica gel, segundo metodologia de Michelin (2009).

2.3 Influência da temperatura no crescimento micelial em meio de cultivo sólido

Realizou-se o inóculo dos fungos isolados pontualmente em triplicata na placa de Petri contendo meio de cultivo sólido aveia (Emerson, 1941; Lopes *et al.*, 2016), posteriormente, as placas foram colocadas em estufa bacteriológica a diferentes temperaturas, que variaram de 30°C a 45°C, com intervalo de 5°C. A medição do raio micelial dos fungos filamentosos foi realizada após 48 horas de crescimento dos microrganismos, sendo calculada a taxa de crescimento em centímetros/hora.

2.4 Identificação de Gênero pela Técnica de Microcultivo

Através da técnica de Ridell (Lacaz *et al.*, 1991) foi realizado o microcultivo dos fungos isolados para analisar suas características microscópicas e com base no formato do corpo de frutificação e dos seus esporos, identificar o possível gênero que o fungo pertence.

2.5 Inóculo, Extração e Determinação da Atividade das Invertases do Extrato Bruto

Inóculo: Os esporos dos fungos filamentosos isolados e do banco de fungos, mantidos em tubos contendo meio de cultura inclinados, foram suspensos com 3 mL de água destilada esterilizada, e um volume de 1 mL da suspensão de esporos (123×10^4 esporos mL⁻¹) foi inoculada em 25 mL do meio de cultura, contidos em Erlenmeyer de 125 mL.

Extração do extrato bruto: O extrato bruto foi obtido através de filtração a vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro Unifil® 12.5 cm de diâmetro. Os filtrados contendo as enzimas extracelulares foram submetidos à dosagem enzimática para a determinação da atividade invertásica (Lopes *et al.*, 2016).

Determinação da atividade enzimática: A determinação da atividade enzimática foi realizada a 60°C, utilizando-se como substrato a sacarose Vetec® 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5.0, utilizando-se o ácido 3',5'-dinitrosalicílico (DNS) como reagente colorimétrico (Miller, 1959), sendo as leituras realizadas à 540 nm em espectrofotômetro Fento®. O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de glicose (0.1 a 1.0 mg mL⁻¹), sendo a unidade de atividade (U mL⁻¹) definida como a quantidade de enzima que hidrolisou um μmol de substrato por minuto por mL, nas condições de ensaio. A atividade total (U total) = μmol mL⁻¹ x volume do filtrado.

2.6 Triagem de Fungos Produtores de Invertases

Juntamente com as espécies isoladas, testou-se quatro espécies do banco de fungos do laboratório identificados como M1.8, M2.4, M2.5 e L1, isolados em trabalhos anteriores (Silva *et al.*, 2022 and Souza *et al.*, 2020) com o intuito de escolher o melhor produtor de invertases.

Dessa forma, preparou-se 25 mL de meio de cultura submerso Carvalho-Peixoto (CP) (Peixoto *et al.*, 2003) com farelo de trigo como fonte de carbono, contidos em Erlenmeyer de 125 mL, sendo autoclavados a 120°C, 1.0 atm, durante 30 minutos. Após o inóculo de 1 mL da suspensão de esporos dos microrganismos, os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a 30°C, durante cinco dias. Decorrido o tempo de incubação, as culturas foram filtradas e a atividade enzimática determinada (Lopes *et al.*, 2016).

2.7 Otimização da Produção de Invertases

Avaliou-se as condições mais propícias para o cultivo e produção otimizada de invertase pelo *Aspergillus* sp. M2.4.

Influência do meio de cultura: Diferentes meios de cultura foram analisados para o crescimento fúngico e produção de invertase contendo farelo de trigo como fonte de carbono, sendo: (1) Czapeck modificado, sem adição de NaNO_3 (Wisemam, 1975); (2) SR modificado, sem adição de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Rizzatti *et al.*, 2001); (3) CP (Peixoto *et al.*, 2003); e (4) Meio Khanna modificado, sem adição de NH_4NO_3 , KCl, ZnSO_4 , MnSO_4 , FeCl_3 e com adição de ZnCl_2 e ZnCl_3 (Khanna *et al.*, 1995). Após o inóculo, os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a 30°C , durante quatro dias. Decorrido o tempo de incubação, as culturas foram filtradas e a atividade enzimática determinada.

Efeito do tempo de cultivo: Para determinar a quantidade de dias necessários para a máxima produção enzimática pelo microrganismo em estudo, prepararam-se 25 mL do meio submerso CP (Peixoto *et al.*, 2003) contendo farelo de trigo como fonte de carbono, inocularam-se os esporos do *Aspergillus* sp. M2.4, sendo mantidos em estufa bacteriológica, de forma estática, a 30°C , durante dez dias, sendo a análise da atividade enzimática do extrato extracelular realizada a cada 24 horas (Lopes *et al.*, 2016).

Efeito da fonte de carbono: Foram analisadas quinze diferentes fontes de carbono na concentração de 1% (m/v) no meio submerso CP (Peixoto *et al.*, 2003), sendo: farelo de trigo (Fito Alimentos[®]), amido de milho (Maizena[®]), sacarose (Vetec[®]), glicose (Isofar[®]), palha de cana-de-açúcar (coletada na SADA), farinha de linhaça (Pachá[®]), farelo de aveia (Fito Alimentos[®]), farinha de linhaça marrom (Fito Alimentos[®]), farinha de trigo integral (Fito Alimentos[®]), farinha de chia (Fito Alimentos[®]), aveia[®], galactose (Vetec[®]), frutose (Isofar[®]), lactose[®] e maltose (Isofar[®]).

Efeito da fonte de nitrogênio: Analisaram-se três diferentes fontes de nitrogênio na composição do meio submerso CP (Peixoto *et al.*, 2003), contendo farelo de trigo como fonte de carbono: (1) 0.48% (m/v) de extrato de levedura, (2) 0.48% (m/v) de peptona e (3) 0.24% (m/v) de extrato de levedura acrescido de 0.24% (m/v) de peptona.

Efeito da solução de sais no meio: A influência do efeito de diferentes soluções de sais do meio de cultura submerso CP foi realizada utilizando-se as soluções de sais: (1) do próprio meio CP (Peixoto *et al.*, 2003); (2) apenas 0.05 g de sais Wesson; (3) sais CP acrescido de 0.05 g de sais Wesson e (4) meio sem solução de sais.

2.8 Caracterização Bioquímica das Invertases Brutas e Solúveis

Temperatura e pH ótimo da enzima: A atividade enzimática em função da temperatura e pH foi analisada de 40°C a 70°C , com intervalos de 5°C , com o substrato sacarose 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, nos pHs 4.5; 5.0 e 5.5; e sacarose 1% (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM nos pHs 6.0; 6.5 e 7.0 (Silva *et al.*, 2022 and Souza *et al.*, 2020).

Estabilidade ao pH: Com o intuito de avaliar a estabilidade da enzima a diferentes pHs adicionaram-se soluções tampão com diferentes pHs, sendo tampão acetato de sódio 100 mM nos pHs 4.5; 5.0 e 5.5 e tampão fosfato de sódio 100 mM nos pHs 6.0; 6.5 e 7.0. Manteve a mistura enzima-tampão no gelo por diferentes tempos de 30 minutos 120 minutos. Decorrido o tempo de incubação, determinou-se a atividade invertásica com o substrato sacarose 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 200 mM pH 4.5, na temperatura de 65°C (Silva *et al.*, 2022 and Souza *et al.*, 2020).

Estabilidade à temperatura: A estabilidade à temperatura foi avaliada através da incubação da enzima durante o tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos, na ausência de substrato, nas temperaturas de 50°C a 70°C , com intervalo de 5°C . Posteriormente, fez-se a dosagem a 65°C , utilizando-se o substrato sacarose 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4.5 (Silva *et al.*, 2022 and Souza *et al.*, 2020).

2.9 Reprodutibilidade e Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados de forma independente e em triplicata, os resultados apresentados são a média dos valores obtidos (Lopes *et al.*, 2016). Os resultados estão acompanhados do desvio padrão quando nas tabelas e o erro quando nos gráficos. Os gráficos e cálculos foram realizados com o auxílio do *software* licenciado Origin 8.0 e de planilhas eletrônicas, respectivamente. A análise estatística foi avaliada com o auxílio do *software de acesso livre* Sisvar 5.8, em que o teste de médias utilizado foi o Tukey, com $\alpha = 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Isolamento, características macroscópicas e taxa de crescimento dos isolados

Isolamento: Isolou-se, dos distintos materiais coletados, três fungos filamentosos identificados como M1, M3 e M6. O microrganismo M1 foi isolado da ração de folha de coqueiro, enquanto os fungos M3 e M6 da casca de coco em decomposição. Dessa forma, verificou-se que a amostra que obteve maior quantidade de fungos filamentosos foi a da casca de coco em decomposição, uma das possíveis explicações está associada ao fato das características do material e do local onde o mesmo foi coletado, uma vez que se sabe que matéria orgânica em decomposição e locais úmidos são um dos principais *habitats* dos microrganismos (Al Haboubi and Matloob, 2022). Enquanto que o bagaço de cana-de-açúcar não apresentou nenhum isolado na temperatura de crescimento avaliada. Isto ocorre, pois algumas espécies de fungos necessitam de temperaturas mais baixas ou mais altas para se desenvolverem, ou seja, cada micro-organismo possui uma temperatura adequada em que começa o seu desenvolvimento, o que pode estar relacionado ao caso observado (Jiang *et al.*, 2022).

Caracterização macroscópica: Após o repique pontual ao centro da placa de Petri contendo meio aveia foi possível identificar que o fungo M1 possuiu textura algodonosa, o meio de cultivo não apresentou pigmentação, sendo a cepa com bordas irregulares, além de possuir coloração de esporos branco acinzentada com esporos pretos e fundo liso. Enquanto que o fungo M3 possuiu textura algodonosa, o meio de cultivo apresentou no centro uma pigmentação levemente alaranjada e os arredores um amarelo escuro, tendo bordas irregulares, e coloração de esporos branco/verde, e fundo liso. Por sua vez, o fungo M6 possuiu textura algodonosa, o meio de cultivo não apresentou pigmentação, bordas irregulares, possuiu coloração de esporos branco acinzentada com esporos cinza escuro e fundo liso. As Figura 2A e Figura 2C, apresentam os fungos no estágio inicial, em que ainda não havia observado o surgimento dos esporos (pontos mais escuros na superfície do micélio). No entanto, a Figura 2B, apresenta pontos de cor verde, indicando o surgimento dos esporos, conforme a Tabela 1.

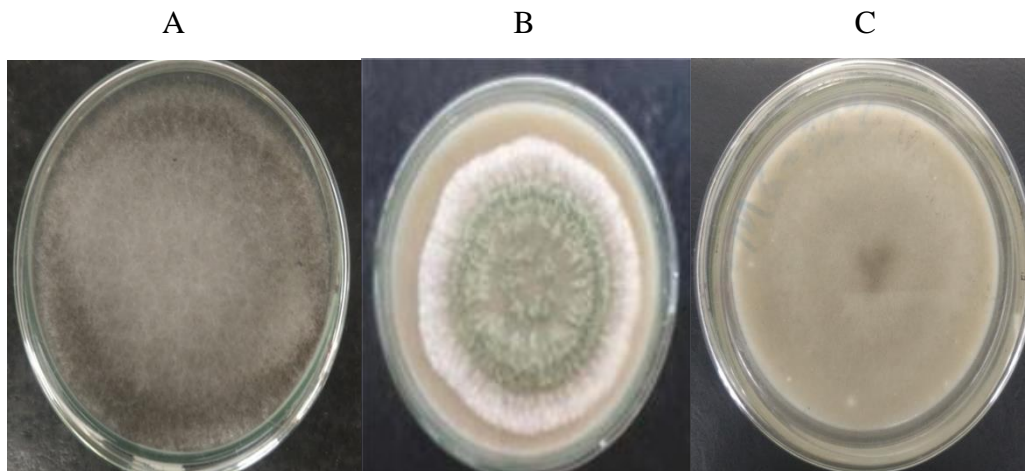


Figura 2 – Fungos isolados da casca e palha de coco: (A) M1, (B) M3 e (C) M6.

Tabela 1 – Análise das características morfológicas macroscópicas dos fungos isolados.

Características	M1	M2	M6
Textura	Algodonosa	Algodonosa	Algodonosa
Pigmentação	Ausente	Presente	Ausente
Bordas	Irregular	Regular	Irregular
Esporos	Branco acinzentado	Branco e verde	Branco acinzentado
Fundo	Liso	Liso	Liso

Os fungos apresentam diferentes características morfológicas macroscópicas a depender da espécie estudada, como se observa na literatura para fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, dentre outros (Ouilí *et al.*, 2022). Com isto, uma das características mais marcantes é a presença do micélio, composto por hifas septadas ou cenocíticas, as quais conferem sustentação, captura de nutrientes e reprodução. Uma das formas de reprodução é o surgimento dos esporos, os quais podem ter diferentes colorações. Além disso, as colônias podem produzir pigmentos no meio, bem como apresentar diferentes texturas, como algodonosa e aveludada (Elfita *et al.*, 2022; Sari *et al.*, 2022).

Taxa de crescimento: Observando a Tabela 2, percebe-se que a temperatura apresentou significativa influência sobre a taxa de crescimento dos fungos isolados, e conforme o teste estatístico de comparação de médias, o fungo M1 possui melhor temperatura de crescimento a 30°C (0.095 cm h⁻¹), conforme o índice a. Enquanto, para os fungos M3 e M6 foi a 35°C, conforme o índice a, com taxa de crescimento de 0.058 cm h⁻¹ e 0.085 cm h⁻¹, respectivamente.

Tabela 2 – Taxa de crescimento dos fungos filamentosos isolados a diferentes temperaturas.

Fungos	Taxa de crescimento / cm h ⁻¹			
	30°C	35°C	40°C	45°C
M1	0.095 ± 2E-4 ^a	0.091 ± 2E-4 ^b	0.081 ± 2E-4 ^c	0.00 ^d
M3	0.035 ± 1E-4 ^b	0.058 ± 3E-4 ^a	0.00 ^c	0.00 ^c
M6	0.031 ± 2E-4 ^b	0.085 ± 3E-4 ^a	0.030 ± 2E-4 ^c	0.00 ^d

Nota: Em (0.00) significa ausência de taxa de crescimento. As médias foram avaliadas com o teste Tukey, com α de 0.05. O teste de médias foi avaliado separadamente para cada fungo isolado.

Os fungos sofrem significativa influência da temperatura, pois ela afeta a germinação dos esporos presentes no substrato, bem como a reprodução destes. Com isto, cada espécie possui um comportamento intrínseco em determinadas faixas de temperaturas, como observado neste trabalho, onde há uma temperatura ótima em que eles possuem taxa de crescimento máxima. Sendo assim, há espécies que possuem seu crescimento inibido em altas temperaturas, e há espécies que necessitam de temperaturas mais elevadas para se desenvolverem. O crescimento do *Aspergillus flavus* foi avaliado a 20 e a 37°C, e foi observado que em temperaturas mais elevadas a taxa de crescimento foi mais significativa (0.047 cm h⁻¹). Por outro lado, os fungos do solo pertencentes aos filotipos *Endogonomycetes* e *Taphrinomycetes* são conhecidos por serem sensíveis a alterações abruptas de temperatura (Feng *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2022; Natarajan *et al.*, 2022).

3.2 Triagem da Produção de Invertases em Meio de Cultivo Submerso

Os fungos isolados, bem como do banco de fungos foram utilizados para a triagem de produção de invertases. Dessa forma, estatisticamente a cepa M2.4 (425.182 U totais) apresentou a atividade estatisticamente mais significativa dentre os fungos avaliados. Por outro lado, constatou-se que o M1, M3 e M6 apresentaram atividade de 0.100 U totais, 0.109 U totais e 0.127 U totais, respectivamente, relativamente baixas e menos significativas, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 – Análise da produção de invertase pelos fungos selecionados no cepário do laboratório.

Fungos	Atividade / U totais
M1	0.100 ± 0.011 ^g
M3	0.109 ± 0.041 ^f
M6	0.127 ± 0.152 ^e
M1.8	1.554 ± 0.067 ^d
M2.4	35.182 ± 0.890 ^a
M2.5	12.993 ± 1.436 ^b
L1	2.866 ± 0.188 ^c

As invertases podem ser produzidas por uma gama de fungos, os quais utilizam resíduos agroindustriais, como cascas, para a produção do catalisador (Rasbold *et al.*, 2022). Na literatura foi relatado que nas condições otimizadas, os fungos *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM, *Aspergillus niger* (45.87 U mL⁻¹), *A. brasiliensis* ATCC 9642 (5.84 U mL⁻¹), *A. carbonarius* PC-4 (9.4 U mL⁻¹) e outras espécies do gênero são industrialmente interessantes para produzir invertases com alto potencial catalítico (Batista *et al.*, 2021; Guerrero-urrutia *et al.*, 2021; Rasbold *et al.*, 2022; Taşar and Taşar, 2022). Por sua vez, o M2.4 não cultivado nas suas melhores condições, apresentou atividade de invertase igual a 21.259 U mL⁻¹, revelando considerável significância da cepa para a produção das enzimas. Determinadas espécies de fungos são especializadas em produzir invertases com elevado potencial de aplicação industrial, para a conversão da sacarose em açúcar invertido e frutooligosacarídeos (FOS) (Batista *et al.*, 2021). O *A. niger* A42 (ATCC 204447) foi avaliado quanto a produção de invertases, e verificou-se que no quinto dia de fermentação, a atividade invertásica foi superior 100 U mL⁻¹, indicando que o gênero é potencialmente um bom produtor da enzima (Gürler *et al.*, 2021).

3.3 Otimização da Produção de Invertases

Meio de cultivo: Conforme descrito anteriormente, o fungo M2.4 é potencialmente do gênero *Aspergillus* (Souza *et al.*, 2020), como observado na Figura 3A. Sendo assim, o cultivo dessa cepa nos quatro diferentes meios de cultura, revelou produção ótima de invertase no meio CP (420.610 U totais), estatisticamente mais significativo conforme o índice a expresso na Figura 3B.

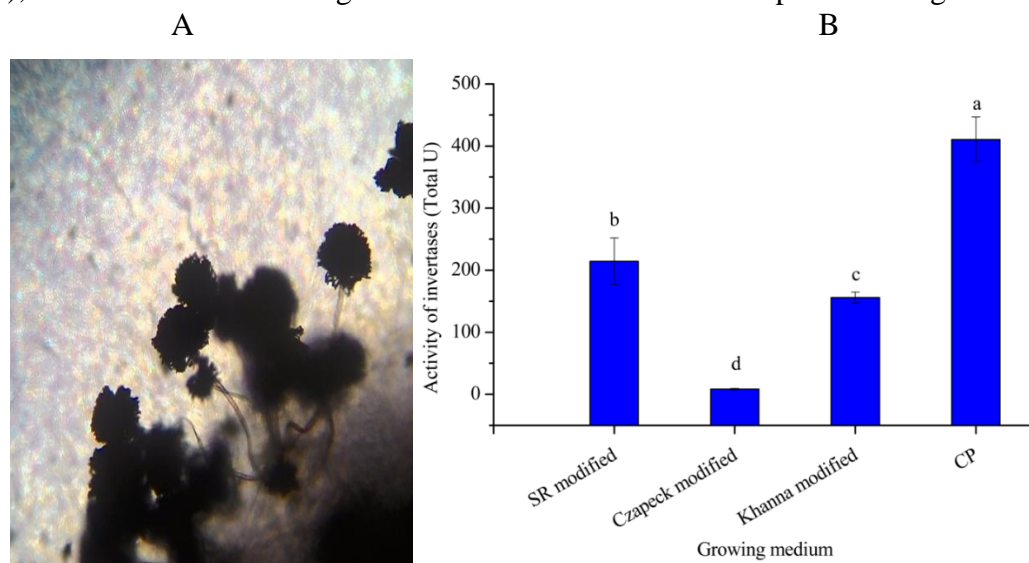


Figura 3 – Resultados para a cepa M2.4: (A) Microscopia da cepa *Aspergillus* sp. M2.4 com aumento de 100x, (B) Análise do melhor meio de cultivo submerso para produção da invertase pelo *Aspergillus* sp. M2.4.

A composição do meio de cultivo é um fator altamente significativo para a expressão da atividade de invertases, como foi evidenciado no estudo com o *A. niger* OZ-3 (Taşar and Taşar, 2022). Foi relatado que a produção de invertases por *Saccharomyces cerevisiae* é melhorada em presença de extrato de levedura (1.15 U mL^{-1}), peptona e caseína, todas fontes orgânicas de nitrogênio. Por outro lado, em presença de fontes inorgânicas de nitrogênio (nitrato de potássio e nitrato de sódio) a atividade invertásica foi mínima (0.39 U mL^{-1}) e menos significativa (Mahendran *et al.*, 2022). O *A. carbonarius* (IOC 4612) foi utilizado para produzir invertases, e nas condições ótimas a atividade alcançada foi superior a 39 U mL^{-1} (Barros *et al.*, 2022). Além disso, o tipo de sal e sua concentração influencia na produção de invertases, como observado com o cultivo nas condições ótimas do *S. cerevisiae*, com atividades maiores em presença de 0.5% de sulfato e sódio (0.89 U mL^{-1}), cloreto de magnésio e sulfato ferroso. Por outro lado, em presença de sulfato de zinco, sulfato de magnésio e fosfato de potássio, a atividade foi mínima ($< 0.5 \text{ U mL}^{-1}$) (Laroute *et al.*, 2021; Mahendran *et al.*, 2022). Isto não foi observado no presente trabalho, pois em presença das baixas concentrações dos sais sulfato de magnésio e fosfato de potássio (sais CP), obteve-se em média uma atividade invertásica de 21.030 U mL^{-1} .

Tempo de cultivo: Estatisticamente, o *Aspergillus* sp. M2.4 no quinto dia de cultivo produziu a maior e mais significativa atividade invertásica (548.785 U totais), cerca de 22% superior ao quarto dia, e, aproximadamente, 11% maior que o sexto dia. Além disso, a partir do sexto dia de cultivo observou decréscimo na atividade enzimática, conforme Figura 4.

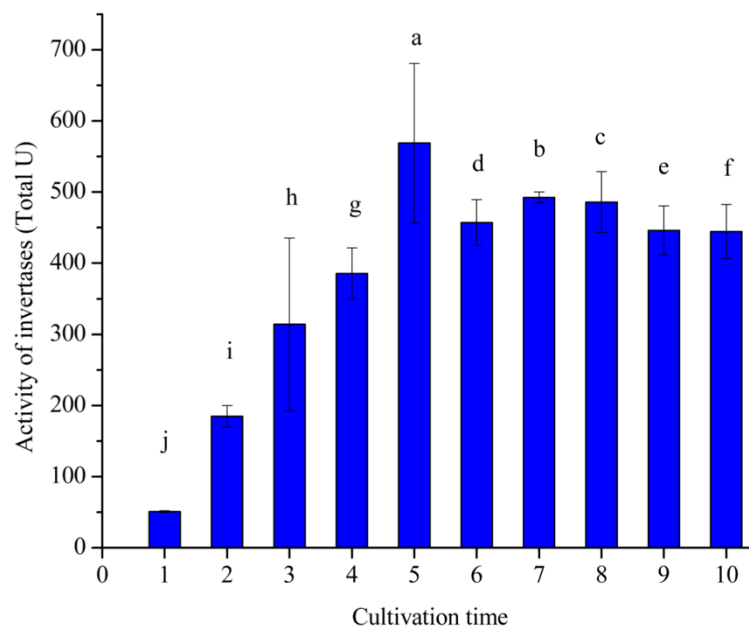


Figura 4 – Análise do tempo de crescimento do *Aspergillus* sp.M2.4 para uma maior produção enzimática.

O perfil de crescimento dos micro-organismos, inicia-se com a ambientação da cepa ao meio de cultivo (fase *lag*), seguida pela fase *log*, que é o crescimento exponencial, acompanhado do consumo dos nutrientes disponíveis e liberação de metabólitos primários, como as enzimas. Por fim, há as etapas de decréscimo, que representa a morte da cepa e a produção de metabólitos secundários, o que reprime as enzimas extracelulares (Jeennor *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2022). Foi relatado que no terceiro dia de cultivo de *S. cerevisiae*, nas condições ótimas, produziu-se invertases com atividade de 1.73 U mL^{-1} , enquanto no quinto dia houve um dos menores valores expressos (1.2 U mL^{-1}) (Mahendran *et al.*, 2022). Outros autores determinaram que o cultivo de *A. niger* A42 (ATCC 204447) revelou atividade de quase 1000 U mL^{-1} em 14 dias de cultivo, observando uma fase inicial

com baixa atividade, seguida por uma fase de aumento exponencial e decréscimo (Germec and Turhan, 2020).

Influência da fonte de carbono: Estatisticamente, o farelo de trigo dentre as quinze fontes de carbono testadas, foi a mais significativa para produção de invertases, apresentando atividade de 495.958 U totais. Além disso, a aveia e a sacarose proporcionaram maiores valores de atividade. Por outro lado, a lactose proporcionou a menor atividade expressada (34.462 U totais), conforme a Figura 5.

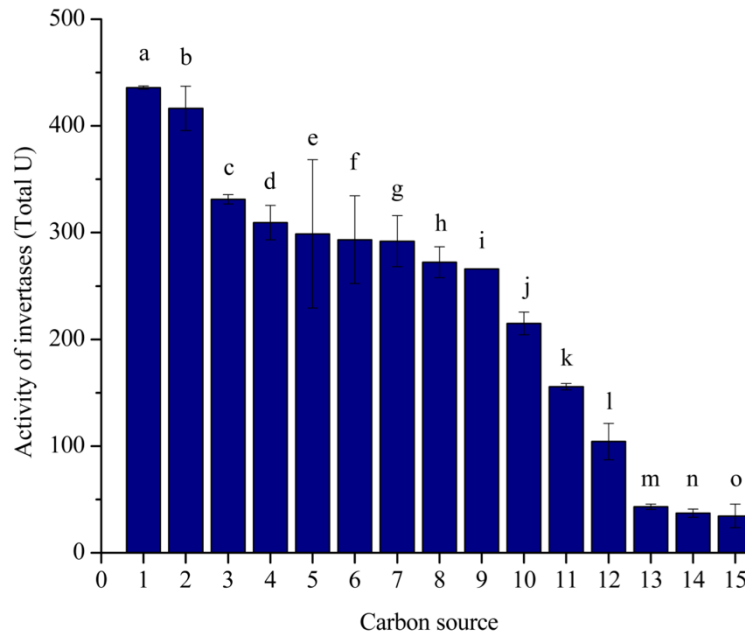


Figura 5 – Efeito indutor da fonte de carbono na produção de invertase pelo *Aspergillus sp.* M2.4 em cinco dias de cultivo em meio de cultura submerso.

Note: Fontes de carbono 1,5%: 1- Farelo de trigo; 2- Aveia; 3- Sacarose; 4- Amido de milho; 5- Farelo de aveia; 6- Farinha de linhaça; 7- Farinha de trigo integral; 8- Farinha de chia; 9- Farinha de linhaça marrom; 10- Maltose; 11- Glicose; 12- Frutose; 13- Galactose; 14- Palha de cana-de-açúcar; 15- Lactose.

Estudos com o *A. carbonarius* PC-4 demonstraram que o farelo de trigo proporcionou a induziu a produção de invertases em presença de farelo de trigo ($< 1.0 \text{ U mL}^{-1}$) e açúcares simples ($< 3.0 \text{ U mL}^{-1}$), como glicose, frutose, sacarose, maltose e lactose (Nascimento *et al.*, 2019). Foi relatado que em presença de sacarose, o *A. brasiliensis* ATCC 9642 produziu invertases com atividade máxima de 41.69 U mL^{-1} (Guerrero-Urrutia *et al.*, 2021). O farelo de trigo, assim como outras fontes de carbono complexas e à base de celulose, hemicelulose e lignina, são excelentes alternativas para a produção de enzimas, pois a hidrólise desses polímeros libera açúcares como a manose, xilose, arabinose e outros. Os farelos e cascas são compostos por substâncias complexas, ricas em proteína e outros, com elevado potencial para produção de enzimas hidrolíticas (Arya *et al.*, 2022; Tuysuz *et al.*, 2020).

Influência da fonte de nitrogênio: Dentre as fontes de nitrogênio analisadas para a produção invertásica, o meio contendo apenas extrato de levedura foi estatisticamente mais significativo, apresentando uma atividade enzimática de 493.797 U totais, de acordo a Figura 6.

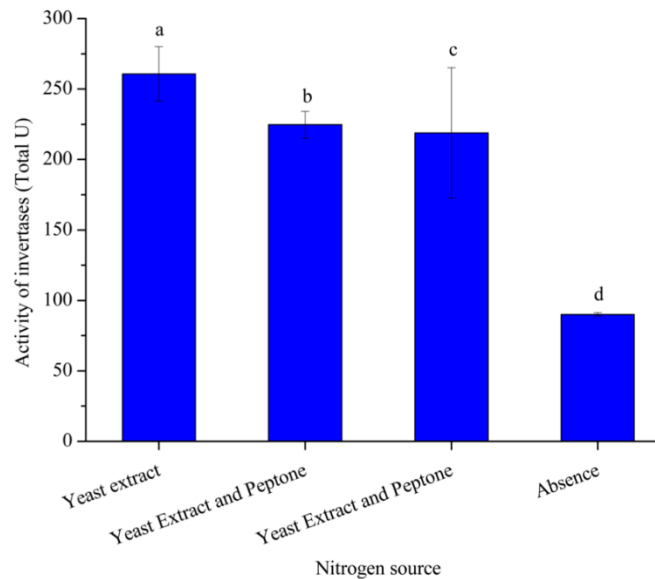


Figura 6 – Efeito da fonte de nitrogênio na produção de invertase por *Aspergillus* sp. M2.4 em meio de cultura submerso tendo farelo de trigo como fonte de carbono.

Estudos prévios com *A. niger* OZ-3 demonstram que a produção de invertase é menos evidenciada em presença do extrato de levedura (entre 21.0 e 34.0 U mL⁻¹), por outro lado é promovida em presença de peptona (entre 23.0 e 44.0 U mL⁻¹) (Taşar and Taşar, 2022). O estudo com o *A. carbonarius* PC-4 evidenciou que o extrato de levedura é capaz otimizar a produção de invertases, as quais apresentaram atividade de 9.7 U mL⁻¹ (Batista *et al.*, 2021). Além disso, foi constatado que a concentração da fonte de nitrogênio também é um fator decisório, pois as invertases produzidas pelo *A. niger* IBGE 01 em presença de maiores concentrações do extrato de levedura foi superior (4.58 U mL⁻¹) às concentrações inferiores do composto (3.81 U mL⁻¹) (Ahmed *et al.*, 2021). Com isto, nota-se que a composição proteica e os nutrientes do extrato de levedura são essenciais para a otimização da produção de invertases, com atividade superior a 18.0 U mL⁻¹.

Efeito de sais no meio: Dentre as variações de sais do meio de cultura submerso, notou-se que os sais do próprio meio CP (Peixoto *et al.*, 2003) foi o que mais induziu a atividade invertásica, 290.473 U totais, seguido dos sais Wesson, 282.491 U totais, de acordo a Figura 7.

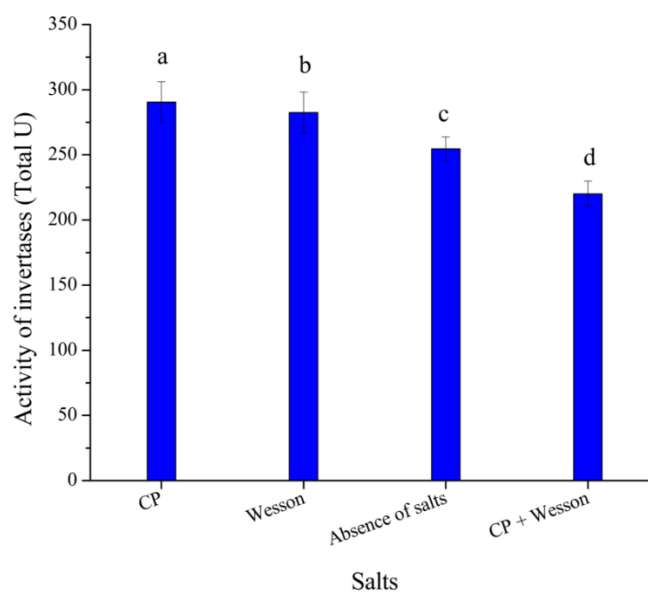


Figura 7 – Efeito das soluções de sais do meio de cultura submerso CP para a produção enzimática pelo *Aspergillus* sp. M2.4.

Estudos prévios têm demonstrado que o uso de 1% de sulfato de magnésio e 0.75% de fosfato de potássio, demonstraram induzir a produção de invertases por *Penicillium* sp., com atividade superior a 10 U mL^{-1} (Nehad and Atalla, 2020). A *S. cerevisiae* foi utilizada para produzir invertases, e foi constatado que o fosfato de potássio e o sulfato de magnésio são bons indutores de síntese de invertase, com atividade superior a 0.4 U mL^{-1} (Mahendran *et al.*, 2022). Esses sais, componentes do meio CP, foram utilizados para induzir a produção de outras enzimas pelo *Aspergillus* sp. M 1.7.2, os quais se mostraram mais eficientes. O contrário foi observado em presença dos sais Wesson, revelando que a complexidade e alta concentração de sais no meio não é viável para a geração de enzimas como amilases ($> 4000 \text{ U}$ totais) pelo gênero *Aspergillus* (Souza *et al.*, 2020). Diferentes espécies de *Aspergillus* apresentaram boa produção de enzimas hidrolíticas de sacarose quando foram incubadas em presença de sais fosfato e sulfato. A atividade das enzimas extracelulares para o *A. awamori* IOC 4142 foi de 14.45 U mL^{-1} ; *A. carbonarius* IOC 4612 de 15.55 U mL^{-1} ; *A. flavus* IOC 4051 de 9.54 U mL^{-1} ; *A. niger* IOC 4591 de 63.95 U mL^{-1} ; e *A. oryzae* IOC 3999 de 9.45 U mL^{-1} , demonstrando alto potencial de produção desses catalisadores pelo gênero, quando incubados em meios de cultivo contendo sais CP (Barros *et al.*, 2020).

3.4 Caracterização Bioquímica das Invertases Brutas e Solúveis

Determinação do pH e temperatura ótimos: Avaliando a estatística das médias gerais para os diferentes pH, percebeu-se que no pH 4.5 obteve-se as maiores atividade médias (à cima de 300 U totais). Com isto, observando os resultados para o pH 4.5, nota-se que a temperatura de 65°C foi estatisticamente mais significativa, alcançando uma atividade invertásica de quase 450 U totais. Os outros pH foram expressivos (entre 4.5 e 5.5), mas não proporcionaram a melhor atividade invertásica, conforme a Figura 8.

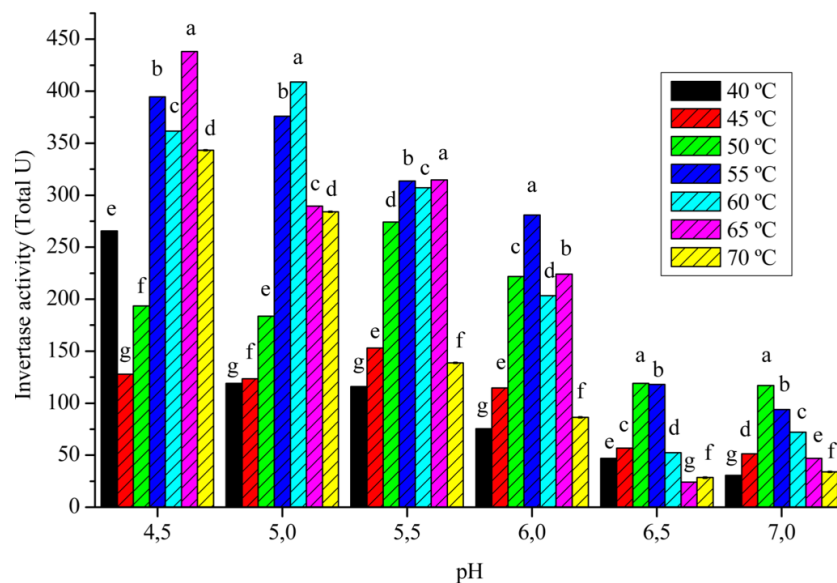


Figura 8 – Efeito da temperatura e do pH na atividade da invertase.

Nota: A análise estatística foi realizada com base no teste de médias Tukey ($\alpha = 0.05$). A primeira etapa foi realizar o desdobramento no pH, com isto avaliou-se qual o pH médio foi estatisticamente mais significativo (pH: $4.5^a - 303.502 \text{ U}$ totais; $5.0^b - 254.948 \text{ U}$ totais; $5.5^c - 231.061 \text{ U}$ totais; $6.0^d - 172.359 \text{ U}$ totais; $6.5^e - 63.698 \text{ U}$ totais; $7.0^f - 63.698 \text{ U}$ totais). O índice a representa a média mais significativa.

As enzimas são compostas por aminoácidos em seus sítios ativos e interações eletrostáticas, as quais necessitam de um pH e temperatura máxima adequados para evitar a desnaturação e perda da atividade. Isto pois, concentrações de H^+ podem afetar a forma como ocorre as interações com o substrato e os aminoácidos presentes na estrutura proteica (Paul *et al.*, 2021). Estudos com o *A. niger* LP5 mostram que a invertase possui ponto ótimo de atividade no pH 6.0 e a $60^\circ C$ ($1.13 U mL^{-1}$). Além disso, o perfil da invertase nos diferentes pH mostrou que a atividade é crescente até pH 6.0 e decrescente a partir do pH 6.5. Em relação a temperatura, a atividade é crescente até os $60^\circ C$ e decrescente a partir dos $65^\circ C$ (Danmek *et al.*, 2022). O *Aspergillus* sp. CSA 35 apresenta ponto ótimo no pH 6.0 e a $50^\circ C$, com atividade máxima entre 18.0 e $8 U mL^{-1}$ (Aghogho *et al.*, 2020). Com isto, pode-se afirmar que no ponto ótimo as invertases produzidas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são altamente eficientes na hidrólise da sacarose (Martínez-Ruiz *et al.*, 2022). Os trabalhos citados, bem como os resultados do presente trabalho mostram que o ponto ótimo varia de espécie e cepa, no entanto, assim como os micro-organismos mencionados, as invertases do *Aspergillus* sp. M2.4 possuem grande potencial hidrolítico ($> 22.22 U mL^{-1}$).

Estabilidade ao pH e à temperatura: A enzima em estudo apresentou-se estável em todos os pH testados, de 4.5 a 7.0, até os 120 minutos, com atividade enzimática acima de 50%. Contudo, a enzima apresentou atividade relativa de 97 a 120% na faixa de pH de 5.5 a 7.0, por 30 minutos. Em tempos superiores, a enzima manteve sua atividade na faixa e 54 a 79%, como observado na Figura 9A. A análise da termoestabilidade da enzima mostrou que a enzima manteve até 62% da sua atividade, quando incubada a 50 e $55^\circ C$; além disso, foi capaz de manter sua conformação por 30 minutos a $60^\circ C$. Contrariamente, a 65 e $70^\circ C$, a invertase perdeu mais de 80% da sua atividade, o que denota a importância de se analisar o comportamento termoestável do biocatalisador, como mostrado na Figura 9B.

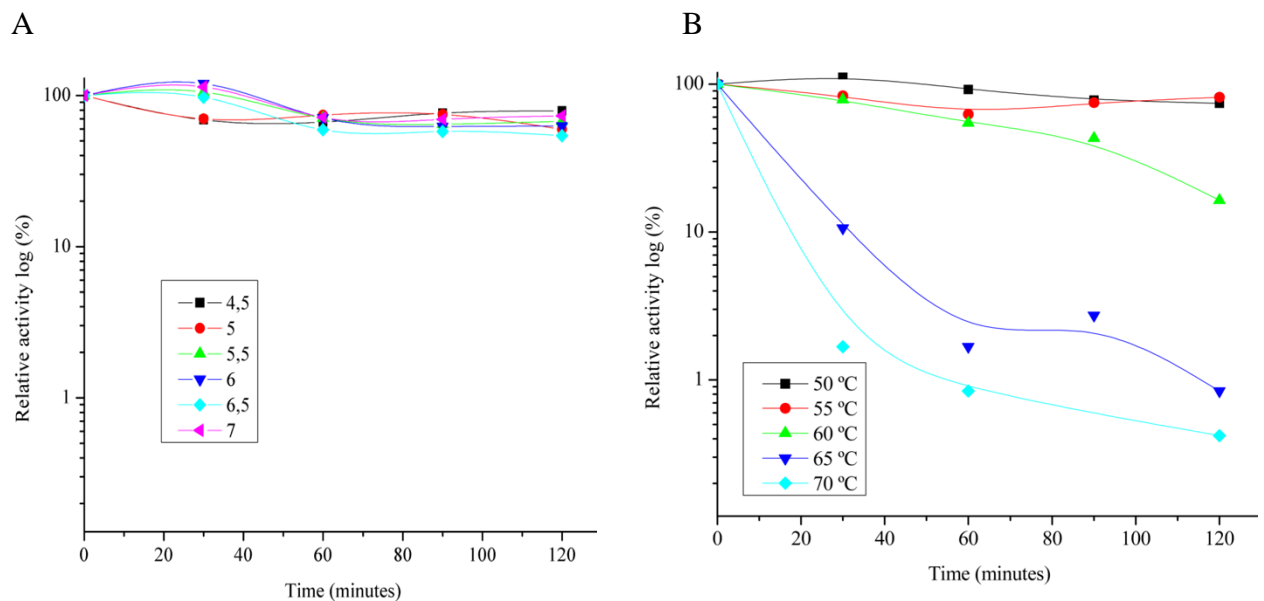


Figura 9 – Estabilidade: (A) diferentes pH e (B) diferentes temperaturas.

Nota: A estabilidade foi avaliada quanto a capacidade da enzima manter até 50% da sua atividade nos tempos pré-estabelecidos. A atividade relativa foi calculada com base no ponto zero ($\pm 400 U$ totais). O erro dos pontos experimentais foi menor que o ícone referente a cada curva.

Enzimas hidrolíticas de sacarose produzidas pelo *A. oryzae* S719 foram caracterizadas bioquimicamente, e constatou-se que a enzima tinha maiores atividades pH 6.0, mas manteve-se estável em todas as faixas de pH avaliadas, reduzindo apenas 10% da atividade máxima. Com isto, foi constatado que as enzimas podem possuir diferentes estados de dissociação, ou seja, em cada pH ela apresenta um comportamento diferente. No entanto, apenas o pH 6.0 a enzima se apresentou

num estado de dissociação que se mostrou eficiente para a ligação com o substrato e para a conformação catalítica da enzima (Han *et al.*, 2020).

O *A. oryzae* S719 produziu enzimas com máxima hidrólise da sacarose a 55°C, mantendo sua estabilidade à cima de 50% em 24 horas de incubação nas temperaturas abaixo dos 50°C. No entanto, a partir desse ponto as enzimas se manterão estáveis por menos de 12 horas, revelando que parte da estrutura proteica foi desnaturada, uma vez que as interações entre as cadeias poliméricas dependem da temperatura (Deng *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2020).

A temperatura e pH ótimos de ensaio das beta-frutofuranosidades solúveis produzidas pelo *A. niger* LBA 02 foram na faixa de 50 a 65°C e pH de 3.5 a 4.0. Essa faixa ótima diz respeito a flexibilidade que a enzima livre possui, sendo necessário formas de estabilizar a enzima, protegendo-a da desnaturação (Da Cunha *et al.*, 2022; Deng *et al.*, 2020). Além disso, em se tratando da estabilidade bioquímica das enzimas produzidas, elas manterão até 50% da atividade por 4 horas a 50°C, até 50% da atividade por 3 horas a 60°C, e perdeu quase 100% da atividade a 70°C. Em relação a estabilidade ao pH, elas manterão até 50% da atividade em duas horas de incubação da faixa de 4 a 5.0 (Da Cunha *et al.*, 2022).

Outras espécies de micro-organismos, como *Yarrowia lipolytica* A-101-B56-5, também produzem invertases termoestáveis e estáveis em diferentes pH. As invertases dessa cepa apresentam estabilidade (manteve mais de 50% da atividade) até os 60°C e na faixa de pH de 3.0 a 6.5, por até 3 horas de incubação (Szymański *et al.*, 2022). Com isto, percebe-se que a estabilidade das invertases varia de espécie para espécie, e que a temperatura e pH interferem consideravelmente na hidrólise, interação com o substrato e conformação da enzima.

4. Conclusões

Através deste trabalho foi possível determinar que os melhores parâmetros para a invertase extracelular do *Aspergillus* sp. M2.4 foi o meio submerso CP, com cinco dias de cultivo, a 30°C, tendo como fonte de carbono o farelo de trigo, fonte de nitrogênio o extrato de levedura e solução de sais do próprio meio, os quais proporcionaram um aumento de mais de 8 vezes na atividade. Além disso, a invertase produzida apresentou ponto ótimo no pH 4.5 e a 65°C, o qual proporcionou um aumento de 12 vezes à atividade inicial determinada. Em complemento, apresentou boa estabilidade ao pH, mantendo atividade superior a 69% nos pHs de 4.5 a 7.0, durante 120 minutos, além de uma excelente termoestabilidade, nas temperaturas de 50°C a 55°C, com atividade residual superior a 80%.

Reconhecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, CNPq, e o apoio da FAPEMIG.

Referências

- Aghogho, O., Aliyu, A. A., Larrey, E. K., & Daniel, O. O. (2020). Characterization of crude invertase extracted from *Aspergillus* species CSA 35. *African Journal of Biotechnology*, 19(8), 584-590. <https://doi.org/10.5897/AJB2019.16928>
- Ahmed, K., Munawar, S., & Khan, M. A. (2021). Beta-D-fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* IBGE 01 using shaken flask technique of submerged fermentation. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 4(3), 323-330. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2015.43008>
- Al Haboubi, Z. S., & Matloob, A. A. (2022). The effects of some plant extracts in inhibiting the growth of the fungi *Penicillium digitatum* and *P. italicum*. *Annals of Forest Research*, 65(1), 5104-5112. <https://doi.org/10.1111/nph.18490>
- Arya, P. S., Yagnik, S. M., Rajput, K. N., Panchal, R. R., & Raval, V. H. (2022). Valorization of agro-food wastes: ease of concomitant-enzymes production with application in food and biofuel industries. *Bioresource Technology*, 361(1), 127738. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127738>

- Barros, R. G. C., Pereira, U. C., Andrade, J. K. S., Barbosa, P. F., Vasconcelos, S. V., Nogueira, J. P., Rajan, M., & Narain, N. (2020). Intracellular and extracellular enzyme patterns during biosynthesis of short chain fructooligosaccharides from *Aspergillus* spp. strains: Profile, biological structure correlation and chemometric characterizations. *Bioresource Technology Reports*, 11(1), 100546. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100546>
- Barros, R. G. C., Pereira, U. C., Andrade, J. K. S., Nogueira, J. P., De Oliveira, C. S., & Narain, N. (2022). Process optimization for simultaneous production of phenolic acids and enzymes with high transfructosylation activity in cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) residue by submerged fermentation with *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Food Science and Technology*, 59(1), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05418-z>
- Barzee, T. J., Cao, L., Pan, Z., & Zhang, R. (2021). Fungi for future foods. *Journal of Future Foods*, 1(1), 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2021.09.002>
- Batista, R. D., Melo, F. G., Do Amaral Santos, C. C. A., De Paula-Elias, F. C., Perna, R. F., Xavier, M. C. A., Morales, S. A. V., & De Almeida, A. F. (2021). Optimization of β -fructofuranosidase production from agrowaste by *Aspergillus carbonarius* and its application in the production of inverted sugar. *Food Technology and Biotechnology*, 59(3), 306-313. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.03.21.6934>
- Bhadra, S., Chettri, D., Verma, A. K. (2022). Microbes in fructooligosaccharides production. *Bioresource Technology Reports*, 20(1), 101159. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101159>
- Cioni, P., Gabellieri, E., Campanini, B., Bettati, S., & Raboni, S. (2022). Use of exogenous enzymes in human therapy: approved drugs and potential applications. *Current Medicinal Chemistry*, 29(3), 411-452. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210713094722>
- Da Cunha, T. M., Mendes, A. A., Hirata, D. B., & Angelotti, J. A. (2022). Optimized conditions for preparing a heterogeneous biocatalyst via cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Catalysts*, 13(1), 62. <https://doi.org/10.3390/catal13010062>
- Da Fonseca, A. M., De Freitas, Í. B., Soares, N. B., De Araújo, F. A. M., Gaieta, E. M., Dos Santos, J. C. S., Sobrinho, A. C. N., Marinho, E. S., & Colares, R. P. (2022). Synthesis, biological activity, and in silico study of bioesters derived from bixin by the CALB enzyme. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(5), 5901-5917. <https://doi.org/10.33263/BRIAC125.59015917>
- Danmek, K., Ruenwai, R., Sorachakula, C., Jung, C., & Chuttong, B. (2022). Occurrence of an invertase producing strain of *Aspergillus niger* LP5 isolated from longan pollen and its application in longan syrup production to feed honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Ecology and Environment*, 46(1), 13. <https://doi.org/10.5141/jee.22.002>
- Elfita, E., Widjajanti, H., Setiawan, A., & Kurniawati, A. R. (2022). Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from the stem bark of jambu mawar (*Syzygium jambos*). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(1), 521-532. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230156>
- Emerson, R. (1941). An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. *Lloydia*, 4(1), 77-144. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1574231874650930176>
- Feng, Y., Zhang, J., Berdugo, M., Guirado, E., Guerra, C. A., Egidi, E., Wang, J., Singh, B. K., & Delgado-Baquerizo, M. (2022). Temperature thresholds drive the global distribution of soil fungal decomposers. *Global Change Biology*, 28(8), 2779-2789. <https://doi.org/10.1111/gcb.16096>
- Germec, M., & Turhan, I. (2020). Enhanced production of *Aspergillus niger* inulinase from sugar beet molasses and its kinetic modeling. *Biotechnology Letters*, 42(10), 1939-1955. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02913-1>
- Guerrero-Urrutia, C., Volke-Sepulveda, T., Figueroa-Martinez, F., & Favela-Torres, E. (2021). Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, 108(1), 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.014>

- Gürler, H. N., Germec, M., & Turhan, I. (2021). The inhibition effect of phenol on the production of *Aspergillus niger* inulinase and its modeling. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(8), e14522. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14522>
- Han, S., Ye, T., Leng, S., Pan, L., Zeng, W., Chen, G., & Liang, Z. (2020). Purification and biochemical characteristics of a novel fructosyltransferase with a high FOS transfructosylation activity from *Aspergillus oryzae* S719. *Protein Expression and Purification*, 167(1), 105549. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105549>
- Huang, W., Li, Y., Du, Y., Pan, L., Huang, Y., Liu, H., Zhao, Y., Shi, Y., Ruan, Y. L., Dong, Z., & Jin, W. (2022). Maize cytosolic invertase INVAN6 ensures faithful meiotic progression under heat stress. *New Phytologist*, 236(6), 2172-2188. <https://doi.org/10.1111/nph.18490>
- Jeennor, S., Anantayanon, J., Chutrakul, C., Panchanawaporn, S., & Laoteng, K. (2022). Novel pentose-regulated promoter of *Aspergillus oryzae* with application in controlling heterologous gene expression. *Biotechnology Reports*, 33(1), e00695. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00695>
- Jiang, L., Pettitt, T. R., Buenfeld, N., & Smith, S. R. (2022). A critical review of the physiological, ecological, physical and chemical factors influencing the microbial degradation of concrete by fungi. *Building and Environment*, 214(1), 108925. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2022.108925>
- Kawai, K., Takehara, S., Kashio, T., Morii, M., Sugihara, A., Yoshimura, H., Ito, A., Hattori, M., Toda, Y., Kojima, M., Takebayashi, Y., Furuumi, H., Nonomura, K., Mikami, B., Akagi, T., Sakakibara, H., Kitano, H., Matsuoka, M., & Ueguchi-Tanaka, M. (2022). Evolutionary alterations in gene expression and enzymatic activities of gibberellin 3-oxidase 1 in *Oryza*. *Communications Biology*, 5(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03008-5>
- Khanna, P., Sundari, S. S., & Kumar, N. J. (1995). Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 11(1), 242-243. <https://doi.org/10.1007/BF00704661>
- Lacaz, C. S., Porto, E., & Martins, J. E. C. (1991). Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 33, p. 332-332, 1991. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651991000400021>
- Laroute, V., Mazzoli, R., Loubière, P., Pessione, E., & Cocaign-Bousquet, M. (2021). Environmental conditions affecting GABA production in *Lactococcus lactis* NCDO 2118. *Microorganisms*, 9(1), 122. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02499-w>
- Madhavan, A., Arun, K. B., Sindhu, R., Jose, A. A., Pugazhendhi, A., Binod, P., Sirohi R., Reshmy, R., & Awasthi, M. K. (2022). Engineering interventions in industrial filamentous fungal cell factories for biomass valorization. *Bioresource Technology*, 344(1), 126209, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126209>
- Mahendran, S., Sankaralingam, S., Tamilarasi, S., Maheswari, P., Kathiresan, D., Ramya, S. S., Seethapathy P., Kousalya L., Harinathan B., & Palpperumal S. (2022). Bioactive potential of invertase by yeast *Saccharomyces cerevisiae* from the honey bee gut: Isolation and characterization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1(1), 1-10. <https://doi.org.ez36.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13399-022-02499-w>
- Martínez-Ruiz, A., Tovar-Castro, L., Aguilar, C. N., Saucedo-Castañeda, G., & Favela-Torres, E. (2022). Sucrose hydrolysis in a continuous packed-bed reactor with auto-immobilise aspergillus niger biocatalyst obtained by solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(3), 1327-1339. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03737-z>
- Michelin, M. (2009). *Potencial dos fungos Aspergillus terrícola e Aspergillus ochraceus no desenvolvimento de bioprocessos e propriedades das enzimas xilanolíticas*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyses Chemistry*, v.31, p. 426-428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nascimento, G. C. D., Batista, R. D., Santos, C. C. A. D. A., Silva, E. M. D., De Paula, F. C., Mendes, D. B., De Oliveira D. P., & De Almeida A. F. (2019). 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*, 2019(6956202), 1-13. <https://doi.org/10.1155/2019/6956202>
- Natarajan, S., Balachandar, D., Senthil, N., & Parandharan, V. (2022). Interaction of water activity and temperature on growth, gene expression, and aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus* on Indian senna (*Cassia angustifolia* Vahl.). *International Journal of Food Microbiology*, 361(1), 109457. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109457>
- Nehad, E. A., & Atalla, S. M. M. (2020). Production and immobilization of invertase from *Penicillium* sp. using orange peel waste as substrate. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, v. 19, n. 2, p. 103-112, 2020. http://dx.doi.org/10.4103/epj.epj_41_19
- Ouili, A. S., Maiga, Y., Zida, E. P., Ouoba, A., Nandkangre, H., Compaore, C. O. T., Nikiema M., Ouedraogo M., & Ouattara A. S. (2022). Isolation and characterization of fungal strains from the seeds of *Bambara groundnut* (*Vigna subterranea* (L.) Verdcourt) produced in Burkina Faso. *African Journal of Food Science*, 16(5), 107-115. <https://doi.org/10.5897/AJFS2022.2168>
- Paul, J. S., Gupta, N., Beliya, E., Tiwari, S., & Jadhav, S. K. (2020). Aspects and recent trends in microbial α -amylase: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(8), 2649-2698. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03546-4>
- Lopes, P. H. S. *et al.* (2016). Caracterização da produção amilolítica pelo fungo *Penicillium* L1. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2016. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá. Disponível em: <<https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/papers/caracterizacao-da-producao-amilolitica-pelo-fungo-penicillium-l1?lang=pt-br>> Acesso em: 11 jan. 2023.
- Peixoto, S. C., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., & Polizeli, M. D. L. (2003). *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *International Microbiology*, v. 6, p. 269– 273, 2003. <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-003-0140-1>.
- Rasbold, L. M., Delai, V. M., Da Cruz Kerber, C. M., Simões, M. R., Heinen, P. R., Da Conceição Silva, J. L., Simão, R. C. G., Kadowaki, M. K., & Maller, A. (2022). Production, immobilization and application of invertase from new wild strain *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 2832-2843. <https://doi.org/10.1111/jam.15394>
- Rizzatti, A. C. S., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Rechia, C. G. V., & Polizeli, M. D. L. T. D. M. (2001). Purification and properties of a thermostable extracelular β -D- xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 26(1), 156-160. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000107>
- Rodrigues, M. P., De Oliveira, Á. A., Biscoto, G. L., Pinto, P. N., Dias, R. R. D. S., Salvato, L. A., Keller L.A.M., Cavaglieri, L. R., Rosa, C. A. Da R., & Keller, K. M. (2022). Inhibitory effect of gras essential oils and plant extracts on the growth of *Aspergillus westerdijkiae* and *Aspergillus carbonarius* strains. *Molecules*, 27(19), 6422. <https://doi.org/10.3390/molecules27196422>
- Sakekar, A. A., Gaikwad, S. R., & Punekar, N. S. (2021). Protein expression and secretion by filamentous fungi. *Journal of Biosciences*, 46(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00120-8>
- Sari, D. N. R., & Anitasari, S. D. (2022). Isolation of indigenous fungi in river containing ammonia from rubber industry waste in jember. *Journal of Multidisciplinary Applied Natural Science*, 2(1), 58-64. <https://doi.org/10.47352/jmans.2774-3047.109>
- Silva, L. T. A., De Oliveira, T. M. F. S., Marinho, B. M., Pasin, T. M., Nelson, D. L., De Meira Pires, J. R., & Benassi, V. M. (2022). Isolation of high amylase-producing filamentous fungi from the caatinga: standardization of the culture conditions and amylase activity from *Penicillium* sp. L1. *Asian Journal of Research in Biochemistry*, 10(1), 1-15. <http://dx.doi.org/10.9734/AJRB/2022/v10i130211>

- Singh, N., Singhanian, R. R., Nigam, P. S., Dong, C. D., Patel, A. K., & Puri, M. (2022). Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 344(1), 126415. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126415>
- Souza, M. T. S., Marinho, B. M., Pasin, T. M., Nelson, D. L., & Benassi, V. M. (2020). Prospection of filamentous fungi and the production of amylase by *Aspergillus* sp. M1. 7.2. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 6(3), 0365-0376. <http://dx.doi.org/10.18540/jcecvl6iss3pp0365-0376>
- Szymański, K., Hapeta, P., Moroz, P., Wąsik, B., Robak, M., & Lazar, Z. (2022). The influence of *Yarrowia lipolytica* glycosylation on the biochemical properties and oligomerization of heterologous invertase. *Sustainability*, 14(13), 7926. <https://doi.org/10.3390/su14137926>
- Taşar, Ö. C., & Taşar, G. E. (2022). Effects of different nitrogen sources on invertase production by *Aspergillus niger*. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 95-99. <https://doi.org/10.46239/ejbcs.1138487>
- Tuysuz, E., Gonul-Baltacı, N., Omeroglu, M. A., Adiguzel, A., Taskin, M., & Ozkan, H. (2020). Co-production of amylase and protease by locally isolated thermophilic bacterium *Anoxybacillus rupiensis* T2 in sterile and non-sterile media using waste potato peels as substrate. *Waste and Biomass Valorization*, v. 11, n. 12, p. 6793-6802, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00936-3>
- Wani, A. K., Rahayu, F., Kadarwati, F. T., Suhara, C., Singh, R., Dhanjal, D. S., Akhtar N., Mir T. G., & Chopra, C. (2022). Metagenomic screening strategies for bioprospecting enzymes from environmental samples. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, 974(1), 012003. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/974/1/012003>
- Wiseman, A., & Woodward, J. (1975). Industrial yeast invertase stabilization. *Process Biochemistry*, 10(1), 24-30. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL7538016898>