

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

TAIOMARA BUTZKE DAPPER

BETA-FRUTOFURANOSIDASE DE *Aspergillus versicolor* UTILIZANDO FONTE DE
CARBONO ALTERNATIVA: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
ENZIMÁTICA

CASCADEL-PR
Fevereiro de 2015

TAIOMARA BUTZKE DAPPER

BETA-FRUTOFURANOSIDASE DE *Aspergillus versicolor* UTILIZANDO FONTE DE
CARBONO ALTERNATIVA: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
ENZIMÁTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Orientadora: Marina Kimiko Kadowaki

Co-orientadora: Marise Fonseca dos Santos

CASCADEL-PR

Fevereiro de 2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D222b

Dapper, Taiomara Butzke

Beta-frutofuranosidase de *Aspergillus versicolor* utilizando fonte de carbono alternativa: produção, purificação e caracterização enzimática. /Taiomara Butzke Dapper.— Cascavel, 2015.

29 p.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marina Kimiko Kadowaki

Coorientadora : Prof^ª. Dr^ª. Marise Fonseca dos Santos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

1.Bagaço de maçã. 2. Otimização. 3. Invertase. 4. *Aspergillus*. I. Kadowaki, Marina Kimiko. II. Santos, Marise Fonseca dos. III.Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

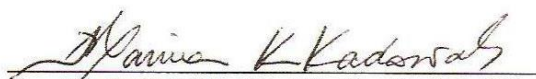
CDD 21.ed. 660.6

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

TAIOMARA BUTZKE DAPPER

**“Beta-Fructofuranosidase de *Aspergillus versicolor* Utilizando Fonte de Carbono
Alternativa: Produção, Purificação e Caracterização Enzimática.”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais-Nível de Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, pela comissão Examinadora composta pelos membros:



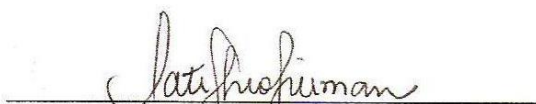
Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowáki.

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente/Orientadora)



Prof. Dr Alexandre Maller

Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr^a. Tatiana Shioji Tiunan

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Aprovada em 27 de fevereiro de 2015.

Local da defesa: Unioeste, Prédio de Salas de Aula, sala 56, Cascavel-PR.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”
Madre Teresa de Calcutá

Ao meu amado esposo Guilherme e à minha linda família, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, seus servidores, docentes e colegas, por todo o conhecimento compartilhado.

À Prof^a Dr^a Marina Kimiko Kadowaki, orientadora, por mais uma vez ter acreditado no meu potencial.

À minha família, pelo apoio incondicional, compreensão e amor.

Ao Guilherme, meu esposo, sua existência é a força que eu preciso e sempre precisarei.

À UFPR Setor Palotina, pela liberação parcial das minhas atividades para realizar o mestrado.

Aos colegas da UFPR – Mara, Cleuza, Aline, Juliana, Ederson e Prof. Cristiano - que apoiaram e sempre colaboraram com as atividades nos momentos cruciais.

À Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Simões de Toledo pelo auxílio na parte estatística.

À Prof^a. Dr^a. Marise Fonseca dos Santos pela co-orientação.

À equipe dos Laboratórios de Bioquímica da Unioeste, docentes e colegas que sempre se mostraram interessados, preocupados e dispostos a ajudar, por todas as sugestões e apoio, pela companhia e ânimo nas horas difíceis de trabalho. Vocês são demais!

Um agradecimento especial à Vanessa Arfelli, que me auxiliou na fase final deste projeto, como se fosse seu próprio trabalho.

A todos os amigos e colegas que não foram citados mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. METODOLOGIA.....	4
2.1. Isolamento e Identificação Taxonômica do Microrganismo	4
2.2. Condições de Cultivo	4
2.3. Análise Estatística	5
2.4. Ensaio Enzimático	6
2.5. Purificação da β -frutofuranosidase	6
2.6. SDS-PAGE e zimograma.....	7
2.7. Caracterização bioquímica da β -frutofuranosidase-I	7
2.7.1. Determinação da temperatura e pH ótimos e estabilidade térmica e ao pH	7
2.7.2. Influência de diferentes compostos na atividade enzimática	8
2.7.3. Determinação dos parâmetros cinéticos	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
3.1. Identificação taxonômica do fungo.....	9
3.2. Otimização da produção da β -frutofuranosidase por planejamento experimental	9
3.3. Purificação da β -frutofuranosidase-I	15
3.4. Caracterização bioquímica da – β -frutofuranosidase - I	17
3.4.1. Temperatura ótima e termoestabilidade da β -frutofuranosidase - I	17
3.4.2. pH ótimo e estabilidade ao pH da β -frutofuranosidase - I	19
3.4.3. Efeito de íons e outros compostos.....	20
3.4.4. Parâmetros cinéticos da β -frutofuranosidase - I.....	21
4. CONCLUSÕES.....	23
5. REFERÊNCIAS	24

RESUMO

A produção de β -frutofuranosidase extracelular de *Aspergillus versicolor* foi significativamente elevada após otimização das condições de cultivo através do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). As variáveis estudadas foram: bagaço de maçã, pH inicial do meio mineral e tempo de cultivo, tendo como resposta a atividade enzimática da β -frutofuranosidase. A produção máxima de β -frutofuranosidase foi obtida quando o fungo foi cultivado por 12 dias, em meio suplementado com 3% (p/v) de bagaço de maçã como fonte de carbono e pH inicial 7,0 do meio mineral. No procedimento de purificação, o extrato bruto extracelular do *A. versicolor* foi precipitado com sulfato de amônio 75%, em seguida submetido à cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex, que resultou em dois picos de atividade enzimática, denominadas de β -frutofuranosidase I e II. A β -frutofuranosidase I exibiu temperatura e pH ótimos de 55°C e 6,0, respectivamente. A enzima mostrou estabilidade nas temperaturas de 40 a 60°C e foi estável em pH na faixa de 3,0 a 6,0. A atividade da β -frutofuranosidase I foi aumentada na presença do íon Fe^{2+} , mas inibida pelo íon Hg^{2+} . Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\text{áx}}$ utilizando sacarose como substrato, foram 26,71 mM, e 56,980 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. Estas características bioquímicas da β -frutofuranosidase evidenciam o potencial de aplicação desta enzima na indústria de produção de etanol, que exige estabilidade a temperatura alta e pH ácido.

Palavras-chave: bagaço de maçã; otimização; invertase; *Aspergillus*.

ABSTRACT

Extracellular β -fructofuranosidase production from *Aspergillus versicolor* was significantly increased after optimization of culture conditions by Central Composite Rotational Design (CCRD). The variables studied were apple pomace, initial pH and cultivation time, and in response to enzymatic activity of β -fructofuranosidase. The maximum yield of β -fructofuranosidase was obtained when the fungus was grown for 12 days in medium supplemented with 3% (w/v) apple pomace as carbon source and the initial medium pH 7.0. In the purification procedure, the extracellular crude extract of *A. versicolor* was precipitated with ammonium sulfate 75%, and applied to the ion exchange chromatography DEAE-Sephadex, which resulted in two peaks of enzyme activities, named β -fructofuranosidase-I and II. The β -fructofuranosidase- I exhibited optimum temperature and pH of 55°C and 6.0, respectively. The enzyme was stable at temperatures from 40 to 60°C and the pH in a range from 3.0 to 6.0. The activity of β -fructofuranosidase-I was increased in the presence of the Fe^{2+} ion, and inhibited by Hg^{2+} . The kinetic parameters V_{max} and K_m with sucrose as substrate were 26.71 mm and 56.980 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively. These biochemical characteristics of the β -fructofuranosidase demonstrate the potential application of this enzyme in the ethanol production industry, which requires high temperature stability and acidic pH.

Keywords: apple pomace; optimization; invertase; *Aspergillus*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido por sua extensiva atividade agrícola e, conseqüentemente, por possuir grande potencial de produção de recursos renováveis, tais como subprodutos e resíduos agroindustriais. A obtenção de novos materiais, produtos, coprodutos e substâncias químicas utilizando estes recursos têm encontrado espaço e vêm crescendo ano a ano.

Dentro desse contexto, o bagaço de maçã, um subproduto gerado pelas indústrias de processamento da fruta, é constituído basicamente por suco remanescente com 80% de umidade, 5% de fibras (composta por 31% de celulose, 15% de lignina e 9% de pectina insolúvel em água) e 14% de sólidos solúveis dos quais a maioria corresponde a açúcares invertidos. Já o material insolúvel da maçã consiste de cascas e polpa (94,5%), as sementes (4,4%) e os centros (1,1%) (Protzek et al., 1998).

A utilização de resíduos agroindustriais como substratos de baixo custo para a produção industrial de enzimas é uma forma significativa para reduzir o custo de produção. Assim, substratos lignocelulósicos têm despertado um considerável interesse devido a sua possível utilização em processos fermentativos com microrganismos para produção de bioativos de interesse biotecnológicos (MURUGAN et al., 2011).

No desenvolvimento de qualquer processo de fermentação, a otimização das variáveis e principalmente dos parâmetros físicos e químicos, é imprescindível, devido à sua viabilidade e ao seu impacto na economia (KAMMOUN et al., 2008). Nesse sentido, a otimização das condições de cultivo tem sido considerada o passo mais importante no desenvolvimento de um processo de fermentação de baixo custo (VAIDYA et al., 2009). As variáveis que afetam a produção de enzimas devem sempre ser investigadas, pois as condições ótimas variam de acordo com o microrganismo, bem como com diferentes enzimas (OTTONI et al., 2012).

Sacarose (α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranosídio) é uma das fontes mais importantes de adoçante na nutrição humana (LAHIRI et al., 2012). Este carboidrato pode ser irreversivelmente hidrolisado por diversas isoformas de β -frutofuranosidases, classificadas como ácidas, neutras e alcalinas de acordo com o pH ótimo (RUSTIGUEL et al., 2010). As β -D-frutofuranosidases (EC 3.2.1.26) são

enzimas das famílias de glicosidases GH-32 (ácidas), GH-68 (ácidas) e GH-100 (neutras e alcalinas) classificada de acordo com a base de dados do CAZy (Carbohydrate Active Enzymes database) (Lombard et al., 2014). Elas hidrolisam ligações β -1,2 de carboidratos tais como a sacarose, produzindo uma mistura equimolar de D-glicose e D-frutose (RUSTIGUEL et al., 2010).

Muitos organismos são capazes de produzir β -frutofuranosidases, especialmente microrganismos como bactérias – *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 (WARCHOL et al., 2002); leveduras – *Schizosaccharomyces pombe* (TANAKA et al., 1998) e *Candida utilis* (BELCARZ et al., 2002); e fungos filamentosos – *Aspergillus niveus* (GUIMARÃES et al., 2009) e *Fusarium oxysporum* (WOLSKA-MITASZKO et al., 2007). Geralmente, β -frutofuranosidase fúngicas estão incluídas na família de GH-32 (RUSTIGUEL et al., 2010).

Biologicamente, a clivagem enzimática da sacarose é uma via alternativa para substituir a hidrólise ácida. O método convencional de fabricação do açúcar invertido envolve a hidrólise ácida da sacarose, que possui alto custo de produção (MADHUSUDHAN e RAGHAVARAO, 2011). A conversão enzimática da sacarose é realizada pela enzima β -frutofuranosidase com 100% de eficiência sem as desvantagens inerentes ao método de hidrólise ácida. O produto obtido por meio da β -frutofuranosidase tem a vantagem de ser incolor, comparado com aquele obtido por hidrólise ácida (KOTZELSKI et al., 1996; DANISMAN et al., 2004). A frutose, um dos produtos da hidrólise da sacarose pela β -frutofuranosidase, é considerada confiável do ponto de vista da saúde, e pode ser usado por diabéticos. Além disso, a frutose não cristaliza e tem maior capacidade adoçante em comparação à sacarose (RUSTIGUEL et al., 2010).

As β -frutofuranosidases possuem aplicação na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica, de papel e de plastificação (QUERSHI et al., 2012) e também na área de análise para a construção de biossensores de sacarose (KOTWAL e SHANKAR, 2009; BAGAL et al., 2007). Além disso, algumas invertases podem apresentar dupla atividade enzimática, a hidrolítica e a transfrutossilação, quando em concentrações elevadas de sacarose (GUIMARÃES et al., 2007; KOTWAL e SHANKAR, 2009).

Em princípio, todo organismo é uma fonte de enzimas em potencial, mas, para aplicação industrial, tanto a estabilidade em diferentes condições físico-químicas quanto o rendimento da enzima devem ser aprimorados. Assim, o objetivo

deste trabalho foi otimizar a produção da enzima β -frutofuranosidase pelo fungo *Aspergillus versicolor* utilizando fonte de carbono alternativa, purificando-a e caracterizando-a bioquimicamente.

2. METODOLOGIA

2.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO MICRORGANISMO

O fungo foi isolado a partir de material em decomposição do Refúgio Biológico Bela Vista – Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil - conforme metodologia padronizada pelo projeto em rede SISBIOTA – BRASIL. A identificação taxonômica do fungo em nível de espécie foi realizada por meio da análise morfológica do fungo pela Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, BRASIL), bem como por identificação com ferramenta de biologia molecular realizada por meio da análise dos produtos amplificados com oligonucleotídeos para genes ribossomais utilizando a metodologia descrita por White e colaboradores (1990). A extração de DNA do fungo e amplificação por PCR foi realizada conforme o procedimento descrito por Oriente e colaboradores (2014). As sequências determinadas de ITS (ITS1, ITS2 e 5.8S) desse fungo foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando a ferramenta básica de alinhamento local (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/website>).

2.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio líquido Czapek utilizado para a produção de β -frutofuranosidase por *A. versicolor* foi composto por (g.L⁻¹) NaNO₃ (3); KH₂PO₄ (1); MgSO₄.7H₂O (0,5); KCl (0,5); Fe₂(SO₄)₃ (0,01), extrato de levedura (1) (COELHO, 2002) e bagaço de maçã (fonte de carbono), o pH do meio variou de 3,5 a 8,5 de acordo com a matriz do planejamento experimental. O bagaço de maçã, utilizado neste trabalho, foi obtido no comércio local de Cascavel-Paraná, apresentando composição de 17,65% de fibras solúveis e 25,37% de fibras insolúveis. As concentrações de bagaço de maçã tiveram seus valores ajustados conforme consta no planejamento experimental (Tabela I). Os esporos do fungo foram inoculados (1x10⁵ esporos.mL⁻¹) e incubados a 28°C em estufas tipo BOD por diferentes períodos, de acordo com o delineamento experimental. Em seguida, estas culturas foram filtradas com auxílio de bomba a vácuo. O filtrado obtido foi utilizado para determinação das atividades enzimática e específica.

Os cultivos foram conduzidos por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três variáveis independentes, cada uma em dois níveis (-1 e +1), com seis pontos axiais e quatro repetições no ponto central, totalizando 18 experimentos (Tabela I). Esse experimento permitiu o desenvolvimento do modelo polinomial de segunda ordem, que determinou os valores ótimos das variáveis para produção de β -fructofuranosidase por *A. versicolor*. As variáveis independentes (pH do meio, tempo de cultivo e concentração de bagaço de maçã) utilizadas foram selecionadas por meio de testes preliminares.

Tabela I - As variáveis e seus níveis para a otimização das condições de produção da β -fructofuranosidase por *A. versicolor*.

Variáveis Independentes	Níveis codificados				
	-1,68	-1	0	1	1,68
pH inicial	3,5	4,5	6,0	7,5	8,5
Tempo de cultivo (dias)	1	4	8	12	15
Bagaço de maçã (%)	0,32	1	2	3	3,68

O comportamento do processo foi descrito pela seguinte equação polinomial (Eq. 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + e \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, Y é a resposta predita, ou seja, a Atividade Enzimática; β_0 é o termo de intercepto; β_1 , β_2 e β_3 são os efeitos lineares; β_{11} , β_{22} e β_{33} são os efeitos quadráticos; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os efeitos de interação; e x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis independentes.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de dados do delineamento experimental foi realizada utilizando o programa STATISTICA 10.0. O nível de significância adotado foi de 5%. Os demais experimentos foram realizados em triplicata.

2.4. ENSAIO ENZIMÁTICO

A atividade de β -frutofuranosidase foi determinada por meio da liberação de açúcares redutores formados durante a incubação da enzima com o substrato sacarose 200 mM tamponada, utilizando-se o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) como descrito por Miller (1959). A reação constituiu-se de 0,5 mL de solução de sacarose 200 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0) e 0,5 mL da enzima (diluída quando necessário).

Após a incubação da mistura de reação a 60°C por 10 minutos, alíquotas de 100 μ L foram retiradas e adicionadas a 100 μ L de DNS. Em seguida, os tubos foram aquecidos em banho fervente por 5 minutos e foi adicionado 1 mL de água destilada.

A leitura da absorbância realizou-se em espectrofotômetro a 540nm. A unidade de atividade enzimática definiu-se pela quantidade de micromoles de açúcares redutores liberados por 1 mL de enzima em 1 minuto ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$), nas condições de ensaio. O cálculo da atividade específica foi determinado pela razão entre a atividade enzimática (U) e a quantidade de proteína (mg).

As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

2.5. PURIFICAÇÃO DA B-FRUTOFURANOSIDASE

O extrato bruto obtido do cultivo líquido do *A. versicolor* utilizando bagaço de maçã foi precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 75% (p/v), centrifugado a $5.478 \times g$ por 30 minutos a 4°C. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 e dialisado contra o mesmo tampão por 18 horas a 4°C. Logo após, a amostra foi aplicada em coluna de troca iônica DEAE Sephadex (10,0 cm x 2,0 cm) equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5. A enzima foi eluída utilizando um gradiente linear de NaCl (0-1M), dissolvido no mesmo tampão.

A cromatografia se desenvolveu sob fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e frações de 5 mL foram coletadas para a quantificação da atividade β -frutofuranosidásica, além de proteínas em absorbância de 280 nm. As frações onde foram eluídas as atividades β -fructofuranosidásicas (de 210 a 245 mM de NaCl e de 330 a 400 mM de NaCl),

foram reunidas e dialisadas contra água deionizada. A amostra dialisada foi liofilizada e utilizada para determinar as características bioquímicas da enzima.

2.6. SDS-PAGE E ZIMOGRAMA

Submeteu-se a enzima purificada à eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) à concentração de 10% (p/v) de acrilamida. Após a corrida eletroforética por SDS –PAGE, o gel foi dividido em duas partes. A primeira foi corada para análise da homogeneidade da proteína com Coomassie Brilliant Blue R-250. Os marcadores de massa molecular utilizados como padrão foram: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor da tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). Estimou-se a massa molecular da invertase por meio do coeficiente de migração da proteína em relação aos padrões (R_f).

Na segunda parte, foi analisada a atividade da enzima (zimograma), executada conforme a metodologia descrita por Rehm e colaboradores (1998), com algumas modificações. Para isso, o gel passou por dois processos de incubação: durante 30 min em 0,5% (v/v) de Triton X-100 em temperatura ambiente; e após lavagem em água destilada, em solução de sacarose 0,3 M dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, por 30 minutos a 40°C. Em seguida, o gel foi corado com cloreto de trifenil tetrazólio a 1% (p/v) dissolvido em NaOH 0,25 M, aquecido a 100°C. A reação enzimática foi interrompida com ácido acético 5% (v/v).

2.7. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BETA-FRUTOFURANOSIDASE-I

2.7.1. Determinação da temperatura e pH ótimos e estabilidade térmica e ao pH

A temperatura e pH ótimos foram determinados, na faixa de 40°C a 80°C e pH de 3,0 a 7,5, respectivamente. Para a análise de estabilidade térmica, a enzima foi incubada em diferentes temperaturas (40°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C e 70°C) por até 12 horas. O mesmo processo realizou-se para determinação da estabilidade ao pH incubando a enzima em tampão McIlvaine a diferentes pH (3,0; 4,0; 5,0 e 6,0) por

até 48 horas. Estimou-se a atividade residual destas análises retirando-se as alíquotas após diferentes períodos, em intervalos pré-determinados, mediante incubação da alíquota da enzima com o substrato.

2.7.2. Influência de diferentes compostos na atividade enzimática

O efeito de vários compostos – íons metálicos, solventes e agentes redutores – sob a atividade enzimática foi avaliado pela incubação da β -frutofuranosidase extracelular com sacarose 0,2 M, diluída em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,0. Acrescentou-se à reação os seguintes compostos: KCl, NaCl, SnCl₂, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂, CuSO₄, BaCl₂, MgSO₄, FeSO₄, HgCl₂, EDTA, etanol, acetona, Tween 80 e SDS, nas concentrações de 1 e 5 mM.

2.7.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Estimaram-se os parâmetros cinéticos de K_m (Constante de Michaelis-Menten) e V_{máx} (velocidade máxima) para a sacarose por meio da exposição da enzima à diferentes concentrações do substrato, de 5 mM a 70 mM. O gráfico foi elaborado por regressão linear, utilizando o software Origin 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO FUNGO

O fungo *Aspergillus versicolor* foi isolado de material em decomposição obtido da Mata Atlântica da região Oeste do Paraná-Brasil e a sua identificação taxonômica realizou-se por meio da análise morfológica, de acordo com a classificação presente na Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco – Brasil. Submeteu-se o fragmento do produto amplificado, obtido da região dos genes ribossomais com oligonucleotídeos de ITS1 a ITS4, ao GenBank. A sequência de 508 pb da região de ITS mostrou 100% de similaridade com e outras linhagens de *Aspergillus versicolor*, e se encontra depositada com número de acesso KM396917 no GenBank do NCBI.

3.2. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA B-FRUTOFURANOSIDASE POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A fim de tornar o processo fermentativo viável e eficaz é necessário otimizar o rendimento da enzima sem aumentar o custo de produção. Para alcançar esta meta, realizou-se um estudo de planejamento experimental por DCCR 2³ para a produção de β -frutofuranosidase por *A. versicolor*, otimizando as condições de cultivo líquido do fungo determinando os valores de pH inicial, tempo de cultivo e concentração da fonte de carbono. As respostas obtidas para cada ensaio do delineamento estão apresentadas na Tabela II.

O Planejamento Experimental permitiu o reconhecimento das condições que favorecem a produção de β -frutofuranosidase do *A. versicolor*, são elas: 3% (p/v) de bagaço de maçã, 12 dias de cultivo e pH inicial 7,5. Com a otimização demonstrada pelo experimento, comprovou-se uma melhora de 150 vezes quando comparada aos ensaios 1 (0,5 U.mL⁻¹) e 8 (77,92 U.mL⁻¹) da Tabela II.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela II é possível observar que nos ensaios 3 (23,83 U.mL⁻¹); 4 (64,75 U.mL⁻¹); 7 (26, 58 U.mL⁻¹) e 8 (77,91 U.mL⁻¹) ocorreram apenas a variação na concentração de bagaço de maçã, de 1% para 3%, proporcionando, assim, a elevação na produção da β -frutofuranosidase.

Enquanto que nos ensaios 6 e 8, houve a alteração da variável de tempo de cultivo, de 4 para 12 dias, respectivamente, aumentando a indução da enzima de 2,25 U.mL⁻¹ para 77,91 U.mL⁻¹. Por outro lado, nos ensaios 4 e 5, notou-se que quando as demais variáveis permaneceram fixas e o pH inicial do meio de 4,5 foi alterado para 7,5, não houve um aumento expressivo na produção da β -frutofuranosidase de 64,750 U.mL⁻¹ (ensaio 4) para 77,917 U.mL⁻¹ (ensaio 8).

Tabela II - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional e valores reais e codificados para os fatores estudados e a Atividade Enzimática para a produção de β -frutofuranosidase por *Aspergillus versicolor*

Ensaio	Fatores			Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)	
	Bagaço de maçã (%)	Tempo de Cultivo (dias)	pH	Observado	Predito
1	1 (-1)	4 (-1)	4.5 (-1)	0,500	3,307
2	3 (1)	4 (-1)	4.5 (-1)	1,375	0,034
3	1 (-1)	12 (1)	4.5 (-1)	23,833	23,929
4	3 (1)	12 (1)	4.5 (-1)	64,750	65,761
5	1 (-1)	4 (-1)	7.5 (1)	1,083	8,521
6	3 (1)	4 (-1)	7.5 (1)	2,250	5,248
7	1 (-1)	12 (1)	7.5 (1)	26,583	29,143
8	3 (1)	12 (1)	7.5 (1)	77,917	70,975
9	0,32 (-1,68)	8 (0)	6 (0)	0,750	-5,890
10	3,68 (1,68)	8 (0)	6 (0)	22,917	26,500
11	2 (0)	1 (-1,68)	6 (0)	1,500	-10,155
12	2 (0)	15 (1,68)	6 (0)	65,000	62,379
13	2 (0)	8 (0)	3,5 (-1,68)	37,333	36,841
14	2 (0)	8 (0)	8,5 (1,68)	48,167	45,602
15	2 (0)	8 (0)	6 (0)	21,672	26,112
16	2 (0)	8 (0)	6 (0)	23,552	26,112
17	2 (0)	8 (0)	6 (0)	26,507	26,112
18	2 (0)	8 (0)	6 (0)	20,955	26,112

Na Figura 1, o diagrama do Pareto demonstra as variáveis que foram significativas e que influenciaram positivamente no aumento da atividade enzimática: o tempo de cultivo (linear), bagaço de maçã (linear), interação entre tempo de cultivo e o bagaço de maçã e o pH (quadrático) ($p < 0,05$).

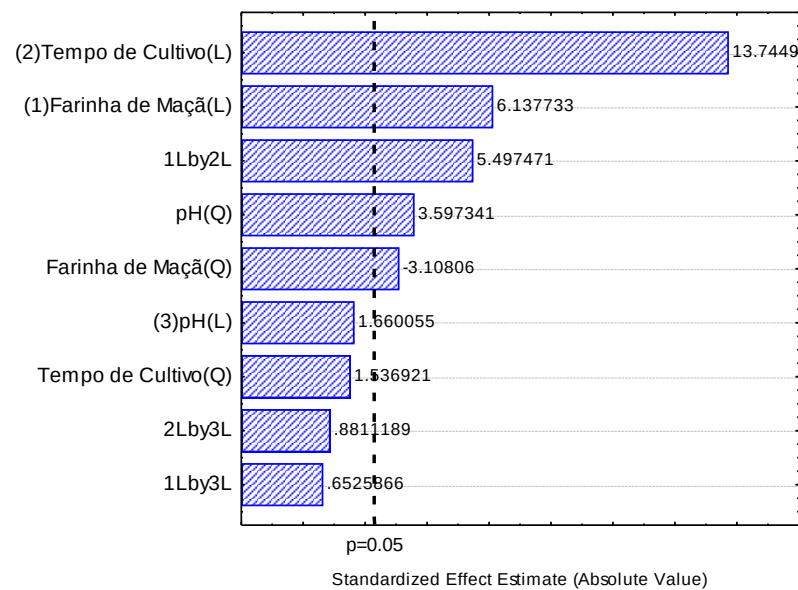


Figura 1 - Diagrama de Pareto dos fatores de estudo em relação a atividade enzimática.

Uma das vantagens em se realizar o planejamento experimental por DCCR é a possibilidade de estudo das interações das variáveis e seus efeitos sobre a resposta, como observado na Figura 1, em que os fatores bagaço de maçã e tempo de cultivo apresentaram interação significativa sobre a produção enzimática. A Figura 2 mostra a interação entre a concentração do bagaço de maçã e o tempo de cultivo.

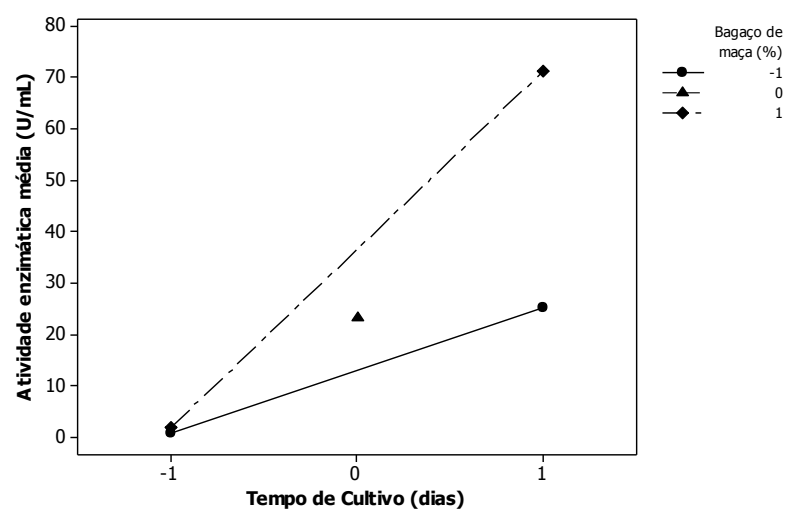


Figura 2 - Interação entre o tempo de cultivo e a concentração de bagaço de maçã na atividade enzimática.

Pode-se observar na figura 2 que a interação no menor nível (-1) do tempo de cultivo, independente da concentração de bagaço de maçã, a produção da enzima foi baixa. Quando o tempo de cultivo foi aumentado para o maior nível (+1) houve, simultaneamente, um aumento da produção enzimática, resultando na maior atividade de β -frutofuranosidase em maior concentração de bagaço de maçã (+1).

A partir dos resultados obtidos por DCCR, calcularam-se os coeficientes de regressão dos fatores sobre a resposta e as interações (Tabela III). Os valores destacados são significativos em um intervalo de confiança de 95%. Os termos bagaço de maçã (linear e quadrático), tempo de cultivo (linear), pH inicial (quadrático) e o termo de interação entre bagaço de maçã *versus* tempo de cultivo, apresentaram-se estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Como a variável de pH inicial (quadrático) foi significativa, o pH inicial (linear) foi mantido no modelo.

Tabela III – Coeficientes de regressão estimados da otimização de produção da β -frutofuranosidase de *A. versicolor* por DCCR

	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(8)	p
Média	23,416	2.896168	8,085	0,000
Bagaço de Maçã (L)	9,640	1.570562	6,138	0,000
Bagaço de Maçã (Q)	-5,077	1.633613	-3,108	0,014
Tempo de Cultivo (L)	21,587	1.570562	13,745	0,000
Tempo de Cultivo (Q)	2,511	1.633613	1,537	0,163
pH (L)	2,607	1.570562	1,660	0,135
pH (Q)	5,877	1.633613	3,597	0,007
Bagaço de Maçã X Tempo de Cultivo	11,276	2.051133	5,497	0,001
Bagaço de Maçã X pH	1,338	2.051133	0,653	0,532
Tempo de Cultivo X pH	1,807	2.051133	0,881	0,404

A equação polinomial de segunda ordem (Eq. 2) para as variáveis significativas na produção de β -frutofuranosidase foi:

$$\text{Atividade } \beta\text{-frutofuranosidásica (Y)} = 23,41 + 9,63X_1 - 5,08 X_1^2 + 21,59 X_2 + 2,6 X_3 + 5,87 X_3^2 + 11,27 X_1 X_2 + e \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde X_1 é a concentração de bagaço de maçã (%), X_2 é o tempo de cultivo (dias) e X_3 é o pH inicial do meio mineral.

Pode-se observar na Tabela IV que o modelo apresentou regressão significativa no intervalo de 95% de confiança (F_{calc} superior ao F_{tab}) com coeficiente

de determinação (R^2) igual a 0,9606, evidenciando que o modelo explicou 96,06% da variação dos dados experimentais. O valor do F_{calc} da regressão foi 14,48 vezes maior que o F_{tab} , indicando que o modelo é preditivo. A falta de ajuste não foi significativa (F_{calc} menor que o F_{tab}), indicando que os dados experimentais se ajustaram ao modelo obtido. Segundo Box e colaboradores (1978), para que uma regressão seja não apenas significativa, mas também útil para fins preditivos, a relação de $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ deve ser superior a três.

Tabela IV - Análise de Variância (ANOVA) do modelo ajustado para a Atividade Enzimática

	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}^*	p
Regressão	9497,20	6	1582,87	44,73	3,09	<0,001
Resíduo	389,22	11	35,38			
Falta de Ajuste	370,79	8	46,35	7,54	8,85	0,062
Erro Puro	18,43	3	6,14			
Total	9886,42	17				

*Valores tabelados (Box et al., 1978): $F_{\text{regressão}}$ (6;11;95); $F_{\text{falta de ajuste}}$ (8;3;95).

Coeficiente de Regressão $R^2 = 0,9696$

Após a análise da significância do modelo foi possível a construção de superfícies de resposta tridimensionais na visualização da influência dos fatores para a produção máxima de β -frutofuranosidase (Fig. 3A, B e C).

Na Fig 3A pode-se observar que nas concentrações mais elevadas de bagaço de maçã (2 a 3,68%), combinados ao maior tempo de cultivo (12 a 15 dias), influenciaram positivamente na maior produção da β -frutofuranosidase pelo *A. versicolor*. A Fig. 3B mostra o efeito do tempo de cultivo *versus* pH inicial na produção da enzima, o aumento do tempo de cultivo eleva a produção da β -frutofuranosidase, porém, o pH do meio não influenciou na faixa testada. Na Fig. 3C é possível observar que o pH inicial influencia no aumento da atividade enzimática somente nos valores das extremidades (3,5 e 8,5), enquanto em concentrações maiores de bagaço de maçã (2 e 3,68%) influencia positivamente a produção de β -frutofuranosidase.

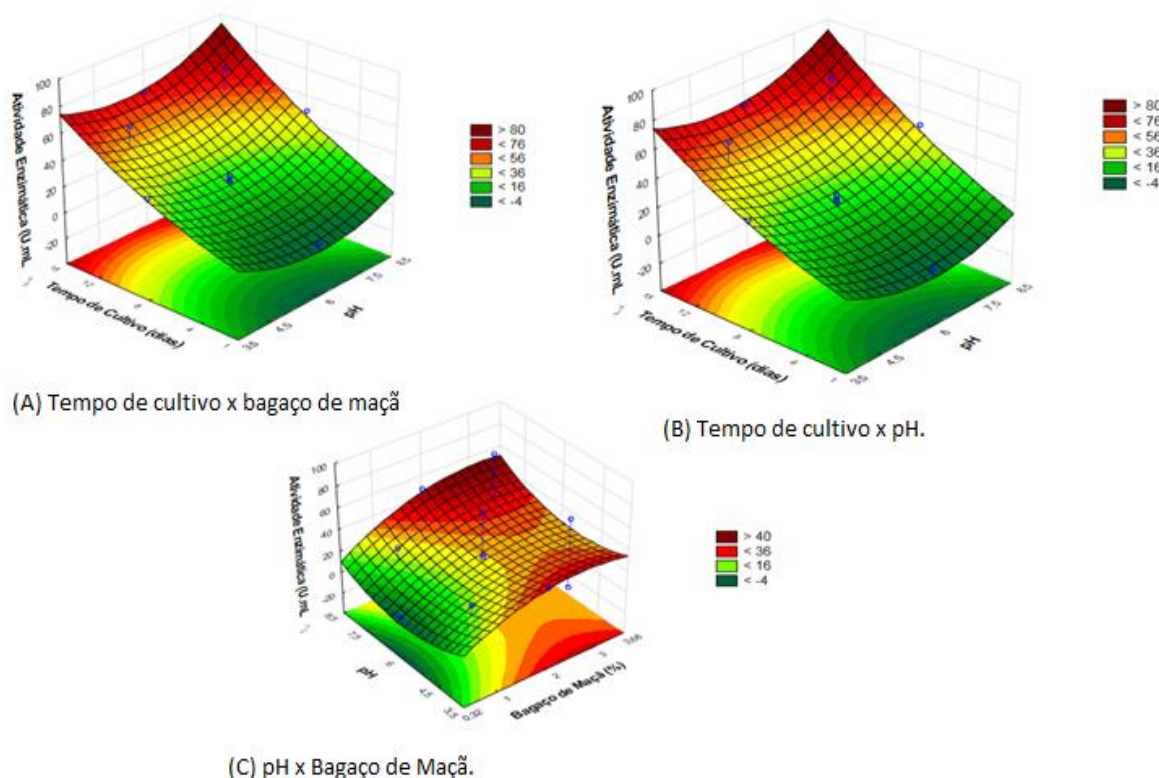


Figura 3 - Superfície de Resposta da influência dos fatores sobre a produção de β -frutofuranosidase.

Vários estudos descrevem a otimização da produção de β -frutofuranosidase por fungos do gênero *Aspergillus*, utilizando resíduos agroindustriais ou fontes alternativas renováveis de baixo custo. Um exemplo, são as pesquisas relatadas por Guimarães et al (2010) para o fungo *A. niveus*, em que se produziu a invertase extracelular (20 U.mL^{-1}) induzido por bagaço de cana-de-açúcar, suplementado com sacarose e glicose; e Reddy et al (2010), que também observou a produção de β -frutofuranosidase pelo fungo *A. niger* PSSF21 com melaço de cana-de-açúcar ($19,1 \text{ U.mL}^{-1}$).

Entretanto, esses estudos consideraram apenas a variação de um fator por vez, o que pode resultar no aumento do número de experimentos necessários para obtenção das condições ótimas, e consequentemente do tempo e dos custos, devido à elevada quantidade de reagentes e materiais necessários para a realização dos estudos (BEZERRA et al., 2008). Por outro lado, a otimização realizada neste trabalho de forma multifatorial permitiu um incremento na atividade enzimática

(77,92 U.mL⁻¹), atingindo valores superiores aos descritos para *A. niveus* (GUIMARÃES et al., 2009) e *A. niger* PSSF21 (REDDY et al., 2010).

3.3. PURIFICAÇÃO DA B-FRUTOFURANOSIDASE-I

A β -frutofuranosidase de *A. versicolor* sofreu um processo de purificação depois de um passo cromatográfico com 3,67 vezes de purificação e 22,57% de recuperação (Tabela V). Após o processo de purificação, a amostra foi separada em dois “pools”, de acordo com seu perfil cromatográfico (Figura 4). Estas amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10% (v/v) e apresentaram migração distinta, tanto no gel corado com a reagente Coomassie blue para visualização de proteínas, quanto no gel para atividade enzimática, sugerindo a presença de duas β -frutofuranosidases (Figura 5). A massa molecular da β -frutofuranosidase - I foi 75 kDa e da β -frutofuranosidase - II foi 60 kDa (Figura 6).

Tabela V - Etapas da purificação parcial da β -frutofuranosidase extracelular de *A. versicolor*

Etapas	Atividade Total (U)	Proteína total (mg)	Atividade Específica (U.mg ⁻¹)	Recuperação (%)	Purificação (vezes)
Extrato bruto	37.714,29	13.258,15	2,84	100,00	1,00
Precipitação	15.748,57	2.932,60	5,37	41,76	1,89
DEAE Sephadex pool I (FFase I)	8.510,91	815,74	10,43	22,57	3,67
pool II (FFase II)	12.474,38	2.403,53	5,19	33,08	1,82

Outros fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram β -frutofuranosidases de massas moleculares variadas – *A. ochraceus*: 13 kDa (GOSH et al., 2001) e 13,5 kDa (GUIMARÃES et al., 2007); *A. niger*: 95 kDa (RUBIO e MALDONADO, 1995) e 75 kDa (GOOSEN et al., 2007); *A. japonicus*: 60 kDa (WANG e ZHOU, 2006).

Esta capacidade de secretar diferentes isoformas de β -frutofuranosidases é comumente encontrada na literatura, *Aureobasidium pullulans* DSM2404 é produtor de cinco isoformas de β -frutofuranosidase, quando cultivado com sacarose (YOSHIKAWA et al., 2006); *Fusarium oxysporum*, quando cultivado na presença de frutose, foi capaz de produzir duas isoformas extracelulares desta enzima (WOLSKA-MITASZKO et al., 2007).

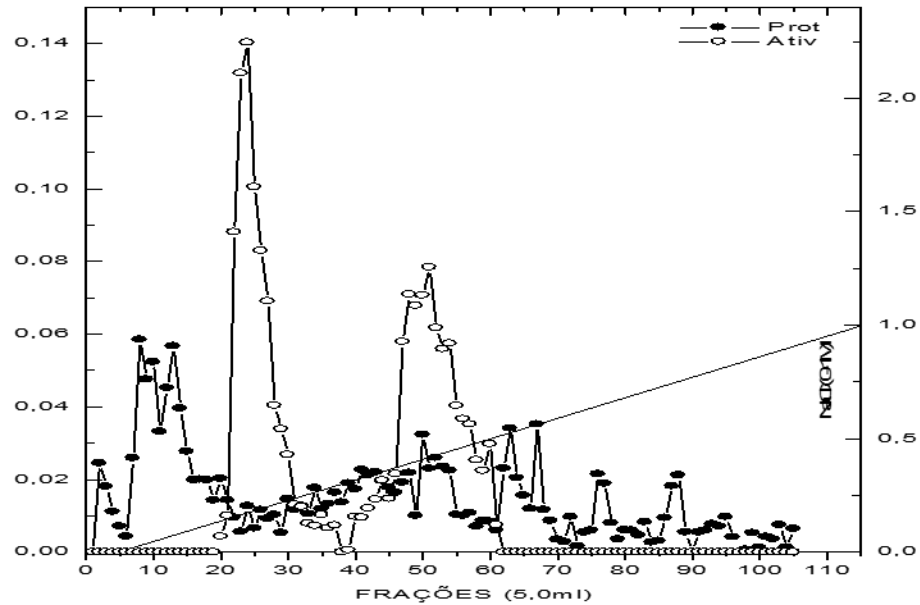


Figura 4 - Perfil cromatográfico na coluna de DEAE-Sephadex da β -frutofuranosidase de *A. versicolor*. (○) Absorbância 540 nm para atividade enzimática; (●) Absorbância 280 nm para proteína.

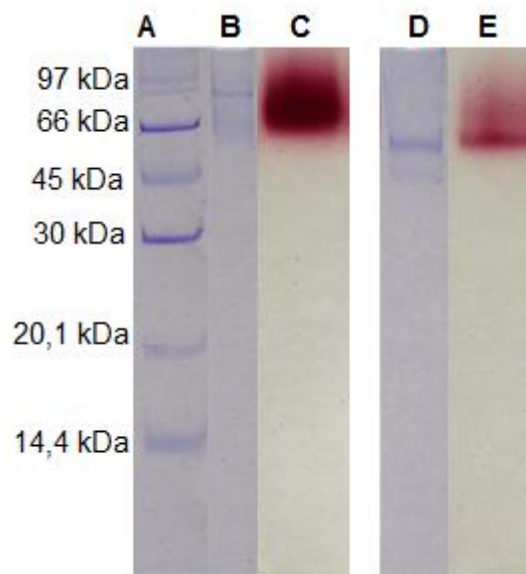


Figura 5 - Perfil eletroforético por SDS-PAGE e Gel de Atividade das β -frutofuranosidases produzidas por *A. versicolor* (A – Marcador de Massa Molecular; B – β -frutofuranosidase pool I; C – atividade no gel da β -frutofuranosidase pool I; D – β -frutofuranosidase do pool II; E – atividade no gel da β -frutofuranosidase do pool II)

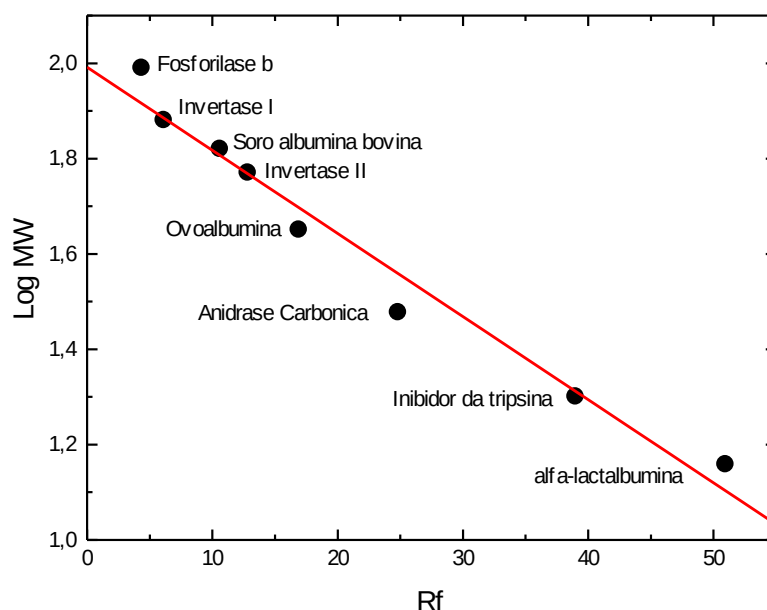


Figura 6 - Determinação da massa molecular das beta-frutofuranosidase - I e II obtidas fungo *Aspergillus versicolor*. Marcador molecular: Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor da tripsina (21,1kDa) e α -lactalbumina (14,1kDa).

3.4. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA – B-FRUTOFURANOSIDASE - I

3.4.1. Temperatura ótima e termoestabilidade da β -frutofuranosidase - I

A β -frutofuranosidase - I purificada de *A. versicolor* exibiu uma temperatura ótima de 55°C (Fig.7), este resultado é superior ao encontrado para as β -frutofuranosidasas de *A. caespitosus* (50°C) (ALEGRE et al., 2009), *Chrysonilia sitophila* PSSF84 (50°C) (PATIL et al., 2011) e à encontrada para *Mucor geophyllus* (45°C) (QUERSHI et al., 2012), e inferior à descrita para *A. phoenicis* (60°C) (RUSTIGUEL et al., 2010). A enzima manteve 100% de sua atividade enzimática por 12 horas quando incubada na faixa de temperatura de 40°C a 55°C, porém a 60°C a atividade da enzima manteve-se por até 6 horas de estabilidade térmica e teve um declínio a partir deste período, atingindo a 40% de atividade após 8 horas e 26% após 12 horas (Fig. 8).

Em temperaturas acima de 60°C a β -frutofuranosidase - I de *A. versicolor* apresentou baixa estabilidade térmica, perdendo totalmente a atividade em 60 minutos. Entretanto, essa β -frutofuranosidase apresentou termoestabilidade superior quando comparada às β -frutofuranosidasas produzidas por *A. phoenicis*

(RUSTIGUEL et al., 2010) e *A. caespitosus* (ALEGRE et al., 2009) que foram estáveis a 50°C por 1 hora e a 60°C por 1 hora e 20 minutos, respectivamente. A β -frutofuranosidase produzida por *A. phoenicis* (RUSTIGUEL et al., 2010) apresentou estabilidade semelhante à produzida por *A. versicolor* a 65°C e 70°C perdendo totalmente sua atividade após 60 minutos.

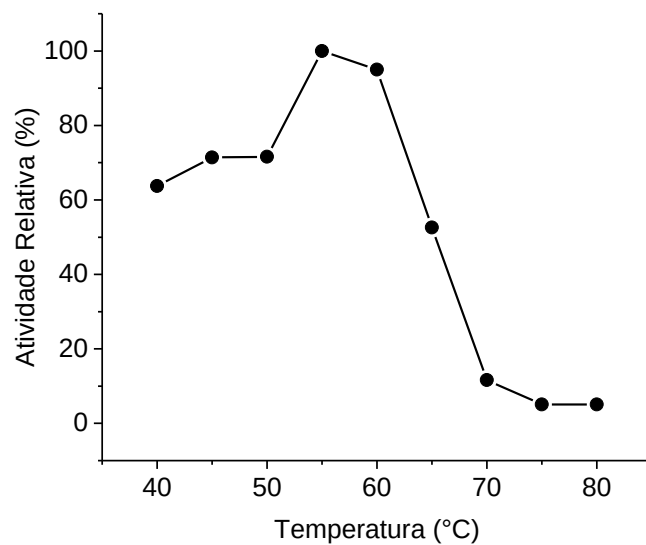


Figura 7 - Efeito da temperatura na atividade da β -frutofuranosidase - I

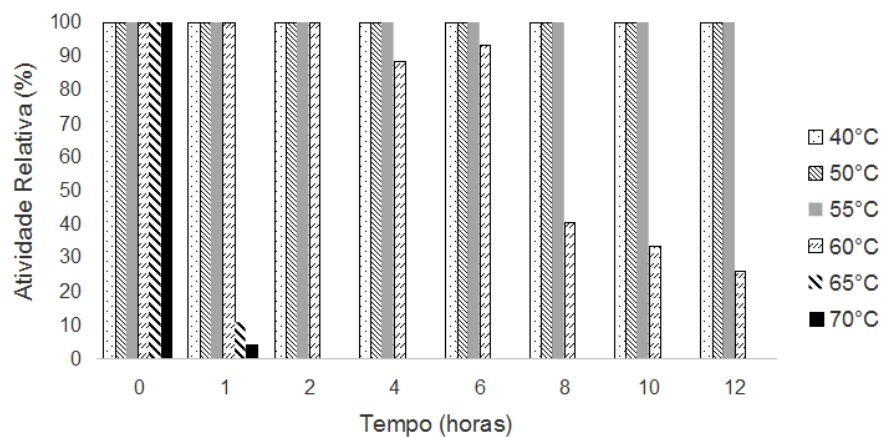


Figura 8 - Estabilidade térmica da β -frutofuranosidase - I

3.4.2. pH ótimo e estabilidade ao pH da β -frutofuranosidase - I

O pH ótimo da β -frutofuranosidase - I purificada de *A. versicolor* foi 6,0 (Fig. 9), semelhante ao pH ótimo encontrado para a β -frutofuranosidase extracelular produzida por *A. caespitosus* (ALEGRE et al., 2009) e *S. cerevisiae* NRRLY12632 (6,0) (MONA e MOHAMED, 2009). Comumente são descritas β -frutofuranosidasas com pH ótimo mais ácido – *A. phoenicis* (pH 4,5) (RUSTIGUEL et al., 2010), *C. sitophila* PSSF84 (PATIL et al., 2011) e *M. geophillus* (pH 5,0) (QUERSHI et al., 2012). Segundo Patil e colaboradores (2011) a mudança no pH afeta a ionização dos resíduos de aminoácidos principais do sítio ativo da enzima, que influencia diretamente na ligação e catálise do substrato em produtos.

A β -frutofuranosidase - I foi estável por 12 horas ao pH na faixa de 3 a 6. Entretanto, em 48 horas a enzima mostrou estabilidade reduzida em 40% principalmente nos pH 4 a 6 (Fig. 10). Um pH ótimo próximo ao neutro é interessante para aplicações industriais, especialmente na área de produção de açúcares invertidos e biossensores de sacarose (BAGAL-KESTWAL et al., 2008). Embora algumas β -frutofuranosidasas de pH ótimo próximo ao neutro – entre 6 e 7 – tenham sido relatadas (OMORI et al., 2010; ALEGRE et al., 2009; MONA e MOHAMED, 2009) elas apresentam estabilidade inferior a β -frutofuranosidase de *A. versicolor*.

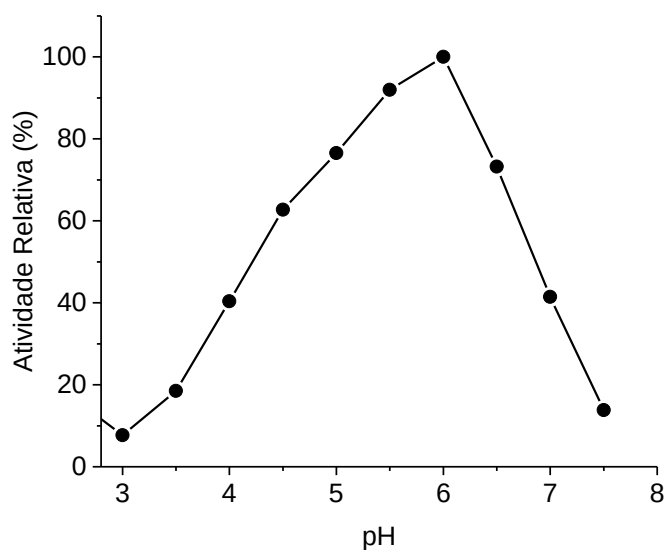


Figura 9 - Efeito do pH na atividade da β -frutofuranosidase - I

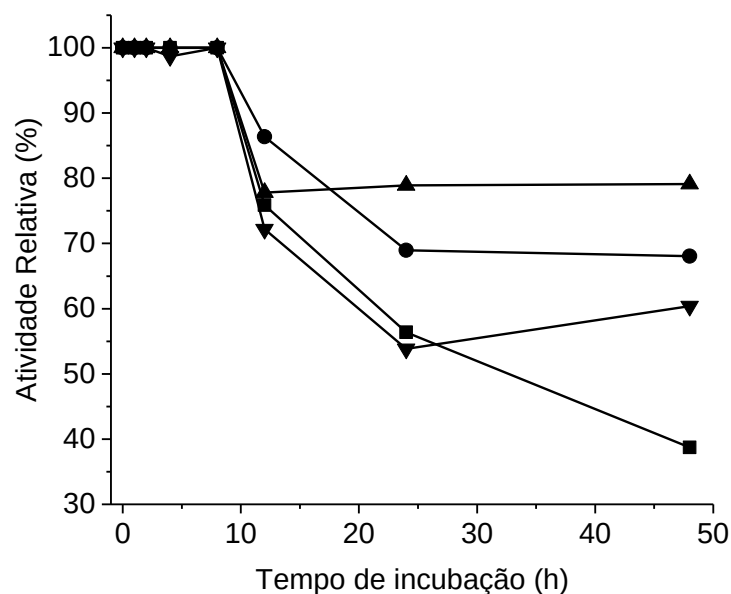


Figura 10 - Estabilidade ao pH da β-frutofuranosidase - I (■) pH 3; (●) pH 4; (▲) pH 5 e (▼) pH 6.

3.4.3. Efeito de íons e outros compostos

Dentre os íons e compostos testados (Tabela VI), o Fe^{+2} na concentração de 5 mM aumentou a atividade da β-frutofuranosidase - I de *A. versicolor* em 27,32%, indicando que este íon atuou como cofator ou grupo prostético da enzima, acelerando a velocidade de reação. Além disso, a enzima não sofreu inibição na presença de etanol, acetona, e detergentes como SDS e Tween 80. Entretanto, o íon Hg^{2+} inibiu fortemente a enzima, em ambas as concentrações, na ordem de 86-89%, respectivamente. Os demais íons não afetaram a atividade da β-frutofuranosidase - I de *A. versicolor*.

Tabela VI - Efeito de íons e outros compostos na atividade relativa da β -frutofuranosidase - I de *A. versicolor*

Compostos	1 mM	5 mM
Controle (sem íon)	100,00	100,00
MgSO ₄	108,78	110,72
NaCl	103,46	106,64
SnCl ₂	96,46	96,32
BaCl ₂	100,21	104,84
(NH ₄) ₂ SO ₄	101,13	101,70
CaCl ₂	111,00	105,74
HgCl ₂	11,69	14,32
CuSO ₄	105,09	99,15
FeSO ₄	114,04	127,32
EDTA	94,63	92,93
Etanol	100,28	94,06
Acetona	101,41	102,40
SDS	104,24	90,95
Tween 80	101,87	103,32

As β -frutofuranosidases de *C. sitophila* PSSF84 (PATIL et al., 2011) e de *A. phoenicis* (RUSTIGUEL et al., 2010) também foram afetadas negativamente pelo íon Hg⁺², sinalizando a presença de grupos tiol, importantes para a atividade catalítica.

3.4.4. Parâmetros cinéticos da β -frutofuranosidase - I

Conforme representado na Figura 11, a β -frutofuranosidase- I de *A. versicolor* apresentou comportamento de cinética de Michaelis-Mentes, mesmo em concentrações superiores de sacarose. Pode-se observar que Km para sacarose da β -frutofuranosidase purificada de *A. versicolor* foi de 26,71 mM e a velocidade máxima aferida para este substrato de 56,98 U.mg⁻¹.

A β -frutofuranosidase de *A. phoenicis* (RUSTIGUEL et al., 2010) apresentou valores de Km e Vmáx de 25 mM e 55,679 U.mg⁻¹, a enzima de *A. ochraceus* apresentou 13,4 mM e 42,13 U.mg⁻¹ (GUIMARÃES et al., 2007), enquanto que para

enzima *A. niveus* corresponderam a 5,78 mM e 30,46 U.mg⁻¹ (GUIMARÃES et al., 2009).

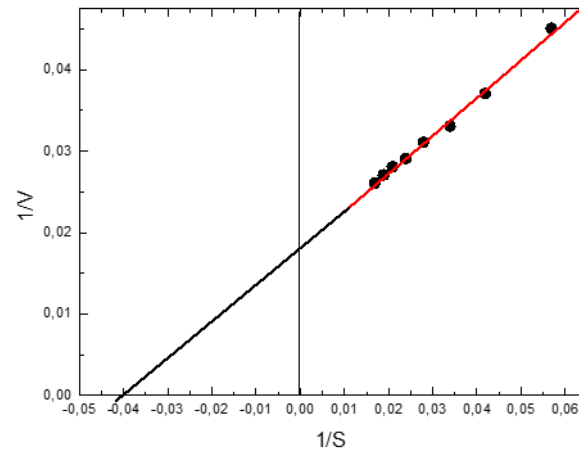


Figura 11 - Representação gráfica de Lineweaver e Burk para os parâmetros cinéticos da β -frutofuranosidase - I

4. CONCLUSÕES

O fungo *A. versicolor* isolado da mata atlântica paranaense tem potencial biotecnológico, pois apresentou produção de β -frutofuranosidase com características interessantes para aplicação industrial. A produção dessa enzima por esse fungo, utilizando bagaço de maçã como fonte indutora, é inédita, além de ser uma boa alternativa para reduzir custos da produção de enzimas. A utilização do planejamento experimental por DCCR auxiliou na otimização das condições de cultivo, proporcionando uma melhora significativa na produção da β -frutofuranosidase.

O processo de purificação dessa enzima revelou a presença de duas isoformas (FFase I e FFase II). A enzima caracterizada (FFase I) apresentou termoestabilidade em até 60°C e estabilidade ao pH numa faixa de 3 a 6. As características bioquímicas apresentadas pela β -frutofuranosidase - I mostram potencial para aplicação em processos industriais que exigem estabilidade em temperaturas moderadas e pH ácidos.

5. REFERÊNCIAS

- ALEGRE ACP, POLIZELI MLTM, TERENCE HF, JORGE JA, GUIMARÃES LHS (2009) Production of thermostable invertase by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. Braz. J. Microbiol. 40:612-622.
- BAGAL DS, VIJAYAN A, AIYER RC, KAREKAR RN, KARVE MS (2007) Fabrication of sucrose biosensor based on single mode planar optical wave guide using co-immobilized plant invertase and GOD. Biosens.Bioelectron. 22: 3072-3079.
- BAGAL-KESTWAL D, KARVE MS, KAKADE B, PILLAI VK (2008) Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ion in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity. Biosens. Bioelectron., 24: 657-664.
- BELCARZ A, GINALSKA, G, LOBARZEWSKI J, PENEL C (2002) The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). Biochim. Biophys. Acta. 1594:40-53.
- BEZERRA MA, SANTELLI RE, OLIVEIRA EP, VILLAR LS, ESCALEIRA LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta. 76:965-977.
- BOX GEP, HUNTER WG, HUNTER JS (1978) Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. John Wiley and Sons Inc., New York, USA. Pages: 653.
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- COELHO GD (2002) Produção e caracterização do sistema xilanolítico excretado por *Aspergillus giganteus*. 57 p. (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Rio Claro.

DANISMAN T, TAN S, KACAR Y, ERGENE A (2004) Covalent immobilization of invertase on microporous PHEMA–GMA membrane. *Food. Chem.* 85: 461–466.

GOOSEN C, YUAN XL, VAN MUNSTER JM, RAM AF, VAN DER MAAREL MJ, DIJKHUIZEN L (2007) Molecular and biochemical characterization of a novel intracellular invertase from *Aspergillus niger* with transfructosylating activity. *Eukaryot. Cell.* 6:674-681.

GOSH K, Dhar A, Samanta TB (2001) Purification and characterization of an invertase produced by *Aspergillus ochraceus* TS. *Indian J. Biochem. Biophys.* 38:180-185.

GUIMARÃES LHS, TERENCE HF, POLIZELI MLT, JORGE JA (2007) Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. *Enzym. Microb. Technol.* 42: 52–7.

GUIMARÃES LHS, SOMERA AF, TERENCE HF, POLIZELI MLTM, JORGE JA (2009) Production of β -fructofuranosidases by *Aspergillus niger* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. *Process. Biochem.* 44:237-241.

KAMMOUN R, NAILI B, BEJAR S (2008) Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour. Technol.* 99:5602-5609.

KOTWAL SM, SHANKAR V (2009). Immobilized Invertase. *Biotechnol. Adv.* 27: 311-322.

KOTZELSKI, J.; STAUDE, E. (1996) Kinetics of bonded invertase: asymmetric polysulfone membranes. *J. Membr. Sci.* 114:201-214.

LAHIRI, S.; BASU, A.; SENGUPTA, S.; BANERJEE, S.; DUTTA, T.; SOREN, D.; CHATTOPADHYAY, K.; GHOSH, A.K. (2012) Purification and characterization of a trehalase-invertase enzyme with dual activity from *Candida utilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 522:90-99.

MADHUSUDHAN MC, RAGHAVARAO KSMS (2011) Aqueous two phase extraction of invertase from baker's yeast: Effect of process parameters on partitioning. *Process Biochem.* 46:2014–2020.

MILLER GL(1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*,31:426-489.

MONA MR, MOHAMED UN (2009). Production, Purification and Characterization of Extracellular Invertase from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 by Solid-State Fermentation of red carrot residue. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 3: 1910-1919.

MURUGAN, S; ARNOLD, D.; PONGIYA, U.D.; NARAYANAN, P.M.(2011) Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. *Enzyme Res.* 2011:1-7.

OMORI T, UENO K, MURAMATSU K, KIKUCHI M, ONODERA S, SHIOMI N (2010) Characterization of recombinant β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Chem. Cent. J.*, 4:1-10.

ORIENTE A. 2014 Produção e caracterização físico-química de celulasas do *Aspergillus niger* urm 6642 isolado da mata atlântica cultivado em resíduos agroindustriais. 25p. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná.

OTTONI CA, CUERVO-FERNÁNDEZ R, PICOLI RM, MOREIRA R, GUILARTE-MARESMA B, SILVA ES, RODRIGUES MFA, MAIORANO AE (2012) Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. *Braz. J. Chem. Eng.* 29:49-59

PATIL PR, REDDY GSN, SULOCHANA MB (2011) Production, optimization and characterization of β -fructofuranosidase by *Chrysonilia sitophila* PSSF84 – A novel source. *Ind. J. Biotech.* 10:56-64.

PROTZEK E. C., FREITAS R. J. S., WASCZYNSKJ N. (1998). Aproveitamento do bagaço de maçã na elaboração de biscoitos ricos em fibra alimentar. *B. Ceppa*, 16:263-275.

QUERSHI AS, KHUSHK I, BHUTTO MA, DAHOT MU, HAQ I, BANO S, IQBAL H (2012). Production and partial characterization of invertase from *Mucor geophyllus* EFRL 03. Afr. J. Biotechnol. 11:10736-10743.

REDDY PP, REDDY GSN, SULOCHANA MB (2010) Highly thermostable β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* PSSF21 and its application in the synthesis of fructooligosacharides from agro industrial residue. Asian. J. Biotechnol. 2;86-89.

REHM J, WILLMITZER L, HEYER AG (1998) Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. J. Bacteriol. 180:1305-1310.

RUBIO MC, MALDONADO MC (1995) Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. Curr. Microbiol. 31:80-83.

RUSTIGUEL CB, TERENCE HF, JORGE JA, GUIMARÃES LHS (2010) A novel silver-activated extracellular β -D-fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 67:10-15.

TANAKA N, OHUCHI N, MUKAI Y, OSAKA Y OHYANI Y TABUCHI M; BHUIYAN MSA, FUKUI H, HARASHIMA S, TAKEGAWA K (1998) Isolation and Characterization of an Invertase and Its Repressor Genes from *Schizosaccharomyces pombe*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 245:246-253.

VAIDYA BK, MUTALIK SR, JOSHI RM, NENE SN, KULKARNI BD (2009) Enhanced production of amidase from *Rhodococcus erythropolis* MTCC 1526 by medium optimisation using a statistical experimental design. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:671-678.

WANG L, ZHOU H (2006) Isolation and identification of a novel *Aspergillus japonicus* JN19 producing beta-fructofuranosidase and characterization of the enzyme. J. Food Biochem. 30:641-658.

WARCHOL M; PERRIN S; GRILL JP; SCHNEIDER F (2002) Characterization of a purified β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. Lett Appl. Microbiol. 35:462-467.

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

WOLSKA-MITASZKO B, JAROSZUK-SCISEL J, PSZENICZNA K (2007) Isoforms of trehalase and invertase of *Fusarium oxysporum*. Mycol Res. 111:456-465.

YOSHIKAWA JS, AMACHI S, SHINOYAMA H, FUJII T (2006) Multiple β -fructofuranosidases by *Aureobasidium pullulans* DSM2404 and their roles in fructooligosaccharide production. FEMS Microbiol. Lett. 265:159-163.