

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM  
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA INVERTASE  
OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE SOJA COM *Aspergillus  
casiellus***

**LEXANDRA NOVAKI**

**TOLEDO – PR  
2009**

**LEXANDRA NOVAKI**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA INVERTASE  
OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE SOJA COM *Aspergillus  
casiellus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em **Processos Químicos e Bioquímicos**.

Orientador: Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan

Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Marina Kimiko Kadowaki

**TOLEDO – PR  
2009**

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária  
UNIOESTE/Campus de Toledo.  
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

N935p Novaki, Lexandra  
Produção, purificação e caracterização parcial da invertase  
obtida por fermentação em estado sólido de soja com  
*Aspergillus caseiellus* .-- Lexandra Novaki. -- Toledo, PR :  
[s. n.], 2009.  
56 f.

Orientador: Drº. Sahah Din Mahmud Hasan  
Dissertação (Mestre em Engenharia Química) -  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo.  
Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

1. Engenharia química 2. Biotecnologia 3. Fermentação  
em estado sólido 4. Farelo de soja 5. Enzimas 6. *Aspergillus*  
*caseiellus* 7. Fungos 8. Purificação I. Hasan, Salah Din  
Mahmud, Or. II.T

CDD 20. ed. 660.28449  
660.634

*Aos meus pais, Alexandre e Angélica,  
Dedico.*

*"A ciência serve para nos dar uma idéia  
de quão extensa é a nossa ignorância."*

*(Félicité Robert de Lamennais)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, força maior, pela vida.

À minha família, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo amor incondicional.

Ao Cláudio Auer, pelo apoio, amor e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan, pelos esclarecimentos, ensinamentos e pela orientação deste trabalho.

À minha co-orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Marina Kimiko Kadowaki, pelo seu papel fundamental para o desenvolvimento da pesquisa, pela paciência e tempo dedicados sempre que necessário, e, acima de tudo, pela amizade.

À acadêmica de Bacharelado em Biologia, Diandra Andrade, pela ajuda e dedicação nos experimentos.

À Josielle, Alessandra, Sandra, Taiomara, Diandra, Rodrigo e Aramis, grande equipe do laboratório de Bioquímica e Microrganismos, pelos bons momentos de amizade e companheirismo.

Ao Edison, sempre à disposição no suporte técnico.

À empresa Sadia de Toledo – PR, pelo fornecimento da soja.

Aos professores do mestrado em Engenharia Química, por todo conhecimento passado.

Aos colegas de turma do mestrado, pela amizade e carinho.

À Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto.

À UNIOESTE Toledo/Cascavel, pela disponibilidade de seus laboratórios de pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>vii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Objetivos .....	3
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1. Fermentação em estado sólido .....	4
2.1.1. Microrganismos comumente utilizados em FES.....	5
2.1.2. Substratos utilizados em FES .....	7
2.1.2.1. Farelo de soja como substrato para FES .....	9
2.2. Invertase ( $\beta$ -frutofuranosidase) .....	11
2.3. Métodos de purificação da invertase .....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1. Microrganismo .....	15
3.2. Preparo do substrato .....	18
3.3. Fermentação em estado sólido (FES).....	18
3.4. Extração das enzimas .....	19
3.5. Dosagem de proteínas solúveis do extrato .....	19
3.6. Determinação da atividade da invertase .....	19
3.7. Recuperação da enzima do extrato bruto mediante precipitação com solventes orgânicos.....	20
3.8. Purificação da invertase .....	20
3.8.1. Purificação da invertase em coluna de troca iônica DEAE-Celulose.....	20
3.8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	21

3.8.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE).....	22
3.9. Influência dos parâmetros pH e temperatura na atividade enzimática .....	22
3.10. Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH .....	23
3.11. Determinação de carboidratos neutros.....	23
3.12. Efeito de solventes orgânicos, íons, agentes redutores e detergente sobre a atividade da invertase .....	24
3.13. Determinação da especificidade ao substrato.....	24
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
4.1. Obtenção de invertase de <i>Aspergillus caseiellus</i> .....	25
4.2. Recuperação da enzima mediante precipitação com solventes orgânicos e sulfato de amônio.....	27
4.3. Purificação da invertase em coluna de troca iônica DEAE-Celulose.....	29
4.4. Análise dos parâmetros pH e temperatura na atividade enzimática.....	34
4.5. Determinação da estabilidade térmica da invertase purificada .....	36
4.6. Efeito de íons, agentes quelante e redutores sobre a atividade da invertase ....	39
4.7. Determinação dos carboidratos neutros.....	41
4.8. Especificidade ao substrato da invertase de <i>A. caseiellus</i> .....	41
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>43</b>
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>45</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo sugerido para a formação do complexo ativo invertase-sacarose.....	13
<b>Figura 2.</b> Reação de hidrólise da sacarose pela invertase .....	14
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografia <i>Aspergillus caseiellus</i> .....	17
<b>Figura 4.</b> Perfis da produção de invertase pelo microrganismo <i>A. caseiellus</i> cultivado sobre farelo de soja e soja bruta (em meio mineral Czapeck ou água corrente), a 25°C em processo de FES em batelada .....	26
<b>Figura 5.</b> Perfis cromatográficos da invertase de <i>Aspergillus caseiellus</i> em coluna de cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose. As frações reunidas em cada etapa estão indicadas por flechas (→). (A)1ª coluna DEAE-celulose. (B) 2ª coluna DEAE-Celulose .....	31
<b>Figura 6.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da invertase do <i>Aspergillus caseiellus</i> . Massa molecular dos marcadores: Fosforilase b (97kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase carbônica (30 kDa), Inibidor da tripsina (20,1kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa).....	33
<b>Figura 7.</b> Determinação da Massa molecular da Invertase do <i>Aspergillus caseiellus</i> purificada. Massa molecular da invertase: 25,5 kDa .....	33
<b>Figura 8.</b> Influência da temperatura sobre a atividade da invertase .....	34
<b>Figura 9.</b> Influência do pH sobre atividade da invertase incubada a 60°C.....	36
<b>Figura 10.</b> Estabilidade térmica da invertase.....	37
<b>Figura 11.</b> Estabilidade da invertase a diferentes pHs à temperatura de 60°C .....	38
<b>Figura 12.</b> Estabilidade da invertase a diferentes pHs à temperatura de 70°C .....	39
<b>Figura 13.</b> Especificidade da invertase de <i>A. caseiellus</i> a diferentes substratos.....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Produção de compostos bioativos por FES (adaptado de PANDEY, SOCCOL & MITCHELL, 2000) .....	10
<b>Tabela 2.</b> Perfis das frações obtidas na precipitação com sulfato de amônio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	27
<b>Tabela 3.</b> Precipitação da invertase com solventes orgânicos.....	28
<b>Tabela 4.</b> Recuperação da invertase do extrato bruto pela utilização de choque-térmico .....	29
<b>Tabela 5.</b> Etapas de purificação da invertase de <i>A.casiellus</i> .....	30
<b>Tabela 6.</b> Dados comparativos da purificação de invertase de diferentes fontes.....	32
<b>Tabela 7.</b> Efeito de íons (na forma de soluções salinas), solventes, agentes quelante e redutores sobre a atividade da invertase de <i>Aspergillus casiellus</i> .....	40

## NOMENCLATURA

BDA – batata dextrose ágar  
BSA – Bovine Serum Albumine  
DEAE – dietilaminoetil  
DTT – ditioneitol  
DMSO - dimetilsulfóxido  
D.N.S. – ácido 3,5-dinitro salicílico  
EDTA – ácido etileno-diamino-tetracético  
FES – fermentação em estado sólido  
FOS – frutooligossacarídeos  
kDa – Kilo Daltons  
PAGE – gel de poliacrilamida  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
Tris – tris (hidroximetil) amino etano  
U – unidade enzimática

NOVAKI, Lexandra. Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus caseiellus*. 56p. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

## RESUMO

A invertase, enzima encontrada em leveduras, sobretudo na espécie *Sacharomyces cerevisiae*, invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos, é uma das principais responsáveis pela hidrólise da sacarose para a formação de açúcar invertido e é utilizada por indústrias alimentícias e farmacêuticas, na hidrólise da rafinose, inulina e gentianose. No presente trabalho objetivou-se a purificação e caracterização parcial da invertase, obtida por fermentação em estado sólido. A invertase foi produzida por *Aspergillus caseiellus* utilizando como substrato farelo de soja por um período de 72 a 220h, a 25 °C. A extração das enzimas foi feita utilizando shaker a 120 rpm por um período de 1h. O extrato obtido foi filtrado e estocado em freezer. A recuperação da enzima invertase foi feita através de precipitação das proteínas com solventes orgânicos, sulfato de amônio e através de choque térmico. A purificação da invertase foi conduzida em coluna de DEAE-celulose. Foram caracterizados atividade enzimática do material fermentado, a estabilidade quanto à temperatura e ao pH, temperatura e pH ótimos, efeito da presença de íons, quelantes, agentes redutores e detergentes, além da determinação de carboidratos neutros e especificidade ao substrato. A atividade específica do extrato bruto foi de 1029,75 após um período de 72h de fermentação usando o farelo de soja como substrato. A recuperação por precipitação por sulfato de amônio e solventes foi menos eficiente que um choque térmico para a recuperação da invertase do extrato bruto. A enzima foi parcialmente purificada através de precipitação por choque térmico (utilizando sobrenadante) e cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose com um fator de purificação de 30,30 vezes e rendimento de 42,70%. As análises eletroforéticas estimaram a massa molecular da invertase estudada em torno de 25,5 kDa. Após ser submetida às etapas de purificação, a enzima manteve as condições ótimas de *pH* 4,0 e de temperatura 70 °C. Após 24 horas de incubação em pH 4,0, a invertase homogênea manteve 50% de atividade enzimática residual. A invertase demonstrou

termoresistência em temperaturas de 60 a 70°C não atingindo o tempo de meia vida em 240 minutos. Nas temperaturas de 75 a 80°C foram mantidas aproximadamente 40% da atividade residual após 4 horas de incubação. A invertase parcialmente purificada não demonstrou a necessidade de íons metálicos para a ativação catalítica, mas a presença de íons  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Cu}^+$  provocaram aumento da atividade, enquanto que  $\text{Sn}^{2+}$  diminuiu a atividade catalítica. O conteúdo de carboidratos corresponde a 36,57% da massa total de proteína. A invertase do *A. caseiellus* demonstrou ser especificidade à sacarose. Para a purificação da invertase de *Aspergillus caseiellus*, induzido por farelo de soja, foram necessários 2 passos constituídos de colunas cromatográficas de troca-iônica DEAE-Celulose, o que torna o processo viável e com tempo despendido em relação a outros processos. O uso de resíduo agroindustrial para obtenção da invertase torna-se uma ferramenta para o desenvolvimento de tecnologias limpas, convertendo o resíduo em questão em um produto de maior valor agregado.

Palavras-chave: invertase, farelo de soja, *Aspergillus caseiellus*, fermentação em estado sólido, caracterização bioquímica, purificação.

NOVAKI, Lexandra. Production, purification and partial characterization of invertase obtained from solid state cultivation of *Aspergillus caseiellus* on soybean substrate. 56p. 2009. Master dissertation in Chemical Engineering West Paraná State University.

## ABSTRACT

The invertase, enzyme found in yeast, above all in the *Sacharomyces cerevisiae* species, invertebrate, vertebrate, green alga, bacteria, vegetal and fungus, is one of the principal accountable for sucrose hydrolysis to form the inverted syrup, is used by the food industry and pharmacy, in the hydrolyses of raffinose, inulin and gentianose. In the present work, the invertase was produced by *Aspergillus caseiellus* through solid state fermentation, using the industrial waste of soy bran, during a period of 72 h at 25°C. The enzyme extraction was done by shaking at 120 rpm to period of 1h. The extract obtained was filtered and stocked in freezer. The enzyme recovery was done throughout the protein precipitation with organic solvents, ammonium sulphate and thermal shock. The invertase purification was carried-out in anion-exchange chromatography DEAE-cellulose. It was characterized the enzyme activity of fermented material, the stability relationship to temperature and pH, optimum temperature and pH, effect of the presence of some ions, chelating, reductors agents and detergents, beyond the neutral carbohydrate content determination and specificity to the substrate. The specific enzyme activity was 1029,75 U/mg after the period of 72h of fermentation using soybean bran as substrate. The precipitation with ammonium sulphate and solvents was less efficient than thermal shock for the invertase recovery. The enzyme was purified through thermal shock and anion-exchange chromatography in DEAE-cellulose with a purification factor of 30,30 fold and a yield of 42,70%. The electrophoretic analyses demonstrated that the studied invertase presents molar mass around 25.5 kDa. After submitted to the purification steps, the enzyme showed optimum pH 4.0 and temperature 70°C. In relation to the stability, after 24 hours of incubation at pH 4.0, the invertase maintained 50% of residual activity. The invertase showed thermal stability at 60 – 70°C not arrive the half-life time in 240 minutes was observed 40% of the catalytic capacity remained. In temperatures of 75-85°C, 40% of residual activity were maintained after 4h of

incubation. The partially purified invertase didn't need metallic ions for catalytic activity, but the presence of  $Al^{3+}$  and  $Cu^{+}$  improved the activity, and  $Sn^{2+}$  challenged decrease in the activity. Sugar content corresponded to 36.57% of total mass protein. The invertase of *A. caseiellus* demonstrated specificity to sucrose. For purification of the invertase of *Aspergillus caseiellus*, induced through soybean bran, were needed 2 steps made up anion-exchange chromatography DEAE-cellulose, which turn the process practible and with few time despended relationship to the others process. The use of agroindustrial waste to obtain invertase is becoming an instrument to development of clean technology, converting the waste in a valuable product.

Key-words: invertase, soy bran, *Aspergillus caseiellus*, solid state cultivation, biochemical charecterization, purification.

## 1. INTRODUÇÃO

Em processos industriais a invertase ou  $\beta$ -frutofuranosidase é usada para obtenção do xarope de açúcar invertido. O açúcar invertido (xarope de glicose e frutose) é amplamente utilizado na indústria de confeitos, na panificação e produtos afins, na formulação de cremes para recheio e de geléias. O uso da invertase está principalmente relacionado à indústria alimentícia, tanto na fabricação do xarope de glicose e frutose (açúcar invertido) quanto com a formação dos frutooligossacarídeos (SAID & PIETRO, 2004).

A invertase é encontrada em leveduras, sobretudo na espécie *Sacharomyces cerevisiae*, invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos (VITOLLO, 2004). Um método de obtenção da invertase é através da Fermentação em Estado Sólido (FES). O interesse neste tipo de fermentação vem da sua simplicidade e proximidade das condições de crescimento natural de muitos microrganismos, especialmente fungos (SELVAKUMAR, ASHAKUMARY & PANDEY, 1997), do consumo reduzido de energia e da não necessidade de utilização de equipamentos complexos e sistema de controle sofisticado. Devido à ausência de água livre, pequenos fermentadores são necessários e os processos de recuperação do produto são feitos com maior facilidade (ROBINSON, SINGH & NIGAM, 2001; DEL BIANCHI, MORAES & CAPALBO, 2001).

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental. Estes resíduos e subprodutos gerados pela agroindústria podem ser reaproveitados para obtenção de novos produtos (PINTO et al., 2005).

Dentre os vários substratos citados na literatura, como farelo de trigo, torta de coco e babaçu, está a soja, que pode ser usada na forma de farelo ou grãos pré-tratados (triturados). Cereais, como o milho e o trigo e oleaginosas, como a soja, são produtos de composição química e bioquímica complexa que têm sido usados como matéria-prima nas mais diversas pesquisas que visam a exploração do potencial destes substratos, no campo da ciência e tecnologia de alimentos, pesquisa com biodiesel, na indústria farmacêutica e produtos naturais, etc. Sabe-se que a soja e o milho são fontes ricas para a obtenção de importantes metabólitos, incluindo

enzimas hidrolíticas de diferentes tipos, como lipases, proteases e glicosidases, entre outras (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

Nas publicações encontradas sobre a produção de enzimas e outros metabólitos (PANDEY, SOCCOL & MITCHELL, 2000), por fermentação de cereais (na forma de farinha, farelo, etc.) verifica-se a utilização de soja do tipo convencional. Ao término do processo FES para produção de enzimas, os sólidos contêm células do fungo (micélio), além de substrato, enzimas e outros metabólitos. As enzimas não estão distribuídas de forma homogênea no meio fermentado e, neste caso, uma extração eficiente é determinante na produção comercial da enzima por FES.

Segundo Castilho et al. (2000), a eficiência de extração é um fator crítico e importante no balanço econômico da FES para a produção de enzimas. Os autores ressaltam a necessidade de estudos nessa área de modo a tornar a Fermentação em Estado Sólido uma alternativa viável para a produção de enzimas.

Após a fermentação e extração, as enzimas podem ser separadas e purificadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação desses e de outros métodos. O grau de pureza necessário da enzima depende de sua aplicação final e será determinado pelas características físico-químicas, propriedades biológicas, fonte da qual a enzima está sendo purificada e tecnologia de purificação disponível (KILIKIAN & PESSOA JR., 2001).

Atualmente, invertases provenientes de uma grande diversidade de microrganismos vêm sendo estudadas e purificadas, no entanto a purificação da invertase produzida pelo fungo *Aspergillus caseiellus* ainda não foi relatada.

## 1.1. OBJETIVOS

O objetivo geral foi a purificação e a caracterização parcial da enzima invertase produzida pelo fungo *Aspergillus caseiellus*, usando como substrato o farelo de soja.

Os objetivos específicos foram:

- comparação da recuperação da enzima do extrato bruto mediante precipitação com solventes orgânicos (etanol e acetona) e com sulfato de amônio;
- purificação da invertase através de colunas cromatográficas;
- caracterização bioquímica da atividade da invertase quanto à temperatura, ao pH e eficiência catalítica.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Fermentação em estado sólido

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é um processo comumente empregado em países orientais visando a elaboração de alimentos e que vem ganhando adeptos em sua utilização entre pesquisadores da Europa e Continente Americano. Entende-se fermentação em estado sólido como um processo onde há uma cultura de microrganismos sobre ou dentro de matriz sólida (substrato ou material inerte), em que o substrato atua como fonte de carbono onde o conteúdo líquido ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (PANDEY, SOCCOL & MITCHELL, 2000).

Como a fermentação em estado sólido é a fermentação na ausência de água livre, a recuperação de seus produtos requer a extração do sólido do meio fermentado. Um extrator comum é a água destilada ou deionizada. Outros extratores tem sido utilizados, como uma solução de NaCl 1% para protease e tampão succinato 0,02 M para lipase e protease (AIKAT & BHATTACHARYYA, 2000). No processo de FES deve-se levar em consideração alguns aspectos importantes, como a seleção do microrganismo, a escolha do substrato, a otimização dos parâmetros do processo, o isolamento e a purificação do produto, dentre outros fatores. A FES reproduz processos microbiológicos naturais. No caso de aplicações industriais, estes processos naturais, se monitorados, produzem o produto desejado (COUTO & SANROMÁN, 2006). Assim, vários produtos de valor agregado têm sido produzidos por esta técnica fazendo uso de matérias-primas provenientes da natureza (PANDEY, SOCCOL & MITCHELL, 2000).

O controle da umidade, da temperatura e do pH do meio, a velocidade e a frequência de agitação, as condições de transferência de oxigênio e de nutrientes, as características do substrato, além de características e estimativas de crescimento da automação do processo são os parâmetros mais frequentemente analisados em diversos estudos revistos (SCHMIDELL, 2001).

O meio de cultivo deve atender à demanda nutricional do microrganismo produtor, aos objetivos do processo e à escala de operação. Sua seleção depende, para a maioria dos processos em larga escala, do custo, disponibilidade e características dos seus componentes (MORAES, 2001).

Este tipo de fermentação tem mostrado também um enorme potencial tecnológico no que diz respeito ao desenvolvimento de produtos que apresentam componentes derivados de microrganismos como rações para animais, produtos para a indústria alimentícia, química e farmacêutica. Estas aplicações envolvem a biotransformação de produtos e resíduos agrícolas para enriquecimento nutricional, produção de biomassa e formação de produtos com alto valor agregado, como metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, micro-pesticidas e bioerbicidas, biossurfactantes, biocombustíveis, compostos aromáticos, etc. (PANDEY, SOCCOL & MITCHELL, 2000).

Na comparação de uma planta que produziu 100 m<sup>3</sup> de lipase concentrada por ano, Castilho et al. (2000) concluíram que a FES foi mais vantajosa economicamente se comparada com a fermentação submersa, devido ao uso de substratos de baixo custo. O produto obtido através da FES apresentou um custo unitário 47% menor que a lipase de mercado, enquanto que pelo processo submerso o custo unitário foi 68% maior que do mercado. Ashokkumar e colaboradores (2001) afirmaram que a produção de enzimas por FES tem vantagens sobre a fermentação submersa com relação à simplicidade na operação, alta produtividade na fermentação, é menos favorável ao crescimento de contaminantes (bactérias e leveduras) e tem formação de produtos mais concentrados quando feita em escala laboratorial.

### **2.1.1. Microrganismos comumente utilizados em FES**

Diferentes tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos. Os fungos produzem em FES apresentando rendimentos de obtenção de enzimas compatíveis com a fermentação submersa e, em alguns casos, produzem enzimas e isozimas que não são produzidas em meio líquido (HOLKER, HOFER & LENZ, 2004).

Fungos filamentosos, entretanto, possuem melhor capacidade de crescer na ausência de água livre (AQUINO, 2000). Os meios sólidos se assemelham aos meios naturais para o crescimento desses seres vivos, suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas, que propiciam a colonização de matrizes sólidas porosas (DURAND, 2003). O potencial industrial dos fungos filamentosos tem estimulado pesquisas para o desenvolvimento de processos de fermentação em larga escala, purificação de enzimas e métodos para melhoramento de linhagens, resultando em uma melhor contribuição do uso de fungos na indústria atual (AQUINO, 2000).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são muito utilizados na produção de enzimas. Existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo e de plantas em decomposição, estes fungos produzem um grande número de enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas na biotecnologia (Wainwright, 1995, citado por GUIMARÃES et al., 2007). Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se o *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fulmigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor* (SLIVINSKI, 2007).

Inúmeras enzimas destes microrganismos vêm sendo isoladas, purificadas e têm aplicabilidade nos mais diferentes ramos da indústria. Algumas espécies como *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus soyae* são utilizadas na produção de alimentos. *Aspergillus oryzae* é grande produtor de  $\alpha$ -amilases,  $\alpha$ -galactosidases e enzimas pectinolíticas (SHANKAR & MULIMANI, 2007). Botella et al. (2007) avaliaram a produção de xilanases e pectinases pelo fungo *Aspergillus awamori* determinando um grande potencial deste microrganismo na produção de enzimas.

A utilização dos fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse comercial é também vantajosa devido ao fato destes microrganismos excretarem estas proteínas para o meio de cultura, o que facilita o processo de obtenção e purificação destas moléculas (REIS, 2007).

Algumas espécies, como *A. glaucus* e *A. repens*, são importantes agentes de deterioração de alimentos. Outras espécies, como *A. oryzae* e *A. soyae*, são utilizadas na produção de alimentos. O *A. niger* é importante na produção comercial de ácido cítrico, glucônico e gálico e das enzimas  $\beta$ -galactosidase, amiloglucosidase, lipases e pectinases. O *A. oryzae* é grande produtor de  $\alpha$ -amilase e enzimas pectinolíticas (LIU et al., 2006).

Para a produção de protease, Tunga e colaboradores (2003) utilizaram *A. parasiticus*, que em cultura de substrato sólido apresentou uma quantidade substancial de atividade proteolítica. Guimarães et al. (2007) utilizaram o fungo *Aspergillus ochraceus* para produzir a invertase.

Invertases de diversos fungos filamentosos têm sido caracterizadas, como exemplo podem ser citados do *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium chrisogenum* (Romero-Gómez et al., 2000 e Chang 2000, citados por GUIMARÃES et al. , 2007) e *Schwanniomyces occidentalis* (ÁLVARO-BENITO, 2007).

Viniegra-Gómez et al. (2007), separaram três linhagens de *A. niger* e observaram a maior produção e com atividade mais alta na fermentação em estado sólido comparado à fermentação submersa. KRONBAUER et al. (2007) avaliaram a produção de xilanase por *Aspergillus casingii* induzida com bagaço de cevada em fermentação submersa. A atividade enzimática da invertase tem sido caracterizada de forma significativa também em plantas e microrganismos. Dentre vários microrganismos, o *Sacharomyces cerevisiae* é particularmente interessante porque sintetiza duas invertases, uma proteína periplasmática e uma proteína citosólica não glicolisada. A *candida utilis* também possui estes dois tipos de invertase (GUIMARÃES et al., 2007).

### **2.1.2. Substratos utilizados em FES**

Geralmente, os substratos para FES são compostos ou produtos heterogêneos da agricultura ou subprodutos da agroindústria. Suas estruturas macromoleculares básicas (celulose, amido, pectina, lignocelulose, fibras) conferem propriedades de sólido aos substratos. A macromolécula estrutural serve de matriz sólida e fornece o carbono e as fontes de energia (açúcares, lipídios, proteínas, ácidos orgânicos) (DOS SANTOS, 2006). A aplicação de resíduos é uma forma de utilizar substratos alternativos, solucionar problemas de poluição para as indústrias e de custo na produção de enzimas (COSTA, 2008).

O material sólido utilizado em fermentação no estado sólido é, geralmente, fragmentado e de natureza granular ou fibrosa que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A quantidade de água presente varia

consideravelmente de acordo com o material utilizado. Os substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho, mandioca) são, na maioria das vezes, fermentados entre 25 e 60% de umidade inicial. No entanto, os substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço, farelos e outros) permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados - 60 a 80% sem o aparecimento de água livre (SOCCOL & VANDERBERGHE, 2003).

Os substratos às vezes necessitam de um pré-tratamento, a fim de fornecer novas características físicas, principalmente o aumento da porosidade e da capacidade de retenção de água adequando as condições necessárias ao crescimento e a produção de metabólitos pelo microrganismo (DEL BIANCHI, MORAES & CAPALBO, 2001).

Para a produção industrial de enzimas microbianas, os microrganismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; produzirem a enzima em velocidade elevada, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação devem ser simples; a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade. O êxito da produção industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos microrganismos é alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (Fellows, 1994 citado por SLIVINSKI, 2007).

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos disponibiliza substratos alternativos e ajuda a resolver problemas relacionados à disposição inadequada de resíduos sólidos (MARÓSTICA & PASTORE, 2005). Segundo Souza & Santos (1998) citados por Dos Santos (2006), a América Latina produz mais de 500 milhões de toneladas de subprodutos e resíduos agroindustriais, sendo que desses, o Brasil produz mais da metade, resíduos esses que poderiam ser mais bem aproveitados. Dos Santos (2006) avaliou a utilização de resíduos do processamento de batata e cenoura para a produção de enzima amiloglucosidase por *Aspergillus awamori* por FES concluindo que este resíduo é um bom substrato para o fungo citado.

Na literatura é encontrado que na formulação do meio de fermentação várias fontes de carbono (substrato principal) são utilizadas, entre elas cita-se: farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de cevada, bagaço de cana-de-açúcar, torta de coco, torta de soja, torta de babaçu, celulose, palha de trigo, grãos de milho, farinha e farelo de soja, grãos de soja, peixe, mandioca, entre outros, além da incorporação

adicional de alguma fonte de carbono indutora para a produção de lipases (óleos, ácidos graxos, detergentes). Em alguns casos, fontes de nitrogênio complementar são utilizadas: licor de milho, extrato de levedura, uréia, etc. A escolha da cada meio, logicamente, irá depender do produto final que se deseja obter (SCHMIDELL, 2001).

Castilho et al. (2000) usaram resíduos de indústria de babaçu como substrato para a produção de lipase por *Penicillium restrictum* a fim de se fazer uma análise econômica comparativa entre a fermentação em estado sólido e a fermentação submersa, concluíram que a fermentação em estado sólido além de ser mais econômica é mais produtiva.

Trabalhos conduzidos por Pandey e colaboradores (2000) utilizaram bagaço de mandioca como substrato para processos microbianos por FES para a produção de ácidos orgânicos e compostos de aroma e sabor, pelo fato do bagaço de mandioca ser um resíduo da indústria de processamento da farinha de mandioca, rico em material fibroso e com aproximadamente 30 a 50 % de amido em base de peso seco, apresentando uma grande quantidade de material orgânico e baixo conteúdo de cinzas.

Kronbauer et al. (2007) produziram xilanase utilizando diversas fontes de carbono (resíduo ou bagaço de cevada, bagaço de cana, casca de amendoim, resíduo fibroso da mandioca, gérmen de trigo, bagaço de milho verde e casca de laranja). Dentre as fontes de carbono testadas na produção de xilanase pelo fungo *A. casingii* em condições de fermentação semi-sólida, os melhores indutores foram o bagaço de cevada seguido pela casca de amendoim com atividade específica de 9,22 U/mg e 4,55 U/mg de proteína, respectivamente.

Na tabela 1 estão diversos compostos que podem ser obtidos por FES utilizando diversos substratos.

### **2.1.2.1 Farelo de soja como substrato para FES**

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2006/07, a cultura ocupou uma área de 20,687 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 58,4 milhões de toneladas. Os Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, responderam pela produção de 86,77 milhões de toneladas de soja. A

produtividade média da soja brasileira é de 2823 kg por hectare, chegando a alcançar cerca de 3000 kg/ha no estado de Mato Grosso, o maior produtor brasileiro de soja (EMBRAPA, 2008).

**Tabela 1** - Produção de compostos bioativos por FES (adaptado de PANDEY, SOCCOL & MITCHELL, 2000).

<i>Compostos</i>	<i>Fonte</i>	<i>Substrato</i>	<i>Função</i>
Aflatoxina	<i>A. oryzae</i> , <i>A. parasitus</i>	Milho, aveia, arroz, trigo, amendoim	micotoxina
Endotoxina bacteriana	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resíduo de coco	inseticida
Ácido giberélico	<i>Giberella fujikuroi</i> , <i>Fusarium moniliforme</i>	Farelo de trigo, farinha de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar	Hormônio de crescimento para plantas
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	bagaço de cana-de-açúcar	Tratamento de doenças
Oxitetraciclina	<i>S. rimosus</i>	Milho de pipoca	Antibiótico
Surfactina	<i>B. subtilis</i>	Resíduos de soja	Antibiótico
Ciclosporina A	<i>Tolyposcladium inflatum</i>	Farelo de trigo	Drogas imunossupressivas

A soja é considerada um dos principais produtos agrícolas do mundo devido a sua alta produtividade, capacidade adaptativa e qualidade nutricional. É amplamente consumida pela população, na forma de óleo e seus derivados, como margarina e gordura hidrogenada (KHARE & KRISHNA, 1994). É um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos; também é amplamente utilizada pela indústria de adesivos e nutrientes, alimentação animal, adubos, formulador de espumas, fabricação de fibra, revestimento, papel emulsão de água para tintas. Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto (EMBRAPA, 2008).

O processo de beneficiamento da soja inicia-se com o esmagamento, no qual basicamente se separa o óleo bruto (aproximadamente 20% do conteúdo do grão) do farelo, utilizado largamente como ração animal. Entende-se como farelo de soja o

produto resultante da extração do óleo dos grãos de soja, por processo mecânico e/ou químico. O farelo de soja, nas mais diversas composições protéicas comerciais (44%, 46% e 48%), tem sido muito utilizado para alimentação animal (de uso para todas as espécies animais), sendo rico em proteínas, tiamina, colina e niacina (MACIEL, 2006).

Lu e colaboradores (2003) utilizaram farelo de soja e farelo de peixe na produção de xilanase por *Aspergillus sulphureus*, em escala piloto. Bakir et al. (2001) citados por MACIEL (2006) fizeram uso de farelo de soja, como fonte de nitrogênio, na produção de endoxilanase por *Rhizopus oryzae* e observaram que, um aumento na concentração deste composto de 1 para 2%, no meio de cultivo, levou a um aumento de 26% na produção de xilanase.

## 2.2. Invertase ( $\beta$ -frutofuranosidase)

Uma das enzimas com aplicabilidade industrial é a invertase. Esta enzima, também chamada de  $\beta$ -frutofuranosidase (E. C. 3.2.1.26) não só catalisa a hidrólise de sacarose a glicose e frutose, mas em algumas condições também é capaz de catalisar a transfrutossilacção para produzir frutooligossacarídeos (FOS) como a kestose (GF<sub>2</sub>), nistose (GF<sub>3</sub>) e 1<sup>F</sup> frutofuranosilnistose (GF<sub>4</sub>) (NGUYEN et al., 2005; MARQUEZ, 2007). Ashokkumar, Kayalvizhi & Gunasekaran (2001) afirmam que a  $\beta$ -frutofuranosidase (E. C. 3.2.1.26) catalisa a hidrólise da sacarose em quantidades equimolares de frutose e glicose, processo conhecido como inversão. Invertase hidrolisa sacarose em uma mistura de glicose e frutose sob concentrações de sacarose mais baixas que 10% (peso/vol.) e tem atividade transfructosilase sob concentrações de sacarose superiores a 10% (peso/vol.) (RUBIO, RUNCO & NAVARRO, 2002). Muitas das enzimas fructosil hidrolíticas (invertases e inulinases) possuem uma grande especificidade ao substrato (WALLIS, HEMMING & PEBERDY, 1997).

A invertase é encontrada em leveduras, sobretudo na espécie *Saccharomyces cerevisiae* (sua principal fonte), invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos (SAID & PIETRO, 2004). Isoformas distintas da invertase existem no vacúolo, citoplasma e apoplasma das células de plantas. As isoformas ácidas (pH ótimo entre 4,5 a 5,5) estão presentes no vacúolo e apoplasto,

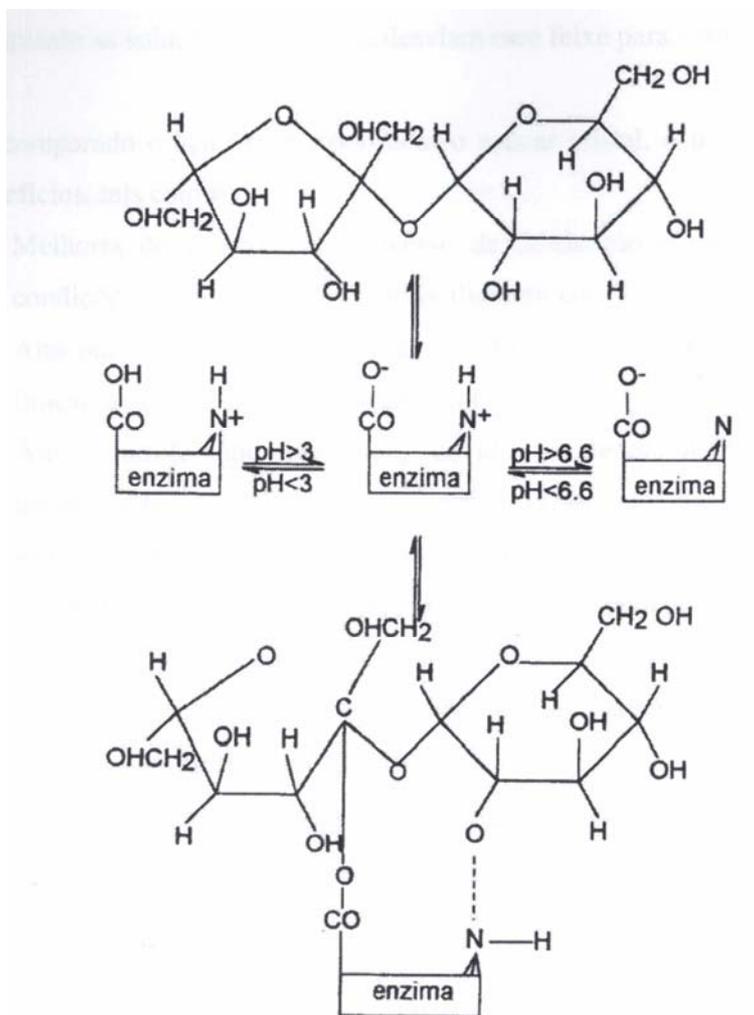
enquanto que as Isoformas de invertases neutras e alcalinas (pH ótimo 8,0) estão localizadas no citoplasma (HUSSAIN et al., 2008). As invertases usadas industrialmente são principalmente oriundas de leveduras, sendo que 80% das enzimas são externas e os 20% restante são intracelulares. A forma externa é uma glicoproteína com cerca de 50% de carboidratos, ao passo que a interna é destituída dos mesmos. Apresentam atividades catalíticas similares, mas a sua composição de aminoácidos é diferente, a invertase externa contém cisteína enquanto a interna não (MARQUEZ, 2007).

Invertases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose e glicose a partir da sacarose como matéria-prima (RUBIO, RUNCO & NAVARRO, 2002). Tomatoni & Vitolo (2007) destacaram o uso da invertase na produção de xarope de frutose usando invertase imobilizada em um biorreator de membrana. O xarope de frutose é empregado como adoçante em indústrias alimentícias, indústrias farmacêuticas e também é usado para obter frutose cristalina (ASHOKKUMAR, KAYALVIZHI & GUNASEKARAN, 2001). Merecem ser lembrados, também, outros usos da invertase, a saber, em produtos para higiene bucal com o objetivo de evitar a formação das placas dentais, na hidrólise da rafinose, inulina e gentianose para obtenção de melibiose, D-frutose e gentibiose, respectivamente, no preparo de meios de cultivo para a propagação de microrganismos não produtores de invertase, em biosensores (SAID & PIETRO, 2004).

De acordo com Bagal et al. (2007), a invertase imobilizada pode ser usada em biosensores de sacarose, muito importante para indústrias de alimentos e bebidas. A adição de invertase ao suco de fruta promove aumento de teores de glicose e frutose. A hidrólise da sacarose a 30-40°C reduz custos de produção quando se utiliza invertase imobilizada, devido à reutilização deste biocatalisador e o uso de um processo contínuo (TOMATONI & VITOLO, 2007). Montiel-González et al. (2004) descreveram um aumento na produção de invertase por FES por uma linhagem diplóide de *A. niger* isoladas pelo cruzamento parasexual entre duas linhagens mutantes melhoradas, quando comparado aos níveis alcançados por uma linhagem selvagem.

O mecanismo de ação da invertase não é totalmente conhecido, mas estudos com a enzima tem sugerido o envolvimento de um ânion carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica (MARQUEZ, 2007). Um mecanismo para a formação

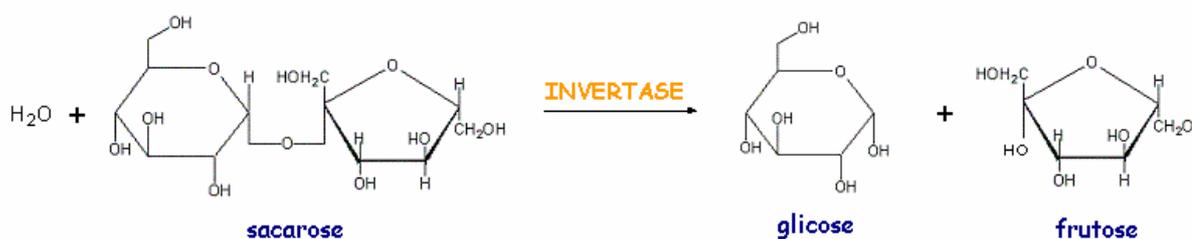
do complexo ativo invertase-sacarose foi proposto por Laidler (1958) citado por Marquez (2007), o qual está representado na Figura 1. Pode-se observar a influência do pH no mecanismo de ligação do sítio ativo da invertase com grupos ácidos e básicos.



**Figura 1** – Mecanismo sugerido para a formação do complexo ativo invertase-sacarose (MARQUEZ, 2007).

A sacarose é um dissacarídeo não redutor o qual por hidrólise com ácidos muito diluídos, resinas de troca catiônica ou a enzima invertase, fornece proporções equimolares de D-glicose e D-frutose (BARBOSA-FILHO et al., 2000). A sacarose é extensivamente utilizada em alimentos e bebidas como adoçante, e como nutriente em processos fermentativos. Ela é produzida a partir da beterraba ou da cana-de-açúcar, sendo esta última sua fonte natural mais importante (GLAZER & NIKAIDO, 1995).

A produção de açúcar invertido pode ser alcançada através da hidrólise ácida ou enzimática (figura 2). A acidez gerada na hidrólise pode ser devido à ação direta de um ácido (hidrólise homogênea) ou à liberação de  $H^+$  de uma resina catiônica (hidrólise heterogênea). O processo enzimático para a hidrólise da sacarose, por não gerar resíduos ácidos e subprodutos tóxicos, sendo desnecessária a sua neutralização, é considerada um processo limpo. Além disso, a hidrólise enzimática catalisada pela invertase produz um alto grau de hidrólise, originando um produto de alta qualidade, com baixos teores de cinzas, cor (RODRIGUES et al., 2000).



**Figura 2-** Reação de hidrólise da sacarose pela invertase.

Fonte: [http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/imagens/hidrolise\\_sacarose.GIF](http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/imagens/hidrolise_sacarose.GIF)

O fator limitante para utilização da hidrólise enzimática em escala industrial tem sido o elevado custo da invertase que está, sobretudo, associado ao baixo rendimento obtido nos processos de extração e purificação desta enzima. Por outro lado, técnicas naturais de imobilização de enzimas (auto-imobilização) sob condições bem controladas de reação tem despontado como alternativas atraentes para a utilização em processos industriais, principalmente por oferecerem grande estabilidade operacional à enzima, possibilitando contínuas reutilizações sem perda significativa de atividade (COUTINHO FILHO et al., 1999).

### 2.3. Métodos de purificação da invertase

O êxito da fabricação industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos microrganismos é alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima. Para a purificação de enzimas, assim como para outros produtos biotecnológicos, não há processos de

aplicação geral. Entretanto, o procedimento pode ser dividido em quatro etapas principais: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução (precipitação fracionada com adição de sais ou solventes orgânicos); purificação de alta resolução (cromatografias) e, finalmente, operações para acondicionamento final do produto (cristalização e liofilização) (KILIKIAN & PESSOA JR, 2005).

O termo precipitação é usado para descrever uma operação na qual uma alteração química ou física, em uma solução protéica causa a formação de partículas insolúveis de proteína. Usualmente ela é considerada um método de concentração e utilizada antes da aplicação de métodos de maior resolução na purificação (KILIKIAN & PESSOA JR, 2005). A precipitação com sulfato de amônio é usada para pré-purificação de muitas enzimas. A capacidade dos sais neutros de influenciar a solubilidade das proteínas é uma função de sua força iônica, que tanto depende de sua concentração como da valência de cátions e ânions que formam o sal. Em altas forças iônicas, conseguidas pela adição de grandes quantidades de um sal muito solúvel (por exemplo, o sulfato de amônio) a uma solução de proteína, pode ocorrer remoção de moléculas de água de hidratação das proteínas, o que leva à predominância das interações proteína-proteína, resultando em precipitação, fenômeno conhecido como *salting-out* (SLIVINSKI, 2007).

Álvaro-Benito et al. (2007), purificaram e caracterizaram a invertase produzida por *Schwanniomyces occidentalis*. Esta enzima foi concentrada e fracionada pela filtração através de 30000 MUCO PES Viva Flow System. Uma fração foi dialisada contra tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 e aplicada em DEAE-Sephacel. A proteína foi eluída usando gradiente salino de 0-0,5M. Através da SDS-PAGE foi confirmada a purificação da invertase, que apresentou massa molecular de 85 kDa. Invertases de *S. cerevisiae* ou *P. anomala* são dímeros com massa molecular média de 60-65 kDa.

Guimarães e colaboradores (2007) purificaram  $\beta$ -D-frutofuranosidase (invertase) extracelular produzida pelo fungo *Aspergillus ochraceus* induzido por bagaço de cana de açúcar. A enzima apresentou-se como uma glicoproteína homodimérica de aparentemente 135 kDa de massa molecular estimada por filtração a gel e 79k Da por SDS-PAGE. Wolska-Mitaszko et al. (2007) purificaram duas enzimas, a invertase e trealase, produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*,

crescido em meio suplementado com 1% de glicose como fonte de carbono, a primeira apresentou 120 kDa de massa molecular.

A  $\beta$ -frutofuranosidase produzida pela levedura *Rhodotorula glutinis* foi purificada por Rubio, Runco & Navarro (2002), e seu peso molecular foi estimado em 100 kDa por filtração a gel e 47 kDa por SDS-PAGE, indicando esta enzima como uma glicoproteína homodimérica.

Na literatura há relatos sobre  $\beta$ -frutofuranosidase de *A. niger* que apresentam no máximo dois monômeros, com diferentes massas moleculares. Rubio & Maldonado (1995) verificaram que invertase de *A. niger* é um dímero com massa molecular de acordo com SDS-PAGE de 47 kDa. Wallis (1997) descreveu as duas formas da  $\beta$ -frutofuranosidase de *A. niger* descritas como dímeros e SUC1 e SUC2, estas proteínas em SDS-PAGE apresentaram massas moleculares de 125 kDa e 90-120 kDa, respectivamente. Frutossiltransferase e invertase foram purificadas e caracterizadas separadamente, a massa molecular delas foi estimada entre 81-168 kDa a de 71 a 111 kDa por SDS-PAGE (NGUYEN et al., 2005).

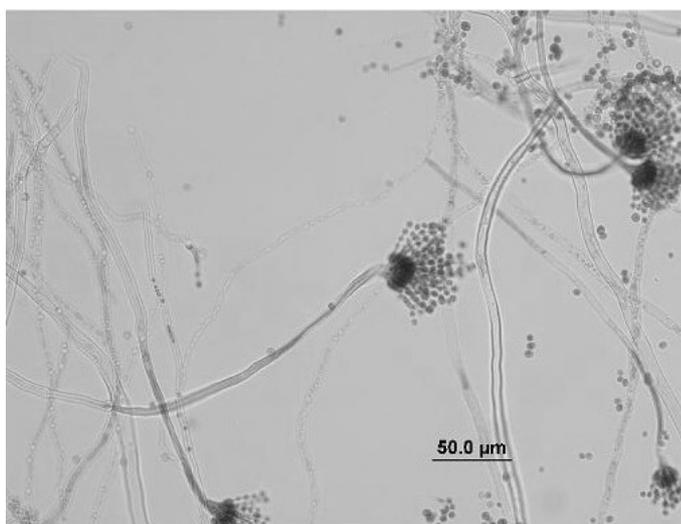
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A produção, purificação e caracterização bioquímica parcial da invertase foram realizadas no laboratório de Bioquímica e Microrganismos do CCBS – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Cascavel.

#### 3.1. Microrganismo

Neste trabalho foi utilizado o fungo *Aspergillus casingii* do Laboratório de Bioquímica da UNIOESTE – Cascavel. Este fungo foi isolado da “cama” de frango (composta de mistura de serragem, urina e fezes, alimentos não consumidos, fragmentos de pele, penas intactas e parcialmente decompostas) dos barracões de produtores integrados da Globoaves, Cascavel - PR, conforme consta na metodologia citada por Marcondes e colaboradores (2008).

O fungo foi mantido em tubo inclinado contendo 5 mL de meio sólido de batata dextrose ágar (BDA). As culturas repicadas foram crescidas a 25°C por 13 dias, sendo após, estocadas em geladeira a 4°C por até 30 dias. A fotomicrografia do *Aspergillus casingii* pode ser observado na figura 3.



**Figura 3** – Fotomicrografia do fungo *Aspergillus casingii*.

### 3.2. Preparo do substrato

O substrato utilizado para a fermentação em estado sólido foi o resíduo de farelo de soja obtido de indústria local. A coleta foi efetuada uma única vez em quantidade suficiente para manter as características sempre iguais do material durante toda a pesquisa. O material foi estocado no *freezer* até o momento da sua utilização.

### 3.3. Fermentação em estado sólido (FES)

Para a fermentação em estado sólido foram usados frascos erlenmeyer de 250 mL, nos quais foram adicionados: 2,0 g de farelo de soja, 2,0 mL de água corrente ou 2,0 mL de meio mineral Czapeck sem adição de extrato de levedura. Os frascos erlenmeyer foram selados e autoclavados a 121°C por 15 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, as culturas foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de uma solução de esporos do microrganismo *Aspergillus casingii*, preparada com água corrente ou meio mineral Czapeck estéril. A FES transcorreu por períodos variáveis de 72 a 220h em estufa à 25°C (processo em batelada).

Composição do Meio mineral líquido Czapeck (COELHO, 2002):

NaNO <sub>3</sub> .....	0,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,05 g
KCl .....	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> .....	0,001 g
H <sub>2</sub> O q.s.p. ....	100 mL

O pH do meio foi acertado para 7,0.

### **3.4. Extração das enzimas**

Após o desenvolvimento dos cultivos, os extratos enzimáticos foram obtidos com adição de 50 mL de água destilada gelada em cada frasco Erlenmeyer e foram agitados em *shaker* a 120 rpm durante 60 min a 4°C. Em seguida estas culturas foram filtradas usando papel Whatman nº 1 com auxílio de bomba à vácuo, os filtrados obtidos foram dialisados e mantidos em banho de gelo para determinação da atividade da invertase.

### **3.5. Dosagem de proteínas solúveis do extrato**

As proteínas foram quantificadas segundo a metodologia de Bradford (1976), utilizando o soro albumina bovina (BSA) como padrão. A mistura de reação foi composta por 100 µl de extrato enzimático apropriadamente diluído e 1000 µl da solução reagente. Após 15 min, as absorbâncias foram medidas a 595 nm, e os resultados foram expressos como mg de proteína por ml (mg/mL) ou mg totais (mg/mL x volume da amostra). Todos os resultados são a média das dosagens realizadas em duplicata.

### **3.6. Determinação da atividade da invertase**

A determinação da atividade enzimática foi realizada através da reação de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959) para açúcares redutores citada por PERALTA (2003). A reação ocorreu através da incubação de 1,0 mL do extrato da enzima devidamente diluído com 1,0 mL da solução de sacarose 1 M dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 a 60°C. Desta mistura de reação foram retiradas alíquotas de 500 µL no tempo 10 min de incubação e adicionados em tubos de ensaio contendo 500 µL de DNS. Após a coleta do ponto experimental, os tubos de ensaio foram fervidos por 5 min e após seu resfriamento em água corrente, foram adicionados 5,0 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm contra um branco. Uma curva padrão de glicose foi feita para determinação do fator de correção do DNS.

A unidade de atividade da invertase foi definida como sendo a quantidade de micromols de açúcares redutores liberados por 1,0 mL de enzima em 1 min, nas condições de ensaio (U/mL). Atividade total (U total) = U/mL x volume do filtrado. Atividade específica = (U total/ miligrama proteína total).

### **3.7. Recuperação da enzima do extrato bruto mediante precipitação com solventes orgânicos e sulfato de amônio**

A recuperação da invertase foi feita através da precipitação com os solventes orgânicos etanol e acetona. Para tanto foi adicionado o solvente gelado ao extrato bruto numa proporção de 2:1. Esta mistura foi mantida sob refrigeração por 30 min e após este período de tempo foi centrifugada por 20 min a 5000 rpm e 4°C. O precipitado obtido foi secado e ressuspendido em água destilada. As proteínas solúveis e atividade enzimática foram determinadas como descrito nos itens 3.5 e 3.6, respectivamente.

Para a precipitação com sulfato de amônio foram utilizadas as seguintes concentrações de sal: 35, 45, 55, 65 e 75%. O sulfato de amônio foi adicionado lentamente ao extrato enzimático sob agitação e resfriamento, após a adição do sal a mistura foi mantida em repouso *overnight* a 4°C e, então centrifugada a 3000 rpm por 30 min. O precipitado foi ressuspendido em água deionizada, dialisado durante 12h com trocas periódicas de água. Em seguida foram determinadas atividade enzimática e proteína.

### **3.8. Purificação da invertase**

#### **3.8.1. Purificação da invertase em coluna de troca iônica DEAE-Celulose**

O extrato enzimático, obtido como descrito no item 3.4, foi dialisado contra água destilada a 4°C por 18 h, substituindo-se a água de diálise a cada 6 h. Este extrato foi levado ao banho-maria a 60°C durante 20 min (choque-térmico), sendo, após este período, centrifugado a 4000 rpm por 10 min. A solução sobrenadante

pós-choque térmico foi aplicada em coluna de troca iônica DEAE-celulose (Sigma, 2 x 20 cm) equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 5,5. Após a aplicação da amostra na coluna, a mesma foi lavada com 5 volumes do mesmo tampão e em seguida foi aplicado o gradiente de NaCl de 0,05 a 1,0 M em tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 5,5. A cromatografia foi desenvolvida sob fluxo de 3 mL/min e frações de aproximadamente 3 mL foram coletadas para a leitura de proteínas em absorvância de 280 nm, as atividades invertásicas dosadas conforme o item 3.6. As frações contendo alta atividade invertásica foram reunidas, dialisadas contra água destilada a 4°C por 18 h, substituindo-se a água de diálise a cada 6 h e guardadas em *freezer* a -20°C para etapas posteriores.

### **3.8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS - PAGE)**

A massa molecular da invertase foi estimada por SDS-PAGE, método descrito por LAEMMLI (1970). Os géis foram utilizados a uma concentração de 10% de acrilamida e foram polimerizados em placas de vidro (7,8 x 9,2 cm) durante uma noite à temperatura ambiente. As amostras analisadas foram diluídas na proporção 1:1 em tampão de amostra (glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,002% e Tris 0,12 M, pH 6,75) na presença de 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol e aquecidas durante 5 min em água fervente, imediatamente antes da aplicação. As eletroforeses foram realizadas à temperatura ambiente na presença de tampão Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1%, pH 8,3, sob corrente de 40 mA e 120V.

A coloração dos géis foi realizada segundo o método descrito por Blum e colaboradores (1988). As proteínas foram fixadas por no mínimo, 1h em solução contendo 50% de metanol, 12% de ácido acético e 37% de formaldeído e, em seguida, tratados duas vezes por 20 min com solução 50% de etanol e uma vez por 20 min com solução 30% de etanol. Após a lavagem, os géis foram submetidos a pré-tratamento de 1 min com solução 0,02% de tiosulfato de sódio e, imediatamente, enxaguado três vezes com excesso de água por 20s cada vez. Para impregnação, os géis foram tratados por 20 min com solução contendo 0,2% de

nitrito de prata e 0,075% de formaldeído. Para retirar o excesso de nitrito de prata, os géis foram lavados 2 vezes com excesso de água por 20s e revelados com solução 6% de carbonato de sódio, 0,0004% de tiosulfato de sódio e 0,05% de formaldeído. O revelador foi desprezado após o escurecimento das bandas do gel e a revelação interrompida por adição da solução de metanol 50% para posterior secagem entre folhas de papel celofane para conservação.

Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as proteínas: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor da tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa). A massa molecular da invertase foi estimada através do coeficiente de migração da proteína em relação aos padrões ( $R_f$ ). O  $R_f$  foi obtido pela relação de migração entre a proteína e frente azul de bromofenol.

### **3.8.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE)**

A eletroforese não-desnaturante foi realizada em géis de poliacrilamida conforme metodologia de Davis (DAVIS, 1964) para proteínas ácidas. O gel numa concentração de 6% de acrilamida foi polimerizado em placa (7,8 x 9,2 cm). As amostras analisadas por eletroforese foram diluídas na proporção de 1:1 em tampão Tris 0,025 mM, pH 8,9, contendo 0,002% de azul de bromofenol e 10% de glicerol. As corridas eletroforéticas foram realizadas em tampão constituído de Tris 50 mM e glicina 36 mM, pH 8,9, durante uma a duas horas, à temperatura ambiente, sob corrente de 70 mA e 120V. A coloração dos géis foi realizada segundo o método descrito por Blum et al. (1988).

### **3.9. Influência dos parâmetros pH e temperatura na atividade enzimática**

A temperatura ótima da invertase foi estimada incubando 1,0 mL do substrato sacarose 1,0 M, em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0, com 1,0 mL do extrato

enzimático diluído. A reação foi conduzida em diferentes ensaios enzimáticos, onde, em cada um deles, a temperatura do banho-maria foi ajustada, respeitando uma escala de diferentes temperaturas previamente elaborada, que variaram de 40 a 90°C. A atividade da invertase foi avaliada pelo método de MILLER (1959) modificado, conforme descrito no item 3.6.

Para a avaliação da influência do pH na atividade invertásica, o substrato (sacarose 1,0 M) foi dissolvido em tampão McIlvaine 50 mM, com uma variação de pH de 2,2 a 8,0.

### **3.10. Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH**

A estabilidade térmica da invertase foi determinada incubando a enzima em banho-maria cuja temperatura foi ajustada em 60, 65, 70, 75 e 80°C por um período que variou de 0 a 240 min. As alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 30, 60, 120, 180 e 240 min e imediatamente acondicionadas em banho de gelo para posterior ensaio de atividade, como descrito no item 3.6. Os resultados são expressos como atividade residual (%) em função do tempo de incubação, e o tempo de meia vida ( $t_{50}$ ) foi definido como o momento em que a enzima retém 50% da atividade inicial, a uma dada temperatura.

A estabilidade ao pH foi determinada por incubação durante 24h retirando-se alíquotas da enzima nos tempos 0, 30, 60, 120, 240 min, 6, 12 e 24 horas de incubação nos pHs: 3,5; 4,0; e 4,5 nas temperaturas de 60 e 70°C. As alíquotas retiradas foram dosadas pelo método DNS.

### **3.11. Determinação de carboidratos neutros**

O conteúdo de carboidratos da invertase homogênea foi estimado através da metodologia do fenol-sulfúrico de DUBOIS et al. (1956), utilizando-se a glicose como padrão. Alíquotas com enzima pura, contendo 50 µg de proteínas, foram diluídas a um volume de 2,0 mL com água destilada. Em seguida, 50 µL de fenol 80% foi

adicionado e, logo após, 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Esta mistura foi deixada em repouso por 15 min à temperatura ambiente. Após esse período, foi feita a leitura da absorbância a 490 nm. Procedimento idêntico foi conduzido com solução padrão de glicose.

### **3.12. Efeito de solventes orgânicos, íons, agentes redutores e detergente sobre a atividade da invertase**

O efeito de alguns íons metálicos, solventes orgânicos e agentes redutores sobre a atividade da invertase foi avaliado pela incubação da enzima com sacarose 1,0 M diluída em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0. Foram acrescentados à reação os seguintes solventes orgânicos: etanol, acetona e o agente redutor:  $\beta$ -mercaptoetanol; o detergente SDS, alguns íons ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) em forma de solução, além de DTT, DMSO, tween 80, triton x100, EDTA e cisteína, nas concentrações de 1 e 5 mM (ou 1 e 5%). A atividade enzimática foi dosada conforme item 3.6.

### **3.13. Determinação da especificidade ao substrato**

A especificidade da invertase ao substrato foi determinada por incubação da mistura de reação contendo 0,5 mL da enzima e 0,5 mL de substrato dissolvido em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0, à temperatura de 60°C. Foram usados os seguintes substratos: sacarose 1,0 M, amido 1%, inulina 1%, xilano 1%, pectina 1% e trealose 20 mg/mL. Foram retiradas alíquotas após 10, 20 e 30 minutos de reação, e adicionadas em DNS para determinação da atividade invertásica.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

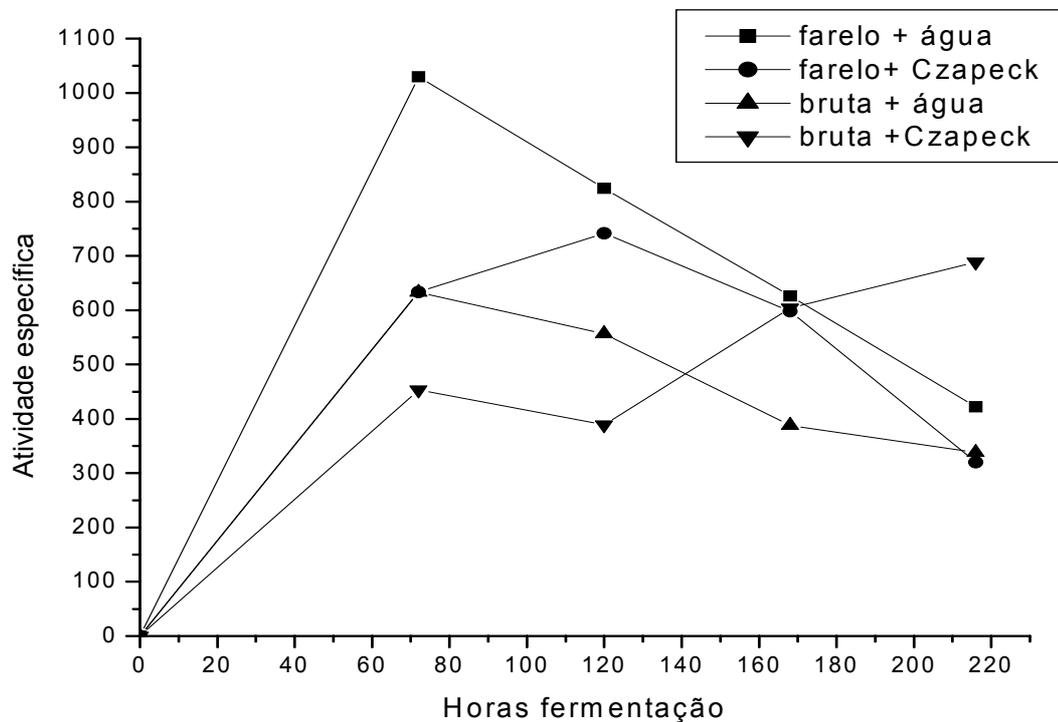
### 4.1. Obtenção de invertase de *Aspergillus caseiellus*

A seleção de um substrato para processos por fermentação em estado sólido depende de fatores principalmente relacionados com viabilidade e custo; então, o reaproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de enzimas é considerado uma alternativa de uso como substratos para produção de enzimas por fermentação sólida, até porque a maioria dos resíduos fornecem nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Fato este que pode ser observado na fermentação do farelo de soja. O farelo de soja, sem adição de nutrientes, apresentou atividade enzimática maior do que quando houve adição de nutrientes, como pode ser verificado na figura 4.

Experimentos foram realizados para estabelecer o melhor meio de cultivo para a produção de atividade invertásica, sendo avaliadas as fontes de carbono de soja (soja bruta granulada e farelo de soja) com água corrente (sem adição de meio mineral) e também, apenas na presença de meio mineral Czapeck sem adição de extrato de levedura. Nesta etapa foi verificado o melhor tempo de cultivo para a produção da invertase, avaliando a atividade da enzima.

Na figura 4 pode ser observado o melhor tempo de crescimento, onde se obteve a atividade máxima após 72 horas de fermentação, utilizando como substrato o farelo de soja na presença de água corrente, sem adição de nutrientes, sendo que a produção de invertase resultou em uma atividade específica igual a 1029,75. Portanto, essas condições de tempo, água corrente e farelo de soja foram utilizados para a produção de invertase a 25°C num processo em batelada. O extrato enzimático obtido da fermentação da soja bruta granulada apresentou turbidez e viscosidade, provavelmente devido à grande quantidade de óleo, também foi decisivo quanto à escolha do farelo de soja, o qual apresentou este problema, o que também tem influência durante as etapas de purificação.

Devido ao farelo de soja ser um resíduo agroindustrial, a produção de invertase torna-se economicamente mais viável dando um maior valor agregado a este resíduo que acaba sendo utilizado apenas como ração animal.



**Figura 4** – Perfis da produção de invertase pelo microrganismo *A. caseillus* cultivado sobre farelo de soja e soja bruta (em meio mineral Czapeck ou água corrente), a 25°C em processo de FES em batelada.

O tempo de 72 horas de fermentação também foi observado por Ashokkumar e colaboradores (2001), no cultivo com *Aspergillus niger* utilizando bagaço de cana-de-açúcar em condições de fermentação em estado sólido a 30°C, e a produção de invertase foi aumentada em quase 5 vezes quando desenvolvida em condições de fermentação sólida (81,8 U/L/h) quando comparada à submersa (18,3 U/L/h). Já Bhatti et al. (2006) relataram uma maior produção de invertase após incubação de 96 horas utilizando o melaço como fonte de carbono pelo *Fusarium solani*, obtendo uma atividade invertásica máxima de 9,90 U/mL.

#### 4.2. Recuperação da enzima mediante precipitação com solventes orgânicos e sulfato de amônio

Na tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos através da avaliação de diferentes saturações de sulfato de amônio para a recuperação da invertase por precipitação.

**Tabela 2** – Perfis das frações obtidas na precipitação com sulfato de amônio -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Sulfato de amônio (%)	Atividade da invertase (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Recuperação (vezes)
0 (extrato bruto)	377,06	1,09	342,93	100,00	1,00
35	259,00	0,62	417,74	68,69	1,22
45	257,03	0,62	414,56	68,16	1,21
55	303,07	0,63	481,06	80,38	1,40
65	252,68	0,63	401,00	67,01	1,17
75	202,95	0,61	332,70	53,82	0,97
85	192,17	0,57	337,14	50,96	0,98

Conforme a tabela 2, foi verificado que a etapa com saturação de 55% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , a enzima teve uma atividade de específica de 481,06 U/mg, apresentando aproximadamente 80,38% de recuperação com relação ao extrato bruto (sem adição do sulfato de amônio), o que equivale a um fator de recuperação de 1,40 vezes. A saturação com sulfato de amônio mostrou eficiência na precipitação da invertase numa faixa de 35 a 65% de saturação, com aumento da atividade específica, mas acima de 75% de saturação foi observada a diminuição da atividade enzimática.

A precipitação por sulfato de amônio é utilizada com frequência para separação de misturas complexas de proteínas, baseando-se na concentração de sal necessária para precipitar diferentes proteínas, sendo frequentemente encontrada na literatura como um processo de purificação. Os resultados obtidos (80,38% e 50,96% de recuperação usando, respectivamente, 55 e 85% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) foram inferiores ao obtido por Nguyen et al. (2005), que obtiveram aproximadamente 90% de aumento na atividade específica da invertase de *Aspergillus niger* IMI303386 usando saturação de 80% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Resultados

com precipitações eficientes usando 85% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e aumento de mais de 100 vezes na atividade específica para a invertase purificada foram descritos por Moreno, Sanchez & Rodriguez (1990), para a invertase obtida de *Schizosaccharomyces pombe*, mostrando uma porcentagem de recuperação da enzima muito superior ao encontrado para a invertase de *A. caseiellus* desta pesquisa.

Precipitações com etanol e acetona também foram realizadas usando uma proporção de 2:1 (solvente:extrato bruto). Os resultados obtidos são relatados na tabela 3.

**Tabela 3 – Precipitação da invertase com solventes orgânicos**

Solvente	Atividade da invertase (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação	
				(vezes)	%
Extrato bruto	381,09	1,15	331,38	1,00	100,00
Etanol	251,60	0,55	457,45	1,38	66,02
Acetona	297,04	0,48	618,83	1,87	77,94

Quando comparadas ao extrato bruto, que apresentou atividade específica de 331,38 U/mg, durante as precipitações com os solventes etanol e acetona foram obtidos fatores de purificação de 1,38 vezes (66,02%) para o etanol e 1,87 vezes (77,94%) para a acetona, sendo as atividades específicas de 457,45 U/mg e 618,83 U/mg, respectivamente.

Porém, tanto para a enzima recuperada através das precipitações com sulfato de amônio quanto para os solventes utilizados, foi observado que durante o tempo de estocagem em *freezer* houve perda de atividade em torno de 30% a 40%.

Além da recuperação da enzima invertase por precipitações com sulfato de amônio, etanol e acetona, aqui relatada, a recuperação também foi avaliada através da aplicação de um choque térmico em banho-maria a 60°C, onde foi possível verificar os resultados expressos na Tabela 4.

**Tabela 4** – Recuperação da invertase do extrato bruto pela utilização de choque-térmico.

Etapa	Atividade da invertase (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação	
				(vezes)	(%)
Sem choque térmico	215,91	1,155	186,93	1,00	100,00
Com choque térmico	235,97	0,088	2681,48	14,34	109,29

De acordo com os valores de atividade específica verificados na tabela 4, foi possível afirmar que a utilização do choque térmico resultou em um fator de recuperação da invertase de aproximadamente 14,34 vezes (109,29%), sendo que este foi valor muito superior às recuperações quando utilizadas de outras formas de recuperação como precipitação com sulfato de amônio (máximo de 80,38%), etanol (66,02%) e acetona (77,94%). A invertase obtida pela fermentação da soja usando o fungo filamentoso *Aspergillus caseiellus*, apresenta-se como uma enzima termoresistente, acredita-se então, que durante o processo do choque-térmico outras proteínas residuais da soja não termoresistentes sejam desnaturadas e precipitadas durante a centrifugação, deixando de interferir na ação da enzima invertase, e assim, resultando em um aumento da atividade específica da mesma.

A recuperação da enzima através do choque térmico mostrou-se como uma alternativa eficaz para processos de purificação. Com isso, a recuperação da invertase obtida de *Aspergillus caseiellus* pela fermentação em estado sólido do farelo de soja, foi realizada através de choque térmico, sendo a enzima recuperada estocada em *freezer* para posterior purificação em coluna cromatográfica.

### 4.3. Purificação da invertase em coluna de troca iônica DEAE-Celulose

Os resultados dos procedimentos da purificação da invertase estão resumidos na Tabela 5. Foram aplicados 46 mL de extrato bruto recuperado por choque térmico, contendo 53,13 mg de proteína e atividade total 9931,86 U em colunas cromatográficas aniônicas DEAE-Celulose. Como pode ser observado na Tabela 5, ao final da 2ª coluna DEAE-celulose foi recuperada 30,30% da atividade da invertase, ou seja, 4241,75 U com relação ao extrato bruto, o que equivale a um fator de purificação de 42,70 vezes.

**Tabela 5 – Etapas de purificação da invertase de *A.casiellus***

Etapas	Proteína total	Atividade total	Atividade específica	Recuperação	
	(mg)	(U) <sup>a</sup>	(U/mg) <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	(vezes) <sup>d</sup>
Extrato bruto	53,13	9931,86	186,93	100	1,0
Choque térmico	0,088	235,97	2681,48	109,29	14,34
1 <sup>a</sup> DEAE- Celulose	3,26	8964,99	2753,37	90,26	14,72
2 <sup>a</sup> DEAE- Celulose	0,75	4241,75	5665,67	42,70	30,30

<sup>a</sup> Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de glicose por minuto nas condições de ensaio estabelecidas

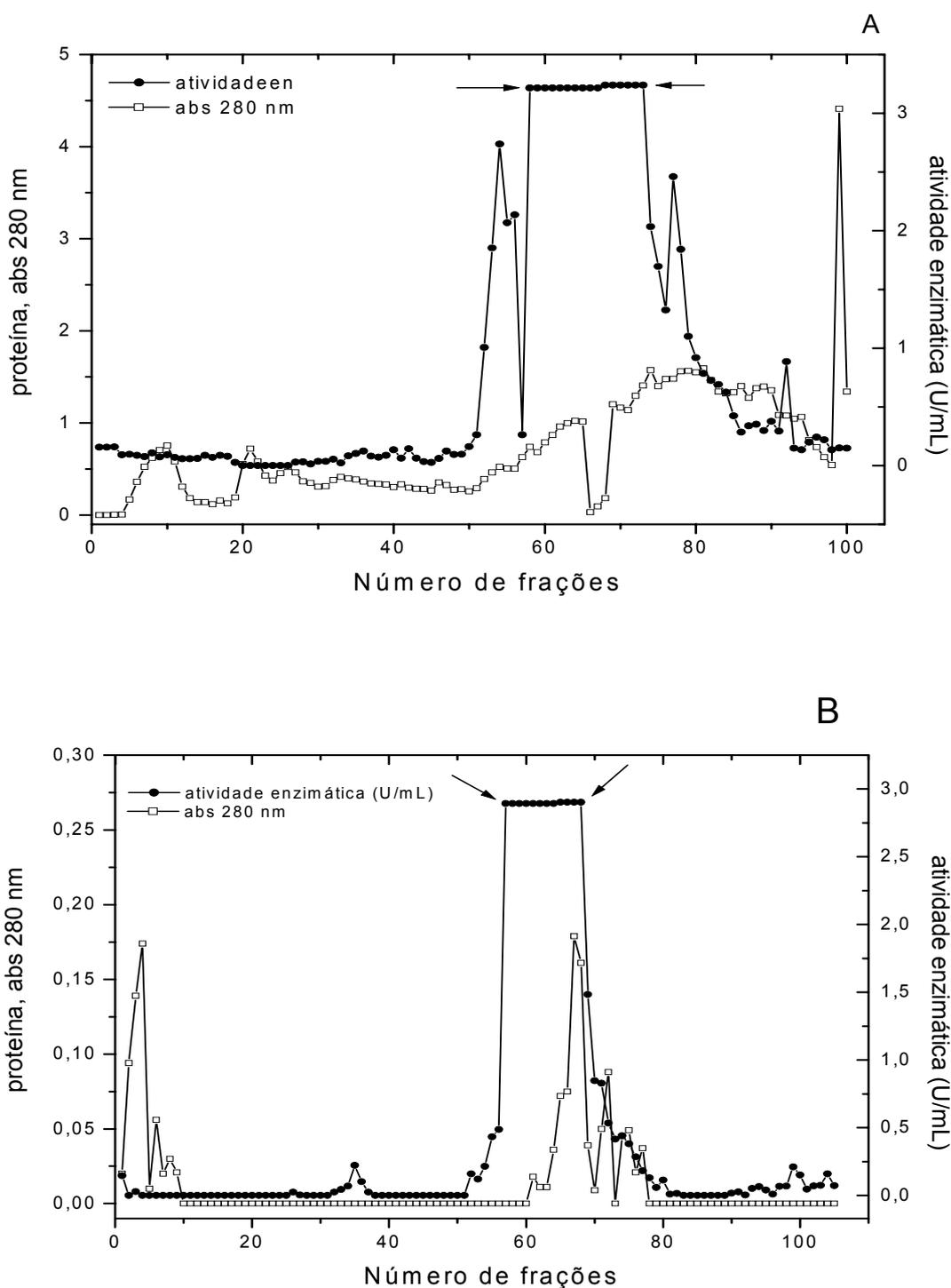
<sup>b</sup> Atividade invertásica total por mg de proteína total

<sup>c</sup> Porcentagem de recuperação das unidades de atividade invertásica total

<sup>d</sup> Relação entre a atividade específica de cada etapa e a etapa inicial.

Na figura 5 podem ser observados os perfis cromatográficos das etapas de purificação utilizando colunas cromatográficas DEAE-celulose. As frações de número 58 a 73, obtidas da 1<sup>a</sup> DEAE-celulose, com volume de 41,5 mL e atividade específica invertásica de 2753,37 U/mg, foram dialisadas e passadas novamente pela coluna DEAE-celulose. A enzima invertase foi eluída com gradiente de NaCl de 175 a 225 mM.

A coluna de troca aniônica DEAE-celulose mostrou-se eficiente na purificação da invertase de *A. Casiellus*, assim como já observado na literatura, a ligação de invertases de outros microrganismos às colunas cromatográficas aniônicas é comumente encontrada, como invertase dos fungos *Aspergillus niger* IMI303386 com aproximadamente 40% de recuperação (NGUYEN et al., 2005), *Aspergillus ochraceus*, obtendo 24% de recuperação (GUIMARÃES et al., 2007), *Aspergillus niger* AS0023 com 12,68% (L'HOCINE et al., 2000).



**Figura 5** - Perfis cromatográficos da invertase de *Aspergillus casiellus* em coluna de cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose. As frações reunidas em cada etapa estão indicadas por flechas (→). (A) 1ª coluna DEAE-celulose. (B) 2ª coluna DEAE-celulose.

Na tabela 6, encontram-se alguns dados comparativos para a invertase purificada neste trabalho com invertases encontradas na literatura.

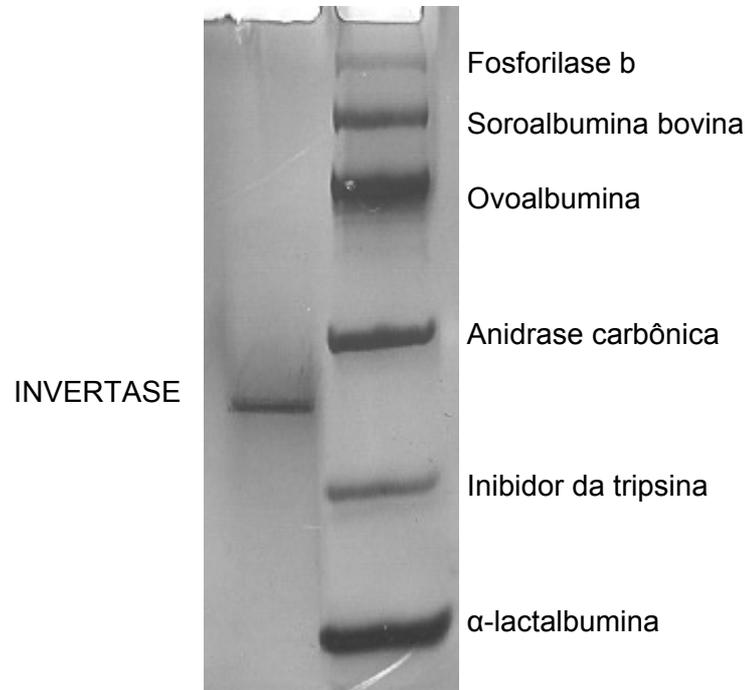
**Tabela 6 – Dados comparativos da purificação de invertase de diferentes fontes**

Fonte	Método	Proteína (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação		Referência
					(vezes)	(%)	
<i>Aspergillus caseiellus</i>	DEAE-celulose	0,75	4241,75	5665,67	42,70	30,3	<b>Este trabalho</b>
<i>Pichia anomala</i>	DEAE-Sephacel	6	8895	1482	51	46	Rodriguez et al., 1995
<i>Aspergillus ochraceus</i>	DEAE-celulose	21,2	901,8	42,5	7,1	24	Guimarães et al., 2007
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	0,113	246	2180	51,4	8,98	Yoshikawa, 2007
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sephacryl S-300	5	7940	1590	-	-	Moreno et al., 1990
<i>Saccharum officinarum</i> L.	Gel filtração	-	-	-	13	35	Hussain, 2008
<i>Aspergillus niger</i>	FPLC	0,78	40,30	51,67	49,08	41,8	Nguyen, 2005
Pera japonesa	DEAE-Sephacel ConA-Sepharose	0,0062	16,7	2670	307	-	Hashizume et al., 2003
<i>Bambusa edulis</i>	-	-	128	128	64	26	Liu, 2006

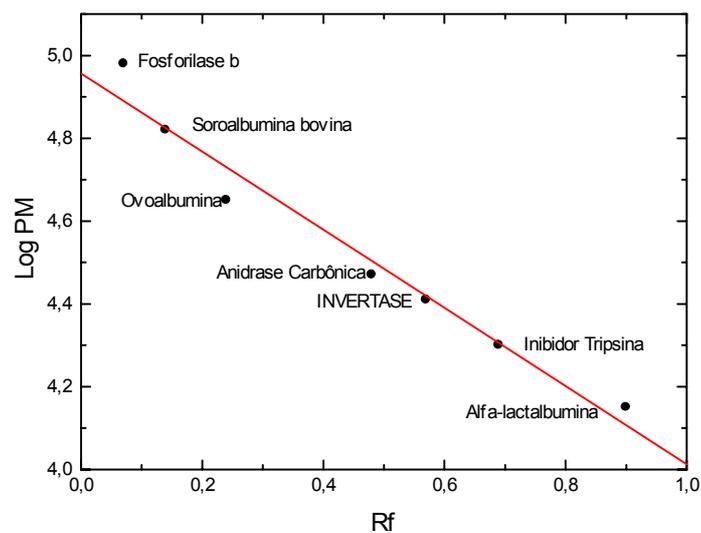
De acordo com a tabela acima, a invertase de *A. caseiellus* purificada tem atividade específica superior quando comparada a invertases de outros microrganismos e está dentro de uma faixa de recuperação encontrada em outros trabalhos.

A enzima purificada mostrou homogeneidade eletroforética em gel SDS PAGE 12% (Figura 6), exibindo massa molecular aparente de 25,5 kDa, como mostrado na Figura 7. Estes dados foram obtidos através de PAGE e SDS-PAGE. Através do PAGE, pode-se dizer que a invertase é um tetrâmero que se aproxima a fosforilase b. Este resultado mostra massa molecular abaixo do que frequentemente é encontrado na literatura, como a invertase obtida da pêra japonesa por Hashizume et al. (2003), que por SDS-PAGE apresentou massa molecular de 38 kDa. Já a invertase de *A. niger* purificada por L'Hocine et al. (2000) exibiu massa molecular em uma faixa maior, de 71 a 111 kDa por SDS-PAGE, 79 kDa de *Aspergillus ochraceus* (Guimarães et al., 2007), 86,5 kDa de *Pichia anômala* (RODRIGUEZ, PEREZ & RODRIGUEZ, 1995), 65 kDa de *Fusarium solani* (BHATTI et al., 2006). A invertase obtida de cana de açúcar por Hussain e colaboradores (2008) foi a qual mais se

aproximou com a invertase do *A. caseiellus*, apresentando massa molecular de 28 kDa por SDS-Page.



**Figura 6** - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da invertase do *Aspergillus caseiellus*. Massa molecular dos marcadores: Fosforilase b (97kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase carbônica (30 kDa), Inibidor da tripsina (20,1kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa).



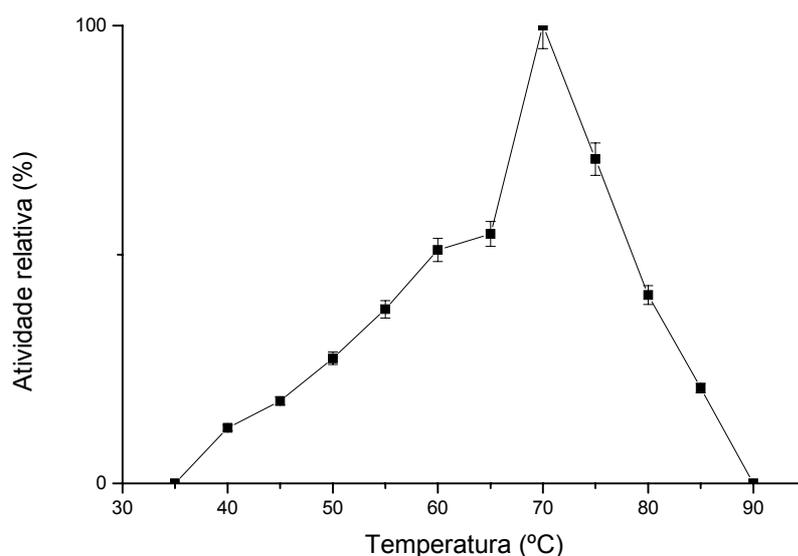
**Figura 7** - Determinação da Massa molecular da Invertase do *Aspergillus caseiellus* purificada. Massa molecular da invertase: 25,5 kDa

#### 4.4. Análise dos parâmetros pH e temperatura na atividade enzimática

A invertase purificada de *A. casiellus* apresentou atividade máxima a 70°C e reteve 50% de sua atividade residual nas temperaturas de 60 e 65°C e aproximadamente 70% a 75°C, como se observa na figura 8. Nas temperaturas inferiores a 60°C a invertase não atingiu 50% da sua atividade máxima. Este resultado mostra uma temperatura superior ao encontrado por Tang e colaboradores (1996) onde a temperatura ótima para a invertase foi de 45°C.

Quanto à temperatura ótima, esta enzima mostrou-se mais eficiente do que as encontradas em outras espécies de *Aspergillus*, como por exemplo, a invertase de *Aspergillus niger* AS0023 apresentou uma temperatura ótima de 55°C e estabilidade a temperaturas de no máximo 65°C (L'HOCINE et al., 2000); e a produzida por *A. ochraceus* que apresentou temperatura ótima de 60°C e meia vida de 60 min a esta temperatura (GUIMARÃES et al., 2007).

Invertases de grau industrial – BIOINVERT<sup>R</sup> da QUEST INTERNATIONAL e INVERTIN<sup>R</sup> da MERCK – e analítico – das marcas FLUKA<sup>R</sup> e SIGMA<sup>R</sup> – também apresentaram padrões inferiores de temperatura ótima – 55, 60, 55 e 55°C respectivamente – e de estabilidade a temperatura – 30-50°C para as primeiras e 30-55°C para as segundas (SAID & PIETRO, 2004).



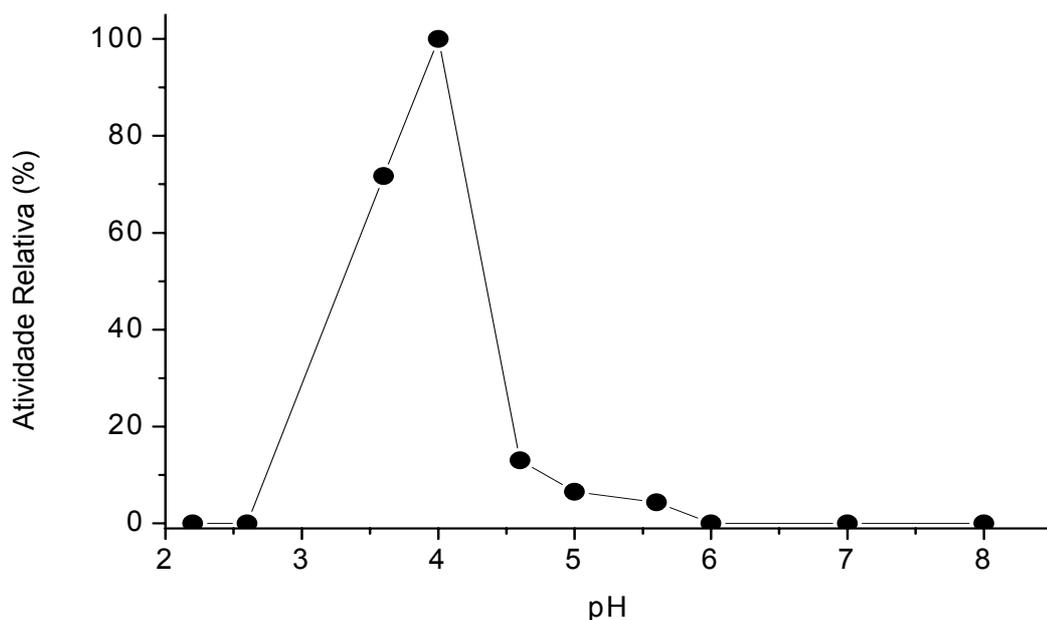
**Figura 8** – Influência da temperatura sobre a atividade da invertase.

Quanto ao efeito do pH no qual a enzima pura do *Aspergillus caseiellus* apresentou atividade máxima ao pH foi 4,0, como pode ser observado na Figura 9. Este pH ótimo ácido está próximo ao encontrado para as invertases da levedura *Rhodotorula glutinis* (RUBIO, RUNCO & NAVARRO, 2002) e dos fungos *Aspergillus niger* AS0023 (L'HOCINE et al., 2000) e *Aspergillus ochraceus* (GUIMARÃES et al., 2007), bem como para as enzimas industriais BIOINVERT<sup>R</sup> da QUEST INTERNATIONAL e INVERTIN<sup>R</sup> da MERCK<sup>R</sup> (SAID & PIETRO, 2004), os quais apresentaram pH ótimo igual a 4,6.

Albertson, Peters & Grof (2001) isolaram diferentes isoformas de invertase de cana-de-açúcar e encontraram que a invertase ácida solúvel tem um pH ótimo de 4,5, sendo esta uma invertase ligada ao crescimento e diferenciação, enquanto que invertases encontradas na parede celular tem um pH ótimo entre 3,2 e 3,6. Já no citosol a invertase apresentou um pH de 7,3, caracterizando-se como neutra.

O pH do meio reacional é um dos fatores importantes para a manutenção da estrutura protéica e da atividade das enzimas, por interferir diretamente com o estado de ionização das cadeias laterais de aminoácidos (COLLINS, BRAGA & BONATO, 1990). A mudança no pH afeta a ionização dos resíduos de aminoácidos essenciais do sítio ativo, que estão envolvidos na ligação do substrato e sua transformação em produto. Alguns resíduos ionizáveis podem estar localizados na periferia do sítio ativo, comumente conhecidos como resíduos não-essenciais. A ionização desses resíduos pode causar distorção conformacional do sítio ativo, afetando indiretamente a atividade enzimática (SHAHEEN et al., 2008).

Outros pHs ótimos foram descritos como 3,85 para a invertase de *Pycnoporus sanguineus* (QUIROGA, VATTUONE & SAMPIETRO, 1995), 4,5 para a enzima produzida por células de bambu (*Bambusa edulis*) (LIU et al., 2006), 5,0 para a enzima de *Fusarium* sp. (SHAHEEN et al., 2008), 5,5 para a invertase produzida pela levedura *Candida utilis* (CHÁVEZ et al., 1997) e 6,0 e 5,5 para invertases da bactéria *Zymomonas mobilis* intracelular e extracelular, respectivamente. HASHIZUME e colaboradores (2003) observaram pH ótimo de 4,5 para uma invertase ácida purificada de pera japonesa.



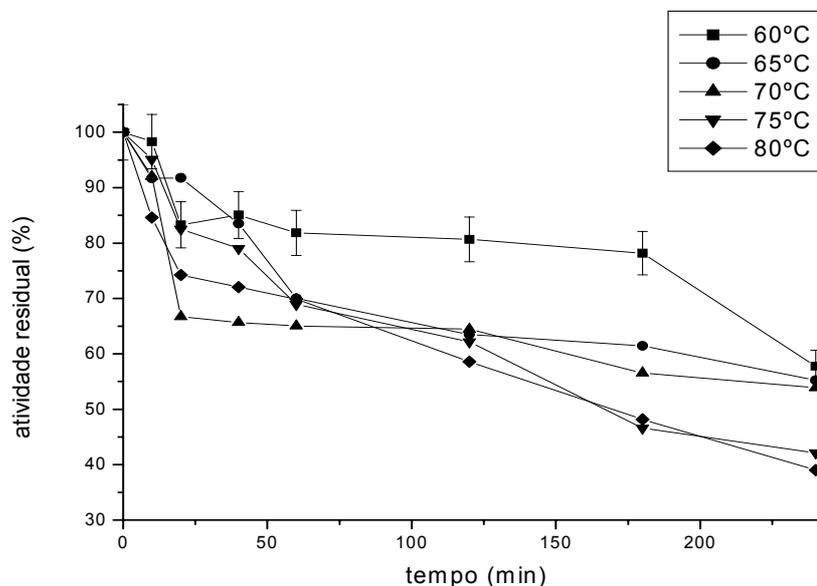
**Figura 9** – Influência do pH sobre atividade da invertase incubada a 60°C.

#### **4.5. Determinação da estabilidade térmica da invertase purificada**

A invertase reteve sua atividade residual acima de 50% por um período de 240 min nas temperaturas de 60, 65 e 70°C. Sua meia vida foi atingida aproximadamente no tempo de 165 min para as temperaturas de 75 e 80°C, como pode ser observado na Figura 10. Ao final dos 240 min de incubação a enzima ainda apresentava 43 e 38% de atividade residual às temperaturas de 75 e 80°C, respectivamente.

Estes resultados demonstram que a invertase ácida solúvel é uma enzima altamente resistente a altas temperaturas, fato este confirmado por BERTI (1996), que observaram melhor desempenho da atividade da invertase para uma faixa de temperatura de 50 a 55°C, enquanto que na temperatura de 60°C verificaram uma sensível desativação térmica, chegando à redução da conversão máxima obtida.

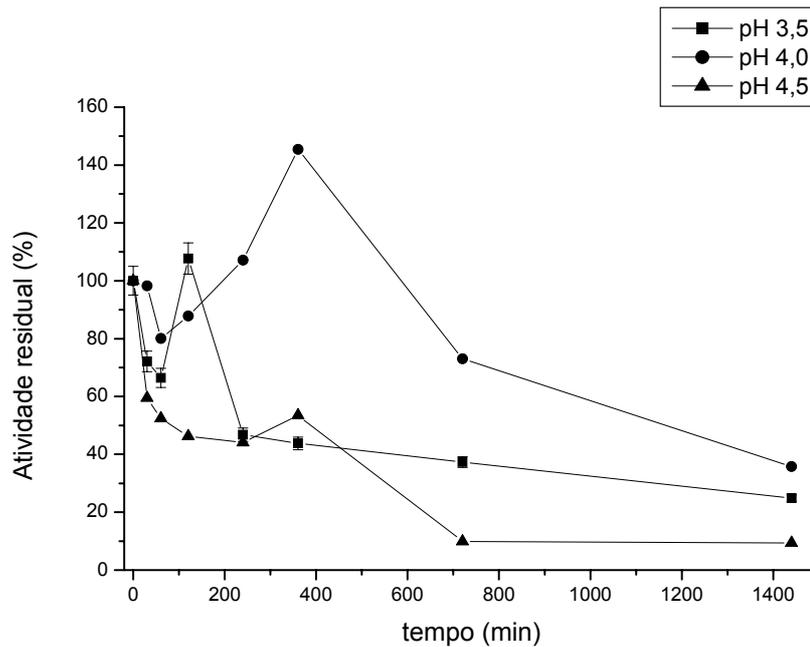
A estabilidade térmica da invertase pode ser devido à estrutura terciária da proteína, a qual contém interações carboidrato-proteína, com ligações cruzadas na cadeia polipeptídica ( Wiseman & Woodward (1975) citado por MARQUEZ, 2007).



**Figura 10 - Estabilidade térmica da invertase**

A estabilidade da invertase do *A. caseiellus* ao pH foi determinada pela incubação da fração pura durante 24 h na ausência de substrato. Os resultados referentes à incubação da enzima a 60°C e 70°C em tampão acetato de sódio nos pHs 3,5, 4,0 e 4,5 estão representados, respectivamente, nas figuras 11 e 12.

Até 6 h de incubação a 60°C, a invertase ainda apresentava atividade residual de 50% para os três pHs estudados, sendo que este valor apresentou queda após este período de tempo. A enzima não se tornou inativa após 24 h de incubação em qualquer um dos pHs, porém no pH 4,5 a atividade residual observada foi de apenas 10%.

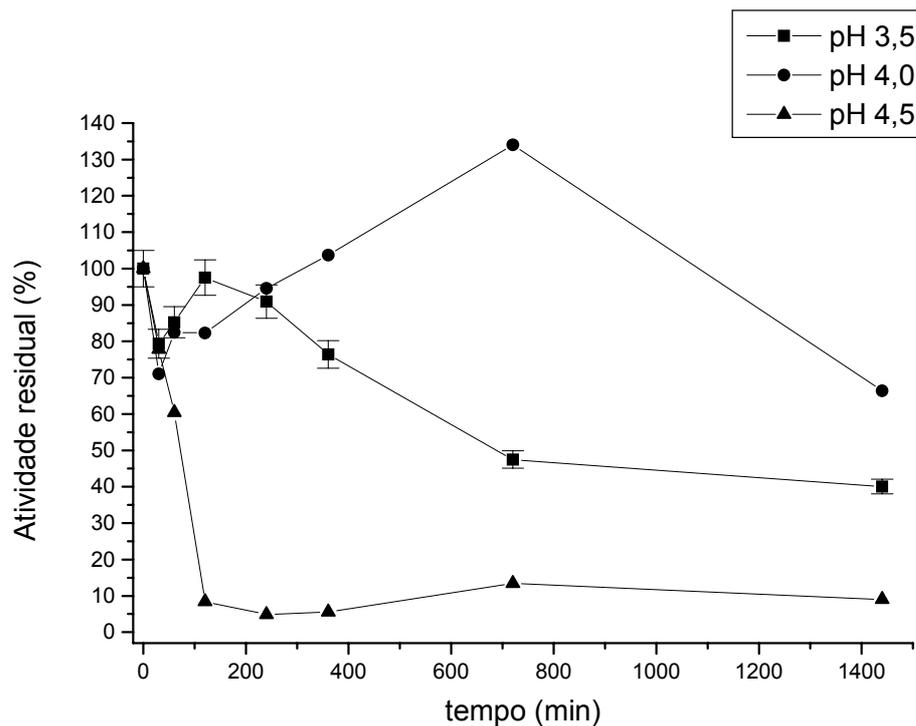


**Figura 11** – Estabilidade da invertase a diferentes pHs à temperatura de 60°C

Na temperatura ótima, de 70°C, a invertase manteve-se relativamente estável nos pHs 3,5 e 4,0, retendo ainda após 24 h de incubação 50% de atividade residual. Para o pH 4,5 foi observada a rápida perda de atividade logo nos primeiros 100 min, atingindo apenas 10% de sua atividade e mantendo-se neste patamar até atingir o tempo total da incubação.

A perda de atividade pode ter sido devido ao fato de enzimas puras serem mais sensíveis a pequenas variações de condições de reação, pela falta de outras proteínas presentes no extrato bruto, que forneciam proteção conformacional para a primeira. Invertases aplicadas industrialmente como a BIOINVERT<sup>R</sup> - QUEST INTERNATIONAL- apresentaram estabilidade na faixa de pH de 4,0 a 5,0. (SAID & PIETRO, 2004).

Nas figuras 11 e 12 é possível observar, principalmente com pH 4,0, que com o decorrer do tempo há picos de aumento da atividade residual mesmo após já ter ocorrido uma diminuição na atividade. Com relação a este fato, sugere-se o desenvolvimento de novos experimentos necessários para entender o fenômeno.



**Figura 12** - Estabilidade da invertase a diferentes pHs à temperatura de 70°C.

#### 4.6. Efeito de íons, agentes quelante e redutores sobre a atividade da invertase

Para avaliar os requerimentos e resistência da invertase quanto a íons, agentes redutores e quelante, soluções de sais foram adicionadas ao meio de reação em concentração final de 1 e 5 mM; e solventes e detergentes a 1 e 5%. Os resultados estão expressos na tabela 7.

Muitas enzimas requerem íons metálicos como co-fatores para atividade catalítica. A invertase de *A. caseiellus* não demonstrou necessidade de íons para a atividade catalítica, já que o agente quelante EDTA não provocou redução significativa na atividade basal da enzima.

Os íons  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Al}^{3+}$ , na concentração de 5 mM, foram os que ativaram a invertase mais significativamente, sendo este aumento de atividade invertásica em torno de 35,58 e 59,92%, respectivamente.

De acordo com NGUYEN e colaboradores (2005), a invertase de *Aspergillus niger* IMI303386 foi ativada por Ba<sup>+2</sup>, além de outros íons como Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup> e EDTA. Também a invertase de *A. ochraceus* foi ativada em 20% por Ba<sup>+2</sup>.

Na tabela 7 pode-se observar que as substâncias que inibiram significativamente a atividade invertásica deste fungo foram NH<sub>4</sub><sup>+</sup> com inibição de 11,26%; Na<sup>+</sup> com 15% na concentração de 5mM; Hg<sup>2+</sup> com 33% e os agentes redutores β-mercaptoetanol e DTT com inibição de 28,74% e 72,07%, respectivamente. Os solventes acetona e etanol também provocaram a perda de atividade em torno de 30%.

**Tabela 7** – Efeito de íons (na forma de soluções salinas), solventes, agentes quelante e redutores sobre a atividade da invertase de *Aspergillus caseiellus*

Sais e outros agentes	Atividade residual	
	1mM	5 mM
Controle	100	100
CuCl	122,69	135,58
KCl	99,98	94,97
HgCl	95,97	77,08
NaCl	91,62	85,26
NH <sub>4</sub> Cl	89,31	88,74
SnCl <sub>2</sub>	99,47	74,87
BaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	120,51	134,44
CuSO <sub>4</sub>	109,48	142,09
FeSO <sub>4</sub>	102,27	130,37
Al(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	146,23	159,92
ZnSO <sub>4</sub>	101,12	118,04
MgSO <sub>4</sub>	88,08	79,09
Etanol	97,20	71,86
Acetona	87,21	73,13
DTT	81,70	27,93
SDS	74,45	45,52
DMSO	97,12	57,55
β-mercaptoetanol	94,68	71,26
Tween 80	99,24	90,34
Triton x 100	93,61	87,98
EDTA	99,86	100,69
Cisteína	130,02	342,97

Íons como o Zn<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup>, Ni<sup>+2</sup> e Hg<sup>+2</sup> foram fortes inibidores da invertase de *A. niger* IMI303386 (NGUYEN et al., 2005), Hg<sup>+2</sup> também foi encontrado como inibidor da invertase de *A. ochraceus*, sendo que a concentração de 10 mM desta substância inibiu completamente a atividade invertásica (GUIMARÃES et al., 2007).

Comparando-se então, com estas referências, foi observado o comportamento oposto da invertase quanto à presença do  $Zn^{+2}$ . Darren & Botha (1998) observaram a inibição completa de uma invertase básica com  $Hg^{2+}$ ,  $Zn^{+}$  e  $Ag^{+}$ .

A cisteína mostrou-se um importante ativador catalítico tendo um aumento de 243% na atividade da invertase. Este aumento significativo na atividade catalítica pela cisteína também foi observado por Liu et al. (2006), porém permanece a necessidade de estudos para melhor entendimento do fenômeno, já que não há uma explicação plausível na literatura.

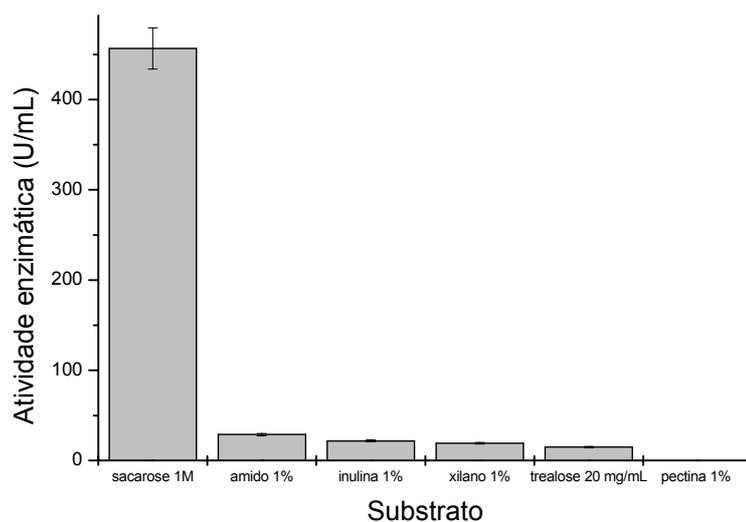
#### **4.7. Determinação do conteúdo de carboidratos neutros**

A natureza glicoprotéica da invertase e a presença de manose e galactose em seus carboidratos foi relatada por Moreno e colaboradores (1990). A porcentagem de carboidrato da invertase de *A. caseiellus* foi determinada em 36,57% da massa total de proteína, um valor menor do que para a invertase de *Schizosaccharomyces pombe* purificada por Moreno e colaboradores (1990) que apresentou um conteúdo de carboidratos igual a 67% da massa total de proteína. O conteúdo de carboidratos encontrado está próximo ao determinado por Chen et al. (1996), o qual foi de 41% para a invertase secretada pelo *A. nidulans*. Este mesmo autor afirmou que o alto conteúdo de carboidrato presente na enzima é resultante da presença de um monômero, e também que a maioria das proteínas secretadas por fungos filamentosos são glicoproteínas que tem um conteúdo de carboidratos na faixa de 10 a 50%.

#### **4.8. Especificidade ao substrato da invertase de *A. caseiellus***

A invertase de *Aspergillus caseiellus* purificada foi incubada com diferentes substratos. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 13, onde pode ser verificado que a enzima apresentou maior especificidade à sacarose 1M. As atividades enzimáticas para os demais substratos foram baixas quando comparadas à sacarose 1M. A invertase não apresentou atividade quando incubada com pectina 1%. A inulina também foi hidrolisada pela invertase de *A. ochraceus* obtida em meio

Khanna suplementado com bagaço de cana de açúcar purificada por Guimarães et al. (2007), assim como pela invertase de *A. caseiellus*. A especificidade ao amido foi verificada por Hashizume et al. (2003) e, como neste trabalho, sua enzima invertase foi pouco específica a este substrato.



**Figura 13** - Especificidade da invertase de *A. caseiellus* a diferentes substratos

## 5. CONCLUSÕES

A produção de enzimas induzida por resíduos agroindustriais destaca-se como uma ferramenta para o desenvolvimento de tecnologias limpas, tanto por dar destino a compostos orgânicos que se acumularia no meio ambiente quanto por gerar produtos aplicáveis industrialmente que dispensam os solventes e reagentes tóxicos atualmente utilizados que provocam a poluição do meio ambiente. A bioconversão dos resíduos agrícolas está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a FES desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam interesse para diversos segmentos industriais, além de valor agregado.

O resíduo de farelo de soja demonstrou ser um bom substrato indutor para utilização em fermentação em estado sólido por *Aspergillus caseiellus* para produção de invertase e destaca-se o grande volume deste resíduo que é produzido na região.

Para a purificação da invertase de *Aspergillus caseiellus*, induzido por farelo de soja, foram necessários 2 passos constituídos de colunas cromatográficas de troca-iônica DEAE-Cellulose, o que torna este processo viável e pouco tempo despendido em relação a outros processos. Pode-se concluir neste trabalho também o êxito em recuperar a invertase através de choque térmico, uma alternativa nova e satisfatória que desperta mais interesse para novos estudos.

Em relação às características da invertase purificada, os valores de pH e temperatura ótimos, foram de 4,0 e 70°C, respectivamente. Esta enzima demonstrou termoresistência em altas temperaturas de 60 a 70°C não atingindo o tempo de meia vida em 240 minutos. E nas temperaturas de 75 a 80°C foram mantidas aproximadamente 40% da atividade residual após 4 horas de incubação. Fato que a torna muito interessante para processos industriais que acontecem em condições de temperatura elevada e pHs ácidos e apresentem variações consideráveis que demandam enzimas resistentes e capazes de atuar em diferentes intervalos de temperatura.

Por possuir características iguais ou melhores do que as de outras invertases encontradas na literatura, e algumas características próprias como, tempo de fermentação relativamente curto (72 horas), alta produção enzimática, ser altamente

termoresistente, a invertase produzida por *Aspergillus caseiellus* torna-se uma forte candidata à aplicação em processos industriais e biotecnológicos.

## **6. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Estudar a otimização do meio de fermentação para a produção de invertase quanto à suplementação de nutrientes, teor de umidade, pH, temperatura e agitação.
- Estudar a otimização dos métodos de recuperação da invertase do extrato bruto fermentado.
- Testar outras formas de purificação da invertase com o objetivo de aumentar o grau de purificação e o rendimento da enzima.
- Estudar a modelagem cinética da enzima pura.
- Com a invertase purificada, determinar sua estrutura tridimensional e as características físico-químicas relacionadas ao mecanismo de ação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKAT, K., BHATTACHARYYA, B.C. **Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus orizae* and growth studies by the soft gel technique.** *Process Biochemistry*. 35, 2000, p. 907-914.
- ALBERTSON, P.L., PETERS, K.. & GROF,C.P.L.. **An improved method for the measurement of cell wall invertase activity in sugarcane tissue.** *Journal Plant Physiology*. n. 28, p. 323-328, 2001.
- ÁLVARO-BENITO, M. et al. **Characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating yielding the prebiotic 6-kestose.** *Journal of Biotechnology*. N. 132, p. 75-81, 2007.
- AQUINO, Ana Carla M. M de. **Purificação e determinação de propriedades bioquímicas das atividades glucoamilase e  $\alpha$  – amilase produzidas pelo fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* 15.1.** Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2000. 124p. Dissertação (mestrado).
- ASHOKKUMAR, B., KAYALVIZHI, N. & GUNASEKARAN, P. **Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation.** *Process Biochemistry*. n. 37, p. 331-338. 2001
- BAGAL, D.S. et al. **Fabrication of sucrose biosensor based on single mode planar optical waveguide using co-immobilized plant invertase and GOD.** *Biosensors and Bioelectronics*. n. 22, p. 3072-3079, 2007
- BARBOSA-FILHO, J.M., et al. **Uma revisão sobre ocorrência de sacarose no reino vegetal.** *Farmácia & Química*. v. 33, n. 23, p.6-22, 2000.
- BHATTI, H. N. et al. **Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*.** *Journal Agricultural and Food Chemistry*. n. 54, p. 4617-4623, 2006.

- BLUM, H. ; BEIER, H.; GROS, H.J. **Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA im polyacrilamides gels.** *Eletrophoresis*, v.81, p. 93-9,1988.
- BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C; BALANDINO, A. **Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid fermentation.** *Process Biochemistry*, v. 42, p. 98-101, 2007.
- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- CASTILHO, L. et al. **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations.** *Biochemical Engineering journal*. n. 4, p. 239-247, 2000.
- CHÁVEZ, F. P.; et al. **Purification and characterization of invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases.** *Journal of Biotechnology*. v. 53, n.1, p. 67-74, 1997.
- CHEN, J. et al. **Production ad characterization of the high and low molecular weight form (S- and F- form) of invertase secreted by *Aspergillus nidulans*.** *Biochimica et Biophysica acta*. n. 1296, p. 207-218, 1996.
- COELHO, G.D. **Produção e caracterização do sistema xilanolítico excretado por *Aspergillus giganteus*.** Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2002, 57 p. Dissertação (Mestrado).
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos.** Campinas: Ed. da Unicamp, 1990, 279 p.
- COSTA, J.A.V.; COLLA,E.; MAGAGNIN, G. SANTOS, L., BERTOLIN, T. **Simultaneous amyloglucosidase and exo-polygalacturonase production by**

***Aspergillus niger* using Solid-state Fermentation.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, n. 5, p. 759-766, 2008

COUTINHO, P.M., HENRISSAT, B. **Carbohydrate-Active Enzymes server an integrated database approach.** In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 3-12, 1999.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M. A. **Application of solid stat fermentation to food industry – A review.** *Journal of Food Engineering*, in press, 2006.

DAVIS, B.J. Disc eletrophoresis II – “Method and application to human serum proteins”. *Ann. NY Aca. Sci.*, v. 121, p.404-27, 1064.

DARREN, J.; BOTHA, F. **Partial purification and characterization of sugarcane neutral invertase.** *Phytochemistry*. v. 49, n. 3, p. 651-655, 1998.

DEL BIANCHI, V.L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. **Fermentação em estado sólido.** In: LIMA, U.A. et al. *Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica*. 1. ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 247-276.

DOS SANTOS, G. **Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*.** Ponta Grossa: Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006. 81p. Dissertação (mestrado).

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, K. K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. **Colorimetric mthod for determination of sugars and related substances.** *Analitical Chemistry*, v. 28, p. 350-6, 1956.

DURAND, A. **Bioreactors desings for solid stat fermentation.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2/3, p. 113-125, 2003.

- GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**. W.H. Freeman and Company, Nova York ed. 2, 640 p., 1995.
- GUIMARÃES, L. H. S. et al. **Production and characterization of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources**. *Enzyme and Microbial Technology*. n. 42, p. 52-57, 2007.
- HASHIZUME, H. et al. **Production and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese pear fruit**. *Phytochemistry*. n. 63, p. 125-129, 2003.
- HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. **Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.
- HUSSAIN, A.; RASHID, M.; PERVEEN, R.; ASHRAF, M. **Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane**. *Plant Physiology et Biochemistry*, in press, 2008.
- KHARE, S.K.; KRISHNA, J. **Entrapment of wheat phytate in polyacrylamide gel and its application in soymilk phytate hydrolysis**. *Biotechnology applied biochemistry*, v. 19, p. 193-198, 1994.
- KILIKIAN, B.V., PESSOA JR. A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMIDEL W. et al. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1. ed., v. 2 São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 21. p. 493-521.
- KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR. A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2005, 988 p.

- KRONBAUER, E.A.W.; PERALTA, R.M.; OSAKU, C.A.; KADOWAKI, M.K. **Produção de xilanase por *Aspergillus caseiellus* com diferentes fontes de carbono.** *B CEEPA*, v. 25, n. 2, 2007.
- L'HOCINE, L. et al. **Production and characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023.** *Journal of Biotechnology*. n. 81, p. 73-84, 2000.
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, v.227, p. 680-85, 1970.
- LIU, C. et al. **Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells.** *Food Chemistry*. n. 96, p. 621-631, 2006.
- LU, W., LI, D., WU, Y. **Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale fermentation by *Aspergillus sulphureus*.** *Enzyme and Microbial Technology*, 32, p. 305-311, 2003.
- MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanasas por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** Curitiba: Pós-graduação em processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. 142 p. Dissertação (mestrado).
- MARCONDES, N.R. et al. **New Feather-Degrading Filamentous Fungi.** *Microbiology and Ecology*, v. 56, p. 13-17, 2008.
- MARÓSTICA, J.; PASTORE, G.M. **Biotransformação de resíduos agroindustriais em compostos funcionais e de aroma.** IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15, 2005, Recife.
- MARQUEZ, L. D.S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas.** Uberlândia: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2007. 124p. Dissertação (Mestrado).

- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-489, 1959.
- MONTIEL-GONZÁLEZ et al. **Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger***. *Process Biochemistry*. n.39, p. 2085-2090, 2004.
- MORAES, I.O. Produção de microrganismos. In: LIMA, U.A. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 1. ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 9. p. 199-214.
- MORENO, S., SANCHEZ, Y. & RODRIGUEZ, L. **Purification and characterization of the invertase from *Schizosaccharomyces pombe***. *Journal Biochemistry*. n. 267, v. 267, p. 697-702, 1990.
- NGUYEN, Q.D. et al. **Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase form *Aspergillus niger* IMI303386**. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2461-2466, 2005.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. **New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products**. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PERALTA, R.M. Procedimentos de isolamento e racionamento de proteínas. In: BRACHT, A. & ISHII-IWAMOTO E. L. **Métodos de laboratório em bioquímica**. São Paulo: Manole, 2003.
- PINTO, G.A.S., et al. **Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Comunicado técnico. Embrapa, ago, 2005. ISSN 1679-6535.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed., v. 1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004. 605 p.

QUIROGA, E.N.; VATTUONE, M.A.; SAMPIETRO, A.R. **Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus***. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein structure and molecular Enzymology*, n.1251, p. 75-80, 1995.

REIS, A. P. **Purificação, caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas de  $\alpha$ -galactosidases de *Aspergillus terreus***. Viçosa: Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007, 108 p. Dissertação (Mestrado).

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. **Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 55, p. 284-289, 2001.

RODRIGUES, M.V.N.; RODRIGUES, R.F.A.; SERRA, G.E.; ANDRIETTA, S.R.; FRANCO, T. **Produção de xarope de açúcar invertido por hidrólise heterogênea, através do planejamento experimental**. *Ciência e tecnologia de Alimentos*, v. 20, p. 103-109, 2000.

RODRIGUEZ, J.; PEREZ, J.A.; RODRIGUEZ, L. **Characterization of the invertase from *Pichia anomala***. *Biochemistry Journal*. n. 306, p. 235-239, 1995.

RUBIO, M.C., RUNCO, R., NAVARRO, A.R. **Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis***. *Phytochemistry*, v.61, p.605-609, 2002.

RUBIO, M.C., MALDONADO, C.M. **Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger***. *Current Microbiology*, v.31, p.80-83, 1995.

SAID, S., PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1. ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 416p.

- SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica**. 1. ed. São Paulo:Edgard Blücher LTDA, 2001, vol 2.
- SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L.; PANDEY, A. **Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate**. *Bioresource Technology*, v. 65, p. 83-85, 1997.
- SHANKAR, S.K.; MULIMANI, V.H.  **$\alpha$ -Galatosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation**. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 958-961, 2007.
- SLIVINSKI, C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. Ponta Grossa: Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2007. 128p. Dissertação (mestrado).
- SOCCOL, C.R., VANDERBERGHE, L.P.S. **Overview of applied solid-state fermentation in Brazil**. *Biochemical engineering Journal*, n. 13, p. 205-218, 2003.
- TANG, X.W. et al. **Purification and characterization of soluble invertases from leaves of *Arabidopsis thaliana***. *Planta*, n. 198, p. 17-23, 1996.
- TOMOTANI, E. J., VITOLO, M. **Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor**. *Journal of Food Engineering*. n. 80, p. 662-667, 2007.
- TUNGA, R., SHRIVASTAVA, B. & BANERJEE, R. **Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus***. *Process Biochemistry*. 38, 2003, p. 1553-1558.

- VINIEGRA-GÓMEZ, G. et al. **Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems.** *Biochemical Engineering Journal*. N. 13, p. 157-167, 2003.
- VITOLO, M. In: SAID, S., PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, São Paulo:Ed. Legis Suma, 2004, p. 207-221.
- WALLIS, G.L.F., HEMMING, F.W. PEBERDY, J.F. **Secretion of two  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus niger* growing in sucrose.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.345, p.214-222, 1997.
- WOLSKA-MITASZKO, B., JAROSZUK-ŚCISEŁ, J., PSZENICZANA, K. **Isoforms of trehalase and invertase of *Fusarium oxysporum*.** *Mycological Research*, v.3, p.456-465, 2007
- YOSHIKAWA, J. et al. **Production and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase I formed by *aureobasidium pullulans* DSM 2404.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 103, n. 5, p. 491-493, 2007.

## **Páginas da internet**

CISOJA. Disponível em: <<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=historico>> Acesso em 15 mai. 2008.

EMBRAPA. Disponível em:

<[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=22&cod\\_pai=16](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16)> Acesso em 15 mai. 2008.

## Anexo A

### Composição do meio BDA (SMITH & ONIONS, 1983):

Glicose.....	1,5%
Ágar-ágar.....	2,0%
Batata.....	20 g para 100 mL de meio.

### Composição do Meio mineral líquido Czapeck (COELHO, 2002):

NaNO <sub>3</sub> .....	0,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,05 g
KCl.....	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> .....	0,001 g
H <sub>2</sub> O q.s.p. ....	100 mL

O pH do meio foi acertado para 7,0.

### Preparo da solução de Bradford para análise de proteínas

- 0,05g de Comassie Blue dissolvidos em 25 mL de etanol sob agitação
- Acrescentar 50 mL ácido ortofosfórico 85%, adicionar água para completar um volume de 500 mL
- Filtrar em papel Watman e conservar em frasco escuro na geladeira