

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Purificação e Caracterização Bioquímica da Invertase Extracelular

Produzida pelo Fungo Filamentoso *Aspergillus terreus*

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Marielle Aleixo Giraldo

Araraquara

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Purificação e Caracterização Bioquímica da Invertase Extracelular

Produzida pelo Fungo Filamentoso *Aspergillus terreus*

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia do
Instituto de Química, UNESP,
Araraquara, para obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia - Área de
Concentração Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique
Souza Guimarães

Marielle Aleixo Giraldo

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

G516p Giraldo, Marielle Aleixo
Purificação e caracterização bioquímica da invertase
extracelular produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus*
terreus / Marielle Aleixo Giraldo. – Araraquara : [s.n], 2011
106 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Invertase. 4. Fungos
filamentosos. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

MARIELLE ALEIXO GIRALDO

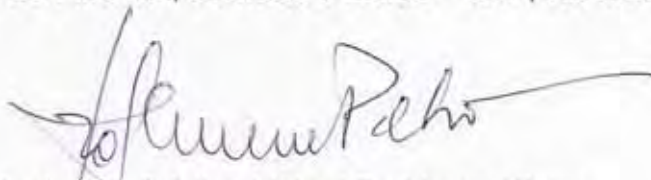
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 09 de maio de 2011.

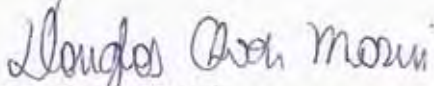
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães (Orientador)
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto



Profª Drª Rosimeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Dr. Douglas Chodi Masui
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por permitir a minha existência e por me guiar em todos os momentos.

Aos meus pais Ronaldo e Amábile, meu muito obrigada por toda confiança, por todos os conselhos, pelo carinho diário, por sempre me apoiarem e ajudarem em todas as decisões, obrigada pela ajuda financeira, sem vocês eu jamais teria concluído este trabalho. amo muito vocês.

A minha irmã Fran, meio filhinha.. obrigada por todos os conselhos, por todas as ajudas, pela força que você mostra diariamente.

Ao meu irmão Ju, que sempre me apóia e acredita no meu sucesso.

Ao meu namorado Renato, obrigada por todas as ajudas, por todos os finais de semana que ficamos em casa estudando juntos, você foi fundamental na realização deste trabalho.

As minhas amigas- irmãs Nátalie e Valdelice, por sempre me incentivarem e por estarem presentes na minha vida.

Ao casal de amigos Lê e Renato, por estarem por perto torcendo por mim e pelo incentivo constante.

Aos meus avós por toda a torcida, por todas as orações.

Aos meus tios, tias, primos e primas, por todo apoio e confiança depositados em mim.

Ao meu afilhado Miguel, por mostrar que a vida vale a pena e por sempre nos alegrar muito.

Ao meu cunhado Paulinho, por sempre me ajudar com a informática e por agora estar lutando bravamente pela sua recuperação.

A Nataly pelo auxílio com o inglês.

Agradeço ao Professor Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, a oportunidade, a confiança e a todos os ensinamentos.

Aos Professores João Atílio Jorge, Maria de Lourdes Polizelli e Héctor Terenzi, por abrir as portas do laboratório e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos técnicos e amigos Maurício, Mariana e Ricardo, por todo o apoio e ensinamentos.

A Alana, companheira inseparável nesta caminhada, obrigada por sempre estar presente, nas horas boas e ruins, nos ensinamentos, obrigada pela amizade e por todos os favores que me fez ao longo deste percurso.

A Loli, que chamei o mestrado todo de Heloísa..rs por não conseguir chamar as pessoas pelo apelido, obrigada pelos ensinamentos, paciência, amizade e por todas as ajudas.

A Cynthia, que mesmo quando estava longe, me auxiliava pela internet, obrigada pelo apoio, favores intermináveis, papos bem divertidos e pela amizade.

A Tati, sempre alegre, sempre disposta a dar conselhos amorosos..rs, obrigada pela amizade, pela agradável convivência e por todas as ajudas.

A Marita, sempre me salvando com os géis, tirando todas as dúvidas com excelentes explicações, obrigada por tudo.

A Telma, que chegou para alegrar o laboratório, excelente astral, muito inteligente, obrigada pelos auxílios nos cálculos químicos e pela sua companhia agradável.

Ao Jean, por sempre emprestar o Temed..rs e por todas ajudas prestadas.

Ao Beraba, pelas explicações via internet, por todo o apoio.

A Simone, por sempre estar disposta a ajudar, por ser sempre muito prestativa.

A Lili, por todas as excelentes explicações de bioquímica e por sempre estar de bem com a vida.

Aos alunos de iniciação André, Bruna, Priscila e Larissa, pela companhia e amizade.

Aos alunos que chegaram agora mais no final deste trabalho, Zé, Josana, e Juliana, que contribuíram também com amizade, companhia.

Aos colegas de trabalho, que ficam um pouco mais distantes no laboratório, mas que também contribuíram, André, Maller, Mateus, Juliana, Vivian, Ana e Michele.

As secretárias da Pós- Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP- Araraquara, em especial a Wennia, que sempre me auxiliou mesmo a distância.

A Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, local onde foi desenvolvido este trabalho.

A Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara.

A Capes e a FAPESP pelo apoio financeiro.

**“ O que ouço, esqueço.
O que vejo, lembro.
Mas o que faço, aprendo.”**

Albert Einstein

**Dedico este trabalho aos meus
pais, irmãos, avós, namorado,
cunhado, madrinha e afilhado,
pessoas fundamentais e especiais
na minha vida.**

Marielle Aleixo Giraldo graduou-se em Biologia pelo Centro Universitário Claretiano de Batatais (2008). Atualmente é membro do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no curso de mestrado, desenvolveu sua dissertação intitulada “Purificação e Caracterização da Invertase Extracelular Produzida pelo Fungo Filamentoso *Aspergillus terreus*” no Laboratório de Biologia Celular e Microbiologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP/SP, sob orientação do Professor Dr. Luis Henrique Souza Guimarães. Tem experiência na área de Microbiologia e Bioquímica, com ênfase em Biologia e Fisiologia dos Microorganismos.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Fungos Filamentosos.....	1
1.2 Filo Ascomycota.....	3
1.3 Microrganismo em Estudo	4
1.4 Enzimas	6
1.4.1 Invertase.....	8
1.4.2 Produção de Invertases	14
1.4.3 Aplicação Industrial.....	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Microrganismo e Manutenção da Cepa	20
3.2 Obtenção das Culturas em Fermentação Submersa (FSbm)	20
3.2.1 Composição dos Meios de Cultivo.....	21
3.2.1.1 Meio Adams.....	21
3.2.1.2 Meio Vogel.....	21
3.2.1.3 Meio SR	22
3.2.1.4 Meio Khanna.....	23
3.2.1.5 Meio M5.....	24
3.2.1.6 Meio Czapeck.....	24
3.3 Obtenção de Culturas em Fermentação em Substrato Sólido (FSS).....	25
3.3.1 Composição dos Sais de Nitrato [20 X] (SELIG et al.,2008).....	25
3.3.2 Solução de Traços de Elementos [1000 X] (SELIG et al.,2008)	26
3.4 Obtenção das Enzimas.....	26
3.4.1 Obtenção das Enzimas em FSbm	26
3.4.2 Obtenção da Enzima em FSS	27
3.5 Dosagem da Atividade Enzimática	27
3.6 Dosagem de Proteínas e Carboidratos.....	28
3.7 Otimização da Produção Enzimática em Função de Fontes Adicionais de Fósforo e Nitrogênio.....	28
3.8 Determinação da Temperatura e do pH Ótimos de Atividade, Termoequilíbrio e Estabilidade ao pH	30
3.10 Influência de Diferentes Compostos na Atividade Invertásica	31
3.11 Purificação em Colunas Cromatográficas.....	32
3.12 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	33
3.13 Determinação da Massa Molecular.....	33
3.14 Hidrólise de Diferentes Substratos.....	34
3.15 Análise dos Produtos de Hidrólise por TLC e HPLC.....	34

3.16 Determinação dos Parâmetros Cinéticos.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Produção de Invertases em FSbm e em FSS.....	36
4.1.1 Efeito da Temperatura sobre o Crescimento do Fungo e sobre a Produção de Invertases em Diferentes Meios de Cultivo	36
4.1.2 Efeito de Diferentes Fontes de Carbono na Produção Invertásica em FSbm	39
4.1.3 Produção de Invertases por <i>A. terreus</i> em Função do Tempo de Cultivo	42
4.1.4 Efeito de Diferentes Concentrações de Glicose e Frutose Adicionadas ao Meio de Cultivo.....	45
4.1.5 Efeito de Peptona e Fosfato na Produção Invertásica.....	47
4.1.6 Efeito do pH Inicial do Meio de Cultivo na Produção de Invertases em FSbm	52
4.1.7 Influência de Diferentes Substratos/Fontes de Carbono na Produção de Invertases em FSS ..	55
4.1.8 Efeito de Diferentes Soluções Adicionadas a FSS na Produção de Invertases.....	57
4.1.9 Produção de Invertases em FSS com Soja Moída em Função do Tempo de Cultivo	60
4.1.10 Efeito de Diferentes Concentrações de Glicose e Frutose Adicionadas à FSS.....	61
4.2 Caracterização das Invertases Extracelulares Produzidas em FSbm e FSS.....	63
4.2.1 Purificação da Invertase Extracelular.....	63
4.2.2 Determinação da Massa Molar e Conteúdo de Carboidratos.....	67
4.2.3 Hidrólise de Diferentes Substratos.....	70
4.2.4 Análise dos Produtos de Hidrólise.....	72
4.2.5 Determinação das Constantes Cinéticas	75
4.2.6 Influência da Temperatura e pH de Reação na Atividade Invertásica.....	78
4.2.7 Influência de Diferentes Compostos na Atividade Invertásica	87
4.2.8 Caracterização Bioquímica da Invertase Produzida em FSS.....	90
4.2.8.1 Influência da Temperatura e pH de Reação na Atividade Invertásica.....	90
4.2.8.2 Influência de Diferentes Compostos na Atividade Invertásica	94
4.2.10 Hidrólise de Diferentes Substratos.....	96
5. CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	98

RESUMO

Os microrganismos, de modo especial os fungos filamentosos, possuem papel fundamental na decomposição de matéria orgânica, sendo interessantes como modelos para realização de diferentes estudos biológicos. Além disso, são de fácil manejo e as condições de cultivo podem ser facilmente adaptadas em laboratório. Outra vantagem é, geralmente, o baixo custo e o fácil acesso aos nutrientes necessários para o crescimento dos mesmos. Entre os microrganismos, os fungos filamentosos têm se destacado na obtenção de enzimas de interesse biotecnológico, como é o caso das invertases, as quais podem ser empregadas nas indústrias de alimentos e bebidas.

As invertases (EC 3.2.1.26) são hidrolases que podem ser encontradas em uma grande variedade de organismos, realizando a hidrólise da ligação β -D-frutofuranosídica, agindo sobre a sacarose, gerando como produtos D-glicose e D-frutose, em quantidades equimolares. Essa mistura é conhecida como açúcar invertido e é geralmente utilizada pelas indústrias de alimentos.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de invertase extracelular pelo fungo filamentoso *Aspergillus terreus*, em fermentação submersa e em fermentação em substrato sólido, bem como purificar e caracterizar a enzima bioquimicamente.

Entre os diversos meios de cultura testados em FSbm, a maior produção invertásica foi obtida em meio M5 mantido em agitação orbital (100 rpm) a uma temperatura de 30°C, por um período de 48 horas de incubação. Já na FSS, o melhor período de incubação foi de 72 horas, também a 30°C. Entre todas as fontes de carbono testadas, a maior produção invertásica foi obtida utilizando-se farinha de centeio para a FSbm e soja moída para FSS. A enzima

extracelular obtida em FSbm foi purificada 139 vezes com uma recuperação de 11%. A invertase extracelular de *A. terreus* é um heterodímero de massa molecular nativa de 74,67 kDa constituído de 2 subunidades, sendo uma de 46,77 kDa e a outra de 26,92 kDa determinadas por SDS-PAGE e apresentou conteúdo de carboidratos ao redor de 11%. As temperaturas ótimas de atividade permaneceram entre 55⁰C e 65⁰C para ambas as formas enzimáticas intra e extracelular, tanto em FSbm quanto em FSS. Já os pH ótimos de atividade foram de 5,0 para ambas as formas produzidas em FSbm e 6,0 para a forma produzida em FSS. A forma extracelular foi ativada principalmente na presença de Mn²⁺, sendo estável a 60⁰C e em uma ampla faixa de pH, o que torna a enzima atrativa para uma possível aplicação industrial. Os valores de K_m e V_{máx} utilizando sacarose como substrato foram 22,73 mM e 178,57 U/mg, respectivamente. Para este substrato na presença de Mn²⁺ os valores foram 11,9 mM e 526,31 U/mg, respectivamente. Já na presença de inulina como substrato, o valor de K_m foi 14,49 mM e V_{máx} de 83,33 U/mg.

Em se tratando do potencial enzimático para produção de frutooligossacarídeo, verificamos na análise feita por HPLC, a presença de um pico com tempo de retenção em torno de 8,5 minutos, sugerindo a formação de FOS.

ABSTRACT

The microorganisms, especially filamentous fungi, have a fundamental role in the decomposition of organic matter, and they are interesting as models for carrying out different biological studies. Moreover, they are easy to handle, and their growing conditions can be easily adapted in the laboratory. Another advantage is, generally, the low cost and easy access to the nutrients needed for their growth. Among the microorganisms, filamentous fungi have been essential in obtaining enzymes of biotechnological interest, such as invertase, which may be employed in the food and beverage industries.

The invertases (EC 3.2.1.26) are hydrolases that can be found in a great variety of organisms, performing the hydrolysis of the β -D fructofuranosidic bond acting on sucrose, generating products such as D-glucose and D-fructose, in equimolar amounts. This mixture is known as inverted sugar and it is commonly used by food industries.

This way, the aim of this work was to study the production of extracellular invertase by the filamentous fungus *Aspergillus terreus* in submerged fermentation and solid state fermentation, as well as its purification and biochemical characterization.

Among the various media tested in FSbm, the highest yield of invertase was obtained by using M5 medium under orbital agitation (100 rpm) at 30°C for 48 hours of incubation. In the FSS, the best incubation period was 72 hours, also at 30°C. Among all carbon sources tested, the highest invertase production was obtained using rye flour for FSbm and soybean meal for FSS. The extracellular enzyme obtained from FSbm was purified 139 fold with 11% recovery. The extracellular invertase of *A. terreus* is a heterodimer of native

molecular mass of 74.67 kDa consisting of two subunits, one of 46.77 kDa and another of 26.92 kDa determined by SDS-PAGE, with carbohydrate content around 11%. The optimal temperature for activity remained between 55⁰C and 65⁰C for both intra and extracellular forms under FSbm and FSS. The optimal pH of activity was 5.0 for the both enzymatic forms produced in FSbm and 6.0 for the enzyme produced in SSF. The extracellular invertase was mainly activated in the presence of Mn²⁺, and it was stable at 60⁰C and in a wide pH range, what makes the enzyme attractive for industrial application. The values of K_m and V_{máx} using sucrose as substrate were 22.73 mM and 178.57 U / mg, respectively. For this substrate in the presence of Mn²⁺ the values were 11.9 mM and 526.31 U / mg, respectively. In the presence of inulin as substrate, the K_m value was 14.49 mM with V_{máx} of 83.33 U / mg.

According to the HPLC analysis for fructooligosaccharides production we found a peak with retention time around 8.5 minutes, suggesting the formation of FOS.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs - Absorbância	m/v - Massa por volume
Atm - Atmosfera	N - Normal
BDA - Batata dextrose ágar	nm - Nanômetros
°C - Graus Celsius	PAGE- Eletroforese em gel de
Da - Dalton	poliacrilamida
DEAE - Dietilaminoetil	pH - Potencial hidrogeniônico
DNS - Ácido 3', 5'dinitrosalicílico	p/v - Peso por volume
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra- acético	qsp - Quantidade suficiente para
FSbm - Fermentação submersa	rpm - Rotações por minuto
FSS - Fermentação em substrato sólido	SDS - Dodecil sulfato de sódio
g - Grama	T ₅₀ - Tempo de meia vida
g - Aceleração da gravidade	TLC – Cromatografia em camada delgada
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência	U - Unidade enzimática
kDa - quilo Dalton	V - Volts
K _m - Constante de Michaelis-Menten	μL - Microlitro
mA - Miliampére	μmols - Micromols
mg - Miligrama	V _{máx} - Velocidade máxima
mM - Milimolar	v/v - Volume por volume
	λ - Comprimento de onda

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i> com as fases sexual (↔), assexual (↔) e parassexual (↔).....	3
Figura 2. Mecanismo de reação catalisada pela invertase.....	9
Figura 3. Fungo <i>Aspergillus terreus</i> em meio BDA nas temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C e 40°C.....	37
Figura 4. Produção de invertases (A) extra (▪) e intracelulares (•) pelo fungo filamentoso <i>A. terreus</i> , e seu respectivo desenvolvimento (B) em função do tempo de cultivo.....	44
Figura 5. Influência de diferentes concentrações de glicose (A) e frutose (B) na produção de invertases extra (■) e intracelulares (▒) pelo fungo filamentoso <i>A. terreus</i> em FSbm.....	46
Figura 6. Superfície de resposta para o modelo que descreve a influência da peptona e do KH ₂ PO ₄ na produção das invertases extracelular (A) e intracelular (B) produzidas pelo fungo <i>A. terreus</i>	51
Figura 7. Influência de diferentes pH iniciais do meio de cultivo na produção de invertases extra (■) e intracelulares (▒) pelo fungo filamentoso <i>A. terreus</i> (A) e crescimento vinculado ao pH (B).....	54
Figura 8. Produção de invertase extracelular pelo fungo <i>Aspergillus terreus</i> em FSS em função do tempo de cultivo.....	60
Figura 9. Influência de diferentes concentrações de glicose (A) e frutose (B) na produção de invertases (▒) pelo fungo filamentoso <i>A. terreus</i> em FSS.....	62
Figura 10. Perfis cromatográficos em DEAE-Celulose (A) e Sephacryl S-200 (B) para invertase extracelular produzida por <i>A. terreus</i> em FSbm. Símbolos: (□) Atividade; (●) Abs 280 nm	65
Figura 11. Perfil eletroforético da invertase extracelular purificada em PAGE 6% revelado por prata (A) e para a atividade invertásica (B).....	66
Figura 12. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 6%) para invertase extracelular purificada revelada por prata (A) e determinação da massa molar nativa produzida por <i>A. terreus</i> (B).....	69
Figura 13. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) para a glicose e a frutose formados a partir da hidrólise da sacarose pela enzima extracelular em função do tempo de reação. Raias: (S) sacarose; (G) glicose; (F) frutose; (0) controle; (5) reação de 5 minutos; (10) reação de 10 minutos; (15) reação de 15 minutos e (20) reação de 20 minutos.....	73

Figura 14. Perfil cromatográfico em HPLC dos produtos de hidrólise da sacarose pela ação da invertase extracelular. As reações foram conduzidas a 60 ⁰ C. Reação com 1% de sacarose tempo zero (A) e reação com 1% de sacarose 4 horas (B).....	74
Figura 15. Representação gráfica do duplo-recíproco para a hidrólise do substrato sacarose na ausência (A) e na presença de Mn ²⁺ (B), e do substrato inulina (C).....	77
Figura 16. Determinação da temperatura ótima de ensaio (A) e pH ótimo de ensaio (B) para as invertases extracelular (▪) e intracelular (•) produzidas pelo fungo <i>A. terreus</i>	80
Figura 17. Superfície de resposta para o modelo que descreve a influência da temperatura e do pH nas atividades invertásicas extracelular (A) e intracelular (B) produzidas pelo fungo <i>A. terreus</i>	84
Figura 18. Estabilidade térmica (A) e ao pH (B) para a invertase extracelular produzida por <i>A. terreus</i> em FSbm.....	86
Figura 19. Determinação da temperatura ótima de ensaio (A) e pH ótimo de ensaio (B) para a invertases extracelular (▪) produzida pelo fungo <i>A. terreus</i>	91
Figura 20. Estabilidade térmica (A) e estabilidade ao pH (B) da invertase extracelular produzida por <i>A. terreus</i> em FSS.....	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Dados comparativos de invertases produzidas por fungos.....	13
Tabela 2. Dados cinéticos comparativos de invertases produzidas por fungos	13
Tabela 3. Planejamento fatorial para as variáveis independentes (peptona e KH_2PO_4) reais e codificadas.....	29
Tabela 4. Planejamento fatorial para as variáveis independentes (temperatura e pH) reais e codificadas.....	31
Tabela 5. Produção de invertases por <i>Aspergillus terreus</i> em FSbm em função do meio de cultivo e da temperatura de incubação.....	39
Tabela 6. Produção de Invertases por <i>Aspergillus terreus</i> em FSbm em função da fonte de carbono.....	42
Tabela 7. Influência da adição de peptona e KH_2PO_4 na produção de invertases pelo fungo filamentoso <i>A. terreus</i>	48
Tabela 8. Atividades enzimáticas extra e intracelulares das invertases produzidas por <i>A. terreus</i> em FSbm.....	49
Tabela 9. Análise de variância de diferentes concentrações de Peptona e KH_2PO_4 para a enzima extracelular.....	51
Tabela 10. Análise de variância de diferentes concentrações de Peptona e KH_2PO_4 para a enzima intracelular.....	52
Tabela 11. Substratos/fontes de carbono utilizados para a produção de invertase por <i>A. terreus</i> em FSS.....	56
Tabela 12. Influência da mistura de substratos na produção de invertases extracelulares por <i>A. terreus</i> em FSS.....	57
Tabela 13. Influência de diferentes soluções de sais, água destilada e água de torneira adicionadas a FSS com soja moída sobre a produção de invertase por <i>A. terreus</i>	58
Tabela 14. Influência de diferentes concentrações de sais SR na produção de invertase pelo fungo <i>A. terreus</i>	59
Tabela 15. Purificação da invertase extracelular produzida por <i>A. terreus</i> em FSbm.....	66
Tabela 16. Hidrólise de diferentes substratos pela invertase extracelular produzida em FSbm.....	71

Tabela 17. Hidrólise de diferentes substratos pela invertase extracelular purificada produzida em FSbm.....	72
Tabela 18. Parâmetros cinéticos da invertase extracelular produzida por <i>A. terreus</i>	76
Tabela 19.. Atividades enzimáticas para as enzimas extra e intracelulares com relação a diferentes temperaturas e pH.....	81
Tabela 20. Análise de variância para diferentes temperaturas e pH para a enzima extracelular.....	82
Tabela 21. Análise de variância para diferentes temperaturas e pH para a enzima intracelular.....	83
Tabela 22. Influência de diferentes compostos na atividade invertásica extracelular do fungo <i>A. terreus</i> em FSbm.....	89
Tabela 23. Influência de diferentes compostos na atividade invertásica do fungo <i>A. terreus</i>	95
Tabela 24. Hidrólise de diferentes substratos pela invertase produzida pelo fungo <i>A. terreus</i>	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fungos Filamentosos

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos que realizam decomposição de matéria orgânica e por isso reciclam elementos vitais na cadeia alimentar. Possuem parede celular rígida, composta por polissacarídeos, proteínas e lipídeos, que oferece resistência às pressões osmóticas e mecânicas. Os fungos são desprovidos de clorofila, e por isso não realizam fotossíntese. Além disso, armazenam como material de reserva glicogênio e podem ser encontrados no ar, solo, água, vegetais e animais. A célula fúngica possui membrana citoplasmática lipoprotéica, cuja uma das funções é regular as trocas com o meio ambiente (BORZANI *et al.*, 2001).

O assunto chama a atenção porque os fungos passaram a ser instrumentos importantes na saúde pública, uma vez que são objetos de estudo em busca de cura e soluções eficientes para as doenças por eles causadas e também, como ferramentas nas áreas de controle biológico e biotecnologia, entre outros (MORAES *et al.*, 2000). Em se tratando de processos biotecnológicos, os fungos estão presentes na panificação, fabricação da cerveja e do álcool, produção de antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, produtos farmacêuticos, processamento de frutas e legumes, clarificação de sucos de frutas, extração de cafés e na produção de adoçantes. Os fungos filamentosos de maior interesse incluem os gêneros *Aspergillus*, *Mucor* e *Trichoderma* como, por exemplo, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *M. michie* e *T. reesei* (BENNETT, 1998; VAN DEN HOMBERGH *et al.*, 1997).

No caso dos fungos filamentosos, o talo consiste de filamentos longos de células conectadas. Estes filamentos são denominados hifas, as quais podem ser septadas ou cenocíticas (TORTORA *et al.*, 2003).

A porção que obtêm nutrientes é chamada de hifa vegetativa e a parte envolvida com a reprodução é chamada de hifa reprodutiva ou aérea, a qual freqüentemente sustenta os esporos. Quando as condições ambientais são favoráveis, as hifas crescem e formam uma massa filamentosa, chamada de micélio, visível a olho nú (TORTORA *et al.*, 2003).

Os fungos filamentosos podem reproduzir-se sexuadamente e assexuadamente, sendo neste último por fragmentação de suas hifas ou pela formação de esporos, e estes além de participarem da reprodução, são os principais meios de disseminação da espécie. Após um fungo filamentoso formar um esporo, este se separa da célula parental e germina originando um novo indivíduo (figura 1) (TORTORA *et al.*, 2003; BORZANI *et al.*, 2001).

De forma geral, os fungos filamentosos têm se destacado na produção de diferentes biomoléculas, estando entre elas as enzimas, que podem ser biotecnologicamente atrativas, uma vez que torna o processo mais rápido, barato e ecologicamente correto. Estes microrganismos adaptam-se melhor às condições da fermentação em substrato sólido se comparado aos microrganismos unicelulares, uma vez que possuem boa tolerância a baixa atividade de água e elevada pressão osmótica (KRISHNA, 2005).

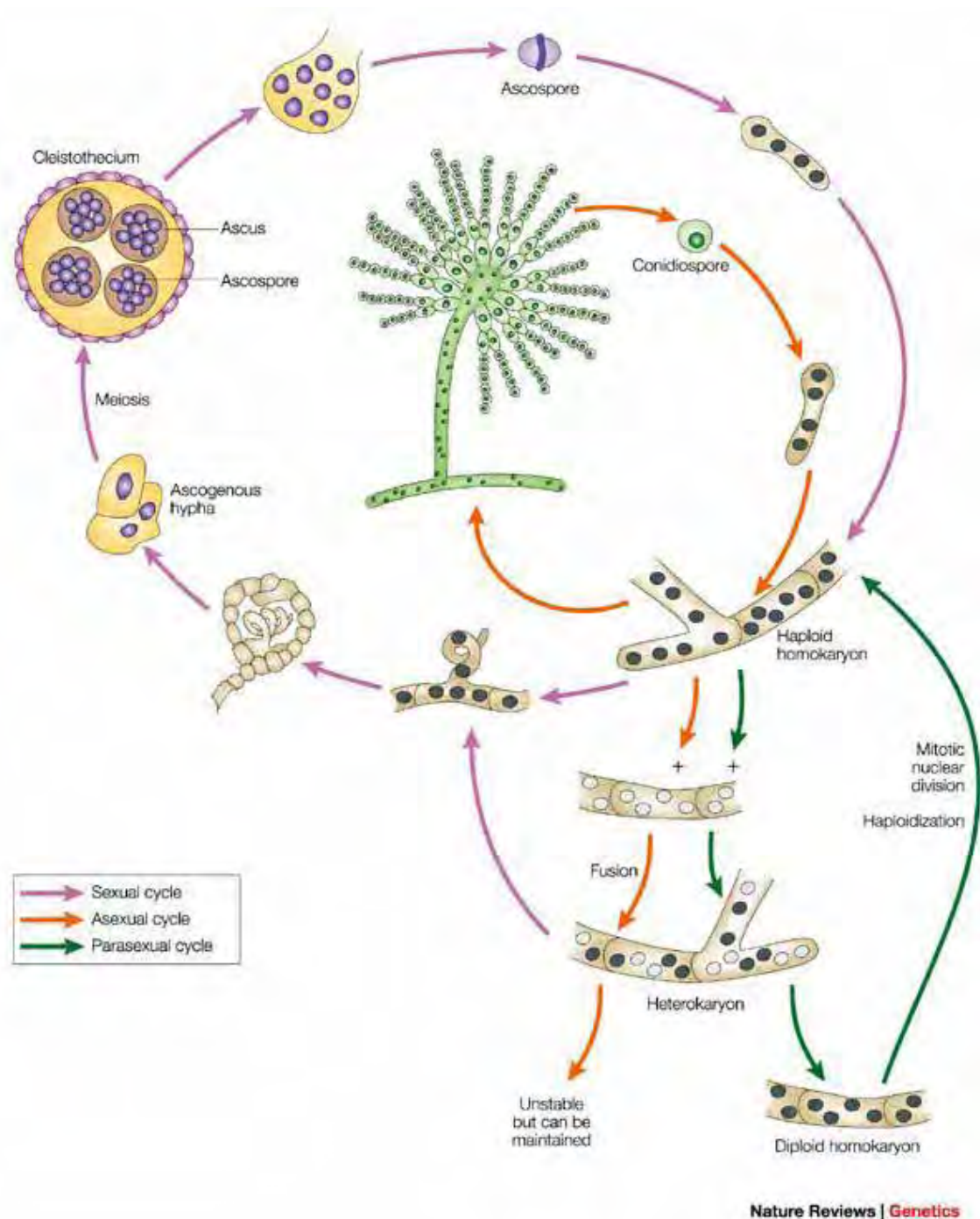


Figura 1. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* com as fases sexual (←), assexual (←) e parasexual (←). Modificado de CASSELTON & ZOLAN, 2002.

1.2 Filo Ascomycota

Entre todos os grupos fúngicos existentes, o filo Ascomycota tem se destacado pela produção de enzimas e biomoléculas. Este filo abriga os fungos em forma de saco, contendo mais de 30.000 espécies, incluindo as leveduras

(BLACK, 2002). Os fungos pertencentes a este filo, produzem esporos sem flagelos e parede celular com quitina. As hifas apresentam septos, exceto algumas leveduras e são chamados de ascomicetos por formarem um asco em forma de saco, durante a reprodução sexuada (BLACK, 2002).

Em espécies que apresentam estágio assexuado, os esporos são chamados de conídios. Na fase sexuada, uma cepa possui um grande ascogônio e uma cepa adjacente possui um anterídio menor. Estas estruturas se unem e os núcleos se fundem, formando um zigoto. O núcleo do zigoto se divide em oito núcleos dentro de cada asco e cada asco forma oito ascósporos, que podem algumas vezes ser expelidos (BLACK, 2002).

Como estruturas somáticas, apresentam-se na forma leveduriforme ou micelial e por isso são considerados dimórficos (ESPÓSITO & AZEVEDO, 2004).

É importante salientar que neste filo encontram-se espécies de grande interesse para a microbiologia, tais como *Penicillium notatum* (penicilina), *P. roquefortii* (queijo Roquefort) e *P. camemberti* (queijo Camembert), e leveduras como *Saccharomyces* (liberam gás carbônico e álcool como produtos da fermentação e são usadas para fermentar pães e bebidas). Há também fungos patógenos de seres humanos, como os dos gêneros *Trichophyton* (pé de atleta) e *Aspergillus* (infecções respiratórias) (BLACK, 2002).

1.3 Microrganismo em Estudo

A primeira etapa da produção microbiana de uma enzima de interesse, consiste na identificação e aquisição do microrganismo produtor, que pode ser de uma linhagem selvagem ou modificado por genética ou técnicas

biomoleculares. Este pode ser adquirido de coleções de culturas científicas ou selecionados a partir de amostras de solo, água, ar e tecidos vegetais em decomposição, entre outros. O microrganismo de interesse deve ter as seguintes características: ser seguro sob ponto de vista biológico, apresentar elevada capacidade de síntese e secreção da enzima, suportar condições ambientais adversas (pressão osmótica, temperatura, força iônica) e ser tolerante à presença de substâncias tóxicas (BON *et al.*, 2008).

Desta maneira, a manutenção e a preservação do microrganismo são etapas importantes para assegurar a sua viabilidade e prevenir mudanças genéticas. Como técnicas de manutenção e conservação de microrganismo, podemos citar repicagens periódicas, conservação em parafina ou glicerol e liofilização, entre outros (DEMAIN & SOLOMON, 1986).

Analisando estes quesitos, o microrganismo escolhido para estudo foi o fungo filamentoso *Aspergillus terreus*, pertencente ao gênero *Aspergillus* e ao sub-gênero *Nidulans*. Os membros desta espécie são diversos na sua morfologia colonial, e podem crescer como colônias brilhantes na coloração laranja ou em vários tons de marrom canela. Em ágar o *A. terreus* cresce rapidamente com um aparecimento variável de colônias, que podem ser muito ou pouco esporuladas (BALAJEE, 2009).

O fungo *A. terreus*, tem sido mencionado como um bom produtor de enzimas, tais como L-asparaginase (SARQUIS, 2002), hemicelulase (BATTESTIN *et al.*, 2004), endoglucanase (SMRUTI *et al.*, 1995), celulase (ROSA, 2010) e α -galactosidase (FERREIRA, 2007), além de invertases como mostrado no presente estudo.

1.4 Enzimas

O uso de enzimas é relatado nos poemas épicos de *Iliada* e *Odisséia*, que datam de aproximadamente 800 aC. Referem-se, portanto, ao uso da renina, uma enzima encontrada no estômago de bezerros, ovelhas e cabritos, que é utilizada na produção de queijo. Já o uso industrial data de 1874, quando o dinamarquês Hansen Christian extraiu esta mesma enzima do estômago de um bezerro (ANDREWS, 1987; NIELSEN *et al.*, 1994).

Neste contexto, pode-se definir as enzimas como proteínas especializadas que possuem eficiência catalítica significativa, pois apresentam alto grau de especificidade por seus substratos, acelerando assim as reações químicas. A atividade catalítica depende da perfeita forma das estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas, além do pH e temperatura ótimos e o substrato adequado. As enzimas são catalisadores que aumentam a velocidade de uma reação sem alterar o equilíbrio da mesma, além de diminuir a energia de ativação. Estas também aceleram a transformação do substrato em produto, não são gastas no processo e fazem a reação alcançar o equilíbrio mais rapidamente (NELSON & COX, 2002).

As enzimas são freqüentemente utilizadas para melhoria de processos, tais como clareamento de papel, tratamento de efluentes, produção de açúcar, e substituindo a hidrólise ácida, entre outros processos, além de possibilitar o uso de novas matérias primas, melhorando suas características físico-químicas e também as de vários produtos (LIMA *et al.*, 2001; BON *et al.*, 2008). Do ponto de vista industrial, a enzima deve proporcionar a obtenção de produtos com as seguintes características: melhor qualidade que o produto tradicional, redução de custos no processo e favorecer a produção de produtos que não são

disponíveis ou somente em pequenas quantidades. Como as enzimas são de origem natural, normalmente são consideradas seguras para o uso em alimentos e bebidas em relação aos aditivos químicos (LIMA *et al.*, 2001; BON *et al.*, 2008).

As enzimas ainda podem ser úteis melhorando a qualidade e facilitando a obtenção de um produto desejado, ou produzir um intermediário no qual este seja difícil de se obter quimicamente (LIMA *et al.*, 2001).

O uso de enzimas é eficiente em vários processos, tais como na área farmacêutica para a produção de medicamentos e limpeza de lentes de contato, na área médica para a limpeza de veias e artérias para transplante, na indústria têxtil, no tratamento de efluentes, e na produção de aminoácidos e cremes dentais, além de serem matéria prima na fabricação de detergentes, entre outros (LIMA *et al.*, 2001).

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, sendo que os microrganismos são as principais fontes devido a grande variedade de atividades catalíticas que exercem, além da possibilidade de produzirem enzimas em grande escala, e devido também ao fato da simplicidade dos requerimentos nutricionais (BON *et al.*, 2008). Além disso, as enzimas microbianas secretadas são normalmente mais estáveis e são produzidas em maiores quantidades. Estes biocatalisadores têm a função principal de degradar macromoléculas presentes no meio ambiente, como a celulose, o amido, a lignina e as proteínas para absorção de seus componentes como nutrientes. São utilizadas desde a antiguidade na obtenção de alimentos e flavorizantes (shoyu, tempeh) a partir da proteína da soja e na bebida sakê, a partir do arroz (BON *et al.*, 2008; FOX 1991 e 1992). O uso controlado de

enzimas pode levar ao melhoramento do sabor, cor, textura, aparência e valor nutricional dos alimentos (BON *et al.*, 2008).

Entre as diferentes enzimas conhecidas, tais como, tanases, fitases, trealases, xilanases, amilases e celulases, entre outras, a invertase merece destaque pelo seu potencial biotecnológico.

1.4.1 Invertase

A invertase (EC 3.2.1.26), também conhecida como β -D-frutofuranosidase, é uma hidrolase que pode ser encontrada em uma grande variedade de organismos procariotos e eucariotos, estando entre estes últimos os fungos e leveduras como os dos gêneros *Aspergillus* e *Saccharomyces*, respectivamente (PIETRO & SAID, 2004). Atuam unicamente na hidrólise da ligação β -D-frutofuranosídica agindo, portanto, sobre a sacarose para formar D-frutose (que possui constituição líquida não cristalizável) e D-glicose (que é um açúcar redutor) (figura 2). A mistura equimolar desses monossacarídeos é conhecida como açúcar invertido, sendo este muito utilizado em indústrias alimentícias devido a sua maior capacidade de adoçar se comparado a sacarose. Além de hidrolizar preferencialmente o substrato sacarose, pode ainda hidrolizar rafinose e estaquiose (SHAHEEN *et al.*, 2007). As invertases podem ser encontradas em diferentes isoformas de acordo com o pH ótimo de atuação. Atualmente estão incluídas na família GH32 das glicosidases, na qual são encontradas 370 membros de origem vegetal, fúngica e bacteriana (ALBERTO *et al.*, 2004). De forma geral, as invertases apresentam maiores atividades em faixas de temperatura e pH variando de 40°C a 60°C e pH de 3,0 a 5,0, respectivamente (PIETRO & SAID, 2004). Em vegetais, a função dessas

isoformas parece estar relacionada com a entrada da sacarose em diferentes vias de utilização (STURM & TANG,1999). A forma ácida que localiza-se na parede celular, tem sido associada com o transporte de açúcar e à zonas de crescimento ativas, tais como os frutos. Já a forma ácida vacuolar, encontra-se ativa geralmente quando o tecido está maduro e as formas neutra e alcalina são encontradas no citosol, sendo consideradas enzimas de manutenção envolvidas na degradação da sacarose, quando a atividade da invertase de parede celular é baixa (VARGAS *et al.*, 2003; COPELAND,1990).

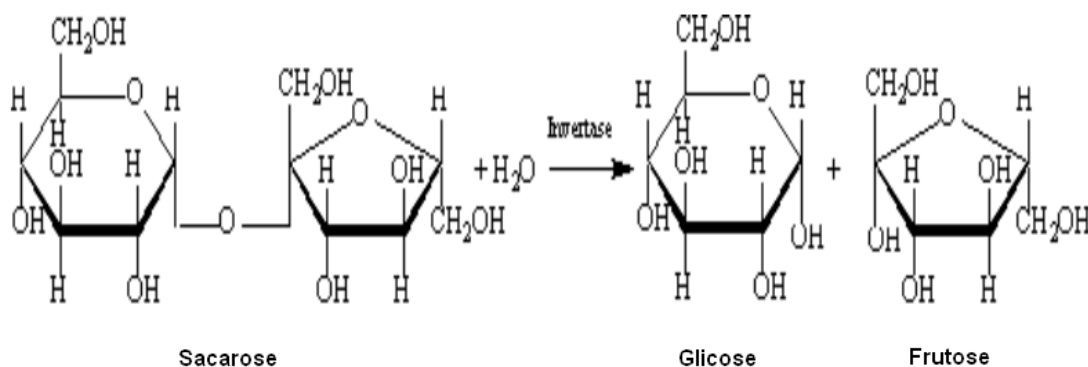


Figura 2. Mecanismo de reação catalisada pela invertase.

Em vegetais, foi verificado que as invertases podem ser encontradas na parede celular como, por exemplo, em plantas de tabaco e de *Arabidopsis* sp., provocando acúmulo de carboidratos e inibição da fotossíntese, ocorrendo quando a taxa de fotossíntese excede a demanda de sacarose. Também foi verificado que estas enzimas participam no desenvolvimento do fenótipo em plantas transgênicas de tabaco (SHAEWEN *et al.*, 1990). Em *Arabidopsis thaliana*, a invertase ácida está presente na parede celular secundária, tendo sua seqüência em aminoácidos sido comparada com as de outras invertases presentes em diferentes espécies de *Arabidopsis* e de *Daucus carota*,

permitindo uma análise filogenética das invertases ácidas presentes nas paredes celulares (MERCIER & GOGARTEN, 1995). Há também invertases alcalinas e neutras, que se acumulam no citosol. Estas têm sido extraídas do hipocótilo da soja, dos cotilédones da *Vicia faba* e das raízes de *Cichorium intybus*, entre outros (VARGAS *et al.*, 2003).

Entre os diversos organismos, os fungos têm se destacado como boas fontes de enzimas de interesse biotecnológico como, por exemplo, o fungo *Schwanniomyces occidentalis* que tem sido utilizado na produção de enzimas extracelulares, pois cresce em fontes de carbono consideradas baratas e tem alto poder de produção de enzimas, tais como a invertase (BENITO *et al.*, 2007). Outros fungos foram estudados e apresentaram boa produção de invertases, tais como *Aspergillus ochraceus* (GUIMARÃES *et al.*, 2007), *Fusarium* sp. (SHAHEEN *et al.*, 2007), *Aspergillus oryzae* KB (KURAKAKE *et al.*, 2008) e *Aureobasidium pullulans* (YOSHIKAWA *et al.*, 2007).

A invertase produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus*, apresentou temperatura e pH ótimos de atividade de 60°C e pH 4,5, respectivamente, tendo sido ativada na presença de Mn^{2+} , Na^{+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , e inibida na presença de Cu^{2+} e Hg^{2+} (GUIMARÃES *et al.*, 2007). Em adição, a invertase produzida pelo fungo *Fusarium* sp. apresentou pH ótimo de atividade de 5,0 e temperatura ótima de atividade de 50°C (SHAHEEN *et al.*, 2007). Já o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* KB, produziu dois tipos de invertases, sendo a primeira chamada de F1, produzida preferencialmente na presença de alta concentração de sacarose, enquanto que a denominada F2, ao contrário, foi preferencialmente produzida em baixa concentração de sacarose (KURAKAKE *et al.*, 2008). Em outro estudo, a invertase de *A. pullulans*, foi

responsável pela produção de frutooligossacarídeos, caracterizando-se assim uma atividade também de transfrutossilação (YOSHIKAWA *et al.*, 2007). O fungo *Aspergillus oryzae* KB também apresentou este mesmo tipo de atividade, assim como *Schwanniomyces occidentalis*, *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus niger* (KURAKAKE *et al.*, 2008; BENITO *et al.*, 2007; LIN & LEE, 2008).

Em se tratando de microrganismos produtores, o fungo *Fusarium solani*, foi um bom produtor de invertase ácida quando cultivado por um período de 96 horas, a 30°C e em pH 5,0, tendo como fonte de carbono melaço a 2%, suplementado com 1% de peptona. O pH e a temperatura ótimas de atividade foram de 2,6 e 50°C, respectivamente (BHATTI *et al.*, 2006). Já a invertase produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* AS0023 apresentou pH e temperatura ótima de 4,4 e 55°C, respectivamente (L'HOCINE *et al.*, 2000). A invertase produzida pelo fungo *Aspergillus caespitosus* apresentou melhor produção em FSS mantida à 30°C, em um período de 72 horas, tendo farelo de trigo como fonte de carbono (ALEGRE *et al.*, 2009). A invertase produzida pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, teve temperatura e pH ótimos de 40°C e 4,2, respectivamente (TALEKAR *et al.*, 2010). Finalizando, a invertase produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus flavus*, apresentou uma maior produção enzimática, quando cultivado por 96 horas, na temperatura de 30°C, utilizando como fonte de carbono cascas de frutas (laranja, abacaxi e romã), sendo esta enzima estável na temperatura de 50°C por um período de 30 minutos (UMA *et al.*, 2010).

Com relação a regulação da expressão gênica da invertase, foi observada, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a existência de um ou mais genes, conhecidos como *SUC* (*SUC1* a *SUC5* e o *SUC7*, sendo que o

SUC2 é o mais comum). Cada gene *SUC* codifica duas formas de invertase, a forma glicosilada que é secretada no espaço periplasmático (extracelular) e a intracelular que é a forma não-glicosilada. Dois tipos de RNAs mensageiros são transcritos a partir do gene *SUC2*, sendo o transcrito maior codificado como 1,9Kb que possui uma sequência sinal responsável por codificar um peptídeo (~20 aminoácidos) que direciona a secreção da proteína para fora da célula, e o outro transcrito menor é codificado como 1,8Kb, e não possui a sequência sinalizadora, ficando a enzima retida intracelularmente. A enzima secretada é responsável pela utilização de sacarose, e esta é regulada pela repressão por glicose (NEIGEBORN & CARLSON, 1984).

Para um melhor entendimento sobre a produção e a caracterização de invertases produzidas por microrganismos, já descritos na literatura, algumas propriedades bioquímicas das mesmas foram agrupadas na tabela 1, assim como alguns parâmetros cinéticos na tabela 2.

Tabela 1. Dados comparativos de invertases produzidas por fungos.

Microrganismos	Temperatura (°C)	pH	Referência
<i>Aspergillus niger</i> AS0023	55	4	L'HOCINE <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhodotorula glutinis</i>	60	4,5	RUBIO <i>et al.</i> , 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	3,5 – 6	SHAFIQ <i>et al.</i> , 2002
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	50	6,5	CHAUDHURI <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus niveus</i>	60	4,5	GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2009
<i>A. pullulans</i>	30	5	YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 2007
<i>S. occidentalis</i>	45-55	5,5	BENITO <i>et al.</i> , 2007
<i>A. ochraceus</i>	60	4,5	GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2007
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	4,2	TALEKAR <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus phoenicis</i>	60	4,5	RUSTIGUEL <i>et al.</i> , 2010

Tabela 2. Dados cinéticos comparativos de invertases produzidas por fungos.

Microrganismo	K_m (mM)	V_{máx} (U/mg de proteína)	Referência
<i>Aspergillus niveus</i>	5,78	30,46	GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2009
<i>S. occidentalis</i>	4,9	—	BENITO <i>et al.</i> , 2007
<i>A. ochraceus</i>	7,37	22,39	GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,227	0,096 µmol/min	RUBIO <i>et al.</i> , 2002
<i>A. flavus</i>	0,23 mg/mL	15,80	UMA <i>et al.</i> , 2010
<i>A. phoenicis</i>	59,9	954,60	RUSTIGUEL <i>et al.</i> , 2010

1.4.2 Produção de Invertases

A produção de invertases pode ser feita de duas maneiras, fermentação submersa (FSbm) ou fermentação em substrato sólido (FSS). Em FSbm, o microrganismo fica em suspensão em um meio de cultura líquido no qual estão dissolvidos ou suspensos todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do organismo. Já na FSS, o microorganismo deve se desenvolver em substratos insolúveis sem disponibilidade de fase líquida livre, lembrando que a maioria dos substratos utilizados são resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, palha de arroz, farelo de trigo) (BON *et al.*, 2008). Desta forma, são de grande interesse por não possuírem custos de produção diretos. Além disso, é uma maneira de se agregar valor aos resíduos abundantes, dando solução para o seu acúmulo, que representa um sério problema ambiental. Em geral, a matéria prima deve apresentar características tais como, composição adequada para o crescimento do microrganismo e formação do produto de interesse, baixo custo de obtenção, beneficiamento, transporte e estocagem, ter elevada disponibilidade e facilidade de padronização dos componentes e não contribuir para dificultar os processos de separação do produto (BON *et al.*, 2008).

Em se tratando de FSbm, esta possui como vantagens, a facilidade de controle das variáveis físico-químicas do processo, maior eficiência de absorção dos nutrientes e secreção de metabólitos pela célula, levando a menores tempos do processo e conseqüente ganhos em produtividade. Já a FSS possui como vantagens, simplicidade dos meios de cultivo, exigência de baixo grau de umidade, reduzindo problemas de contaminação, condições de crescimento do microrganismo semelhantes às encontradas em seu ambiente

natural, maiores concentrações de enzimas em relação às obtidas em FSbm, estabilidade da enzima secretada e baixo nível de repressão catabólica, ausência de espuma e possibilidade de extração imediata do produto, entre outros (BON *et al.*, 2008). Além disso, a invertase produzida por este tipo de fermentação é encontrada na forma extracelular, facilitando a sua obtenção, enquanto que na FSbm apenas uma parte da enzima é de natureza extracelular (BON *et al.*, 2008).

A produção de invertases por microrganismos ainda pode ser influenciada pela adição de outros compostos nos meios de cultivos, aumentando a produção enzimática, como é o caso de fontes de carbono e nitrogênio, íons metálicos e substratos indutores de atividade invertásica (BON *et al.*, 2008).

Dentre as invertases produzidas por estes dois tipos de fermentação, merecem destaque as enzimas produzidas pelos seguintes microrganismos:

- FSbm: *Thermomyces lanuginosus* (CHAUDHURI *et al.*, 1999), *Fusarium solani* (BHATTI *et al.*, 2006), *A. niger* AS0023 (L'HOCINE *et al.*, 2000), *S. cerevisiae* (TALEKAR *et al.*, 2010), *Rhodotorula glutinis* (RUBIO *et al.*, 2002), *A. flavus* (UMA *et al.*, 2010), *A. ochraceus* (GUIMARÃES *et al.*, 2007), *Cladosporium cladosporioides* (ALMEIDA *et al.*, 2005), *Zymomonas mobilis* (YANASE *et al.*, 1995), *A. niger* IMI303386 (NGUYEN *et al.*, 2005) e *A. phoenicis* (RUSTIGUEL *et al.*, 2010).

- FSS: *Rhizopus* sp. (GOULART *et al.*, 2003), *A. niger* Aa.20 (ARANDA *et al.*, 2006), *Fusarium* sp. (SHAHEEN *et al.*, 2007) e *A. niger* (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2001; GÓMEZ & GONZÁLEZ, 2000).

1.4.3 Aplicação Industrial

A invertase pode ser utilizada no setor industrial voltado principalmente para alimentos e bebidas, e desta forma, o estudo da mesma torna-se atrativo e interessante. A sua adição ao suco de fruta, por exemplo, promove aumento dos teores de glicose e frutose, sendo que esta última é interessante sob o ponto de vista nutricional visto que o consumo de frutose por diabéticos é menos problemático do que o de glicose. O consumo de outros açúcares que não a frutose, aumentam exageradamente o nível de açúcar no sangue, e conseqüentemente, o nível de insulina. O consumo de alimentos que aumentam os níveis de insulina pode causar flutuações excessivas no açúcar do sangue, que podem provocar um rápido retorno à sensação de fome. (CARDOSO *et al.*, 1998).

O produto final da hidrólise da sacarose (açúcar invertido) pode substituir o mel natural, sendo utilizado como xarope, o qual pode ser usado na fabricação de medicamentos. Em adição, a quantidade de mel também pode ser aferida analisando-se a atividade invertásica. Neste caso, amostras de mel expostas a temperaturas acima de 40°C tiveram a invertase parcialmente degradada, ao passo que amostras nas quais não se detectou atividade invertásica foram expostas a altas temperaturas, acima de 70°C. Desta maneira, pode-se investigar a qualidade do mel e sua forma de armazenamento, tendo como referência a atividade invertásica (LUCARINI, 2000). A invertase permanecerá no mel ativa por algum tempo, a menos que seja inativada pelo aquecimento. Além disso, a inversão da sacarose em glicose e frutose, produz uma solução mais concentrada de açúcares que possui maior resistência à deterioração por fermentação devido a diminuição

da água biodisponível (COSTA, 2005). O açúcar invertido obtido através da ação da invertase possui a vantagem de ser incolor em contraste com o colorido dos açúcares obtidos por hidrólise ácida, além de possuir várias aplicações, tais como alimentação de abelhas, produção de bolachas, chocolates, ácidos orgânicos, preparação de compotas, doces e refrigerantes (SHAHEEN *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2007).

A invertase também pode ser utilizada na 3ª fase de produção do etanol, que é a fermentação do melaço. Neste contexto, um estudo foi realizado com a levedura *S. cerevisiae*, sendo que a presença de invertase foi testada em diferentes pH e temperaturas. Verificou-se que estes influenciaram a produção da enzima, sendo que a maior produção foi obtida a 40°C e no pH 5,0 com um aumento de 5,5% se comparado às demais condições (PARK & SATO, 1982).

É importante salientar também que as invertases são utilizadas na fabricação de colutórios bucais e na produção de frutooligossacarídeos (FOS) (PIETRO & SAID, 2004). Os FOS são oligossacarídeos de ocorrência natural, encontrados principalmente em produtos de origem vegetal. São chamados também de açúcares não convencionais não metabolizados pelo organismo humano. Os FOS não são calóricos e o sabor é similar ao da sacarose, sendo que apresentam 1/3 do poder adoçante desta. Eles podem ser usados por diabéticos com segurança, mas não podem ser considerados fontes de energia. Os FOS podem ser produzidos por reação enzimática de transfrutossilação em resíduos de sacarose. Possuem geralmente grau de polimerização de 1 a 5 unidades frutossil, sendo eles, kestose (2 unidades frutossil), nistose (3 unidades frutossil) e frutofuranosil nistose (4 unidades frutossil). Eles podem também ser produzidos por hidrólise enzimática da

inulina, tendo um grau de polimerização de 1 a 7 unidades frutossil (PASSOS & PAR, 2003; KURAKAKE *et al.*, 2008).

Com o aumento da preocupação da população com a qualidade de vida e, conseqüentemente com o consumo de alimentos considerados saudáveis e com baixo teor calórico, os FOS alcançaram destaque devido suas propriedades funcionais, ou seja, eles previnem cáries dentárias, estão associados também a redução de alguns tipos de câncer, reduzem os níveis de colesterol total e lipídeos além de melhorarem o metabolismo de bifidobactérias, diminuindo assim o pH do intestino grosso e destruindo bactérias putrefativas. São conhecidos como prebióticos, pois promovem o crescimento de probióticos, como *Acidophillus*, *Bifidus* e *Faecium*, os quais são bactérias benéficas no trato gastrointestinal. São mais solúveis que a sacarose, não cristalizam, não precipitam e não deixam sensação de secura na boca, sendo por isso usados em sorvetes e sobremesas lácteas (PASSOS & PAR, 2003).

Assim, podemos concluir que o uso industrial de invertases tem grande importância, pois estas podem ser utilizadas em diferentes setores industriais, o que reforça a importância deste estudo. É uma das hidrolases mais vendidas, sendo que em 2001, ocupou de 5-10% do mercado mundial de enzimas (LIMA, *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi o estudo da invertase extracelular produzida pelo fungo filamentoso *A. terreus*, determinando-se os melhores parâmetros físico-químicos para obtenção desta enzima, purificando e caracterizando-a bioquimicamente.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar as melhores condições de cultivo em fermentação submersa para a produção de invertases;
- Padronizar as melhores condições de cultivo em fermentação em substrato sólido para a produção de invertases;
- Purificar a invertase extracelular;
- Caracterizar bioquimicamente a invertase extracelular;
- Determinar os parâmetros cinéticos, tais como K_m e $V_{máx}$;
- Analisar os produtos de hidrólise da sacarose por TLC e HPLC;
- Avaliar o potencial enzimático para a produção de FOS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo e Manutenção da Cepa

O fungo utilizado foi o *A. terreus* que faz parte da coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, coletado no município de Sertãozinho-SP e identificado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pernambuco. Este fungo foi escolhido após realização de um *screening*, sendo um dos melhores produtores. As cepas foram mantidas no laboratório em meio sólido de batata (BDA), em tubos inclinados, previamente autoclavados por 20 minutos a 120°C e 1,5 atm. Os repiques foram realizados periodicamente a cada 30 dias e mantidos em estufa à temperatura de 30°C, por um período de 5 dias e depois armazenados em geladeira a 4°C.

3.2 Obtenção das Culturas em Fermentação Submersa (FSbm)

As culturas em fermentação submersa foram obtidas através do inóculo de uma suspensão de esporos (10^5 esporos/mL), obtida a partir da raspagem da cultura de *A. terreus* em meio BDA, com o auxílio de uma alça de platina, sendo os esporos ressuspensos em água destilada esterilizada. Foi inoculado 1 mL da suspensão em diferentes meios de cultura, tais como Adams (ADAMS, 1990), SR (RIZZATTI *et al.*, 2001), Vogel (VOGEL, 1964), Khanna (KHANNA, 1995), M5 (PERALTA, 1990) e Czapeck (WISEMAN, 1975) em frascos Erlenmeyers de 125mL, contendo 25mL de meio adicionados de diferentes fontes de carbono (1% para oligossacarídeos e fontes complexas e 2% para monossacarídeos) com pH inicial ajustado para 6,0. Os meios foram

autoclavados por 20 minutos, a 120°C e 1,5 atm. As culturas foram incubadas em condição estacionária ou sob agitação (100 rpm), a 30°C e a 40°C, e por diferentes períodos conforme determinado para cada experimento.

3.2.1 Composição dos Meios de Cultivo

3.2.1.1 Meio Adams

Extrato de levedura.....	0,20g
KH ₂ PO ₄	0,10g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05g
Fonte de carbono	
Água destilada qsp.....	100mL

3.2.1.2 Meio Vogel

Solução de sais de Vogel [50x].....	2mL
Solução de Biotina.....	1 gota
Fonte de Carbono	
Água destilada qsp.....	100mL

Solução de Biotina

Biotina.....	0,005g
Etanol 50%.....	100mL

Solução de Sais de Vogel [50X]

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	12,5g
KH_2PO_4	25g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1g
NH_4NO_3	10g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5g
Solução de traços de elementos.....	0,5mL
Água destilada qsp.....	100mL

Solução de Traços de Elementos

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,0g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,11g
H_3BO_3	1,1g
Água destilada.....	100mL

3.2.1.3 Meio SR

Solução de sais [10x].....	5,0mL
Peptona.....	0,02g
Extrato de levedura.....	0,45g
Fonte de carbono	
Água destilada qsp.....	100mL

Solução de Sais SR

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,14g
KH_2PO_4	0,3g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,0g
Água destilada qsp.....	100mL

3.2.1.4 Meio Khanna

Solução de sais [20x].....	5,0mL
Extrato de levedura.....	0,1g
Fonte de carbono	
Água destilada qsp.....	100mL

Solução de Sais de Khanna [20x]

NH_4NO_3	2,0g
KH_2PO_4	1,3g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,362g
KCl.....	0,098g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0138g
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,007g
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0066g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0062g
Água destilada qsp.....	100mL

3.2.1.5 Meio M5

CaCO ₃	0,1g
Peptona.....	0,1g
Gelatina.....	0,250g
NaCl.....	1g
Extrato de levedura.....	0,6g
Fonte de carbono	
Água destilada.....	100 mL

3.2.1.6 Meio Czapeck

NaNO ₃	0,3g
KH ₂ PO ₄	0,1g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05g
KCl.....	0,05g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,001g
Extrato de levedura.....	0,1g
Fonte de carbono.....	1g
Água destilada.....	qsp 100mL

3.3 Obtenção de Culturas em Fermentação em Substrato Sólido (FSS)

As culturas em substrato sólido foram obtidas através do inóculo de 1mL de uma suspensão de esporos (10^5 esporos/mL) obtida como descrito no item 3.2 em diferentes fontes de carbono/ substratos (milho moído, palha de arroz, sabugo de milho, bagaço de cana, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de aveia, farinha de mandioca e farinha de centeio, entre outros) adicionados de água de torneira, água destilada ou de diferentes soluções salinas (sais de Khanna, SR, de Vogel, como descrito anteriormente, nitrato e solução de traços de elementos) em diferentes proporções (1:0,5-1:4 m/v), conforme determinado para cada experimento.

Os meios foram mantidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo aproximadamente 5g de substrato, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos a 1,5 atm. As culturas foram incubadas em estufa a 30°C ou 40°C, com umidade relativa mantida ao redor de 70%, verificada por termohigrômetro.

3.3.1 Composição dos Sais de Nitrato [20 X] (SELIG *et al.*,2008)

NaNO ₃	12g
KH ₂ PO ₄	3,04g
KCl.....	1,04g
MgSO ₄	1,04g
Água destilada qsp.....	100mL

3.3.2 Solução de Traços de Elementos [1000 X] (SELIG *et al.*,2008)

ZnSO ₄	2,2g
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
CoCl ₂ .5H ₂ O.....	0,16g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,16g
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O.....	0,05g
Na ₂ EDTA.....	5g
pH 6,5	
Água destilada qsp.....	100mL

3.4 Obtenção das Enzimas

3.4.1 Obtenção das Enzimas em FSbm

Após incubação, as culturas foram filtradas a vácuo, obtendo-se um filtrado livre de células, o qual foi chamado de extrato bruto extracelular. A massa micelial obtida foi prensada entre papel de filtro, macerada com areia previamente tratada e lavada, e em seguida adicionada de 10mL de água destilada. Essa mistura foi levada à centrifuga por 5 minutos a 23.000g. O sobrenadante contendo as enzimas intracelulares foi separado e chamado de extrato bruto intracelular. Os extratos brutos foram dialisados em 4 litros de água destilada, durante 24 horas, a 4°C, sendo feitas 3 trocas de água.

3.4.2 Obtenção da Enzima em FSS

Após a incubação as culturas foram quebradas com auxílio de uma espátula, em seguida adicionadas de 25mL de água destilada gelada e agitadas com auxílio de uma barra magnética em um agitador na câmara fria (4°C) por 30 minutos para extração e homogeneização do meio. Depois os conteúdos foram filtrados a vácuo com gaze em um funil de vidro e os resíduos retidos foram descartados. Os filtrados obtidos contendo as enzimas extracelulares foram dialisados em 4 litros de água destilada, durante 24 horas, a 4°C, sendo feitas 3 trocas de água.

3.5 Dosagem da Atividade Enzimática

A determinação da atividade invertásica foi realizada mediante a incubação da enzima com o substrato (sacarose 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,0 para a fração obtida em FSbm e em tampão Mes 100 mM, pH 6,0 para a fração obtida em FSS e os açúcares redutores formados quantificados utilizando-se o DNS (ácido 3',5'- dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).. A mistura de reação foi constituída de 200µL de uma solução de substrato e 200µL de amostra enzimática. Após a incubação em diferentes temperaturas conforme determinado para cada experimento, alíquotas de 100µL foram retiradas em períodos apropriados e adicionadas em tubos contendo 100µL de DNS. Em seguida os tubos foram aquecidos em banho-maria fervente por 5 minutos e após o resfriamento, foi adicionado 1mL de água destilada por tubo. O tubo branco consistiu de uma alíquota de 100µL da mistura de reação adicionada imediatamente a 100µL de DNS. As leituras foram realizadas em $\lambda = 540$ nm em espectrofotômetro. Uma unidade de

atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa um μmol de substrato, por minuto, nas condições de ensaio.

3.6 Dosagem de Proteínas e Carboidratos

As proteínas foram dosadas pelo método descrito por LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão (BSA). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com $\lambda = 620\text{nm}$, sendo os resultados expressos em mg/mL de proteína.

O conteúdo de carboidratos da invertase extracelular purificada foi estimado através da metodologia do fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956), utilizando-se manose como padrão. As amostras foram diluídas com água destilada qsp 2 mL, adicionadas de 50 μL de fenol 80% e, logo após, de 5mL de ácido sulfúrico concentrado. Essa mistura foi deixada em repouso por 10 minutos em gelo. Após este período, a reação foi colocada em banho maria em temperatura de 30°C, por um período de 15 minutos, em seguida foi feita a leitura da absorbância em $\lambda = 490\text{nm}$.

3.7 Otimização da Produção Enzimática em Função de Fontes Adicionais de Fosfato e Nitrogênio

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar os parâmetros envolvidos na produção enzimática intracelular e extracelular por *A. terreus*. Os efeitos das variáveis concentração de peptona e concentração de KH_2PO_4 (variáveis independentes) sobre a atividade enzimática (variável dependente) foram analisados através de realização de 10 ensaios, conforme

um planejamento experimental de compósito central rotacional, sendo os valores máximos codificados para cada uma das variáveis independentes fixado como +1 e os valores mínimos como -1, adicionados de 2 pontos centrais e 2 axiais (-1,41 e +1,41) como pode ser observado na tabela 3.

O programa Statistica V.8.0 (STATSOFT, USA) foi utilizado para análise de variância (ANOVA), para gerar a superfície de resposta e otimizar as condições. O nível de significância foi fixado em 90% ou 95% com valores de α de 0,1 e 0,05, respectivamente. A variância explicada pelo modelo foi dada pelo coeficiente de determinação R^2 .

Tabela 3. Planejamento fatorial para as variáveis independentes (peptona e KH_2PO_4) codificadas e reais.

Corrida	Valores Codificados		Valores Reais	
	Peptona (X1)	KH_2PO_4 (X2)	Peptona (%) (X1)	KH_2PO_4 (%) (X2)
1	1	1	5	5
2	1	-1	5	0,5
3	-1	1	0,5	5
4	-1	-1	0,5	0,5
5	0	0	2,75	2,75
6	0	0	2,75	2,75
7	1,41	0	5,4	2,75
8	-1,41	0	0,1	2,75
9	0	1,41	2,75	5,4
10	0	-1,41	2,75	0,1

3.8 Determinação da Temperatura e do pH Ótimos de Atividade, Termoestabilidade e Estabilidade ao pH

Foram realizados ensaios, assim como descritos no item 3.5, em diferentes temperaturas (25°C a 80°C) e diferentes pH (2,5 a 9,0) sendo utilizados tampão citrato de sódio (pH 2,5 e 3,0), tampão acetato de sódio (pH 3,5 a 6,0), tampão Mes (pH 6,5) e tampão Tris-HCl (pH 7,0 a pH 9,0) para definição de temperatura ótima e do melhor pH para a atividade invertásica, respectivamente. Adicionalmente, amostras enzimáticas foram previamente incubadas em diferentes temperaturas (60°C a 90°C) e diferentes pH (citrato de sódio 20 mM, pH 3,0; acetato de sódio 20 mM, pH 4,0 e 5,0; Mes 20 mM, pH 6,0; Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, 8,0 e 9,0; Glicina 20 mM, pH 10,0) em banho de gelo, por 1 hora e posteriormente utilizadas na reação enzimática para se avaliar a estabilidade térmica e ao pH.

3.9 Otimização da Reação Enzimática em Função da Temperatura e do pH

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar os parâmetros envolvidos na atividade enzimática intracelular e extracelular por *A. terreus*. Os efeitos das variáveis temperatura e pH (variáveis independentes) sobre a atividade enzimática (variável dependente) foram analisados, conforme descrito no item 3.7 e como mostra a tabela 4.

Tabela 4. . Planejamento fatorial para as variáveis independentes (temperatura e pH) codificadas e reais.

Corrida	Valores Codificados		Valores Reais	
	Temperatura (X1)	pH (X2)	Temperatura (X1)	pH (X2)
1	-1,41	0	36	5,5
2	-1	+1	40	8
3	-1	-1	40	3
4	0	0	55	5,5
5	0	0	55	5,5
6	0	+1,41	55	8,4
7	0	-1,41	55	2,6
8	+1	-1	70	3
9	+1	+1	70	8
10	+1,41	0	74	5,5

3.10 Influência de Diferentes Compostos na Atividade Invertásica

A mistura de reação foi adicionada de diferentes compostos, tais como sais (AlCl_3 , AgNO_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$, FeCl_3 , HgCl_2 , KH_2PO_4 , KCl , MgCl_2 , MnCl_2 , NH_4F , NaH_2PO_4 , NaBr , NaCl , NH_4Cl , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, ZnCl_2), EDTA e β -mercaptoetanol em baixas (1mM) e altas (10mM) concentrações e ensaiadas como descrito no item 3.5.

3.11 Purificação em Colunas Cromatográficas

O extrato bruto extracelular produzido em FSbm foi submetido, inicialmente, ao processo de purificação em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose (1 X 11,5 cm) previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, e mantida em temperatura ambiente. A atividade enzimática foi eluída mediante aplicação de um gradiente linear de NaCl (0 – 1M). Foram coletadas frações de 3,8 mL e a vazão foi mantida em 2,6 mL/min. As frações que apresentaram atividade invertásica foram reunidas em um único “pool”, o qual foi dialisado em água destilada, a 4°C, por 24 horas e , posteriormente liofilizado. O conteúdo foi então ressuspensão em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 + NaCl 50 mM e aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephacryl S-200 (1 X 80 cm), previamente equilibrada em tampão Tris- HCl 50 mM pH 7,5 + NaCl 50mM, sendo eluída com este mesmo tampão e mantida a 4°C. Foram coletadas frações de 1,2 mL e a vazão foi mantida em 0,4 mL/min. As frações que apresentaram atividade invertásica foram reunidas em um único pool, o qual foi dialisado em água destilada, a 4°C por 24 horas. Em seguida, parte da amostra foi liofilizada, para posterior realização do procedimento eletroforético em condições não desnaturantes (PAGE 6%) e desnaturantes (SDS- PAGE 6%) e o restante utilizado para os ensaios de caracterização bioquímica.

3.12 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os procedimentos cromatográficos foram acompanhados através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE 6%) de acordo com a metodologia descrita por DAVIS (1964). A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,9 + glicina 36mM e a fonte (Bio-Rad modelo PowerPac Universal) ajustada para 120 V, 8 W e 40 mA. Os géis foram revelados por prata como descrito por BLUM *et al.* (1987) ou então utilizado para determinação da atividade invertásica em gel. Para determinação da atividade em gel, logo após a corrida o gel foi lavado com tampão acetato de sódio 0,5M, pH 5,0 por 30 minutos e posteriormente lavado mais 3 vezes em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 por 20 minutos cada vez. Após as lavagens o gel foi incubado em banho-maria a 37°C no escuro com uma solução contendo 0,2mg/mL de metil sulfato de fenazina, 0,4mg/mL de nitroblue tretazolium, 30 unidades/gel de glicose oxidase e 1% (m/v) de sacarose pelo tempo necessário para o surgimento da banda.

3.13 Determinação da Massa Molecular

A massa molecular nativa para a invertase extracelular foi estimada por filtração em coluna cromatográfica Sephacryl-S200 (80,0 x 1,0 cm), utilizando-se como padrões moleculares para cálculo da massa molecular β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). O volume livre da coluna (V_o) foi de 86,5 mL, determinado com Blue Dextran 2000. A amostra invertásica extracelular purificada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE 6%) de acordo com Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi realizada em

tampão Tris-HCl 25mM, pH 8,9 + glicina 192mM + 0,1% SDS , sendo a fonte (Bio-Rad modelo PowerPac Universal) ajustada para 120V, 8 W e 40 mA. Foram utilizados os seguintes padrões moleculares para cálculo da massa molecular: α -Macroglobulina (169 kDa), β -Galactosidase (112,5 kDa), Lactoferrina (92 kDa), Piruvato quinase (67 kDa), Fumarase (60 KDa), Deidrogenase láctica (36,5 KDa) e Triosefosfato isomerase (31,5 kDa). Após a corrida eletroforética o gel foi retirado das placas e colocado em solução fixadora para revelação por prata segundo o método descrito por Blum (Blum *et al.*, 1987).

3.14 Hidrólise de Diferentes Substratos

A atividade hidrolítica do extrato bruto contendo invertase e da enzima purificada sobre amido, celobiose, maltose, rafinose, sacarose , trealose e inulina foi determinada. As dosagens foram realizadas conforme descrito no item 3.5. Os substratos utilizados estavam na concentração 1% (m/v) em tampão Acetato de Sódio 100 mM, pH 5,0, para a forma extracelular obtida em FSbm e em tampão Mes 100 mM, pH 6,0 para a obtida em FSS.

3.15 Análise dos Produtos de Hidrólise por TLC e HPLC

Os produtos de hidrólise da sacarose obtido pela ação da invertase extracelular purificada, foram submetidos à cromatografia em placa delgada de sílica, cujas medidas foram 10,0 x 9,5 cm. Utilizou-se como padrões soluções 1% (m/v) de sacarose, glicose e frutose. A solução para o desenvolvimento da cromatografia continha butanol, etanol e água destilada na proporção de 5:3:2

(v/v/v). Após a corrida e secagem completa das placas delgadas, revelou-se o cromatograma com solução contendo orcinol 0,2% em ácido sulfúrico e metanol na proporção de 1:9 (v/v), incubando-as posteriormente a 100°C para visualização dos “spots”.

Os produtos de hidrólise da sacarose obtidos pela ação da invertase extracelular foram submetidos a análise em HPLC Varian 385-LC com detector light scattering equipado com uma coluna PL Hi-Plex Ca 8µm mantida a 60°C. Soluções de sacarose, glicose, frutose, kestose, nistose, foram utilizadas como padrões, na concentração de 1% (m/v). Para desenvolvimento da cromatografia utilizou-se água Mili-Q.

3.16 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

As constantes cinéticas Michaelis- Mentem (K_m), velocidade máxima ($V_{máx}$) e eficiência catalítica ($V_{máx}/K_m$) sobre os substratos sacarose (1 - 600 mM) e inulina (0,6 - 18 mM) para a invertase extracelular purificada foram determinadas pela representação gráfica do duplo-recíproco de acordo com Lineweaver-Burk (1934) utilizando o programa Enzyplot (LEONE *et al.*, 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para um melhor entendimento, esta seção foi organizada em dois itens:

4.1 Produção de Invertases em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fermentação Substrato Sólido (FSS).

4.2 Caracterização Bioquímica das Invertases.

4.1 Produção de Invertases em FSbm e em FSS

4.1.1 Efeito da Temperatura sobre o Crescimento do Fungo e sobre a Produção de Invertases em Diferentes Meios de Cultivo

O crescimento do fungo sobre meio solidificado (BDA) em placas de petri mantidas em diferentes temperaturas (25⁰C, 30⁰C, 35⁰C e 40⁰C) foi analisado (figura 3). Neste caso, nota-se que o fungo cresceu em todas as temperaturas testadas, tendo um maior crescimento na temperatura de 30⁰C, sendo que a colônia teve um diâmetro de 4,0 cm e na temperatura de 35⁰C, com um diâmetro de 3,0 cm, sendo então considerado um fungo mesófilo, ou seja, que cresce melhor em temperaturas intermediárias, pois nas temperaturas de 25⁰C e 40⁰C, os diâmetros das colônias foram de 2,5 cm. Quando verificada a pigmentação, observa-se que nas temperaturas de 25⁰C, 30⁰C e 35⁰C, esta foi marrom, ao passo que, na temperatura de 40⁰C, a pigmentação observada foi branca.

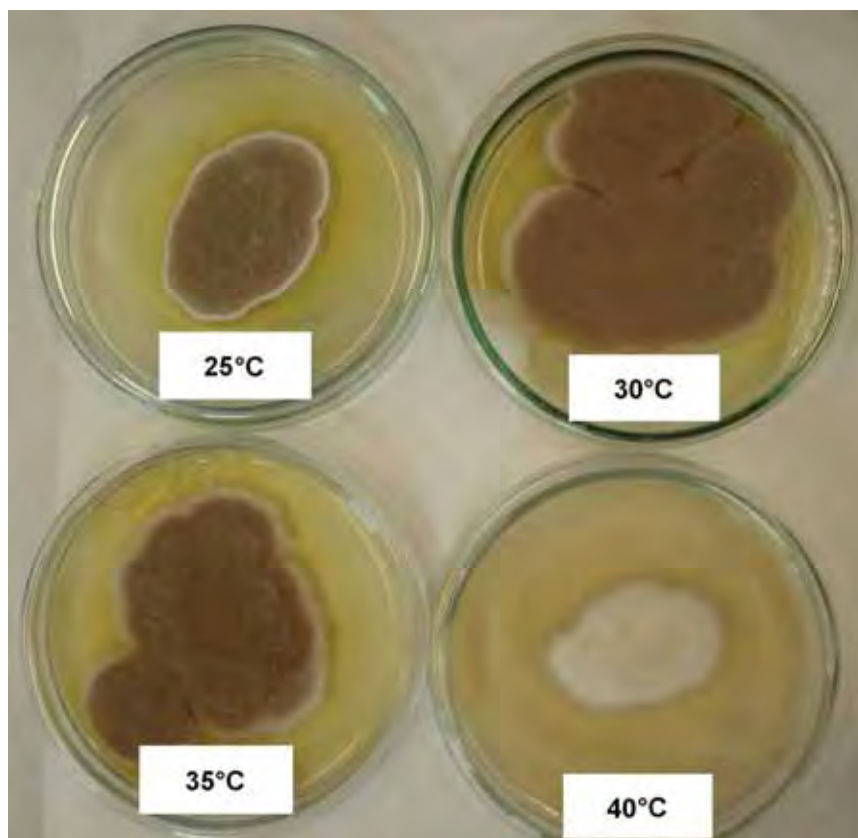


Figura 3. Fungo *Aspergillus terreus* em meio BDA nas temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C e 40°C. Foto: Alana J. Riul

A influência de diferentes meios de cultivo, mantidos sob agitação (100 rpm) ou não, a 30°C e a 40°C, na produção de invertases intra e extracelulares por *A. terreus* também foi analisada, como pode ser observado na tabela 5.

Entre os diferentes meios analisados, a maior produção enzimática extracelular foi obtida em meio M5 (178,60 U totais), mantido a 30°C sob agitação (100 rpm). Quando a temperatura foi elevada para 40°C, a produção enzimática foi reduzida 2,8 vezes, sendo que nesta temperatura em condição estacionária, a produção inexistente em vários meios testados, o que pode ser atribuído além da maior temperatura, a uma menor aeração do meio. Já para as enzimas intracelulares, o meio que proporcionou melhor produção foi o Khanna mantido a 30°C sob agitação (100 rpm) (169,34 U totais), seguido pelo

meio M5 nas mesmas condições. Quando analisamos a produção total (intra + extra), o meio M5 mantido a 30°C sob agitação foi o melhor (238,81 U totais), sendo seguido pelo meio Khanna nas mesmas condições (181,44 U totais). Para continuidade dos estudos, considerando-se principalmente a forma extracelular, foi escolhido o meio M5 mantido a 30°C sob agitação. Rustiguel *et al.* (2009) utilizaram o meio Khanna sob agitação, na temperatura de 40°C para a produção de invertases pelo fungo filamentoso *A. phoenicis*. Assim, como Rustiguel *et al.* (2009), Alegre *et al.* (2009) também utilizaram o mesmo meio de cultivo, nas mesmas condições citadas, para a produção de invertases pelo fungo filamentoso *A. caespitosus*. Este mesmo meio, neste trabalho, também proporcionou produção, quando utilizado em agitação, mas a 30°C. Já Bhatti *et al.* (2006) utilizaram o meio de cultivo Vogel a 30°C em agitação para a produção de invertases pelo fungo filamentoso *Fusarium solani*. Este meio também proporcionou produção de invertases, neste trabalho, como pode ser observado na tabela abaixo. Para a invertase produzida por *Rhodorula glutinis*, o meio de cultivo utilizado foi o Czapek em agitação e na temperatura de 30°C. Este mesmo meio foi utilizado para a produção de invertases pelo fungo filamentoso *Aspergillus flavus*, também na temperatura de 30°C e por *Cladosporium cladosporioides*, mas a 28°C (RUBIO *et al.*, 2002; UMA *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 1995). O meio em questão também foi testado neste trabalho, mas este não favoreceu significativamente a produção de invertases.

Tabela 5. Produção de invertases por *Aspergillus terreus* em FSbm em função do meio de cultivo e da temperatura de incubação.

Meios		Atividade Enzimática (U totais)			
		Agitação		Estacionário	
		30°C	40°C	30°C	40°C
Adams	Intra	6,32 ± 0,12	4,99 ± 0,02	1,05 ± 0,07	1,09 ± 0,02
	Extra	7,60 ± 0,57	6,00 ± 0,57	8,20 ± 0,28	10,45±0,21
SR	Intra	0,48 ± 0,04	0,47 ± 0,05	6,80 ± 0,04	0
	Extra	33,90 ± 1,56	28,10 ± 1,27	7,60 ± 0,28	0
Vogel	Intra	20,03 ± 0,04	2,99 ± 0,02	0,79 ± 0,02	0
	Extra	10,80 ± 1,13	11,50 ± 0,71	1,38 ± 0,18	0
Khanna	Intra	169,34 ± 0,51	1,56 ± 0,06	50,36 ± 0,08	0
	Extra	12,10 ± 0,71	3,60 ± 0,57	24,20 ± 0,28	5,43 ± 0,25
M5	Intra	60,21 ± 0,03	27,05 ± 0,21	52,10 ± 0,28	0
	Extra	178,60 ± 1,98	63,00 ± 1,98	59,15 ± 0,35	19,93 ± 0,11
Czapeck	Intra	4,38 ± 0,03	2,69 ± 0,16	1,82 ± 0,11	0
	Extra	0	0	0	6,30 ± 0,42

Os meios de cultivo foram adicionados de sacarose (1%,m/v) como fonte de carbono e incubados, por 72 horas nas condições apresentadas.

4.1.2 Efeito de Diferentes Fontes de Carbono na Produção Invertásica em FSbm

Entre as diferentes fontes de carbono analisadas (tabela 6), temos que a produção enzimática extracelular foi favorecida por farinha de centeio (348,50 U totais), sendo 9 vezes maior se comparado ao meio sem fonte de carbono e 3 vezes ao meio com sacarose, sendo seguida por farelo de trigo (320,10 U totais), soja moída (287,00 U totais) e por farelo de arroz (250,20 U totais). Analisando a composição da farinha de centeio, observamos que esta é uma

fonte nutricional rica, pois apresenta água, proteínas, carboidratos, fibras, colesterol, lipídios, ácidos graxos, fósforo, ferro, cálcio, potássio, sódio, tiamina, riboflavina e niacina (<http://www.informacaonutricional.net>).

Sendo assim, o fungo apresentou uma melhor produção utilizando esta fonte de carbono, provavelmente devido aos nutrientes essenciais importantes para o crescimento do mesmo. Para a forma intracelular, a fonte que propiciou uma melhor produção foi o farelo de arroz (188,25 U totais) sendo 38 vezes superior ao observado para o meio sem fonte de carbono, seguido por farelo de trigo (156,40 U totais) e farinha de mandioca (153,85 U totais). Para as demais fontes de carbono testadas, a produção foi significativa, assim como mostrado na tabela 6.

Considerando-se o pH final do cultivo, observa-se que não houve grande variação se comparado ao pH inicial (6,0) para a maioria das fontes utilizadas. A maior variação ocorreu com a farinha de mandioca (pH 7,9). O pH do meio de cultivo, pode afetar a estrutura e função das enzimas, e muitas enzimas têm o rendimento aumentado quando trabalham próximas ao pH ótimo de atividade (BATHOMEUF *et al.*, 1994).

Entre as diferentes fontes de carbono adicionadas ao meio de cultivo para a produção de invertases por *T. lanuginosus*, a sacarose foi a que mais favoreceu-a (CHAUDHURI *et al.*, 1999), assim como para a enzima produzida por *Saccharomyces cerevisiae* (TALEKAR *et al.*, 2010) e como observado também por Rubio *et al.* (2002) para a enzima de *Rhodotorula glutinis*, sendo, neste caso, a produção enzimática favorecida também por rafinose. Para a invertase produzida pelo fungo filamentoso *A. flavus*, a fonte de carbono que mais favoreceu sua produção, foi a casca de romã (UMA *et al.*, 2010) e bagaço

de cana para a enzima produzida por *A. ochraceus* (GUIMARÃES *et al.*, 2007). Já para o fungo filamentoso *Fusarium solani*, a fonte de carbono utilizada foi o melaço de cana suplementado com 1% de peptona (BHATTI *et al.*, 2006). De forma geral os resultados que encontramos está em concordância com os citados, pois a sacarose, o bagaço de cana e a rafinose também foram fontes de carbono que proporcionaram uma produção considerável por *A. terreus*. A utilização de resíduos agroindustriais é atrativa, uma vez que são mais baratos e podem favorecer a alta produção enzimática como a obtida neste trabalho e a observada por Guimarães *et al.* (2009) para a enzima de *A. niveus*. Para se ter idéia, o quilo da farinha de centeio custa de R\$ 5,60 a R\$ 10,30 dependendo da marca. (<http://www.twenga.com.br/dir-Alimentos-Bebidas,Farinhas-e-cereais,Farina-de-centeio> Acesso em: 12/05/2011).

Com base nos resultados obtidos para a enzima extracelular, optamos pela utilização de farinha de centeio como fonte de carbono para prosseguimento do estudo.

Tabela 6. Produção de Invertases por *Aspergillus terreus* em FSbm em função da fonte de carbono.

Fontes de carbono	Atividade Extracelular (U totais)	Atividade Intracelular (U totais)	Proteína (mg/mL)	pH final
Aveia	237,50 ± 14,85	135,80 ± 5,94	0,35	6,40
Bagaço de cana	76,70 ± 4,67	17,25 ± 3,89	0,11	6,90
Farelo de arroz	250,20 ± 13,86	188,25 ± 2,47	0,41	6,71
Farelo de trigo	320,10 ± 2,69	156,40 ± 5,09	0,25	6,39
Farinha de centeio	348,50 ± 10,61	136,80 ± 4,53	0,41	6,75
Farinha de mandioca	233,60 ± 9,05	153,85 ± 4,45	0,56	7,9
Frutose	61,80 ± 2,55	19,15 ± 1,20	0,48	6,48
Glicose	20,30 ± 0,42	22,45 ± 2,90	0,82	6,27
Milho moído	95,90 ± 5,80	25,30 ± 5,52	0,24	6,15
Rafinose	177,80 ± 3,11	147,75 ± 3,18	0,37	6,45
Sabugo de milho	52,40 ± 3,39	26,55 ± 3,46	0,23	6,60
Sacarose	129,90 ± 10,89	62,50 ± 3,54	0,62	6,65
Soja moída	287,00 ± 7,07	73,80 ± 2,83	0,41	6,50
Controle	39,00 ± 2,26	4,95 ± 0,92	0,13	6,56

O fungo foi crescido em meio M5 suplementado com diferentes fontes de carbono, sob agitação (100 rpm) à 30°C, por um período de 72 horas.

4.1.3 Produção de Invertases por *A. terreus* em Função do Tempo de Cultivo

Considerando-se o cultivo em meio M5 em diferentes períodos (24-96h), sob agitação (100 rpm), a 30°C, a maior produção enzimática foi obtida em 48 horas para ambas as formas, extracelular e intracelular (figura 4A), sendo que depois deste período há declínio da atividade invertásica, o que poderia ser

explicado pela presença de proteases no extrato. Com relação ao crescimento, o máximo foi obtido em 72 horas. Após este período houve diminuição do crescimento (0,44 mg prot./mL), o que pode ser atribuído a autólise celular ou escassez de nutrientes (figura 4B).

Cada microrganismo possui um tempo e uma forma específica de desenvolvimento que possibilita melhores condições de obtenção de enzimas como, por exemplo, *R. glutinis* que apresentou melhor produção enzimática quando cultivado a 30°C por 36h (RUBIO *et al.*, 2002). Já para *A. flavus*, o melhor tempo de cultivo foi de 96h, na temperatura de 30°C (UMA *et al.*, 2010). Este mesmo tempo favoreceu a produção de invertases por *A. ochraceus*, mas a 40°C (GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Para a levedura *S. cerevisiae* o melhor tempo de cultivo foi de 48h, nas temperaturas de 40°C e 42°C (PATARO *et al.*, 2002; TALEKAR *et al.*, 2010). Esta mesma levedura teve produção invertásica favorecida no mesmo período, mas na temperatura de 30°C (BAIG *et al.*, 2003), assim como o obtido para a produção enzimática por *F. solani* (BHATTI *et al.*, 2006) e pelo fungo filamentoso *A. terreus* neste trabalho.

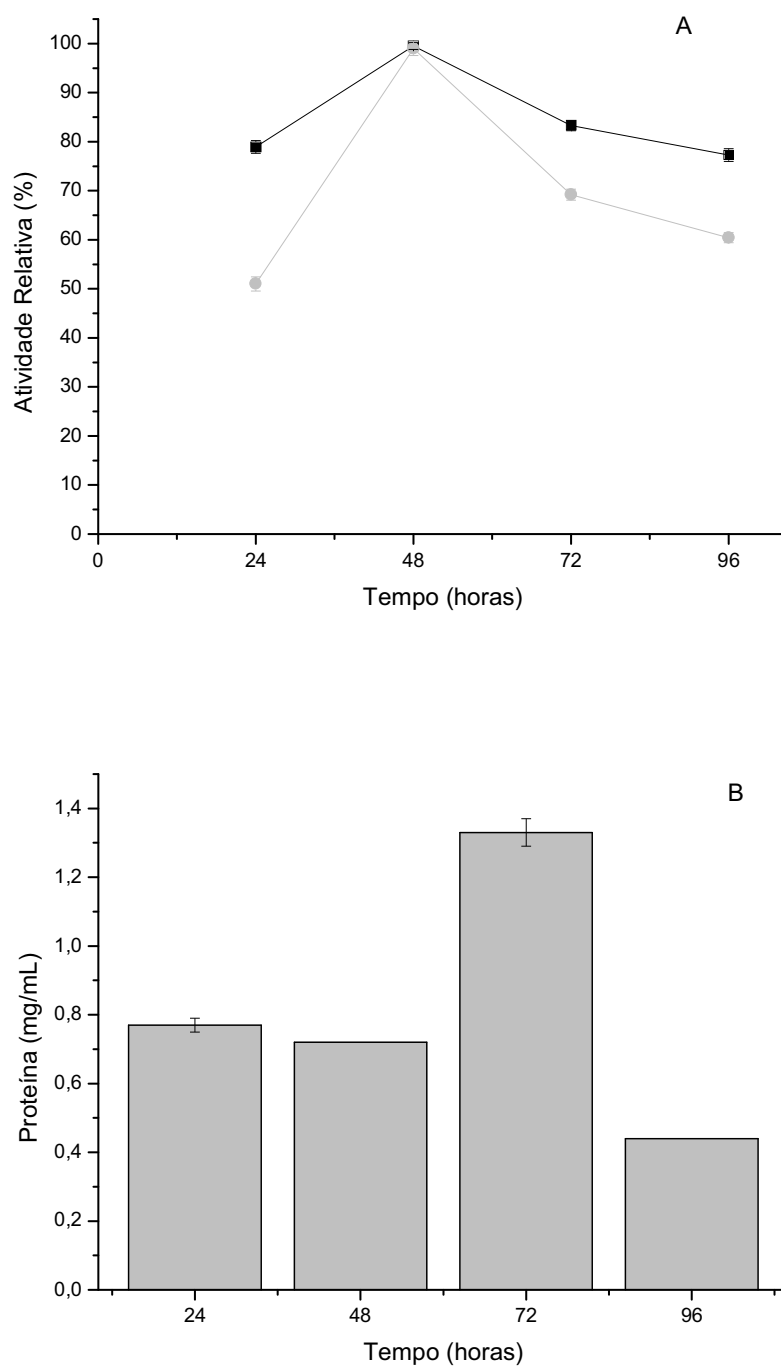


Figura 4. Produção de invertases (A) extra (■) e intracelulares (●) pelo fungo filamentoso *A. terreus*, e seu respectivo desenvolvimento (B) em função do tempo de cultivo. Em (A): 100% = 83,27 U totais (extracelular) e 100% = 69,21 U totais (intracelular); em (B): 100% = 1,33 mg/mL.

4.1.4 Efeito de Diferentes Concentrações de Glicose e Frutose Adicionadas ao Meio de Cultivo

Considerando que os açúcares glicose e frutose são os produtos finais da reação catalisada pela invertase, a influência dos mesmos, em diferentes concentrações, sobre a produção invertásica foi verificada e os resultados obtidos foram reunidos na figura 5. Com a adição de glicose ao meio, a produção enzimática, de forma geral, foi decrescendo de maneira significativa, uma vez que o fungo não precisava hidrolisar a sacarose para obter nutrientes, pois estes já haviam sido fornecidos, chegando a 5,24% e 2,22% para as formas extra e intracelular, respectivamente, em meios adicionados de 5% de glicose, quando comparados ao controle sem adição do açúcar. Tal fato sinaliza claramente a ocorrência de repressão catabólica por glicose.

Analisando os dados obtidos com relação à influência da frutose, verificamos que com o aumento da concentração de frutose, para a forma extracelular, houve diminuição da produção invertásica ao redor de 5 vezes, quando comparada ao controle, na concentração de 5% (m/v). Já para a forma intracelular, na presença de 0,1-0,5% (m/v) de frutose, a produção enzimática foi próxima à obtida para o controle. Entretanto, com o aumento da concentração de frutose, a produção enzimática foi decrescendo. Desta forma, pode-se dizer que a frutose exerce um papel regulador negativo sobre a produção enzimática quando presente em altas concentrações.

Em conclusão, podemos dizer que os resultados aqui apresentados, estão em concordância com a literatura, uma vez que a sacarose como fonte de carbono induz a produção enzimática (RUBIO *et al.*, 2002 e CHAUDHURI *et*

al., 1999), a qual é inibida pela adição dos produtos da hidrólise da sacarose, ou seja, glicose e frutose, nutrientes prontamente assimiláveis.

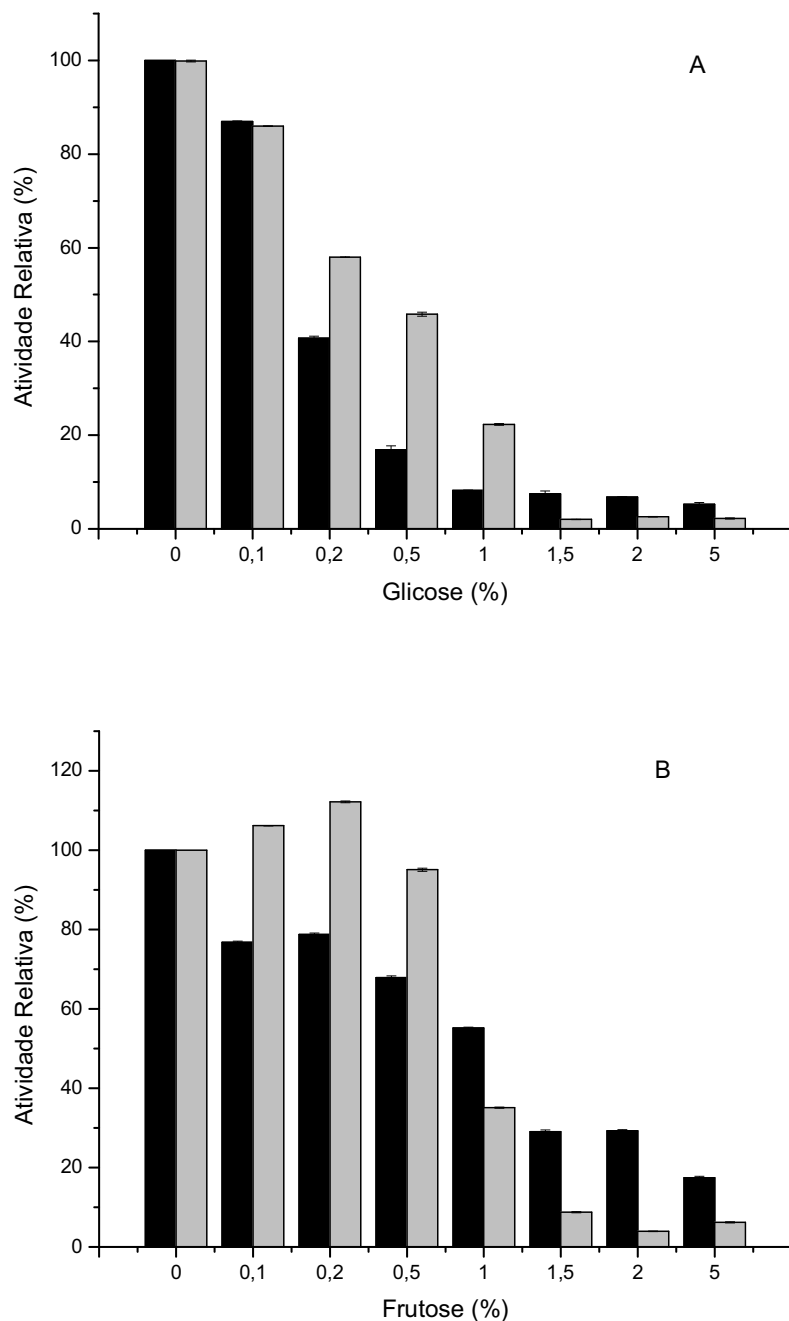


Figura 5. Influência de diferentes concentrações de glicose (A) e frutose (B) na produção de invertases extra (■) e intracelulares (▒) pelo fungo filamentoso *A. terreus* em FSbm. Em (A): 100% = 86,97 U totais (extracelular) e 100% = 85,97 U totais (intracelular); em (B): 100% = 78,75 U totais (extracelular) e 100%= 80 U totais (intracelular).

4.1.5 Efeito de Peptona e Fosfato na Produção Invertásica

Ao suplementar o meio de cultivo com uma fonte de nitrogênio, em diferentes concentrações, observou-se que houve um aumento da atividade invertásica extracelular de aproximadamente 45% e de 88% quando o meio foi adicionado de 0,1% e 0,5% (m/v) de peptona, respectivamente. Já na concentração de 5% (m/v), houve redução se comparado ao controle (tabela 7). Para a enzima intracelular houve aumento da produção em todas as concentrações testadas, sendo esta cerca de 78% maior quando o meio foi adicionado de 0,5% (m/v), se comparado ao controle.

De acordo com Vargas *et al.* (2003) a adição de nitrogênio ao meio de cultivo possibilitou um aumento da produção de invertases de três a seis vezes por *Anabaena* sp. Outro estudo feito com a levedura *S. cerevisiae* GCB-K5 mostra que a adição de peptona promove aumento da produção enzimática, pois o nitrogênio presente na peptona é um componente que influencia o equilíbrio e a produtividade das células (SHAFIQ *et al.*, 2002). A peptona foi utilizada também para suplementar o meio de cultivo para a produção de invertase pelo fungo filamentoso *F. solani* (BHATTI *et al.*, 2006).

Ainda na tabela 7, podemos observar também a influência de diferentes concentrações de fosfato (KH_2PO_4) na produção de invertases. Quando o meio foi adicionado de 0,5% (m/v) de fosfato, não houve variação significativa quando comparada a forma extracelular com o controle. Entretanto, a medida que se aumentou a concentração de fosfato houve declínio da produção invertásica. Resultado semelhante foi observado para a forma intracelular, sendo que a produção obtida com a adição de 5% (m/v) de KH_2PO_4 foi apenas 35% da observada na sua ausência. Segundo SHAFIQ *et al.* (2002), ao

suplementar o meio de cultivo com concentrações crescentes de KH_2PO_4 , ocorreu um declínio na produção de invertase por *S. cerevisiae* GCB-K5, assim como ocorreu no presente estudo.

Tabela 7. Influência da adição de peptona e KH_2PO_4 na produção de invertases pelo fungo filamentososo *A. terreus*.

Concentração (m/v)	Atividade Relativa Invertásica (%)			
	Peptona		KH_2PO_4	
	Extra	Intra	Extra	Intra
Controle	100	100	100	100
0,1%	144,38± 0,79	175,16 ± 1,03	78,32 ± 0,11	141,28 ± 0,39
0,5%	187,46± 0,69	178,12 ± 0,60	110,71 ± 0,42	103,85 ± 0,28
2,75%	117,93± 0,52	111,88 ± 0,82	80,51 ± 0,52	73,02 ± 0,06
5%	79,14± 0,31	103,06 ± 0,12	59,55 ± 0,33	35,19 ± 0,44

O fungo foi crescido em meio M5 suplementado com farinha de centeio, sob agitação (100 rpm) à 30°C, por um período de 48 horas.

Adicionalmente na tabela 8 podem ser observadas as respostas para as atividades enzimáticas intracelular e extracelular em função das variáveis independentes peptona e KH_2PO_4 mediante análise de compósito central rotacional. Desta forma, verifica-se que para a enzima extracelular a maior atividade foi obtida quando utilizado 2,75% de peptona e 0,1% de KH_2PO_4 (18,24 U/mL), já para a enzima intracelular, a maior atividade foi encontrada quando utilizado 2,75% de ambos os compostos (12,80 U/mL). As menores atividades encontradas para as enzimas extra e intracelulares foi na presença de 5% de cada composto, com valores de atividade de 7,22 U/mL e 6,04 U/mL, respectivamente.

Tabela 8. Atividades enzimáticas extra e intracelulares das invertases produzidas por *A. terreus* em FSbm.

Corrida	Valores		Valores Reais		Atividade	Atividade
	Codificados				Extra	Intra
	Peptona	KH ₂ PO ₄	Peptona (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	(U/mL)	(U/mL)
	(X1)	(X2)	(X1)	(X2)		
1	1	1	5	5	7,22	6,04
2	1	-1	5	0,5	15,87	12,02
3	-1	1	0,5	5	12,27	7,40
4	-1	-1	0,5	0,5	13,27	12,64
5	0	0	2,75	2,75	14,78	10,47
6	0	0	2,75	2,75	12,53	12,80
7	1,41	0	5,4	2,75	14,67	10,62
8	-1,41	0	0,1	2,75	15,11	8,00
9	0	1,41	2,75	5,4	8,04	7,24
10	0	-1,41	2,75	0,1	18,24	11,67

A figura 6 mostra o modelo tridimensional da superfície de resposta em função da equação proposta para as atividades invertásicas extra e intracelular de *A. terreus*. Pode ser observado que nas faixas de concentração de 2,5 a 5,0% (m/v) de peptona e de 0 a 1,5% (m/v) de fosfato (KH₂PO₄) ocorre a maior produção invertásica. Já as tabelas 9 e 10 mostram a análise de variância para a resposta atividade enzimática intracelular e extracelular, onde pode ser observado que nenhum dos fatores lineares ou quadráticos foi significativo ao nível de 90% de confiança. O coeficiente de determinação R² para o modelo foi 0,87 e 0,82 para as respostas extra e intracelular respectivamente.

Desta forma, a equação que melhor representa o modelo na faixa estudada é:

$$\text{Atv extra} = 13,61 + 0,94 P - 0,02 P^2 + 1,08 F - 0,26 F^2 - 0,38 PF$$

$$\text{Atv intra} = 10,63 + 1,40 P - 0,22 P^2 + 0,13 F - 0,2 F^2 - 0,04 PF$$

Onde P se refere a variável peptona e F à variável KH_2PO_4 .

O delineamento de compósito central rotacional (DCCR) permite calcular os efeitos e gerar a superfície de resposta. Porém, em algumas situações não é possível se determinar as condições otimizadas em um primeiro planejamento, sendo necessário um outro modificando-se a faixa de estudo de cada variável. Tal afirmativa é verdadeira para o planejamento apresentado anteriormente. Portanto, torna-se necessária a realização de um novo planejamento em um futuro próximo.

É importante salientar, que em processos industriais vários fatores influenciam simultaneamente a produção enzimática e estudar a influência conjunta de tais variáveis é válido para se obter a máxima eficiência no processo.

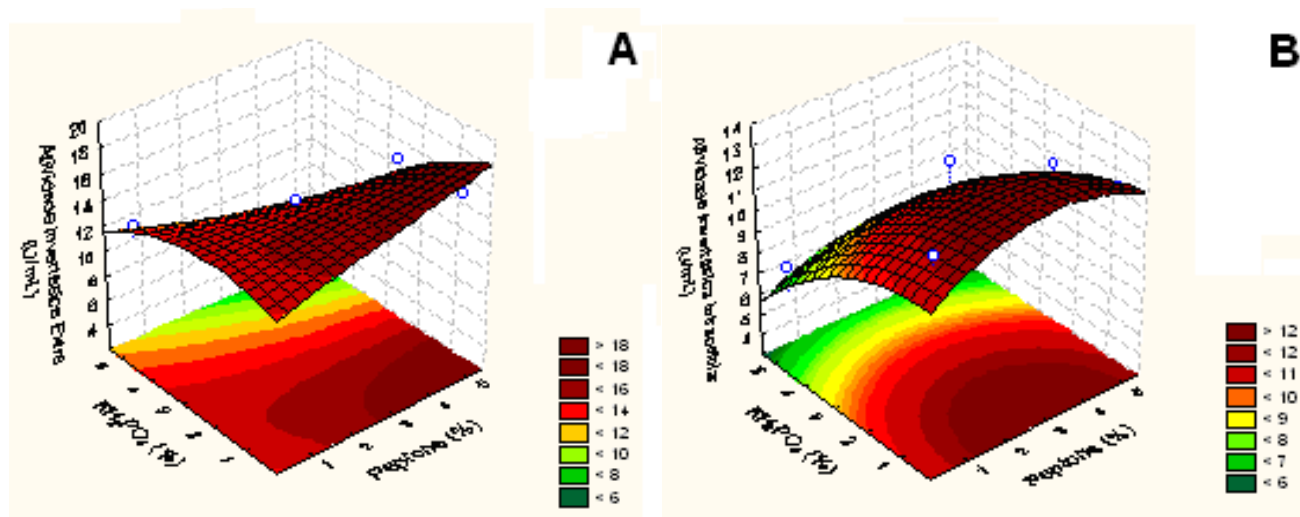


Figura 6. Superfície de resposta para o modelo que descreve a influência da peptona e do KH_2PO_4 na produção das invertases extracelular (A) e intracelular (B) produzidas pelo fungo *A. terreus*.

Tabela 9. Análise de variância de diferentes concentrações de Peptona e KH_2PO_4 para a enzima extracelular.

Modelos/Efeitos	SQ	GL	MQ	F calc	P
E-L	1,3006	1	1,30055	0,51380	0,604080
E-Q	0,0223	1	0,02232	0,00882	0,940400
F-L	69,2763	1	69,27632	27,36842	0,120240
F-Q	5,7094	1	5,70943	2,25558	0,373970
E-L x F-L	14,6306	1	14,63063	5,78000	0,250940
Falta de ajuste	11,0099	3	3,66997	1,44986	0,532824
Erro puro	2,5313	1	2,53125	-	-
Total	104,5406	9	-	-	-

$R^2 = 0,87$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados, E= Peptona e F= KH_2PO_4

Tabela 10. Análise de variância de diferentes concentrações de Peptona e KH_2PO_4 para a enzima intracelular

Modelos/Efeitos	SQ	GL	MQ	F calc	P
E-L	0,18050	1	0,18050	0,00649	0,839337
E-Q	3,99986	1	3,99986	1,47354	0,438683
F-L	39,88492	1	39,88492	14,69355	0,162459
F-Q	3,29190	1	3,29190	1,21273	0,469350
E-L x F-L	0,13690	1	0,13690	0,05043	0,859365
Falta de ajuste	7,12371	3	2,37457	0,87479	0,636624
Erro puro	2,71445	1	2,71445	-	-
Total	56,22240	9	-	-	-

$R^2 = 0,82$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados, E= Peptona e F= KH_2PO_4

4.1.6 Efeito do pH Inicial do Meio de Cultivo na Produção de Invertases em FSbm

Na figura 7A podemos observar que a maior produção invertásica (intra + extra) foi obtida quando o pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 8,0, seguido do pH 7,0. Considerando a produção de cada enzima em separado, os melhores resultados foram obtidos com o pH inicial ajustado em 8,0 para ambas as formas. Com estes resultados, verifica-se que a produção e a secreção enzimática são influenciadas pelo pH do meio no qual o fungo *A. terreus* foi crescido bem como seu desenvolvimento (figura 7B), que foi melhor em pH mais alcalino.

O ajuste do pH para um valor ideal é muito importante para o crescimento do microrganismo e para a manutenção das atividades

metabólicas, sendo que estas são muito sensíveis às mudanças no pH. Valores diferentes do pH ideal podem alterar a produção de invertases extracelulares, que são enzimas secretadas para o meio de cultivo (SHAHEEN *et al.*, 2007).

Considerando que a produção enzimática da forma extracelular obtida em pH 6,0 e 8,0 foram próximas e também a maior proporção desta forma em relação a intracelular em pH 6,0, foi selecionado este último valor, para dar continuidade aos estudos.

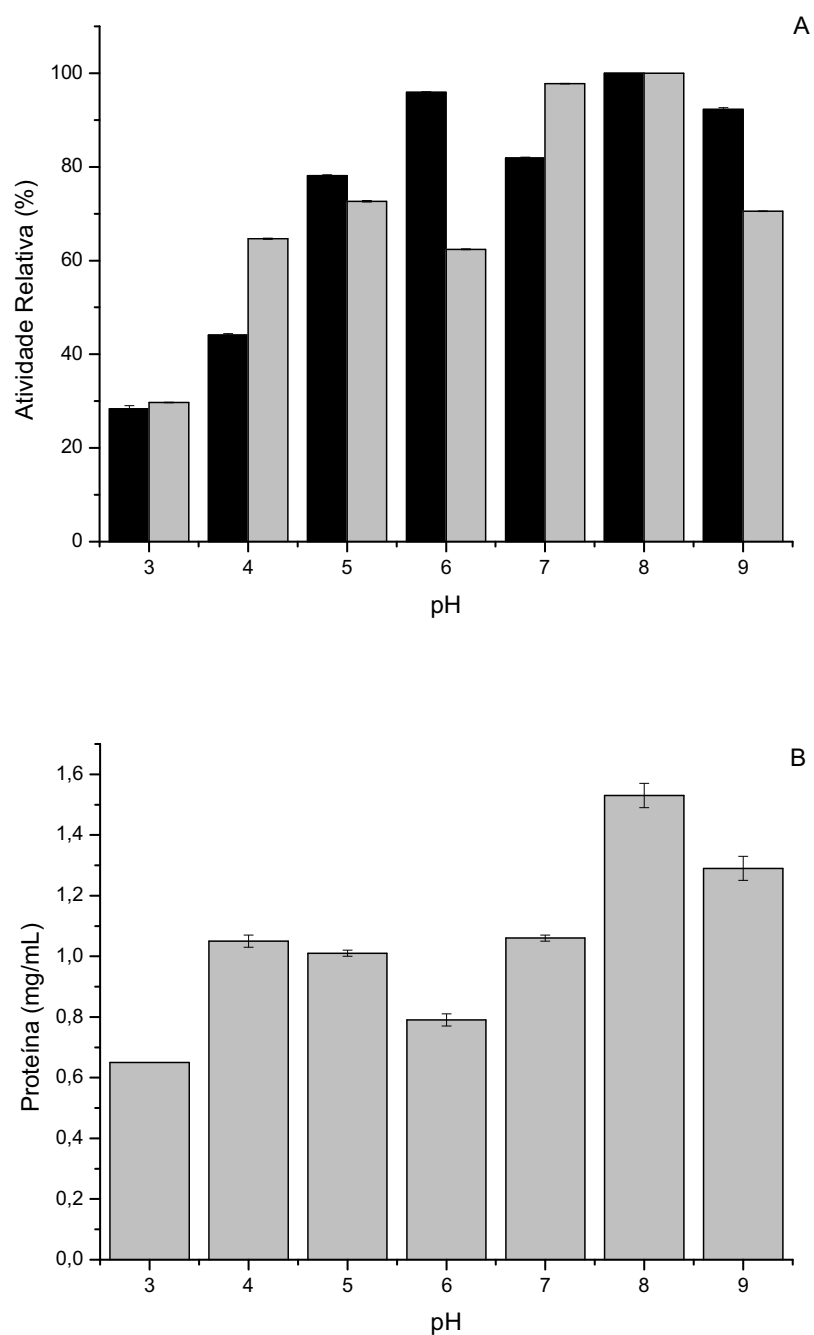


Figura 7. Influência de diferentes pH iniciais do meio de cultivo na produção de invertases extra (■) e intracelulares (▒) pelo fungo filamentoso *A. terreus* (A) e crescimento vinculado ao pH (B). Em (A): 100% = 90 U totais (extracelular) e 100% = 80 U totais (intracelular).

4.1.7 Influência de Diferentes Substratos/Fontes de Carbono na Produção de Invertases em FSS

A análise da tabela 11, nos mostra que dentre os diversos substratos/ fontes de carbono testados, a soja moída foi a que proporcionou uma maior produção enzimática (261,58 U/g de substrato), seguida pelo farelo de trigo (169,82 U/g de substrato) e farinha de centeio (94,63 U/g de substrato) quando o meio de cultivo foi mantido a 30°C, pois a 40°C, os níveis de produção invertásica foram reduzidos.

Considerando-se que os melhores resultados foram obtidos a 30°C, a produção enzimática em função da mistura de substratos foi analisada (tabela 12). Neste caso, a maior produção invertásica foi obtida quando o meio de cultivo foi adicionado de soja moída e farelo de trigo 1:1 (m/v) (163,29 U/g de substrato), seguido por soja moída com farinha de mandioca 1:1 (m/v) (128,32 U/g de substrato) e por farelo de trigo mais farinha de centeio (106,14 U/g de substrato).

Shaheen *et al.* (2007) utilizaram farelo de trigo como fonte de carbono, e obtiveram maior produção invertásica quando o meio de cultivo foi umidificado na proporção de 1:1,4 (m/v) com solução de sais minerais, tendo um valor de atividade de 22,80 U/g de substrato para a invertase produzida por *Fusarium* sp. A produção enzimática para *A. terreus* obtida neste estudo, utilizando-se farelo de trigo foi cerca de 7 vezes maior que a observada para a enzima de *Fusarium* sp. A mesma fonte de carbono foi utilizada por Goulart *et al.* (2003) para produção de invertase por *Rhizopus* sp. Rustiguel *et al.* (2009) utilizaram farelo de soja como fonte de carbono para a produção de invertases pelo fungo filamentoso *A. phoenicis*, tendo uma atividade de 470,54 U/g de substrato. Para

continuidade do estudo, padronizou-se o uso de soja moída, como substrato / fonte de carbono e a temperatura de 30°C para cultivo, uma vez que esta sozinha proporcionou maior produção, se comparado com as misturas de diferentes substratos.

Tabela 11. Substratos/fontes de carbono utilizados para a produção de invertase por *A. terreus* em FSS.

Fontes de carbono	30°C		40°C	
	Atividade (U/g de substrato)	Proteína (mg/g de substrato)	Atividade (U/g de substrato)	Proteína (mg/g de substrato)
Bagaço de cana	2,12 ± 0,09	1,59 ± 0,27	4,01 ± 0,16	1,61 ± 0,03
Bagaço de laranja	9,99 ± 0,04	16,69 ± 0,44	13,13 ± 0,16	10,91 ± 0,11
Farelo de trigo	169,82 ± 0,24	5,38 ± 0,13	2,81 ± 0,11	4,24 ± 0,10
Farinha de aveia	37,41 ± 0,16	3,86 ± 0	5,00 ± 0,07	1,72 ± 0,03
Farinha de centeio	94,63 ± 0,09	4,64 ± 0,19	1,50 ± 0,16	1,42 ± 0,05
Farinha de mandioca	46,83 ± 0,09	3,38 ± 0,33	0,65 ± 0,08	0,59 ± 0,04
Milho moído	19,39 ± 0,09	2,79 ± 0,29	0	0,68 ± 0,06
Sabugo de milho	15,44 ± 0,35	3,42 ± 0,33	1,46 ± 0,06	1,37 ± 0,09
Soja moída	261,58 ± 0,58	10,36 ± 0,20	2,44 ± 0,06	2,75 ± 0,06

Substrato umidificado com água de torneira (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 72 horas em atmosfera úmida (60%).

Tabela 12. Influência da mistura de substratos na produção de invertases extracelulares por *A. terreus* em FSS.

Fontes de carbono	Atividade (U/g de substrato)	Proteína (mg/g de substrato)
F. aveia + F. centeio	47,19 ± 0,23	3,77 ± 0,11
F. aveia + Soja moída	95,49 ± 0,47	7,04 ± 0,06
F. mandioca + Soja moída	128,32 ± 0,19	5,78 ± 0,16
F. mandioca + F. centeio	50,81 ± 0,03	2,30 ± 0,03
F. mandioca + F. trigo	47,90 ± 0,13	2,74 ± 0,06
F. mandioca + F. aveia	32,76 ± 0,10	3,04 ± 0,09
F. trigo + F. centeio	106,14 ± 0,20	5,00 ± 0,06
F. trigo + F. aveia	70,22 ± 0,13	4,48 ± 0,40
Soja + F. centeio	67,21 ± 0,21	4,78 ± 0,33
Soja moída + F. trigo	163,29 ± 0,23	6,87 ± 0,17

Substratos umidificados com água de torneira (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 72 horas a 30°C em atmosfera úmida (60%).

4.1.8 Efeito de Diferentes Soluções Adicionadas a FSS na Produção de Invertases

Visando melhorar a produção de invertases em FSS, foram testadas diferentes soluções salinas, água de torneira e água destilada, na proporção de 1:1 (m/v), como agentes umidificantes (tabela 13). Desta forma, verificou-se que a maior produção invertásica foi obtida quando utilizou-se solução de sais SR (310,10 U/g de substrato), seguido por sais de Khanna (297,21 U/g de substrato) e água destilada (281,70 U/g de substrato).

Observando a composição dos sais de Khanna e dos sais SR, verifica-se que ambos os sais possuem dois componentes similares, sendo eles o

MgSO₄ e o KH₂PO₄, sendo que provavelmente, o MgSO₄ pode ter um papel importante no desenvolvimento do microrganismo e consequentemente na produção enzimática (tabela 13) ao passo que, como visto anteriormente, o KH₂PO₄, diminuiu a produção enzimática (item 4.1.5).

Goulart *et al.* (2003) utilizaram água destilada para umidificar o meio de cultivo na produção de invertases pelo fungo *Rhizopus* sp. Este mesmo umidificante foi testado neste trabalho para produção de invertases por *A. terreus* possibilitando atividade enzimática significativa, como pode ser observado na tabela 13. Considerando os resultados obtidos, para a continuidade do estudo, padronizou-se o uso de solução de sais SR para fazer a umidificação do meio de cultivo, como também realizado por Alegre *et al.* (2009) para o cultivo de *A. caespitosus*.

Tabela 13. Influência de diferentes soluções de sais, água destilada e água de torneira adicionadas a FSS com soja moída sobre a produção de invertase por *A. terreus*.

Soluções de sais 1:1 (m/v)	Atividade (U/g de substrato)	Proteína (mg/g de substrato)
Água de torneira	271,23 ± 1,10	17,74 ± 0,37
Água destilada	281,70 ± 1,84	23,41 ± 0,85
Khanna	297,21 ± 1,53	22,69 ± 0,98
Nitrato	223,68 ± 1,87	14,45 ± 0,74
SR	310,10 ± 0,45	14,54 ± 0,75
Traços	267,50 ± 2,26	13,50 ± 0,68
Voguel	16,12 ± 1,27	10,73 ± 0,47

O fungo foi crescido em meio tendo soja moída como fonte de carbono/substrato, mantido a 30°C, por um período de 72 horas.

O nível de umidade em FSS influencia a biossíntese e secreção de enzimas, porque a umidade pode causar interferência nas propriedades físicas das partículas sólidas utilizadas como fontes de carbono, e sendo assim, um substrato com alta umidade resulta em diminuição da porosidade, o que impede a penetração do oxigênio e conseqüentemente o crescimento do microrganismo em estudo (RAMESH & LONSANE, 1990). Desta maneira, a influência de diferentes proporções (0,5 – 4%; m/v) da solução de sais SR adicionadas ao substrato foi analisada (tabela 14). Pode-se observar que a produção enzimática foi semelhante para as proporções (m/v) 1:1, 1:2 e 1:3. Entretanto, quando utilizada a proporção 1:4 (m/v) a produção foi drasticamente reduzida. Considerando-se que, entre todas as proporções analisadas, o maior nível enzimático foi obtido na proporção 1:1 (m/v), esta foi utilizada nos demais experimentos.

Tabela 14. Influência de diferentes concentrações de sais SR na produção de invertase pelo fungo *A. terreus*.

Soluções de sais SR	Atividade	Proteína
(m/v)	(U/g de substrato)	(mg/g de substrato)
1:0,5	201,34 ± 0,59	9,11 ± 0,72
1:1	300,70 ± 0,75	13,79 ± 0,79
1:2	284,62 ± 0,60	33,98 ± 0,60
1:3	291,58 ± 0,43	38,68 ± 0,64
1:4	22,78 ± 0,35	35,70 ± 0,62

O fungo foi crescido em meio tendo soja moída como fonte de carbono/substrato, mantido a 30°C, por um período de 72 horas.

4.1.9 Produção de Invertases em FSS com Soja Moída em Função do Tempo de Cultivo

Na figura 8 pode-se observar que a produção enzimática foi crescente e atingiu o máximo em 72 horas (305,64 U/g de substrato). Após este período houve decréscimo da produção, o que pode ser atribuído a autólise celular sem considerar, também, a possível presença de proteases no extrato, que levaram a diminuição de atividade enzimática.

Este mesmo período de incubação foi utilizado para a produção de invertases por *A. caespitosus* a 30°C (ALEGRE *et al.*, 2009), *A. niger* (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2001) e *A. phoenicis* (RUSTIGUEL *et al.*, 2009). Já nos estudos realizados por Shaheen *et al.* (2007) e por Goulart *et al.* (2003) com os fungos *Fusarium* sp. e *Rhizopus* sp. o crescimento foi realizado em 96 horas e 168 horas, respectivamente, períodos estes superiores ao encontrado neste estudo. Sendo assim, para prosseguimento do estudo padronizou-se 72 horas de cultivo.

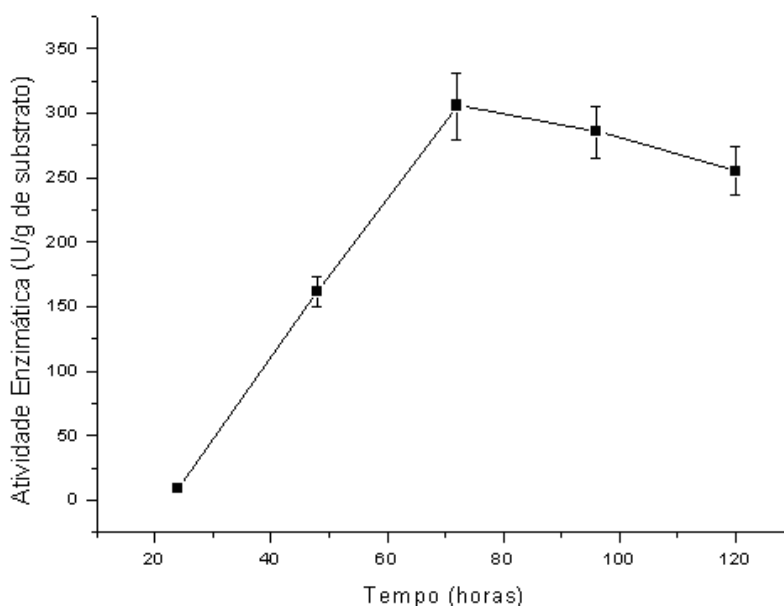


Figura 8. Produção de invertase extracelular pelo fungo *Aspergillus terreus* em FSS em função do tempo de cultivo.

4.1.10 Efeito de Diferentes Concentrações de Glicose e Frutose Adicionadas à FSS

Como pode ser observado na figura 9A pequenas concentrações de glicose adicionadas a FSS não proporcionaram aumento da produção invertásica, como verificado para a produção em FSbm, exceto na concentração de 0,5%. Entretanto, com o aumento da concentração de glicose, a produção invertásica diminuiu, indicando mais uma vez a ocorrência de repressão catabólica por glicose. Sendo assim, o valor obtido na presença de 5% (m/v) de glicose foi cerca de 3 vezes menor que o obtido na ausência deste monossacarídeo. No estudo realizado com a invertase extracelular produzida por *A. caespitosus* em FSS verificou-se que a adição de glicose ao meio de cultivo promoveu diminuição da atividade enzimática (ALEGRE *et al.*, 2009), assim como ocorreu no presente estudo. Aranda *et al.* (2006) observaram que conforme se aumentou a concentração de glicose no meio de cultivo, a atividade invertásica total da enzima produzida por *A. niger* foi decrescendo, mas quando a concentração de glicose chegou a 200 g/L, não foi observado o processo de repressão catabólica, pois a atividade invertásica foi maior se comparado ao controle e as demais concentrações menores testadas.

Analisando-se também a influência de frutose adicionada a FSS (figura 9B), a produção enzimática foi semelhante ao observado na ausência da mesma até a concentração de 0,5% (m/v). Entretanto em concentrações superiores (1,5-5%;m/v), houve diminuição da produção enzimática, uma vez que havia frutose suficiente no meio para suprir a necessidade do microrganismo.

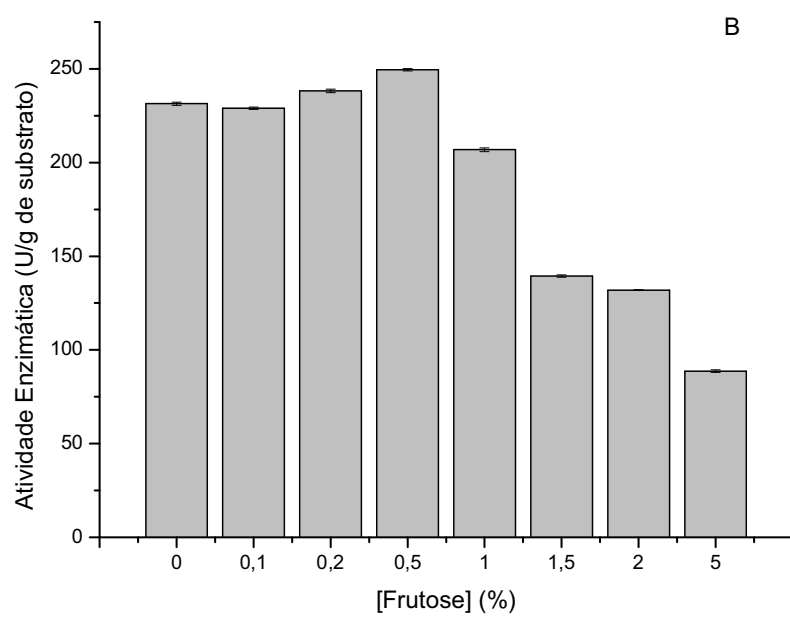
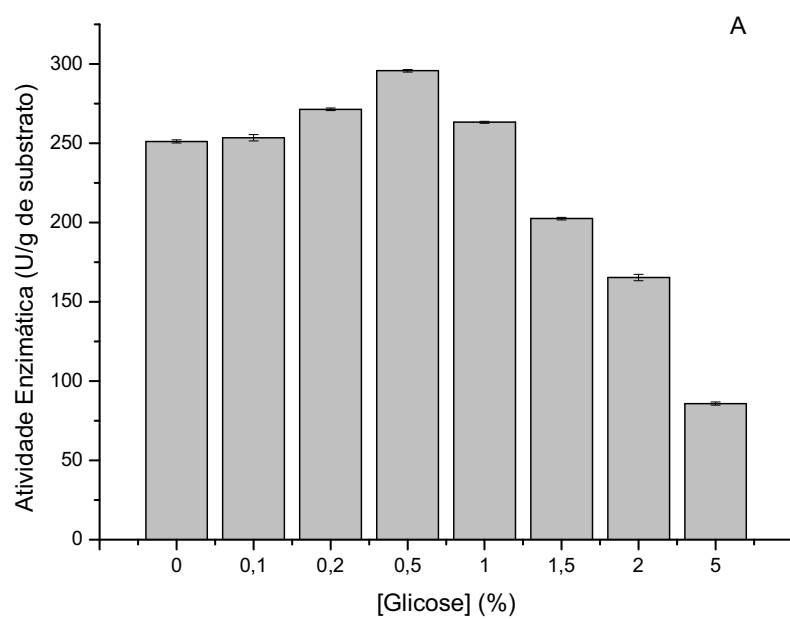


Figura 9. Influência de diferentes concentrações de glicose (A) e frutose (B) na produção de invertases (■) pelo fungo filamentoso *A. terreus* em FSS.

4.2 Caracterização das Invertases Extracelulares Produzidas em FSbm e FSS

4.2.1 Purificação da Invertase Extracelular

O extrato bruto obtido de FSbm contendo a enzima extracelular após ser dialisado “overnight”, a 4°C contra água destilada foi aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose equilibrada previamente em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0. A atividade invertásica foi eluída como única forma com 0,36 M de NaCl através de um gradiente linear de NaCl (0 - 1M) (figura 10A). As frações que apresentaram atividade foram reunidas em um único “pool”, o qual foi dialisado “overnight”, a 4°C contra água destilada, posteriormente liofilizada, ressuspensa em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 + NaCl 50 mM e então aplicada em uma coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephacryl S-200 equilibrada e eluída com este mesmo tampão (figura 10B). As frações que apresentaram atividade foram reunidas em um único “pool”, o qual foi dialisado “overnight”, a 4°C contra água destilada, liofilizado e posteriormente aplicado em eletroforese em condição não desnaturante (PAGE 6%) e desnaturante (SDS-PAGE 6%). Através destes procedimentos, a enzima extracelular foi purificada 139 vezes com recuperação de 11% (tabela 15). A eficiência do procedimento de purificação foi confirmado por PAGE 6% revelado para atividade invertásica, sendo que a única banda obtida possui a mesma mobilidade relativa que a banda revelada por prata (figura 11).

Rustiguel *et al.* (2009) utilizaram três procedimentos para purificar as enzimas intra e extracelular produzidas pelo fungo filamentoso *A. phoenicis*. Em um outro estudo realizado por Guimarães *et al.* (2007), observou-se que

para a purificação da invertase extracelular produzida pelo fungo filamentoso *A. ochraceus*, dois passos de purificação (DEAE-Celulose e Sephacryl S-200) foram empregados, assim como para este trabalho. Já a invertase produzida por *F. solani*, foi purificada através de três passos de purificação (BHATTI *et al.*, 2006).

Na purificação da invertase produzida pelo fungo filamentoso *A. niger* AS0023, foram utilizados cinco passos (L'HOCINE *et al.*, 2000). Uma *et al.* (2010) purificaram a invertase produzida por *A. flavus* em torno de 5,8 vezes, com uma recuperação de 3,2%, sendo utilizados dois métodos, sendo eles, precipitação com sulfato de amônio e coluna de troca iônica DEAE-Celulose. Finalmente, a enzima produzida pelo fungo filamentoso *A. niger* IMI303386, foi purificada através de três passos (NGUYEN *et al.*, 2005). Desta maneira, verifica-se que a invertase em estudo passou somente por dois passos de purificação obtendo-se fatores de purificação e recuperação compatíveis com os encontrados na literatura, sendo então um processo bem sucedido e viável. É importante salientar que o fator de purificação obtido para a enzima extracelular produzida por *A. terreus* foi superior se comparado às demais citadas anteriormente.

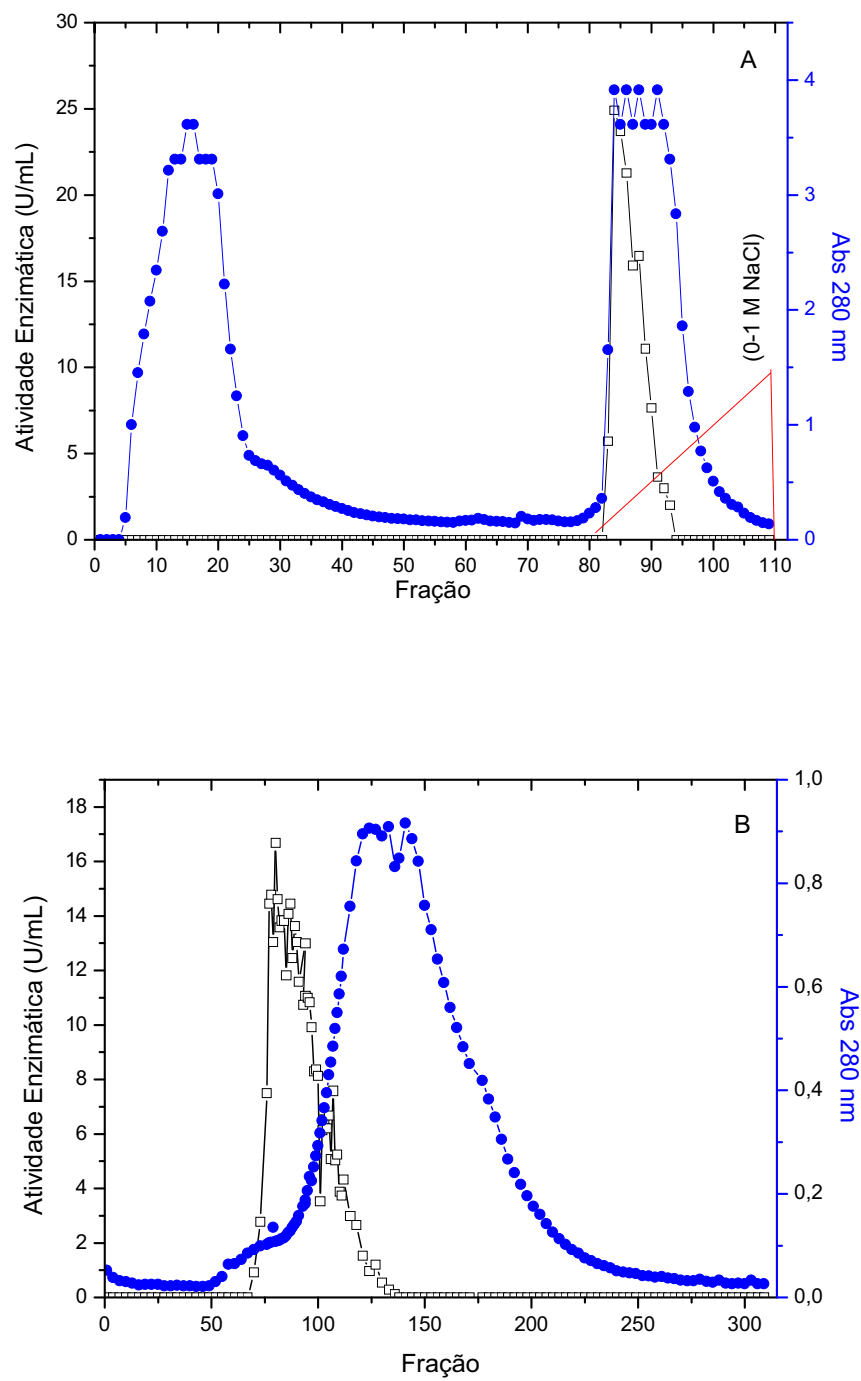


Figura 10. Perfis cromatográficos em DEAE-Celulose (A) e Sephacryl S-200 (B) para invertase extracelular produzida por *A. terreus* em FSbm. Símbolos: (□) Atividade; (●) Abs 280 nm.

Tabela 15. Purificação da invertase extracelular produzida por *A. terreus* em FSbm.

Passo	Volume (mL)	Proteína Total (mg totais)	Atividade total (U totais)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato bruto	150	415,50	1653	3,98	1	100
DEAE – Celulose	20	62,20	662,20	10,65	2,68	40,06
Sephacryl S- 200	45	0,33	183,15	555,00	139,45	11,08

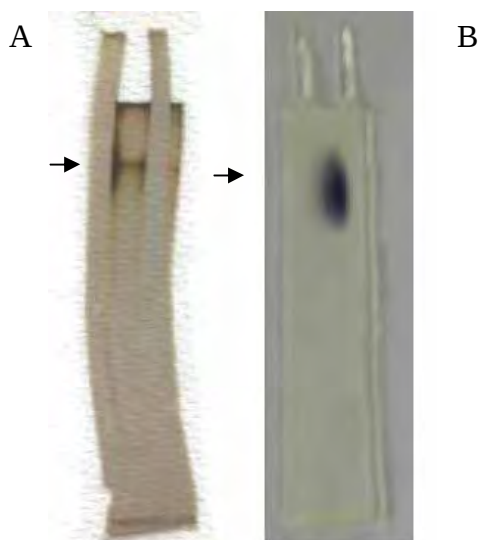


Figura 11. Perfil eletroforético da invertase extracelular purificada em PAGE 6% revelado por prata (A) e para a atividade invertásica (B).

4.2.2 Determinação da Massa Molar e Conteúdo de Carboidratos

A massa molar nativa da invertase extracelular produzida em FSbm por *A. terreus* foi de 74,76 kDa determinada por coluna de filtração Sephacryl-S200 (figura 12B) com conteúdo de carboidratos de aproximadamente 11,34%, sendo considerada uma glicoproteína. No entanto, quando avaliada a massa molar em condições desnaturantes (SDS-PAGE 6%) duas bandas foram observadas, sendo uma de 46,77 kDa e a outra de 26,92 kDa (figura 12A), supondo-se um possível heterodímero.

Na literatura encontra-se uma ampla faixa de valores para a massa molecular de invertases. Neste contexto, Bhatti *et al.* (2006) determinaram que a massa molecular da invertase produzida por *F. solani* foi de 65 kDa, ao passo que L'Hocine *et al.* (2000) obtiveram uma massa molecular de 166 kDa para a invertase produzida por *A. niger* AS0023. Já Rubio *et al.* (2002) encontraram para a invertase de *R. glutinis* massa molecular de 100 kDa quando utilizada coluna de filtração e de 47 kDa quando verificada por SDS-PAGE, sendo um homodímero, com conteúdo de carboidratos de 19%. Uma *et al.* (2010) encontraram que a massa molecular da invertase produzida por *A. flavus* foi de 67 kDa e Guimarães *et al.* (2007) obtiveram massa molecular de 135 kDa quando verificada por coluna de filtração e de 79 kDa (homodímero) quando analisada por SDS-PAGE para a invertase de *A. ochraceus*. A invertase produzida por *A. niger* IMI303386 teve uma massa molecular ao redor de 130 kDa, e a quantidade de carboidratos foi de 17%, sendo então considerada uma glicoproteína, assim como neste estudo (NGUYEN *et al.*, 2005). Já a enzima produzida pela bactéria *Zymomonas mobilis* teve uma massa molecular de 58 kDa (YANASE *et al.*, 1995). Guimarães *et al.* (2009) encontraram que a massa

molecular da invertase produzida por *A. niveus* foi de 141 kDa quando analisada por filtração (Sephacryl-S 200). Já quando verificada por SDS-PAGE, uma única banda de 57 kDa foi obtida. Trimble & Maley (1977) também obtiveram uma única banda de 61,8 kDa (SDS-PAGE), ao passo que em coluna de filtração a massa molecular foi de 123 kDa para a invertase produzida por *S. cerevisiae*. Em um outro estudo, realizado com a invertase produzida por *Schizophyllum commune*, Rojo *et al.*(1994) encontraram um dímero com duas subunidades iguais com peso de 60 kDa.

Assim, verifica-se que os valores da massa molecular e de conteúdo de carboidratos encontrados estão em concordância com a literatura. Entretanto, a enzima estudada neste trabalho é um heterodímero e não homodímero como observado para a maioria das invertases encontradas na literatura.

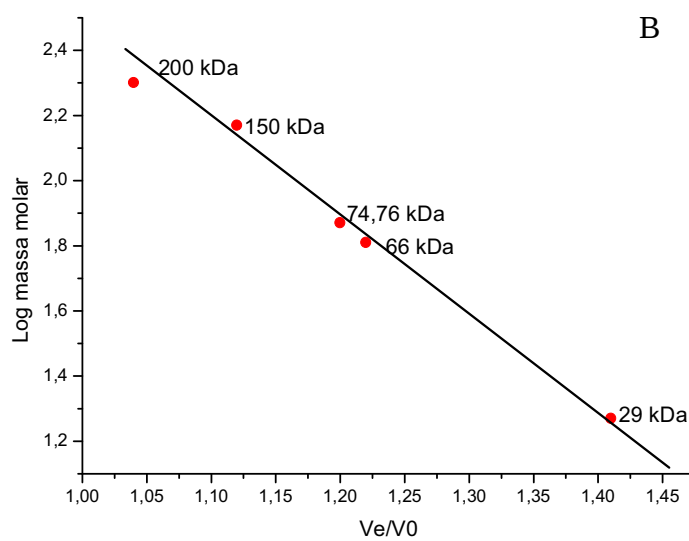
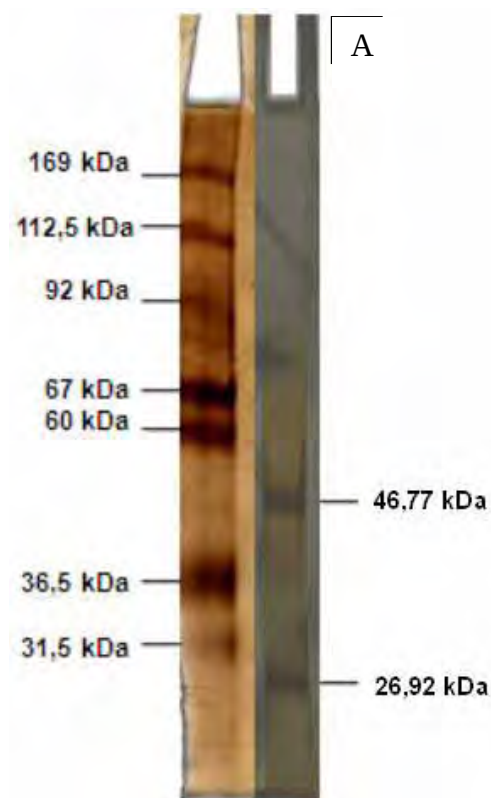


Figura 12. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 6%) para invertase extracelular purificada revelada por prata (A) e determinação da massa molar nativa produzida por *A. terreus* (B).

4.2.3 Hidrólise de Diferentes Substratos

Analisando a tabela 16, verifica-se que, como o esperado, a maior atividade enzimática foi obtida quando utilizado o substrato sacarose (9 U/mL), sendo seguido pelo substrato maltose (2,73 U/mL), rafinose (2,26 U/mL) e celobiose (1,71 U/mL). A explicação para a atividade hidrolítica do extrato bruto sobre outros substratos que não a sacarose, deve-se ao fato, provavelmente, da presença de outras enzimas além da invertase. Após a purificação do extrato enzimático, verificou-se que a enzima continuou hidrolisando quatro substratos, sendo eles sacarose (9,13 U/mL), rafinose (4,87 U/mL), celobiose (2,20 U/mL) e inulina (0,65 U/mL) (tabela17).

No que se refere à hidrólise da sacarose e da inulina, existe uma discussão para definir se a enzima é uma invertase ou uma inulinase, sendo que há na literatura uma relação entre especificidade para os substratos que ajuda a diferenciar tais enzimas. A relação é definida como o quociente S/I, ou seja hidrólise da sacarose sobre a da inulina. Se o resultado desta relação for maior que 50 tem-se invertase. Contudo, vale ressaltar que essa análise deve ser feita com cuidado, uma vez que esta relação é influenciada pela origem da inulina utilizada e pela concentração do substrato (ROUWENHORST *et al.*, 1988; RUSTIGUEL *et al.*,2009). A relação encontrada para a invertase extracelular purificada produzida por *A. terreus* foi 14,05 e para um melhor esclarecimento deste aspecto, a análise da eficiência catalítica é fundamental. Sendo assim, os resultados referentes a esta análise serão mostrados no item 4.2.5.

É interessante destacar que a enzima mesmo purificada apresenta atividade de celobiohidrolase, diferindo das demais invertases descritas até o momento, o que merece futuras investigações.

Rubio *et al.* (2002) mostraram que a enzima de *R. glutinis* hidrolisou sacarose e rafinose. Em outro trabalho Guimarães *et al.* (2007) observaram que a enzima produzida por *A. ochraceus* hidrolisou além desses dois substratos, a inulina assim como observado neste trabalho. A enzima produzida pela bactéria *Z. mobilis*, hidrolizou pequena quantidade de rafinose e inulina (YANASE *et al.*, 1995).

Tabela 16. Hidrólise de diferentes substratos pela invertase extracelular produzida em FSbm.

Substrato	Atividade Enzimática (U/mL)
Amido	0,79 ± 0,13
Celobiose	1,71 ± 0,20
Inulina	0,30 ± 0,28
Maltose	2,73 ± 0,16
Rafinose	2,26 ± 0,11
Sacarose	9,00 ± 0,33
Trealose	0

O fungo foi crescido em meio tendo farelo de centeio como fonte de carbono/substrato, mantido a 30°C, por um período de 48 horas.

Tabela 17. Hidrólise de diferentes substratos pela invertase extracelular purificada produzida em FSbm.

Substrato	Atividade Enzimática (U/mL)
Amido	0
Celobiose	2,20 ± 0,70
Inulina	0,65 ± 0,04
Maltose	0
Rafinose	4,87 ± 0,45
Sacarose	9,13 ± 0,86
Trealose	0

O fungo foi crescido em meio tendo farelo de centeio como fonte de carbono/substrato, mantido a 30°C, por um período de 48 horas.

4.2.4 Análise dos Produtos de Hidrólise

A análise dos produtos de hidrólise da sacarose pela ação da invertase extracelular foi realizada em cromatografia de placa delgada (TLC) e também por cromatografia líquida de alta afinidade (HPLC). Desta forma, verifica-se na figura 13 que houve hidrólise da sacarose e conseqüente formação de glicose e frutose em todos os períodos de reação analisados, ou seja, de um a 20 minutos. Este mesmo método de análise foi utilizado para as invertases produzidas por *A. phoenicis*, sendo encontrado como produtos glicose e frutose (RUSTIGUEL, 2009).

Na análise feita por HPLC, os produtos de hidrólise da sacarose a 1% (m/v) em um período de 4 horas, encontrados pela ação da invertase foi formação dos açúcares glicose e frutose com tempos de retenção de 12,5 min e 17 min. Além destes, ainda pode ser observado um pico com tempo de

retenção de 8,5 min, o que sugere a formação de frutooligossacarídeo (figura 14) . No entanto, esta observação precisa ser confirmada adequadamente.

L'HOCINE *et al.* (2000) também utilizaram a metodologia de HPLC para a enzima produzida por *Aspergillus niger* AS0023, sendo uma coluna Lichrosorb-NH₂ , na temperatura de 30⁰C, tendo como fase móvel acetonitrila e água (80:20, v/v), e obtiveram como resultado a presença de glicose e frutose. Esta mesma metodologia foi utilizada para a enzima produzida por *A. phoenicis*, mas com a coluna Shimadzu EC 250/4.6 nucleosil- 100.5 NH₂ a 60⁰C. Neste caso, verificou-se que a invertase presente no extrato bruto produziu glicose, frutose e nistose, ao passo que a purificada produziu somente glicose e frutose, a partir da utilização de sacarose como substrato.

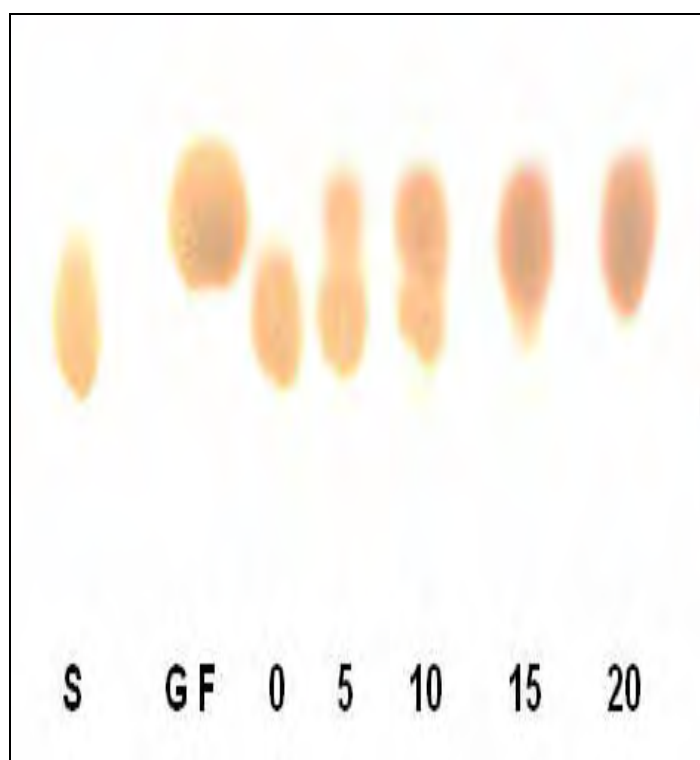


Figura 13. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) para a glicose e a frutose formados a partir da hidrólise da sacarose pela enzima extracelular em função do tempo de reação. Raias: (S) sacarose; (G) glicose; (F) frutose; (0) controle; (5) reação de 5 minutos; (10) reação de 10 minutos; (15) reação de 15 minutos e (20) reação de 20 minutos.

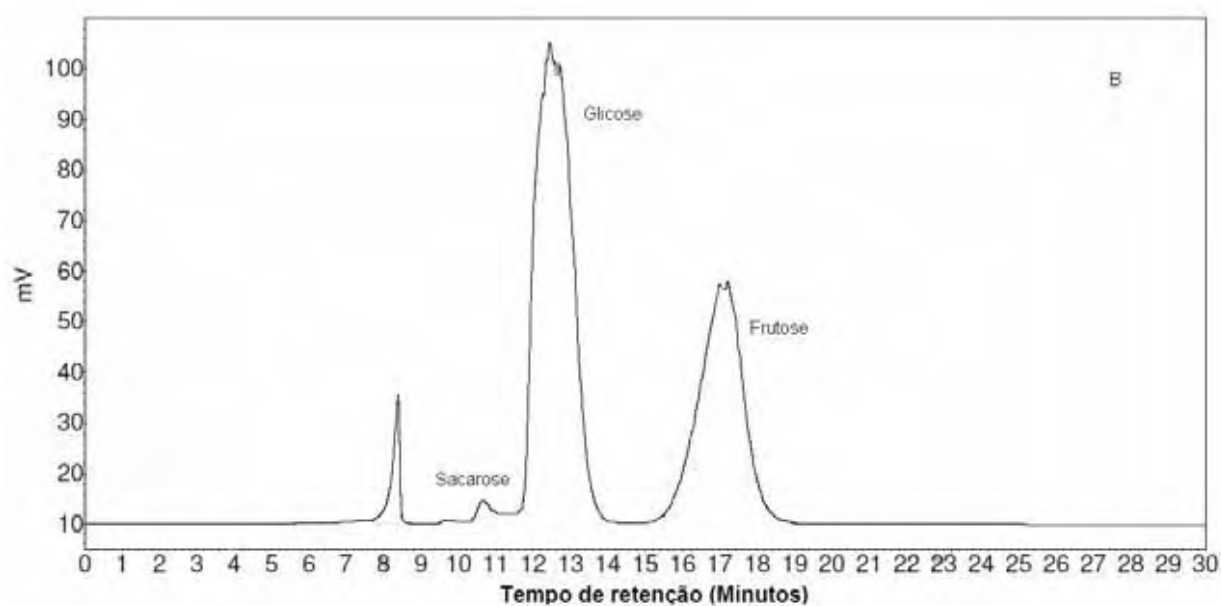
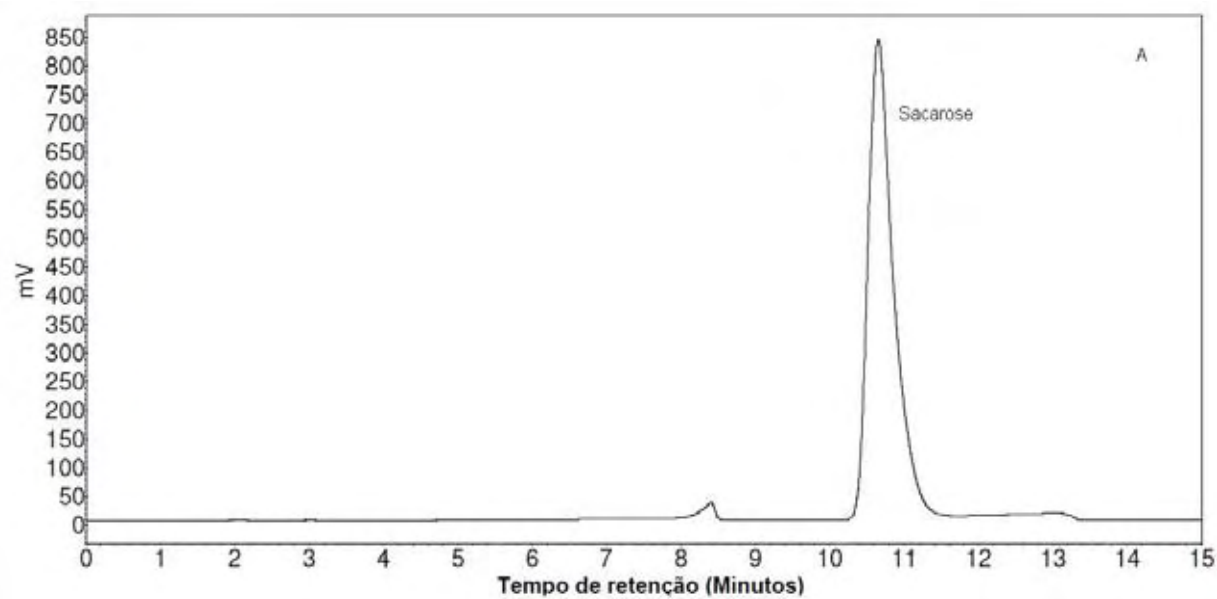


Figura 14. Perfil cromatográfico em HPLC dos produtos de hidrólise da sacarose pela ação da invertase extracelular. As reações foram conduzidas a 60⁰C. Reação com 1% de sacarose tempo zero (A) e reação com 1% de sacarose 4 horas (B).

4.2.5 Determinação das Constantes Cinéticas

A determinação das constantes cinéticas foi realizada com os substratos sacarose (1 – 600 mM) na presença e na ausência de 1 mM de Mn^{2+} e inulina (0,6 – 18 mM), utilizando-se a representação gráfica do duplo recíproco ($1/V \times 1/S$) (figura 15). Como pode ser observado na tabela 18, a enzima apresentou $V_{m\acute{a}x} = 178,57$ U/mg, $K_m = 22,73$ mM e $V_{m\acute{a}x}/K_m = 7,86$ $Umg^{-1}mM^{-1}$ quando utilizado o substrato sacarose. Já quando utilizado este mesmo substrato, mas na presença de 1 mM de Mn^{2+} , temos $V_{m\acute{a}x} = 526,31$ U/mg, $K_m = 11,90$ mM e $V_{m\acute{a}x}/K_m = 44,23$ $Umg^{-1}mM^{-1}$. Na presença de inulina como substrato, o valor de $V_{m\acute{a}x}$ foi 83,33 U/mg, com K_m de 14,49 mM e $V_{m\acute{a}x}/K_m = 5,75$ $Umg^{-1}mM^{-1}$. Analisando os dados, verifica-se que os maiores valores de $V_{m\acute{a}x}$ e $V_{m\acute{a}x}/K_m$ foram encontrados quando utilizado, como substrato, a sacarose na presença de 1mM de Mn^{2+} , o que pode ser atribuído ao fato da enzima necessitar desse íon como co-fator. Já quando compara-se os valores de K_m obtidos nas 3 condições pode-se dizer que a enzima possui uma maior afinidade pelo substrato sacarose na presença de Mn^{2+} , assim como uma maior eficiência catalítica (tabela 18). Quando analisamos a hidrólise dos substratos sacarose e inulina, verificamos uma maior velocidade de reação para a primeira, bem como uma maior eficiência catalítica. Tal fato sugere que a enzima em questão é realmente uma invertase que também atua sobre inulina, apesar do valor S/I obtido (14,05). Diferentes trabalhos têm apontado a sacarose como substrato preferencial desta enzima, assim como verificado neste trabalho.

Para a enzima produzida pelo fungo filamentoso *A. niger* AS00123 o K_m foi de 35,67 mM (L'HOCINE *et al.*, 2000) na presença de sacarose como substrato. Já para as enzimas produzidas por *S. cerevisiae* (TALEKAR *et al.*,

2010) e por *Cladosporium cladosporioides* (ALMEIDA *et al.*, 2005) os valores de K_m foram 13,45 mM e 447 mM, respectivamente. Guimarães *et al.* (2007) testaram além da sacarose, rafinose e inulina, tendo valores de K_m de 13,40 mM, 7,37 mM e 2,66 mM, respectivamente, para a invertase produzida pelo fungo filamentoso *A. ochraceus*. Desta maneira, verificamos que a invertase produzida pelo fungo filamentoso *A. terreus*, na presença de Mn^{2+} , apresentou maior afinidade pelo substrato sacarose, se comparada às enzimas de outros microrganismos citados anteriormente. Já quando comparada a afinidade por inulina, observou-se que esta foi menor para a enzima de *A. terreus* se comparada à invertase de *A. ochraceus* (GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Tabela 18. Parâmetros cinéticos da invertase extracelular produzida por *A. terreus*

Parâmetros	Sacarose	Sacarose Mn^{2+}	Inulina
$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	178,57	526,31	83,33
K_m (mM)	22,73	11,90	14,49
$V_{m\acute{a}x} / K_m$ (Umg ⁻¹ mM ⁻¹)	7,86	44,23	5,75

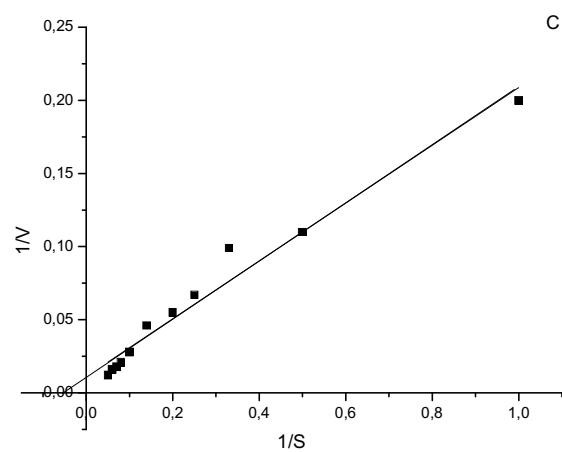
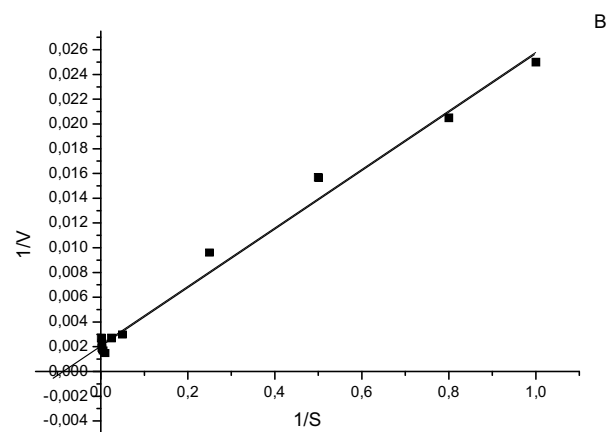
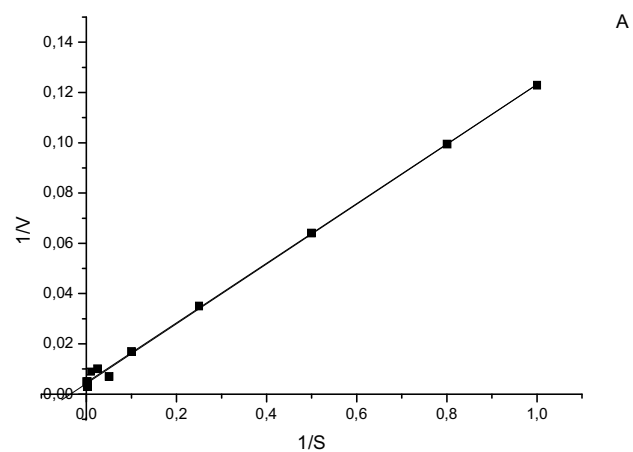


Figura 15. Representação gráfica do duplo-recíproco para a hidrólise do substrato sacarose na ausência (A) e na presença de Mn^{2+} (B), e do substrato inulina (C).

4.2.6 Influência da Temperatura e pH de Reação na Atividade Invertásica

A partir da análise dos resultados obtidos, para os ensaios realizados em diferentes temperaturas (30°C a 80°C), pode-se observar que as atividades enzimáticas extra e intracelular, aumentaram progressivamente chegando ao máximo na temperatura de 60°C (17,05 U/mL=100%) para a forma extracelular e 55°C (13,36 U/mL=100%) para a forma intracelular (figura 16A). Em temperaturas superiores houve decréscimo da atividade ficando esta ao redor de 5,79% para a forma extracelular e 26,65% para a forma intracelular a 80°C.

Para a maioria das invertases citadas na literatura, a temperatura ótima de atividade permanece abaixo de 60°C, o que difere do observado por nós para a enzima do fungo *A. terreus*. Desta forma, as enzimas produzidas por este fungo são ativas em temperaturas mais elevadas, tornando-se atrativas para usos biotecnológicos. A enzima produzida pelo fungo *T. lanuginosus* apresentou temperatura ótima de 50°C (CHAUDHURI *et al.*, 1999) assim como as enzimas produzidas pelos fungos filamentosos *F.solani* (BHATTI *et al.*, 2006) e *A.niger* IMI303386 (NGUYEN *et al.*, 2005). A invertase produzida pela bactéria *Z. mobilis*, também apresentou este mesmo valor de temperatura ótima (YANASE *et al.*, 1995). As enzimas produzidas pela levedura *S. cerevisiae* apresentaram temperaturas ótimas de 40 °C e 30°C (PATARO *et al.*, 2002; TALEKAR *et al.*, 2010), ou seja, inferiores às obtidas neste trabalho. Resultados semelhantes ao encontrado por nós foram obtidos para as invertases dos fungos *A. niger* com atividade ótima em 55°C (L'HOCINE *et al.*, 2000) e *A. ochraceus* em 60°C (GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Já com relação ao pH ótimo de atividade, verificou-se que para a forma extracelular os valores de atividade foram aumentando até chegar ao máximo,

em pH 5,0, com uma atividade de 21,60 U/mL (100%) decrescendo em valores superiores. O mesmo ocorreu para a enzima intracelular, com atividade máxima também em pH 5,0 (10,53 U/mL=100%), sendo inexistente em pH 9,0 (figura 16B). Os valores encontrados neste trabalho são próximos aos observados para as invertases de *R. glutinis* (RUBIO *et al.*, 2002), de *A. ochraceus* (GUIMARÃES *et al.*, 2007) e de *A. niger* AS0023 (L'HOCINE *et al.*, 2000). Para a enzima produzida pela levedura *S. cerevisiae* o pH ótimo de atividade foi de 4,2 (TALEKAR *et al.*, 2010). Para a enzima de *A. niger*, valores de pH acima de 5,0 levaram a diminuição da atividade, sendo que acima de 7,0 esta inexistente (L' HOCINE *et al.*, 2000). O pH ótimo para a invertase produzida por *A. niger* IMI303386 foi de 5,5, assim como para a enzima produzida pela bactéria *Z. mobilis* (NUGYEN *et al.*, 2005; YANASE *et al.*, 1995).

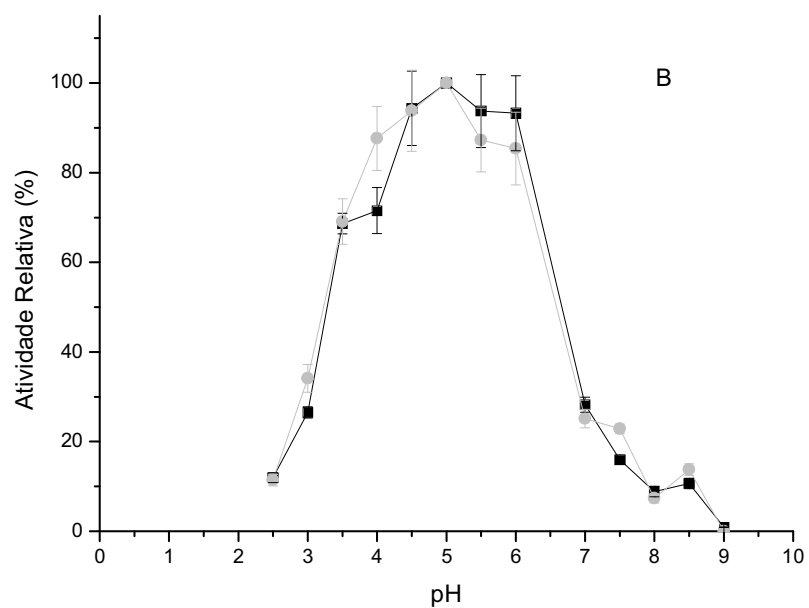
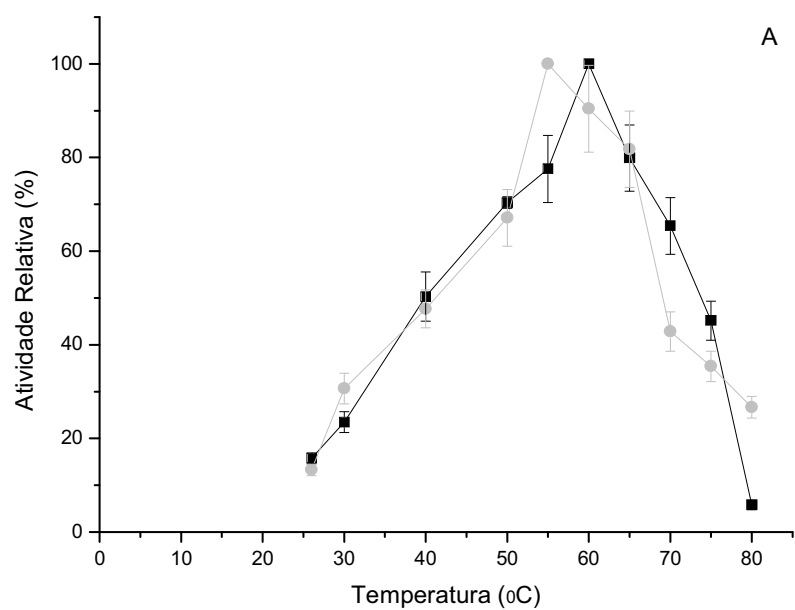


Figura 16. Determinação da temperatura ótima de ensaio (A) e pH ótimo de ensaio (B) para as invertases extracelular (■) e intracelular (●) produzidas pelo fungo *A. terreus*.

Adicionalmente, na tabela 19, podem ser observadas as respostas para as atividades enzimáticas extra e intracelular em função das variáveis independentes temperatura e pH de reação. Desta maneira, observa-se que a maior atividade encontrada para a enzima extracelular foi na temperatura de 55⁰C e no pH 5,5 (3,38 U/mL). Já para a enzima intracelular, foi na temperatura de 70⁰C e no pH 3,0. As menores atividades foram encontradas na temperatura de 40⁰C e no pH 8,0 (0,62 U/mL) para a enzima extracelular e na temperatura de 55⁰C e no pH 8,4 (0,07 U/mL) para a intracelular.

Tabela 19.. Atividades enzimáticas para as enzimas extra e intracelulares com relação a diferentes temperaturas e pH.

Corrida	Valores Codificados		Valores Reais		Atividade	Atividade
	Temperatura (X1)	pH (X2)	Temperatura (X1)	pH (X2)	Extra (U/mL)	Intra (U/mL)
1	-1,41	0	36	5,5	1,49	0,49
2	-1	+1	40	8	0,33	0,27
3	-1	-1	40	3	0,62	0,40
4	0	0	55	5,5	3,20	1,18
5	0	0	55	5,5	3,38	1,40
6	0	+1,41	55	8,4	0,47	0,07
7	0	-1,41	55	2,6	0,27	0,60
8	+1	-1	70	3	1,42	1,53
9	+1	+1	70	8	3,07	0,87
10	+1,41	0	74	5,5	1,67	1,00

As tabelas 20 e 21 mostram a análise de variância para a resposta atividade enzimática intracelular e extracelular, onde pode ser observado que as variáveis temperatura linear e quadrática, e pH quadrático foram significantes ao nível de 90% de confiança para a atividade enzimática extracelular. O coeficiente de determinação R^2 para o modelo foi 0,87 e 0,78 para as respostas extra e intracelular respectivamente.

Desta forma, a equação que melhor representa o modelo na faixa estudada é:

$$\text{Atv extra} = 10,18 + 0,23T + 1,99P^2 + 0,01TP$$

$$\text{Atv intra} = 4,54 + 0,1T + 0,087P - 0,07P^2 + TP$$

Onde T se refere a variável temperatura e P à variável pH.

Tabela 20. Análise de variância para diferentes temperaturas e pH para a enzima extracelular.

Modelos/Efeitos	SQ	GL	MQ	F calc	P
T-L	1,79983	1	1,799834	111,1009	0,060218
T-Q	2,63178	1	2,631779	162,4555	0,049845
pH-L	0,33737	1	0,337367	20,8251	0,137333
pH-Q	8,50201	1	8,502007	524,8153	0,027772
T-L x pH-L	0,94090	1	0,940900	58,0802	0,83060
Falta de ajuste	1,79075	3	0,596916	36,8467	0,120377
Erro puro	0,011620	1	0,016200	-	-
Total	13,55716	9	-	-	-

$R^2 = 0,87$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados, T= Temperatura e pH

Tabela 21. Análise de variância para diferentes temperaturas e pH para a enzima intracelular

Modelos/Efeitos	SQ	GL	MQ	F calc	P
T-L	0,783113	1	0,783113	32,36005	0,110780
T-Q	0,066407	1	0,066407	2,74408	0,345758
pH-L	0,294934	1	0,294934	12,18736	0,177603
pH-Q	0,559508	1	0,559508	23,12018	0,130538
T-L x pH-L	0,070225	1	0,070225	2,90186	0,337937
Falta de ajuste	0,449237	3	0,149746	6,18784	0,285392
Erro puro	0,024200	1	0,024200	-	-
Total	2,188490	9	-	-	-

$R^2 = 0,78$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados, T= Temperatura e pH

Já a figura 17 mostra o modelo tridimensional da superfície de resposta em função das equações propostas para as atividades invertásicas extra e intracelular. Os resultados foram compatíveis com os encontrados anteriormente em separado. A melhor faixa de pH foi de 4,0 a 6,0, assim como para a invertase produzida por *C. cladosporium* (ALMEIDA *et al.*,2005) e a melhor faixa de temperatura foi de 45°C a 60°C.

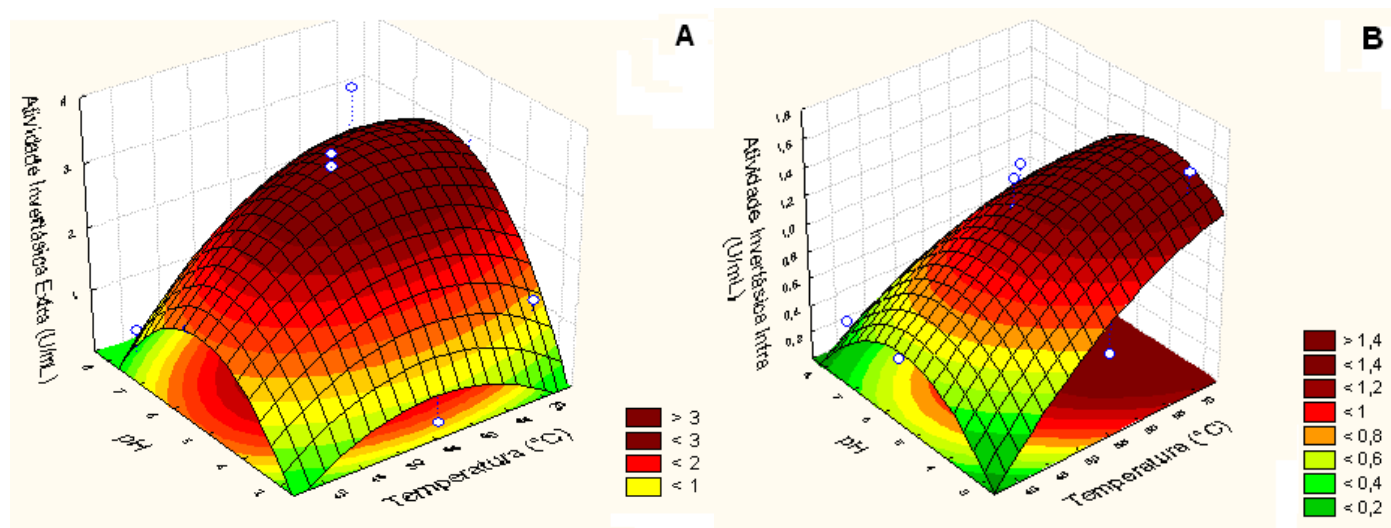


Figura 17. Superfície de resposta para o modelo que descreve a influência da temperatura e do pH nas atividades invertásicas extracelular (A) e intracelular (B) produzidas pelo fungo *A. terreus*.

Com relação à estabilidade térmica, ilustrada na figura 18A, foi possível observar que a invertase extracelular foi estável na temperatura de 60°C, com uma meia vida (t_{50}) de 40 minutos, ao passo que a 70°C a meia vida foi reduzida para 5 minutos. Em temperaturas superiores a invertase perdeu totalmente a atividade em todos os períodos analisados. O interessante deste resultado, é que na temperatura ótima de atividade, a enzima ainda mantém 50% de sua atividade por um período de uma hora, o que é atraente para utilização da mesma. Na literatura, encontra-se que as invertases são estáveis em temperaturas entre 30°C e 50°C, para um período de 30 minutos (PIETRO & SAID, 2004) e, sendo assim, a invertase extracelular em estudo, mostrou-se mais atraente para uma possível utilização industrial. Na literatura, a invertase produzida por *A. flavus* foi estável a 50°C por um período de 30 minutos e a enzima produzida por *R. glutinis* foi estável na faixa de temperatura de 20-60°C (UMA *et al.*, 2010; RUBIO *et al.*, 2002).

Na figura 18B, podemos observar que a invertase extracelular manteve-se estável por um período de uma hora, no intervalo de pH entre 3 e 10. Rustiguel *et al.* (2009), estudando invertases produzidas por *A. phoenicis*, observaram que a enzima intracelular foi estável por uma hora quando mantida na faixa de pH de 3,5 a 7,0 e a extracelular na faixa de pH de 4,5 a 8,0. Já a invertase de *R. glutinis* foi estável na faixa de pH de 2,6 a 5,5 por 30 minutos (RUBIO *et al.*, 2002). Desta forma, a enzima em estudo apresentou uma melhor estabilidade, visto que permaneceu estável em todos os valores de pH analisados.

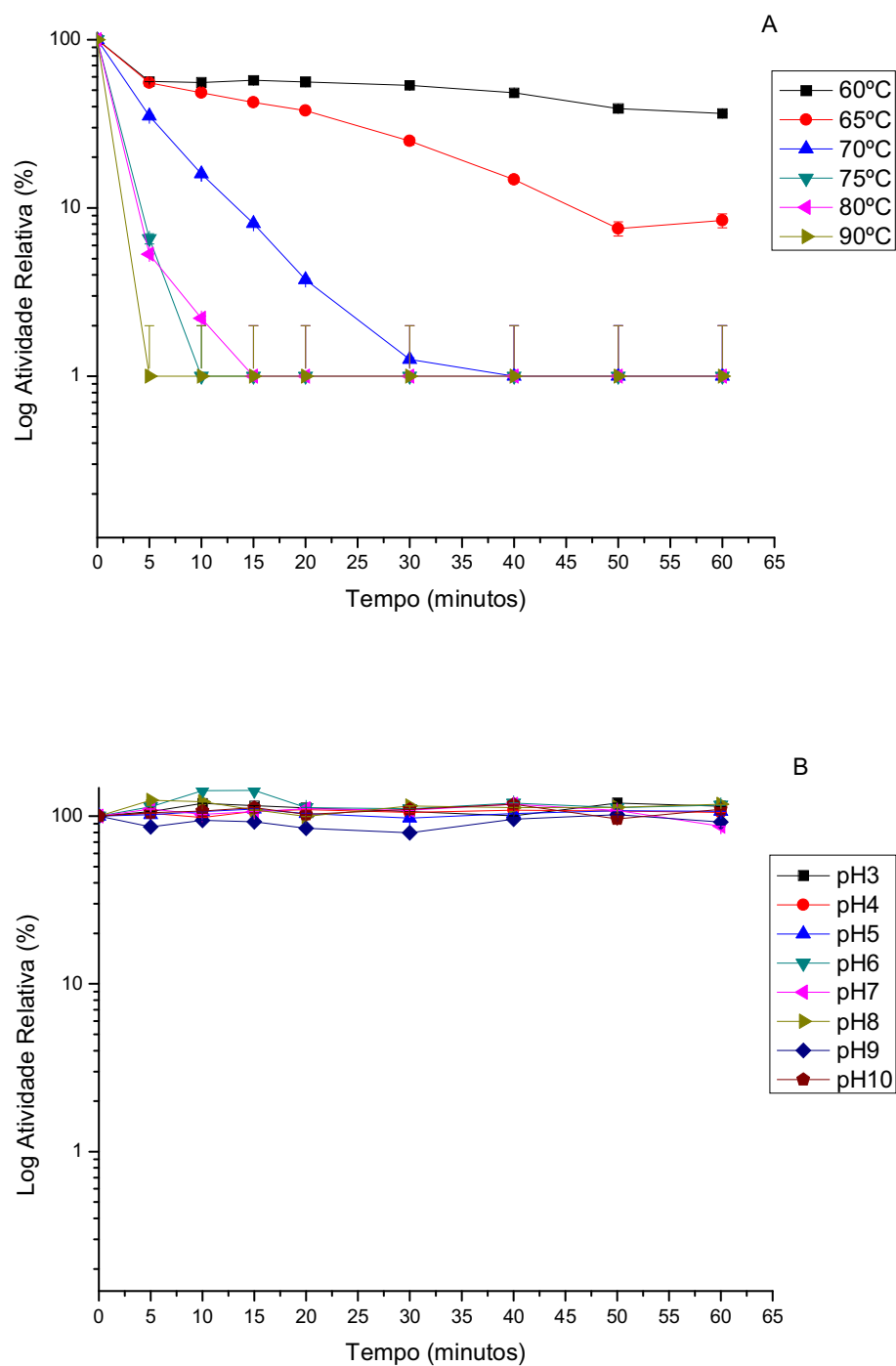


Figura 18. Estabilidade térmica (A) e ao pH (B) para a invertase extracelular produzida por *A. terreus* em FSbm.

4.2.7 Influência de Diferentes Compostos na Atividade Invertásica

Analisando a tabela 22, observa-se que a atividade invertásica extracelular foi incrementada mediante adição principalmente de 1 mM de Mn^{2+} (161,06%), sendo seguido por Co^{2+} (68,03%) e Mg^{2+} (61,22%), entre outros. A adição de Fe_2SO_4 e HgCl_2 promoveu decréscimo de 58% e 50% da atividade enzimática, respectivamente. Já em alta concentração (10 mM), os íons que mais promoveram aumento na atividade enzimática foram Mn^{2+} (91,42%) e Ca^{2+} (44,90%), sendo inibida totalmente na presença de Hg^{2+} , e de 80-89% na presença de Al^{3+} , Ag^+ , Fe^{2+} e Fe^{3+} .

Algumas enzimas necessitam de compostos adicionais denominados co-fatores para alcançarem totalmente a eficiência catalítica, esses compostos são geralmente íons metálicos, que não estão ligados permanentemente à molécula da enzima. Essas enzimas que precisam desses íons são chamadas de metaloenzimas. Metais pesados como Hg^{2+} , Pb^{2+} e Ag^{2+} reagem com os grupos $-\text{SH}$ (thiol) das proteínas, levando a uma alteração conformacional da enzima ou alterando sua carga elétrica total, o que na maioria das vezes leva a inibição da atividade enzimática. O efeito é provocado pela ligação a radicais não pertencentes ao centro ativo, sendo então conhecidos, como inibidores não-competitivos (RUSTIGUEL *et al.*, 2009). Quando adicionado EDTA, um agente quelante, a atividade invertásica foi inibida, mostrando que a enzima por nós estudada, necessita da presença de íons.

Guimarães *et al.* (2007) analisando a influência de diferentes compostos na atividade invertásica produzida por *A. ochraceus*, verificaram que na presença de MgSO_4 , NaCl e BaCl_2 em baixa concentração (1 mM) houve aumento da atividade, ao passo que na concentração de 10 mM somente

MnCl₂ promoveu aumento. Rustiguel *et al.* (2009) observaram que para as invertases produzidas por *A. phoenicis*, que os íons Mn²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, além de EDTA, promoveram aumento da atividade enzimática, assim como Ag⁺ e K⁺. Bhatti *et al.* (2006) observaram que a adição de 1mM KCl, NaCl, CuSO₄, BaCl₂, MgSO₄ e CoCl₂ ativaram a enzima produzida por *F. solani*. Já para a invertase de *A. niger* AS0023 nenhum íon ou composto químico ativou a mesma (L'HOCINE *et al.*, 2000). Rubio *et al.* (2002) verificaram que para a enzima produzida por *R. glutinis*, os íons Mg²⁺ e Ca²⁺ ativaram a enzima em 3 vezes e Fe²⁺, K⁺, Ca²⁺, Na⁺ e Cu²⁺ em 2 vezes se comparado ao controle. Já para a enzima produzida por *A. niger* IMI303386 os íons ativadores foram Ba²⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺, bem como o EDTA, e os inibidores foram Hg²⁺, Ag⁺ e Ni²⁺ (NGUYEN *et al.*, 2005; YANASE *et al.*, 1995).

Tabela 22. Influência de diferentes compostos na atividade invertásica extracelular do fungo *A. terreus* em FSbm.

Composto	Atividade Relativa (%)	
	1 mM	10 mM
AlCl ₃	87,97 ± 0,05	20,50 ± 0,04
AgNO ₃	101,87 ± 0,21	17,98 ± 0,06
BaCl ₂	136,23 ± 0,31	113,73 ± 0,20
CaCl ₂	129,36 ± 0,34	144,90 ± 0,05
CoCl ₂	168,30 ± 0,14	63,48 ± 0,10
CuCl	84,40 ± 0,16	28,55 ± 0,15
Fe ₂ (SO ₄)	42,23 ± 0,11	11,57 ± 0,22
FeCl ₃	117,38 ± 0,19	16,54 ± 0,33
HgCl ₂	50,04 ± 0,05	0
KCl	124,03 ± 0,11	67,13 ± 0,13
MgCl ₂	161,22 ± 0,16	104,91 ± 0,03
MnCl ₂	261,06 ± 0,19	191,42 ± 0,17
NH ₄ F	130,54 ± 0,11	51,35 ± 0,11
NaH ₂ PO ₄	106,24 ± 0,15	67,91 ± 0,04
NaBr	130,92 ± 0,11	62,71 ± 0,04
NaCl	119,99 ± 0,09	117,33 ± 0,16
NH ₄ Cl	105,04 ± 0,09	36,64 ± 0,07
Zn(NO ₃) ₂	155,36 ± 0,26	66,18 ± 0,09
ZnCl ₂	125,94 ± 0,11	95,54 ± 0,10
EDTA	86,74 ± 0,21	47,95 ± 0,08
Mercaptoetanol	134,42 ± 0,18	87,80 ± 0,16
Controle	100	100

O fungo foi crescido em meio M5 tendo farelo de centeio como fonte de carbono/substrato, mantido a 30°C, por um período de 48 horas

4.2.8 Caracterização Bioquímica da Invertase Produzida em FSS

4.2.8.1 Influência da Temperatura e pH de Reação na Atividade Invertásica

Na figura 19 pode-se observar que os maiores níveis de atividade invertásica foram obtidos na temperatura de 65°C (301,58 U/ g de substrato) e no pH 6,0 (302,00 U/g de substrato), sendo próximos ao que encontramos para a enzima produzida em FSbm. Na FSS em temperaturas superiores a atividade foi decrescente, chegando a 46,64 U/g de substrato a 80°C. Com valores de pH maiores houve diminuição da atividade chegando a 18,93 U/g de substrato no pH 9,0. A temperatura ótima de atividade para a enzima de *A. terreus* foi superior a observada por Shaheen *et al.* (2007) para a invertase de *Fusarium* sp., que foi de 50°C, com pH ótimo de 5,0, e também por Alegre *et al.* (2009) para a enzima de *A. caespitosus*, com ótimo de 50°C e pH na faixa de 4,0 a 6,0. Já a invertase produzida pelo fungo *Rhizopus* sp., teve temperatura ótima de atividade de 45°C e pH ótimo na faixa de 6,0-9,0 (GOULART *et al.*, 2003).

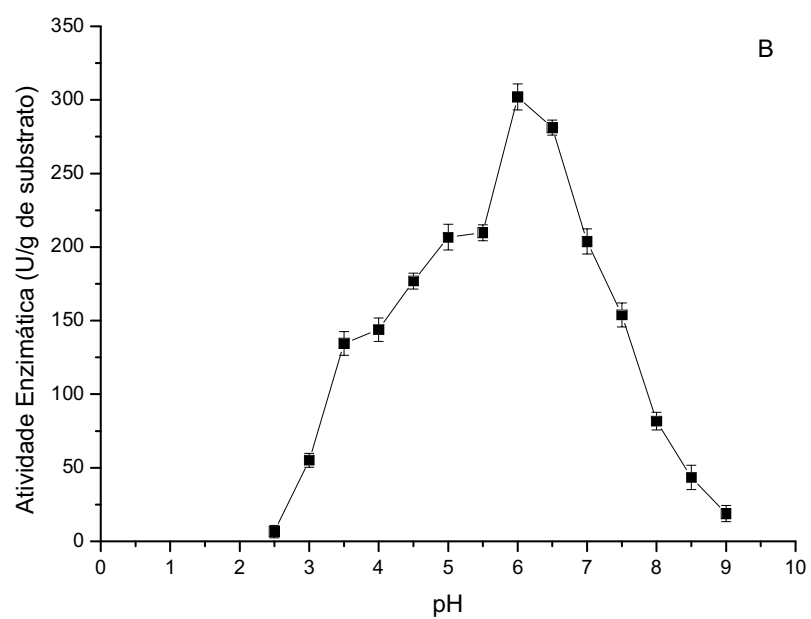
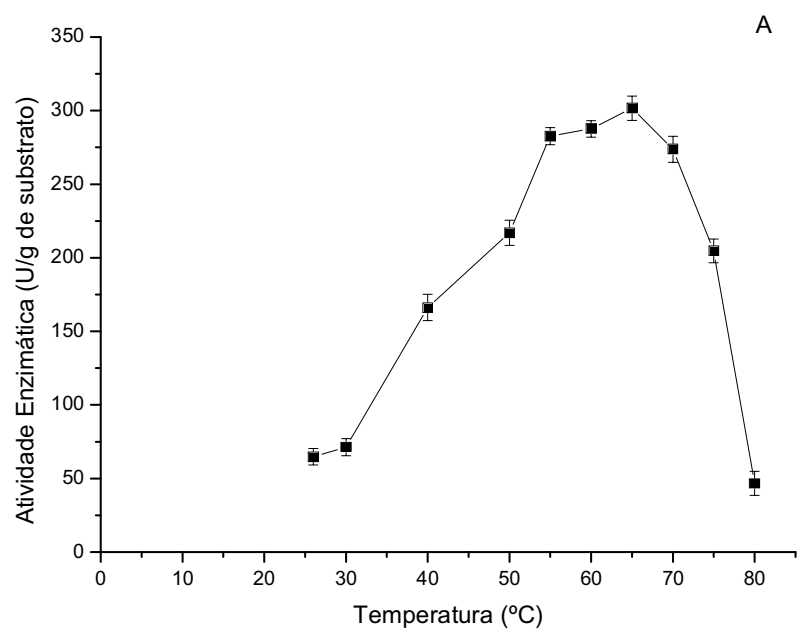


Figura 19. Determinação da temperatura ótima de ensaio (A) e pH ótimo de ensaio (B) para a invertase extracelular produzida pelo fungo *A. terreus* em FSS

Adicionalmente, a estabilidade térmica da enzima produzida por *A. terreus* em FSS foi determinada, bem como ao pH (figura 20). Desta maneira, verifica-se que a enzima foi estável na temperatura de 60°C, mantendo cerca de 98% de sua atividade após 1 hora de incubação. Já a 65°C, a enzima manteve 55% de sua atividade em 60 minutos e a 70°C teve t_{50} de 20 minutos. Nas temperaturas de 80°C e 90°C, a atividade foi drasticamente reduzida. A invertase extracelular produzida em FSbm também foi estável a 60°C com um t_{50} de 40 minutos, sendo que a 70°C, o t_{50} foi de 5 minutos. De modo semelhante, a enzima produzida por *Fusarium* sp. foi estável nas temperaturas de 50-65°C (SHAHEEN *et al.*, 2007). Já para a enzima produzida pelo fungo *Alternaria* sp., foi observada boa estabilidade em temperaturas menores que 40°C, sendo inativada rapidamente a 80°C (SANGALETTI *et al.*, 2010).

Quando analisada a estabilidade ao pH (figura 20B), foi verificado que a invertase produzida em FSS, foi relativamente estável em todos os pH testados, assim como a invertase extracelular produzida em FSbm. A invertase do fungo *Alternaria* sp., teve uma maior estabilidade no pH 6,0, sendo que em pH 5,0 a enzima manteve 81% da sua atividade e em pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0 a enzima não foi estável (SANGALETTI *et al.*, 2010). Rustiguel *et al.* (2009) observaram que as enzimas extracelulares produzidas em FSbm e em FSS pelo fungo filamentoso *A. phoenicis*, foram estáveis na faixa de pH de 4,5-8,0 durante 1 hora, sendo que em pH superiores as enzimas perderam parcialmente suas atividades.

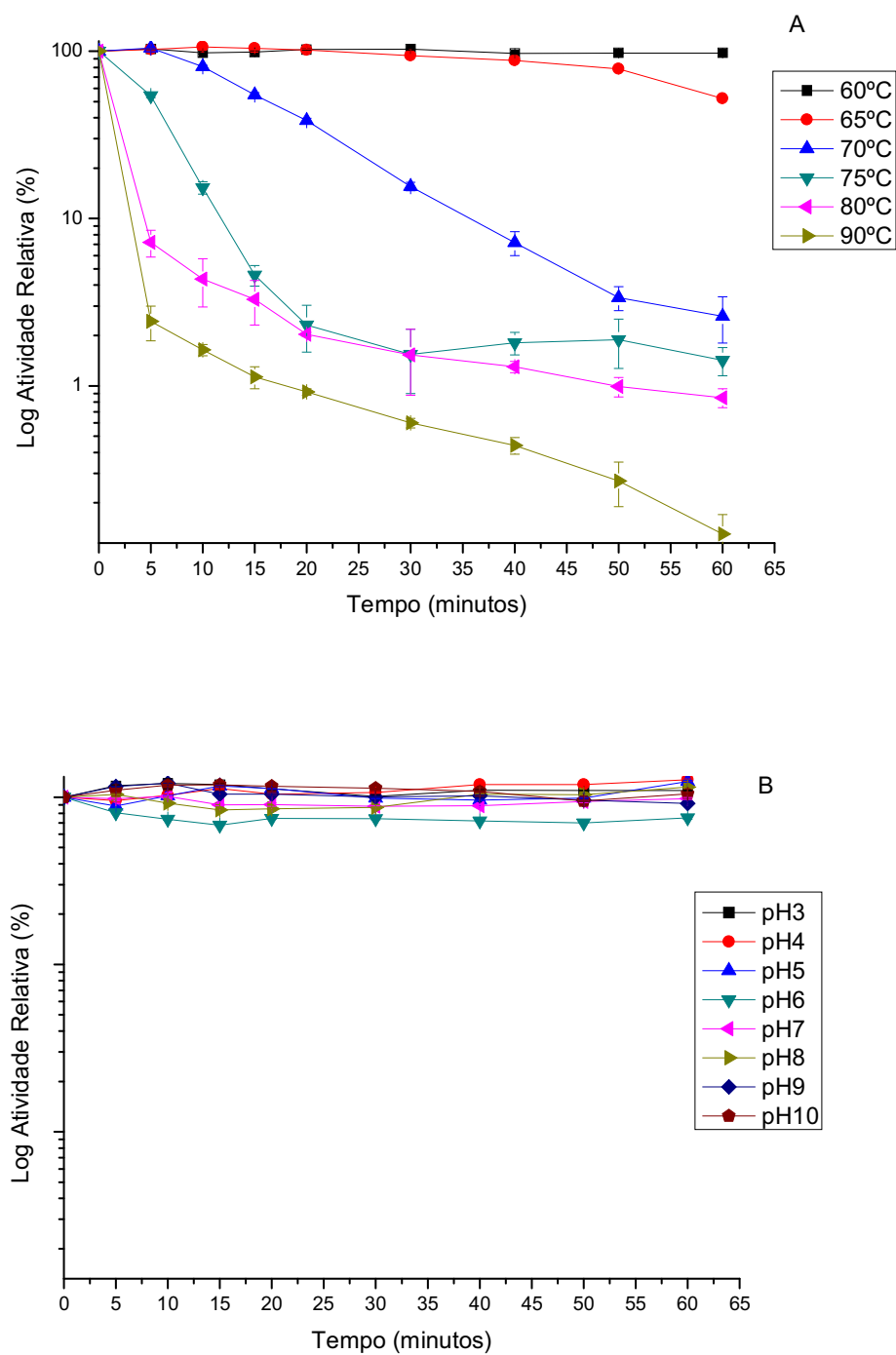


Figura 20. Estabilidade térmica (A) e estabilidade ao pH (B) da invertase extracelular produzida por *A. terreus* em FSS.

4.2.8.2 Influência de Diferentes Compostos na Atividade Invertásica

Na tabela 23, estão reunidos os resultados obtidos para a influência de diferentes compostos, em baixas (1 mM) e altas (10 mM) concentrações sobre a atividade invertásica. Podemos observar que entre os compostos testados, em baixas concentrações, as maiores atividades foram obtidas com Mn^{2+} (54,92%), Co^{2+} (22,52%) e Ba^{2+} (12,00%), os mesmos compostos ativaram a enzima extracelular produzida em FSbm. As maiores inibições ocorreram na presença de Ag^+ , Hg^{2+} e Cu^{2+} , assim como para a enzima produzida em FSbm, além do Al^{3+} , Fe^{2+} . Já em alta concentração, ativação significativa foi obtida somente com Mn^{2+} (60,53%), sendo que este íon também proporcionou aumento significativo na enzima produzida em FSbm (91,42%).

. Rubio *et al.* (2002) ao testar a influência de íons metálicos na atividade invertásica de *R. glutinis*, verificaram um aumento da atividade enzimática na presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , Cu^{2+} e K^+ . A inibição da atividade invertásica por íons metálicos foi relatada para as enzimas de *A. japonicus* (HAYASHI *et al.*, 1992) e de *A. chroococcum* (DELAVERGA *et al.*, 1991).

Tabela 23. Influência de diferentes compostos na atividade invertásica do fungo *A. terreus*.

Composto	Atividade Relativa (%)	
	1 mM	10 Mm
AlCl ₃	87,53 ± 0,56	15,55 ± 0,64
AgNO ₃	6,92 ± 0,16	0
BaCl ₂	112,00 ± 0,32	89,62 ± 0,55
CaCl ₂	105,65 ± 0,48	101,13 ± 0,42
CoCl ₂	122,52 ± 0,65	101,80 ± 0,89
CuCl ₂	39,13 ± 0,45	2,59 ± 0,62
Fe ₂ (SO ₄)	69,47 ± 0,43	8,20 ± 0,81
FeCl ₃	95,83 ± 0,42	46,65 ± 0,54
HgCl ₂	11,58 ± 0,42	1,25 ± 0,35
KH ₂ PO ₄	92,08 ± 0,30	22,68 ± 0,65
KCl	92,49 ± 0,39	34,90 ± 0,33
MgCl ₂	90,47 ± 0,58	9,41 ± 0,58
MnCl ₂	154,92 ± 0,26	160,53 ± 0,70
NH ₄ F	100,82 ± 0,45	105,24 ± 0,36
NaH ₂ PO ₄	92,74 ± 0,27	89,93 ± 0,30
NaBr	92,77 ± 0,31	87,85 ± 0,39
NaCl	90,59 ± 0,29	88,75 ± 0,25
NH ₄ Cl	85,42 ± 0,24	68,03 ± 0,19
Zn(NO ₃) ₂	54,23 ± 0,46	10,01 ± 0,38
ZnCl ₂	87,33 ± 0,59	60,89 ± 0,90
EDTA	56,62 ± 0,56	54,50 ± 0,38
Mercaptoetanol	106,64 ± 0,48	96,75 ± 0,56
Controle	100	100

O fungo foi crescido em meio tendo soja moída como fonte de carbono/substrato, mantido a 30°C, por um período de 72 horas.

4.2.10 Hidrólise de Diferentes Substratos

A análise da tabela 24, mostra que o substrato que sofreu uma maior hidrólise, foi a sacarose, como já esperado. Os demais substratos também foram hidrolisados, tendo atividades variando de 0,50 U/g de substrato (trealose) até 170,89 U/g de substrato (rafinose). Este resultado pode ser atribuído ao fato de que, foi utilizado extrato bruto e não enzima pura, existindo assim outras enzimas, tais como amilases e trealases, entre outras.

Rustiguel *et al.* (2009), estudando as invertases intra e extracelulares produzidas por *A. phoenicis* verificaram que estas enzimas foram capazes de hidrolisar diferentes substratos, tais como sacarose, rafinose e inulina, sendo que a maior taxa de hidrólise foi vista para a sacarose. O mesmo resultado foi observado por Guimarães *et al.* (2009), onde a invertase intracelular produzida por *A. niveus*, também hidrolisou sacarose, rafinose e inulina.

Tabela 24. Hidrólise de diferentes substratos pela invertase produzida em FSS pelo fungo *A. terreus*

Substrato	Atividade Enzimática (U/g de substrato)
Amido	34,43 ± 0,75
Celobiose	29,75 ± 0,43
Inulina	7,89 ± 0,15
Maltose	45,03 ± 0,76
Rafinose	170,89 ± 0,48
Sacarose	304,51 ± 0,70
Trealose	0,50 ± 0,09

O fungo foi crescido em meio tendo soja moída como fonte de carbono/substrato, mantido a 30°C, por um período de 72 horas.

5. CONCLUSÕES

Avaliando-se os resultados encontrados, pode-se concluir que *A. terreus* foi um bom produtor de invertases extracelulares, em ambas as formas de cultivo (FSS e FSbm) utilizando-se produtos agroindustriais de baixo custo como fonte de carbono. Além disso, as temperaturas ótimas de atividade foram elevadas, sendo as formas extracelulares estáveis na temperatura de 60°C e em uma ampla faixa de pH o que é um atrativo para uma possível utilização industrial. A atividade invertásica, foi ativada principalmente na presença de Mn^{2+} . Já com relação a afinidade, verificou-se que esta foi maior para sacarose na presença de Mn^{2+} . Em se tratando da massa molecular, verificou-se que esta foi de 74,67 kDa quando utilizado coluna de filtração Sephacryl S-200, ao passo que quando analisada por SDS-PAGE 6%, encontramos 2 subunidades, uma com 46,77 kDa e a outra com 26,92 kDa, sugerindo portanto um heterodímero. A quantidade de carboidratos encontrados na amostra purificada foi ao redor de 11%, sendo esta uma glicoproteína. Quando a enzima purificada foi analisada em HPLC, verificou-se que houve um pico de algum açúcar com tempo de retenção em torno de 8,5 minutos, sugerindo que este seja um possível FOS.

Finalmente, o microrganismo em estudo, ou seja, *A. terreus*, foi uma escolha viável, uma vez que não se encontram trabalhos desta enzima com este fungo na literatura, sendo então uma novidade, além de ter sido o melhor produtor se comparado com outras espécies da coleção do laboratório analisadas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. R. Mycelial amylase of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathology**, v.112, p. 35-37, 1990.
- ALBERTO, F.; BIGNOM, C.; SULZENBACHER, G.; HENRISSAT, B.; MIRJAM, C. Z. J. Z. The three-dimensional structure of Invertase (β -Fructosidase) from *Thermotoga maritime* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting Glycosidases. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 18, p. 18903-18910, 2004.
- ALEGRE, A. C. P.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production on thermostable Invertase by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p. 612-622, 2009.
- ALMEIDA, A. C. S.; ARAÚJO, L. C.; COSTA, A. M.; ABREU, C. A. M.; LIMA, M. A. G. A.; PALHA, M. L. A. P. F. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto- immobilized Invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. **Electronic J. Biotechnol.**, v.8, n. 1, p. 54-62, 2005.
- ANDREWS, A. T. **Chemical aspects of food enzymes**. London: Royal Society Chemistry, 1987.
- ARANDA, C.; ROBLEDO, A.; LOERA, O.; ESQUIVEL, J. C. C.; RODRIGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. Fungal Invertase expression in solid-state fermentation. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, n. 2, p. 229-233, 2006.
- BAIG, M. A.; SHAFIQ, K.; MIRZA, S.; ALI, S.; HAQ, I. Effect of urea as an inducer of Fructofuranosidase in *Saccharomyces* fermentation. **Pakistan J. Nutr.**, v. 2, n. 2, p. 106-108, 2003.
- BALAJEE, S. A. *Aspergillus terreus* complex. **Med. Mycol.**, v. 47. p. S42-S46, 2009. Suppl. 1.
- BALASUBRAMANIAM, A.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochem.**, v. 36, p. 1241-1247, 2001.

BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. **J. Ferm. Bioeng.**, v. 77, p. 320-323, 1994.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alim. Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BENITO, M. A.; ABREU, M.; ARROJO, L. F.; PLOU, F. J.; BARBERO, J. J.; BALLESTERO, A.; POLAINA, J. Characterization of β -Fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. **J. Biotechnol.**, v. 132, p. 75-81, 2007.

BENNET, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **J. Biotechnol.**, v. 66, p. 101-107, 1998.

BHATTI, H. N.; ASGHER, M.; ABBAS, A.; NAWAZ, R.; SHEIKI, M. A. Studies on kinetics and thermostability of a novel acid Invertase from *Fusarium solani*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 23-4617, 2006.

BLACK, J. **Microbiologia**: fundamentos e perspectivas. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 829.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant protein RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 81, p. 93-9, 1987.

BON, E. P. S.; FERRARA, M.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 506.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 1, p. 254.

CARDOSO, M. H.; JACKIX, M. N. H.; MENEZES, H. C.; GONÇALVES, E. B.; MARQUES, S. B. Efeito da associação de pectinase, invertase e glicose isomerase na qualidade do suco de banana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 3, p. 275-282, 1998.

CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. **Nature Rev. Genet.**, v. 3, n. 9, p. 683-697, 2002.

CHAUDHURI, A.; BHARADWAJ, G. ; MAHESHWARI, R. An unusual pattern of Invertase activity development in the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 177, p. 39-45, 1999.

COPELAND, L. Enzymes of sucrose metabolism. **Methods in Plant Biochem.**, v. 3, p. 73-83, 1990.

COSTA, M. G. Enzimas na produção de mel. **Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas**. Disponível em : <<http://www.sbrt.ibict.br>>. Acesso em: 13 jun. 2007.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II: Method and application to human serum protein. **An NY Acad Sci.**, v.11, p. 407-7, 1964.

DELAVEGA, M.; CEJUDO, F.; PANEQUE, A. Purification and properties of an extracellular Invertase from *Azotobacter chroococcum*. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 13, p. 267-271, 1991.

DEMAIN, A. J.; SOLOMON, N. A. **Manual of industrial microbiology and technology**. Washington, DC : American Society for Microbiology, 1986.

DUBOIS, M.; GILLES, K. H.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2004. p. 510.

FERREIRA, J. G. **Purificação parcial e caracterização bioquímica-cinética de α -galactosidase de *Aspergillus terreus***. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado Bioquímica Agrícola) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

FOX, P. F. (Ed.). **Food enzymology**. London: Elsevier, 1991. 2 v.

FOX, P. F.; GRUFFERTY, M. B. Exogenous enzymes in dairy technology. In: FOX, P. F. (Ed.). **Food enzymology**. London: Elsevier, 1992. p. 219-270.

GÓMEZ, S. J. R.; AUGUR, C.; GONZÁLEZ, V. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid- state fermentation. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p. 1255-1258, 2000.

GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R. Purificação parcial de Invertase a partir de *Rhizopus* sp. em fermentação semi-sólida. **Alim. Nutr.**, v. 14, n. 2, p. 199-203, 2003.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T.; JORGE, J. A. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D Fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon source. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 42, n. 1, p. 52-57, 2007.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOMERA, A. F.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T.; JORGE, J. A. Production of β -Fructofuranosidases by *Aspergillus niger* using agroindustrial residues as carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulates in the presence of glucose. **Process Biochem.**, v. 44, p. 237-241, 2009.

HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K. Purification and properties of β -Fructofuranosidase de *Aspergillus japonicus*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 8, p. 276 -279, 1992.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems- an overview. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

KURAKAKE, M.; OGAWA, K.; SUGIE, M.; TAKEMURA, A.; SUGIURA, K.; KOMAKI, T. Two types of β - Fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 591-596, 2008.

L'HOCINE, L.; WANG, Z.; JIANG, B. O.; XU, S. Purification and partial characterization of Fructosyltransferase and Invertase from *Aspergillus niger* AS0023. **J. Biotechnol.**, v. 81, p. 73-84, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 222, p. 680-685, 1970.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; CIANCAGLINI, P. Enzyplot: a microcomputer assistant program for teaching enzyme kinetics. **Biochem. Education.**, v. 37, p. 35-37, 1995.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 593.

LIN, T. J.; LEE, Y. C. High –content fructooligosacharides production using two immobilized microorganisms in an internal- loop airlift bioreactor. **J. Chin. Inst. Chem. Eng.**, v. 39, p. 211-217, 2008.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 56, p. 658-666, 1934.

LOWRY, H.; ROSETHROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 267- 275, 1951.

LUCARINI, A . **Experimento de biotecnologia**. Disponível em: <<http://www.fei.edu.br/noticias/biotecnologia.htm>>. Acesso em: 21 mar. 2007.

MERCIER, R. W.; GOGARTEN, J. P. A second cell wall acid Invertase gene in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 659-660, 1995.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORAES, A. M. L.; BORBA, C. M.; COSTA, G. L.; RODRIGUES, K.; SARQUIS, M. I .M. **Fungos**: ferramentas na saúde pública. Disponível em : <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 01 mar. 2000.

NEIGEBOERN, L.; CARLSON, M. Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 108, p. 845-858, 1984.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 975.

NIELSEN, P. H.; MALMOS, H.; DAMHUST, T.; DIDERICHSEN, B.; NIELSEN, H. K.; SIMONSEN, M.; SCHIV, H. E.; OESTERGAARD, A.; OLSEN, H. S.; EIGTVED, P.; NIELSEN, T. K. Enzyme applications. In: KIRK- OTHMER ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY, 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. p. 567-620.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J.; BHAT, M. K.; HOSCHKE, A. Purification and some properties of β - Fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. **Process Biochem.**, v. 40, p. 2461-2466, 2005.

PARK, Y. R.; SATO, H. H. Fungal Invertase as an aid for fermentation of cane molasses into ethanol. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 44, n. 4, p. 988-989, 1982.

PASSOS, L. M. L.; PAR, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciênc. Rural.**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; GOMES, F. C. O.; NEVES, M. J.; PIMENTEL, P. F.; ROSA, C. A. Trehalose accumulations, Invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of handmade brazilian cachaça. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, n. 3, p. 202-208, 2002.

PERALTA, R. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. β -D Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1033, p. 243-249, 1990.

PIETRO, R.; SAID, S. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Summa, 2004. p. 416.

RAMESH, M. V.; LONSANE, B. K. Critical importance of moisture content of the medium in alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid state fermentation medium. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, p. 501-505, 1990.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D- xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 156-160, 2001.

ROJO, H. P.; VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. Invertase from *Schizophyllum commune*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 1, p. 119-123, 1994.

ROSA, F. O. **Aspectos gerais e morfológicos do fungo *Aspergillus* sp.**
Disponível em: < [http:// fitopatologia1.blogspot.com/2010/04/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo_15.html](http://fitopatologia1.blogspot.com/2010/04/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo_15.html)>. Acesso em: 14 mar. 2011.

ROUWENHORST, R. J.; VISSER, L. E.; VAN DER BAAN, A. A.; SCHEFFERSWA VAN DIJKEN, J. P. Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 1131-1137, 1988.

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

RUSTIGUEL, C. B. **Produção, purificação e caracterização bioquímica das invertases do fungo filamentoso *Aspergillus phoenicis*.** 2009. 133 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

RUSTIGUEL, C. B.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. A novel silver-activated extracellular β -D-fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis*. **J. Mol. Catal. Enzymatic**, v. 67, p. 10-15, 2010.

SANGALETTI, N.; CADORIN, T. L.; HENDGES, D. H.; DARTORA, D. F.; ONOFRE, S. B.; ALENCAR, S. M. **Produção de invertases de *Alternaria* sp. por fermentação semi-sólida.** Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t164.doc>. Acesso em: 12 jun. 2010.

SARQUIS, M. I. M. **Seleção de linhagens fúngicas produtoras de L-asparaginase:** efeito da fonte de nitrogênio na produção da enzima por *Aspergillus tamarii* IOC 186 e *Aspergillus terreus* IOC 217. 2002. 126 f. Tese (Doutorado em Biomedicina) - Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

SCHAEWEN, A. V.; STITT, M.; SCHMIDT, R.; SONNEWALD, U.; WILLMITZER, L. Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. **Embol. J.**, v. 9, n. 10, p. 3033-3044, 1990.

SELIG, M. J.; KNOSHAUG, E. P.; DECKER, S. R.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; ADNEY, W. S. Heterologous expression of *Aspergillus niger* beta-D-xylosidase (XlnD) characterization on lignocellulosic substrates. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 146, p. 57-68, 2008.

SHAFIQ, K.; SIKAND, A.; LKRAM-ul-HAQ . Effect of different mineral nutrients on Invertase production by *Sacharomyces cerevisiae* GCB-K5. **Biotechnol.**, v. 1, p. 40-44, 2002.

SHAHEEN, I.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, T. Production, purification and thermal characterization of Invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. Under solid-state fermentation. **J. Int. Food Sci. Techn.**, p. 1365-2621, 2007.

SMRUTI, P.; RAO, K. K.; KRISHNA, M. The production of beta glucosidase by *Aspergillus terreus*. **Curr. Microbiol.**, v. 30, p. 255-258, 1995.

STURM, A.; TANG, G. Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends Plant Sci.**, v. 4, p. 401-407, 1999.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. p. 827.

TRIMBLE, R. B.; MALEY, F. Subunit structure of external Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 252, n. 12, p. 4409-4412, 1977.

UMA, C.; GOMATHI, D.; MUTHULAKSHMI, C.; GOPALAKRISHNAN, V. K. Production, purification and characterization of Invertase by *Aspergillus flavus* using fruit peel waste as substrate. **Adv. Biol. Res.**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2010.

VAN DEN HOMBERGH, J. P. T. W.; VAN DE VONDERVOORT, P. J. I.; FRAISSINET- TACHET, L.; VISSER, J. *Aspergillus* as host for heterologous protein production: the problem of proteases. **Trends Biotechnol.**, v. 15, n. 7, p. 256-263, 1997.

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

VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **Am. Nat.**, v. 98, p. 435-446, 1964.

WISEMAN, A .; WOODWARD, J. Industrial yeast Invertase stabilization. **Process Biochem.**, v. 10, p. 24-30, 1975.

YANASE, H.; IWATA, M.; KITA, K.; KATO, N.; TONOMURA, K. Purification, crystallization, and characterization of the extracellular Invertase from *Zymomonas mobilis*. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 79, n. 4, p. 367-369, 1995.

YOSHIKAWA, J.; AMACHI, S.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. Purification and some properties of β -Fructofuranosidase I formed by *Aureobasidium pullulans* DSM 2404. **J. Biosc. Bioeng.**, v. 103, p. 491-493, 2007.