

**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

PAULA MIRELLA GOMES BARBOSA

**PRODUÇÃO DE INVERTASES POR LEVEDURAS ISOLADAS NO CENTRO-
OESTE BRASILEIRO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

ABRIL/2015

PAULA MIRELLA GOMES BARBOSA

**PRODUÇÃO DE INVERTASES POR LEVEDURAS ISOLADAS NO CENTRO-
OESTE BRASILEIRO**

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO FOSSA DA PAZ

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental na área de concentração de tecnologia ambiental.

DOURADOS/MS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B238p Barbosa, Paula Mirella Gomes
PRODUÇÃO DE INVERTASES POR LEVEDURAS ISOLADAS NO
CENTRO-OESTE BRASILEIRO / Paula Mirella Gomes Barbosa -- Dourados:
UFGD, 2015.

37f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Co-orientador: Marcelo Fossa da Paz

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de
Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. cultivo submerso. 2. enzimas industriais. 3. β -frutofuranosidases.
4. açúcar invertido. I. Título.

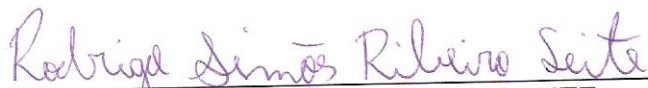
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação


Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Produção de invertases por levedura isoladas no Centro-oeste brasileiro”**, de autoria de **PAULA MIRELLA GOMES BARBOSA**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE
Presidente da Banca Examinadora



Profa. Dra. MARGARETH BATISTOTI
Membro Examinador (UEMS)


Profª Drª GISELE JANE DE JESUS
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 09 de Abril de 2015.

Agradecimentos

A Deus, por sempre ter guiado meus caminhos e por tudo que tem realizado em minha vida.

A minha vó Neusa a quem eu dedico este trabalho, que não esta mais presente, mas que sempre esta comigo.

A toda minha família, que sempre esteve ao meu lado incentivando e apoiando minhas decisões, principalmente, a minha mãe Tânia, ao meu pai Paulo, minha Vó Ilda, tias e aos meus irmãos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pelo apoio, paciência, acolhimento e ensinamentos transmitidos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz, pela paciência, pela dedicação e ensinamentos.

A todos os colegas do laboratório e verdadeiros amigos, Tobias, Nayara, Flávia, Gaby, Carol, Marília, Haroldo, Rodrigo, pelos ensinamentos, pelas risadas, pela contribuição e pelos momentos de descontração e alegria.

A minha banca de qualificação, pelas contribuições com o trabalho.

Aos técnicos da FCBA, Ju, Mara, Emerson, Suelen, Paulo, Marquinhos, em especial a Faby por todo apoio e força.

A todos os professores do mestrado em especial o coordenador do programa Prof. Dr. Hebert Juliano Vieira.

Ao Professor Dr. Gustavo G. Fonseca, por ceder o laboratório para as ultimas analises e todo pessoal do laboratório em especial a Cinthia pela ajuda.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao Cnpq e a Fundect.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)

LISTA DE ABREVIATURAS

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico.

g - gramas.

h - horas.

M – molar (mols/L).

mg - miligramas.

min - minutos.

mL - mililitros.

nm - nanômetros.

rpm - rotações por minuto.

pH – potencial hidrogeniônico.

CAT-1 – linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae*.

YEPD - meio contendo extrato de levedo, peptona, Agar e dextrose.

YEPS - meio contendo extrato de levedo, peptona e sacarose.

μL - microlitros.

μmol - micromolar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia de varredura da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	03
Figura 2 - Mecanismo de reação catalisada pela invertase... ..	05
Figura 3 - Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos.....	08
Figura 4 – Produção de invertases por <i>S. cerevisiae</i> e isolado 35.....	14
Figura 6 – Caracterização físico-química das invertases <i>S. cerevisiae</i> e isolado 35.....	17
Figura 7 – Avaliação do efeito de etanol sobre <i>S. cerevisiae</i> e isolado 35.....	18
Figura 8 - Produção de nistose em diferentes concentrações de sacarose.....	19

ANEXO I

Tabela 1 - Produção de fruto-oligossacarídeos pela invertase da *S. cerevisiae* em diferentes concentrações de sacarose.

Tabela 2 - Produção de fruto-oligossacarídeos pela invertase do isolado 35 em diferentes concentrações de sacarose.

RESUMO

As invertases são enzimas que catalisam a hidrólise da sacarose liberando monômeros de glicose e frutose. Dentre as aplicações é possível detectar, a produção do xarope de açúcar invertido, como também por atividade transferásica a produção de fruto-oligossacarídeos que são açúcares de baixa caloria, os dois muito utilizados na indústria alimentícia. O presente trabalho teve como objetivo comparar a produção de invertases da linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (CATANDUVA-1) com uma linhagem de levedura isolada da região Centro-Oeste, denominada isolado 35, suas características físico-química e produção de fruto-oligossacarídeos. Neste experimento foram avaliados, viabilidade e produção de invertases intra e extracelulares. As invertases intracelulares foram caracterizadas físico-química e foi também avaliado seu potencial para produção de fruto-oligossacarídeos (Nistose). Quanto a produção de enzimas extracelulares o isolado 35 apresentou uma produção de 4,21 U/mL em 168 horas de cultivo, enquanto que a linhagem comercial de *S. cerevisiae* apresentou uma produção de apenas 2,54 U/mL em 168 horas de cultivo. Todos os isolados obtiveram produção de invertase intracelular, o isolado 35 produziu 21 U/mL em 72 horas de fermentação, enquanto a linhagem de *S. cerevisiae* apresentou a maior produção de 35 U/mL em 48 horas de cultivo. O isolado 35 obteve um melhor desempenho de viabilidade se comparados a linhagem comercial, apresentando 70% de células viáveis após 120 horas de fermentação, enquanto a linhagem de *S. cerevisiae* apresentou apenas 15% de células vivas com igual período de cultivo. A invertase do isolado 35 apresentou máxima atividade no pH 4,0 e temperatura de 70°C enquanto que a da linhagem de *S. cerevisiae* no pH 4,5 a 50°C. A enzima dos dois isolados apresentaram produção de Nistose, a invertase da *S. cerevisiae* apresentou sua maior produção de 13,27 g/L em 20% de sacarose, enquanto que a do isolado 35 apresentou 12,82 g/L em igual condição.

Palavras-chave: cultivo submerso, enzimas industriais, β -frutofuranosidases, açúcar invertido.

ABSTRACT

The invertase are enzymes that catalyze the hydrolysis of sucrose releasing monomeric glucose and fructose. Among the applications can be detected, the production of invert sugar syrup, as well as by activity transferásica the production of fructo-oligosaccharides that are low calorie sugars, both widely used in the food industry. This study aimed to compare the invertase production of commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (CATANDUVA-1) with an isolated yeast strain in the Midwest region, called isolated 35, its physical and chemical characteristics and production of fructo-oligosaccharides. In this experiment were evaluated, viability and production of intracellular and extracellular invertase. Intracellular invertase were characterized physicochemical and was also evaluated its potential for producing fructo-oligosaccharides (nystose). As the production of extracellular enzymes isolated 35 showed a production of 4.21 U/mL at 168 hours of culture, while the commercial strain of *S. cerevisiae* showed a yield of only 2.54 U/mL at 168 hours of culture . All isolates obtained intracellular production of invertase isolated 35 produced 21 U/mL at 72 hours of fermentation, whereas *S. cerevisiae* strain showed the highest production of 35 U/mL in 48 hours of cultivation. Isolated 35 obtained a better performance of viability as compared to a commercial line, with 70% of viable cells after 120 h of fermentation, whereas *S. cerevisiae* strain showed only 15% of living cells with the same culture period. Invertase isolated 35 showed maximal activity at pH 4.0 and 70°C, whereas the *S. cerevisiae* strain at pH 4.5 at 50°C. The enzyme showed two isolates produce nystose, the *S. cerevisiae* invertase presented a greater production of 13.27 g/L in 20% sucrose, while 35 showed isolated 12.82 g/L in the same condition.

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	02
2.1. Objetivo Geral.....	02
2.2. Objetivos Específicos.....	02
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
3.1. Potencial biotecnológico de leveduras.....	02
3.2. As invertases	05
3.3 Aplicação biotecnológica das invertases.....	06
4. METODOLOGIA	09
4.1. Microrganismo.....	09
4.2 Manutenção da cultura.....	10
4.3 Cultivo Submerso para produção de invertases.....	10
4.4 Determinação da Viabilidade	10
4.5 Obtenção dos extratos.....	11
4.6 Determinação da atividade enzimática.....	11
4.7 Caracterização físico-química das enzimas.....	11
4.7.1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática.....	11
4.7.2. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática.....	12
4.7.3. Efeito de etanol.....	12
4.8. Obtenção de frutooligossacarídeos.....	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5.1. Produção das invertases de <i>S. cerevisiae</i> e isolado 35.....	12
5.2. Caracterização físico-química de <i>S. cerevisiae</i> e isolado 35.....	15
5.3. Efeito de etanol da <i>S. cerevisiae</i> e isolado 35.....	18
5.4. Produção de fruto-oligossacarídeos <i>S. cerevisiae</i> e isolado 35.....	18
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
7. REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

O etanol é produzido principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza monossacarídeos provenientes da quebra da sacarose (dissacarídeo), esta sacarose é uma substância orgânica cristalina de maior produção mundial tendo duas fontes naturais importantes: beterraba (*Beta vulgaris*) e cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum*), esta última é cultivada em vários países sendo responsável por 60-70% da sua produção (BON et al., 2008; FERREIRA et al., 2009).

As β -frutofuranosidases (E.C 3.2.1.26) conhecidas popularmente como sacarases ou invertases, hidrolisam a sacarose obtendo o xarope de açúcares invertidos (glicose e frutose). Em *Saccharomyces cerevisiae* essa enzima pode ser encontrada em duas formas, a invertase extracelular que fica localizada aderida na parede celular e a invertase intracelular que se encontra no citoplasma (PARAZZI-JUNIOR, 2006). As invertases também podem ser encontradas em invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos (VITOLLO, 2004).

A principal aplicação das invertases encontra-se na indústria alimentícia para produção de xaropes, doces, mel artificial, leite condensado e bebidas. No entanto, esta enzima também pode ser utilizada pela indústria de cosméticos, farmacêutica, papel e principalmente em processos de produção do etanol (QURESHI et al., 2012). No entanto a aplicação em escala industrial desta enzima ainda é limitada devido ao elevado custo de produção e à necessidade de parcial purificação após cultivo (ASHOKKUMAR, 2001).

Apesar da invertase está principalmente relacionada à indústria alimentícia na fabricação do xarope de glicose e frutose (açúcar invertido) ela também tem grande importância na formação de frutooligossacarídeos. Algumas invertases em altas concentrações de sacarose (acima de 10%) podem apresentar uma atividade transferásica, essa atividade transferásica realizada ocorre através de uma reação enzimática de transfrutossilagem que pode resultar na formação desses açúcares 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutoforanosil nistose (GF4) (PASSOS E PARK, 2003;NOVAKI et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir invertases pelo cultivo submerso de leveduras previamente isoladas e selecionadas da Rede Centro-Oeste de Leveduras (RECOL). Avaliar a o potencial industrial das enzimas produzidas.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Produzir invertases pelo cultivo submerso das leveduras (isolado 35 e Cat-1) previamente selecionadas;
- 2) Realizar análise físico-química das invertases produzidas pelas leveduras e avaliar o potencial industrial destas enzimas;
- 3) Avaliar o potencial de produção de frutooligossacarídeos utilizando as invertases produzidas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Potencial biotecnológico de leveduras

Atualmente, a cana-de-açúcar é uma das principais monoculturas que movimentam a economia brasileira, sendo o Brasil o maior produtor de cana de açúcar é o primeiro do mundo na produção de açúcar e o segundo maior na produção de etanol. A produção de etanol conta com projeções positivas para os próximos anos, podendo alcançar 58,8 bilhões de litros em 2019, mais que o dobro registrado em 2008 segundo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014).

Após a crise do petróleo em 1973, o Brasil investiu fortemente no Plano Nacional do Alcool (PROÁLCOOL) numa tentativa de fomentar a produção do etanol, uma fonte de energia sustentável a qual minimizaria o impacto do aumento do preço do petróleo. De fato, atualmente, um dos maiores desafios mundiais é a busca de alternativas ao petróleo, combustível fóssil, com reserva em declínio, altamente poluente e com preços voláteis. A busca de alternativas para combustíveis derivados de

petróleo tem aumentado a fim de reduzir a dependência mundial dos recursos não renováveis (FARRELL et al., 2006).

O etanol produzido no Brasil é obtido por fermentação de açúcares contidos no mosto de cana-de-açúcar, tendo como principais características a alta densidade celular, curto tempo de fermentação e reciclo das leveduras. (PULIGUNDLA et al., 2011). Um fator que vem se tornando limitando neste processo é a tolerância das leveduras disponíveis no mercado frente aos estresses impostos em uma fermentação com um elevado teor alcoólico (PIDDOCKE et al., 2009; PEREIRA et al., 2011).

A fermentação alcoólica é um processo que ocorre em anaerobiose com a transformação de açúcares em etanol e CO₂ catalisados por enzimas, realizada principalmente por leveduras, em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia (obtida na forma de ATP), a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas (LIMA et al, 2001).

As leveduras são fungos unicelulares, sendo a maioria classificado no Domínio Eukarya, reino Fungi, porém não formam grupo taxonômico ou filogenético específico. As células de leveduras são geralmente esféricas, ovais ou cilíndricas e sua divisão celular geralmente ocorre por brotamento (Figura 1). No processo de brotamento uma nova célula é gerada como pequena protuberância da célula antiga. As células das leveduras são muito maiores que as células bacterianas, podendo ser facilmente distinguidas de bactérias em microscópio óptico (MADIGAN, 2004).

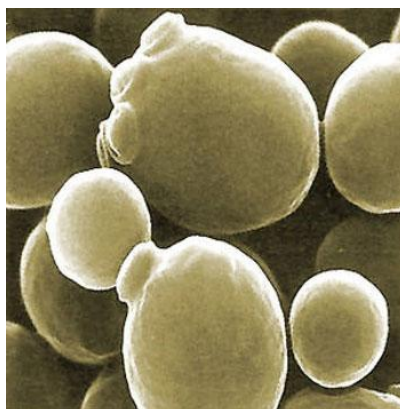


Figura 1: Microscopia de varredura da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
(lqes.iqm.unicamp.br).

Dentre essas leveduras o gênero *Saccharomyces* é um dos mais conhecidos por serem utilizados em vários processos fermentativos em escala industrial, como por exemplo na produção do etanol. O Brasil produz atualmente uma grande quantidade de

biomassa de levedura que são obtidas como subproduto de algumas indústrias. Essa biomassa além de ser destaque como uma excelente fonte de proteínas, apresentam características não-patogênicas (PINTO, 2011).

Diante dessa situação, faz-se necessário encontrar linhagens novas e mais robustas, que certamente esta presente na grande biodiversidade de leveduras encontradas nas dornas de fermentação (BASSO et al., 2008). Devido a sua excelente característica fermentativa, as leveduras são utilizadas na indústria de alimentos e bebidas em diversas formas, como na indústria de panificação, na fermentação alcoólica nas indústrias de cerveja, vinhos e álcool, em outros processos fermentativos como catalisador biológico (PINTO, 2011). Esses fungos unicelulares são muito bem adaptados a cultivos submersos, sendo este processo o mais utilizado em escalas industriais para multiplicação celular e obtenção de bioprodutos de leveduras.

O cultivo submerso consiste em um processo no qual os microrganismos desenvolvem-se em meio líquido sob agitação, contendo nutrientes dissolvidos ou em suspensão. Este tipo de processo apresenta diversas vantagens, entre elas, a facilidade no controle dos parâmetros de cultivo, fácil recuperação metabólitos e redução da possibilidade de degradação do produto (FAHEINA-JUNIOR, 2012).

Leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* necessitam de sacarose na composição do meio de cultura para produção de invertases. O melaço de cana de açúcar, um subproduto proveniente da manufatura de açúcar, é rico neste dissacarídeo e pode ser utilizado para o cultivo microbiano visando a produção de invertase, contribuindo para redução no custo de produção destas enzimas. O Brasil possui 181 usinas sucroenergéticas, que geram grandes quantidades de melaço de cana. (QURESHI et al., 2012)

A conversão dos carboidratos em açúcares fermentescíveis pode ser realizada por via ácida ou enzimática. A hidrólise ácida apresenta uma série de desvantagens, dentre elas a formação de subprodutos tóxicos indesejáveis (LEITE et al., 2008). A utilização do método enzimático seria uma alternativa, no entanto, a utilização industrial de algumas enzimas ainda apresenta problemas a serem superados, como: elevado custo de produção, baixa estabilidade estrutural das enzimas e inibição pelo produto de reação (ZANOELO et al., 2004). Entre as diferentes enzimas conhecidas, as invertases também merecem destaque pelo seu potencial biotecnológico e por apresentar diferentes aplicações possíveis (GIRALDO, 2011).

3.2 As invertases

A invertase é uma enzima muito utilizada na indústria de alimentos, foi também a enzima que serviu de base para os estudos Michaelis-Menten relativos à curva de saturação da atividade da enzima versus substrato. A constante de Michaelis-Menten (K_m), uma constante empírica igual à concentração em substrato para o qual há uma velocidade inicial igual à $V_{m\acute{a}x}/2$ em condições experimentais definidas, vem sendo determinada para caracterizar a hidrólise da sacarose de invertase *in vitro* (WHITAKER, 2003; EMREGUL, 2006; VUJČIĆ, 2011).

Seu nome comum, invertase, deve-se ao fato de que a hidrólise da sacarose leva à inversão da rotação óptica do meio reacional, basicamente em consequência do surgimento de frutose, quando observado em polarímetro. O mecanismo de reação é baseado no esquema abaixo (Figura 2):

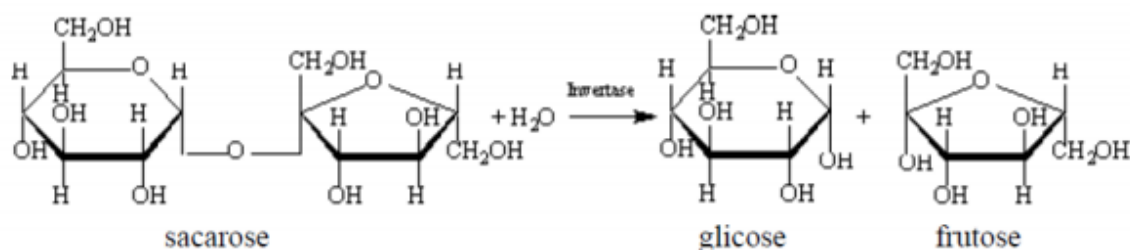


Figura 2: Mecanismo de reação catalisada pela invertase (SILVEIRA, 2013).

A sacarose é um dissacarídeo não redutor constituído de dois monossacarídeos, D-glicose e D-frutose que estão ligados entre si através de seus carbonos anoméricos (FERREIRA, 2009).

Muitos estudos referente as invertases estudam, principalmente, invertase denominada extracelular, que não necessariamente é excretada pela levedura, e sim encontra-se no espaço periplasmático, esta invertase por ser uma enzima de fácil acesso, vem sendo muito estudada por não ser necessário seu rompimento celular para a sua obtenção. *Saccharomyces cerevisiae* é uma fonte de invertase bastante conhecida, contendo as duas formas desta enzima. Sendo a intracelular pobre em carboidrato, e a invertase extracelular rica em carboidrato, sendo esta última a mais utilizada em indústrias de bebidas e alimentos (KARKAS e ONAL, 2012).

As invertases foram uma das primeiras carboidrases a ser estudada na história de enzimologia. Em 1828, identificou-se pela primeira vez sua atividade observando-se que a levedura de panificação fermentava a sacarose em meio aquoso. A partir daí, a grande quantidade de experimentos realizados sobre a invertase favoreceu seu uso como enzima modelo para estudos de catálise enzimática (SILVEIRA, 2013).

A invertase possui a habilidade de catalisar o desdobramento da sacarose na mistura de glicose e frutose, produzindo açúcar invertido (CABAJ et al., 2012). A solução de açúcar invertido é uma solução densa comparada à sacarose, capaz de minimizar a cristalização. Corresponde a uma mistura de açúcares em solução, constituída principalmente de glicose, frutose e sacarose residual, sendo 20% mais doce que a sacarose além de diminuir a temperatura de congelamento devido a sua afinidade com água (CADENA et al., 2010). A mistura de açúcar hidrolisada obtido pela invertase tem uma vantagem industrial de não apresentar coloração, em contraste com os produtos coloridos obtidos pela hidrólise ácida (SHAHEEN, 2008).

Essa hidrólise enzimática da sacarose é catalisada por dois tipos de enzimas: a β -D-glicosidase (EC 3.2.1.20) e β -D-frutofuranosidase (EC 3.2.1.26). Embora em ambos os casos ocorra a formação do açúcar invertido, apenas a segunda delas ficou conhecida como invertase. A atividade da invertase pode ser dosada de diferentes formas, sendo uma delas a dosagem de açúcares redutores ou dosagem colorimétrica de glicose usando o método DNS (3,5- ácido dinitrosalisílico) dos açúcares redutores (VITOLLO, 1979; CANTARELLA et al., 2003).

Essas enzimas podem ser encontradas em diferentes isoformas, no entanto, a função específica destas isoformas não é conhecida ainda, mas parecem controlar a entrada de sacarose em diferentes vias de utilização (ALEGRE et al., 2009).

3.3 Aplicações biotecnológicas de invertases

Os alimentos industrializados surgiram proporcionando redução de custos e aumento do tempo de conservação. Dentre os aditivos usados na indústria alimentícia, destacam-se os adoçantes, responsáveis por melhorar o sabor de alimentos. Existem adoçantes naturais e sintéticos, entretanto o consumo de adoçantes naturais como a sacarose nem sempre é bem-vindo, como é o caso dos diabéticos e dos obesos. Para esses casos foram desenvolvidos adoçantes sintéticos como o aspartame, sacarina,

ciclamato e acesulfame-K, que apresentam suspeitas e controvérsias quanto aos seus efeitos em seres humanos, inclusive sua ação carcinogênica (VICENTE, 2000).

As principais aplicações industriais estão relacionadas com aquelas que utilizam o açúcar no estado dissolvido, tais como bebidas carbonatadas, sucos concentrados, xaropes medicinais, doces e molhos, o açúcar invertido tem sido preferencialmente utilizado pela sua estabilidade em altas concentrações, em função da sua alta solubilidade, permitindo maior tempo de vida de prateleira se comparado com soluções de sacarose. Além do mais a qualidade do produto obtido por hidrólise enzimática é superior quando comparada com o produto da hidrólise ácida (TOMOTANI e VITOLO, 2006).

Em processos industriais a invertase ou β -frutofuranosidase é usada para obtenção do xarope de açúcar invertido, esta mistura tem uma maior capacidade edulcorante do que a sacarose, pois tem grandes potencialidades e aplicações na indústria de alimentos (QURESH et al., 2012). O açúcar invertido (xarope de glicose e frutose) é amplamente utilizado na indústria de confeitos, na panificação e produtos afins, na formulação de cremes para recheio e de geléias, que é cerca de 40% superior ao da sacarose, e à sua lenta cristalização, ocasionando uma melhoria na textura dos alimentos (GRACIDA, et al., 2005).

Podemos ressaltar que a invertase também é utilizada para a produção de mel artificial, alguns produtos cosméticos, farmacêuticos e na indústria de papel e recentemente na plastificação, podem também ser utilizadas na análise para a produção de biosensores (QUERESHI, 2012). Dentro deste contexto, podemos concluir que o uso industrial de invertases tem grande importância, pois estas enzimas podem ser utilizadas em diferentes setores industriais, o que reforça a importância deste estudo.

Outra interessante propriedade das invertases é a síntese de frutooligossacarídeos, quando incubadas em concentrações superiores a 10% de sacarose (SAID; PIETRO, 2004). A produção de frutooligossacarídeos é realizada enzimaticamente, a partir da sacarose, por reação de transfrutossilação e, devido a suas características de fibra alimentar solúvel, têm sido amplamente utilizados como alimentos funcionais, pois não interferem nas propriedades organolépticas dos produtos, além disso, sua solubilidade encontra-se próxima à da sacarose (SILVA, 2008).

Os Frutooligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos de ocorrência natural em produtos de origem vegetal, conhecidos como açúcares não convencionais e têm tido impacto na indústria de açúcares devido às suas excelentes características funcionais.

Atualmente os FOS, nome comumente dado a oligômeros de frutose, sendo os mais utilizados: 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4), são compostos por unidades de frutose ligadas na posição beta- 2,1 da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (PASSOS, 2003), como mostra a Figura 3:

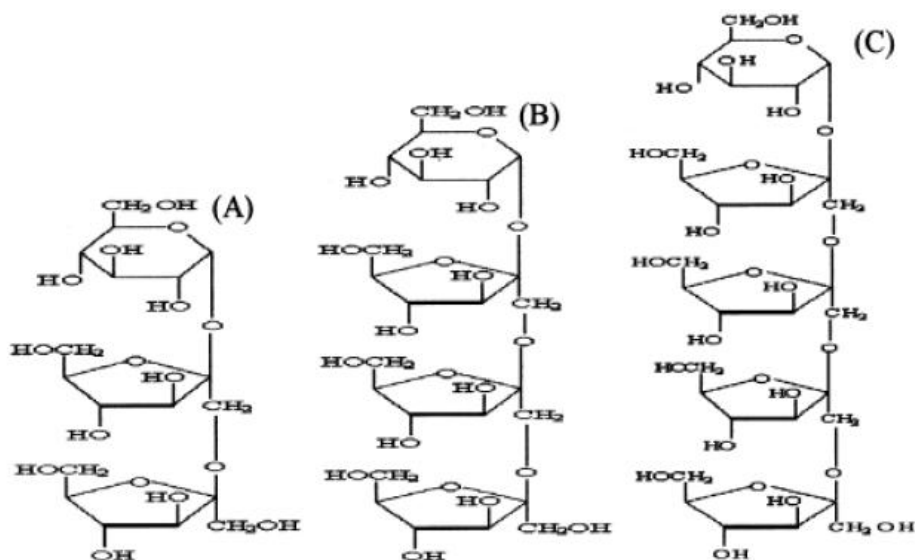


Figura 3: Estrutura química dos principais frutooligosacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C) (Fonte: PASSOS e PARK, 2003).

Os FOS são considerados ingredientes e não aditivos alimentares, na maioria dos países. São fibras dietéticas, confirmado pelas autoridades legais em vários países, e nos Estados Unidos possuem o status GRAS (Generally recognized as safe). Comercialmente, os FOS são suplementos caros, a cerca de U\$ 0,20 por grama, o consumo nas doses recomendadas pode custar U\$ 2,00 por dia. Devido a suas boas características como um dietético natural, os FOS podem ser usados em formulações de sorvetes e sobremesas lácteas que levem no rótulo “açúcar reduzido” “sem adição de açúcar” “calorias reduzidas”, etc., em formulações para diabéticos, em produtos funcionais que promovam efeito nutricional adicional nas áreas de prebióticos, simbióticos, fibras dietéticas, em iogurtes, promovendo efeito simbiótico (além do próprio efeito probiótico do iogurte), em biscoitos e produtos de panificação, substituindo carboidratos, em barras de cereais, sucos e néctares frescos, produtos de confeitaria, molhos, etc., (PASSOS e PARK, 2003).

As moléculas de FOS, pela sua configuração química, são resistentes às enzimas digestivas, não sendo digeridas pelo organismo humano, chegando, portanto, intactas ao

intestino grosso. Desta maneira, podem ser fermentadas pelas bactérias presentes no cólon, especialmente as dos gêneros *Lactobacilos* e *Bifidobactérias*, exercendo assim seu efeito prebiótico (SIQUEIRA et al., 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que as os FOS podem apresentar inúmeros benefícios à saúde humana. Dentre eles, têm se destacado os efeitos relacionados à promoção do equilíbrio da flora e do funcionamento intestinal, o controle do colesterol e dos triglicerídeos séricos, além de auxílio no tratamento de enfermidades como anemia, osteoporose, hipertensão, diabetes, intolerância à lactose e insuficiência renal (PASSOS e PARK, 2003; SIQUIERA et al., 2008).

Os FOS, por seu efeito antagonista, suprimem o crescimento de bactérias maléficas como as *escherichia coli* balanceando a flora intestinal, reduzindo, assim, o acúmulo de metabólitos tóxicos decorrentes de processos fermentativos e a incidência de câncer de colo. E aumenta a proliferação das bactérias benéficas como as bifidobactérias que previne, também, a constipação, dentre outros benéficos (FREITAS, 2000).

A ingestão diária de frutooligossacarídeos como alimento é comprovadamente benéfica à saúde humana, devido principalmente ao efeito prebiótico que promovem no organismo. O estímulo ao crescimento de microrganismos probióticos, associada à fermentação e produção de ácidos graxos de cadeia curta, concomitante à inibição do crescimento de bactérias patogênicas, promovem um equilíbrio da microbiota intestinal, levando a uma série de benefícios ao organismo, especialmente os relacionados ao equilíbrio da função intestinal e ao controle dos lipídeos sanguíneos (PASSOS e PARK, 2003).

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismo

No presente trabalho foram utilizadas uma linhagem de levedura previamente selecionada para produção de invertases (isolado 35) pertencente a Rede Centro-Oeste de Leveduras (RECOL) e uma linhagem de *Saccharomyces cereviseae* denominada “CAT-1” como padrão. Esta linhagem foi cedida pela Usina São Fernando, Dourados – MS. A linhagem selecionada foi encaminhada para a Coleção Brasileira de Culturas do

Meio Ambiente e Indústria CBMAT/Unicamp – Campinas – SP para sua identificação taxonômica.

4.2 Manutenção da cultura

As culturas estoques de leveduras foram mantidas em meio YEPD Agar inclinado contendo (1,0% de extrato de levedo, 2,0% de peptona, 2,0% de glicose, 1,5% de Agar). Após incubação por 48 horas a 28°C, as culturas foram armazenadas a 4°C contendo óleo mineral para sua preservação, sendo repicadas continuamente para manter a sua viabilidade.

4.3 Cultivo Submerso para produção de invertases

As leveduras foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio Agar inclinado YEPD (2% de peptona, 2% de glicose; 1% de extrato de levedura e 1,5% de ágar), mantidos por 48 horas a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura adicionado 20 mL do próprio meio que será usado para produção da enzima YEPS (2% de peptona, 2% de sacarose e 1% de extrato de levedura). A inoculação das leveduras foi feita através da transferência de 2mL da suspensão microbiana para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 18 mL do meio YEPS. Esses foram mantidos em agitação de 150 RPM de 0 a 168 horas a 28°C, amostras foram retiradas em diferente tempo de cultivo. Os valores representa as medias das duplicatas de cada cultivo.

4.4 Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi rotineiramente realizada através do método de coloração com azul de metileno. (LEE et al., 1981).

4.5 Obtenção dos extratos enzimáticos intra e extracelular

Os meios cultivados foram centrifugados a 1500 \times g por 5 minutos a fim de separar a massa celular do sobrenadante, sendo o último denominado extrato enzimático extracelular. A massa celular foi ressuspendida com 5 mL de tampão acetato e

centrifugada a fim de eliminar as impurezas, o procedimento foi repetido e após a última centrifugação, a massa celular foi ressuspensa em 10 mL de tampão acetato, sendo denominada biomassa celular não rompida. Para obtenção das enzimas intracelulares a biomassa celular foi submetida a 3 séries de agitação de 3 minutos cada, sob agitação em Vortex utilizando 50g de pérolas de vidro. Posteriormente essa biomassa rompida foi centrifugada, e o sobrenadante obtido foi denominado extrato enzimático intracelular. Os extratos extracelulares e intracelulares foram utilizados para os ensaios de determinação de invertase (VIEIRA, 2012).

4.6 Determinação das atividades enzimáticas

A mistura de reação foi composta por 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0, contendo 1% de sacarose e 0,1 de extrato enzimático, mantido por 10 minutos a temperatura de 50°C. O açúcar redutor liberado foi quantificado a 540 nm pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), descrito pelo método de Miller (1959). A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de produto por minuto (U).

4.7 Caracterização Físico-química das enzimas

4.7.1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática

O pH ótimo das invertases foi determinado mensurando a atividade da enzima a 50°C em diferentes valores de pH (3,0 - 8,0), nesta etapa foi utilizado tampão Citrato-Fosfato a 0,1 M. A estabilidade das enzimas em pH foi determinada incubando-as por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH. Os tampões utilizados foram Citrato-Fosfato 0,1 M (3,0 - 8,0), Tris-HCl 0,1 M (8,0 - 8,5) e Glicina-NaOH 0,1 M (8,5 - 10,5). A atividade residual foi determinada nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima.

4.7.2. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

A temperatura ótima das invertases foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em temperaturas de 30 a 75°C, no respectivo pH ótimo da enzima. A termoestabilidade das invertases foi determinada incubando as enzimas por 1 hora de 30

a 75°C. As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima.

4.7.3. Efeito de etanol

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de etanol, em diferentes concentrações, na mistura de reação (0-30% de etanol). Os ensaios foram realizados a 50°C em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0.

4.8. Obtenção de fruto-oligossacarídeos por atividade transferásica

O potencial para produção de fruto-oligossacarídeo pelas invertases foi avaliado incubando as enzimas por duas horas em soluções contendo concentrações de 5 a 20% de sacarose a 50°C. Os controles foram igualmente tratados, no entanto, foi utilizado enzimas inativadas por temperatura. Os açúcares foram separados e quantificados por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC, Agilent 1260) utilizando uma coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, EUA). As amostras foram eluídas a 25°C, utilizando 0,005M de ácido trifluoracético (TFA) como fase móvel a vazão de 0,3 mL min⁻¹, utilizando detector refratômetro diferencial (Agilent 1260, RID) acoplado a um módulo de aquisição de dados. A identificação dos picos eluídos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos padrões de sacarose, glicose, frutose, 1-kestose e nistose.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção das invertases por leveduras (*S. cerevisiae* e isolado 35)

Na avaliação para a produção das invertases intra e extra celulares, foram analisadas os parâmetros fermentativos, como a viabilidade celular, atividade da enzima invertase intra e extra celular das linhagens. Quanto a produção de invertases no meio extracelular (Figura 4A) pode-se notar um aumento na produção de enzimas ao decorrer do tempo para os isolados analisados. A linhagem comercial de *S. cerevisiae* (CAT-1) apresentou sua máxima produção de invertases de 2,54 U/mL em 168 horas de incubação, enquanto que do isolado 35 apresentou 4,21 U/mL também em 168 horas de

cultivo. Praticamente o dobro da linhagem industrial, apresentando um isolado em potencial para a produção da enzima.

Quanto a produção de enzimas no meio intracelular (Figura 4B) a *S. cerevisiae* (CAT-1) apresenta sua maior produção de 35 U/mL em 24 horas de cultivo, enquanto que o isolado 35 apresentou sua maior produção de 23 U/mL em 72 horas de cultivo.

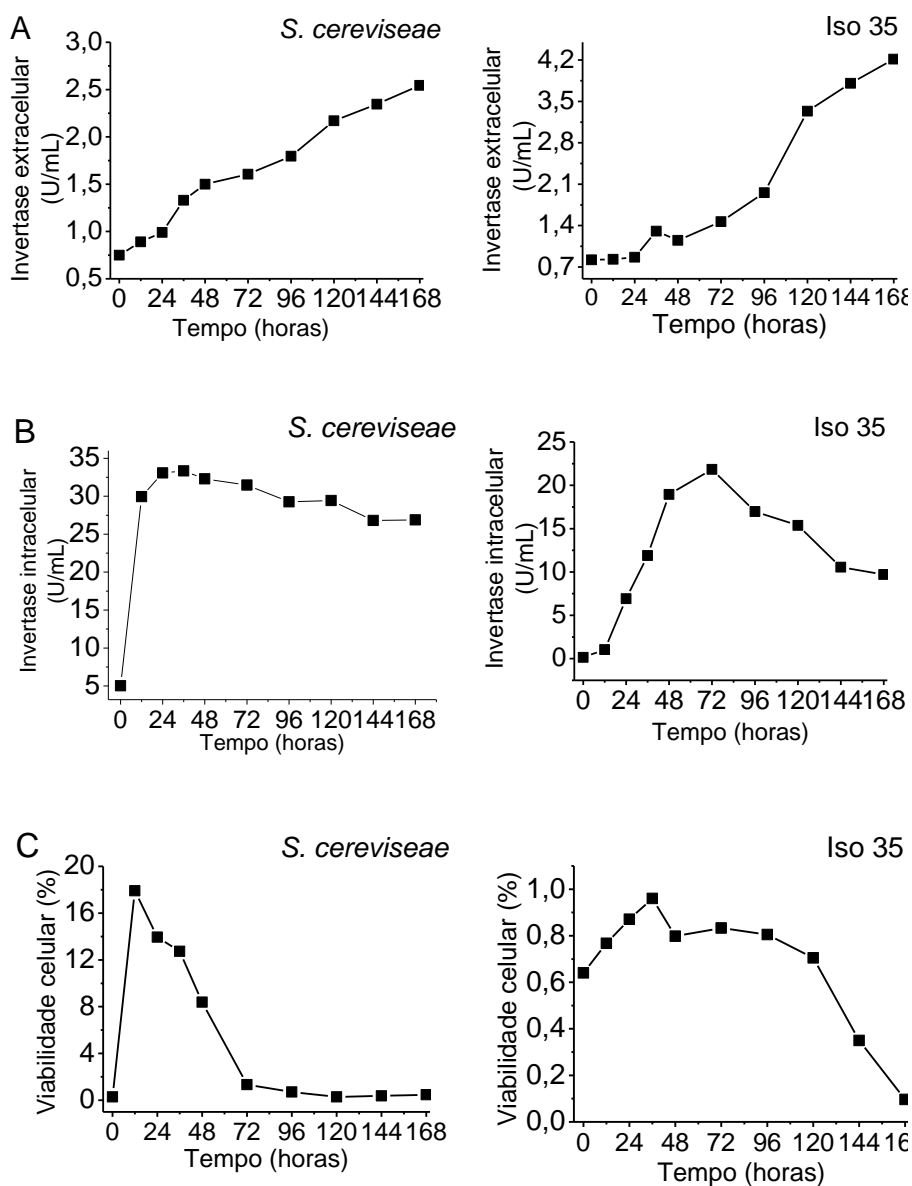
Na avaliação da taxa de viabilidade celular o isolado 35 obteve um melhor desempenho quanto ao número de células vivas no decorrer do tempo em relação a linhagem comercial de *S. cerevisiae* (Figura 4C). Enquanto a *S. cerevisiae* teve sua viabilidade celular reduzida para 13% em 120 horas, o isolado 35 permaneceu com uma viabilidade de 70% no mesmo período de cultivo. Em seus estudos SILVEIRA (2013), também encontrou uma excelente viabilidade celular de leveduras num período de 24 horas, mostrando neste estudo que essa viabilidade pode se estender por um período bem maior.

Não foi recuperada toda a atividade enzimática presente na célula nos extratos extracelulares. Quando ocorre o extravasamento celular pode haver a liberação de metabolitos que podem resultar na perda ou redução da atividade enzimática.

Comparando os resultados de produção com viabilidade é possível observar o aumento na quantidade de enzimas extracelular nos estágios finais de cultivo, no qual coincidem com a perda da viabilidade celular, o que permite inferir que o aumento na concentração de enzimas no caldo fermentativo pode não ser proveniente da secreção da enzima pela levedura e sim pelo rompimento desta célula resultando da liberação dos componentes intracelulares para o meio de cultivo.

Após períodos mais longos de cultivo foi observado que houve queda da atividade da enzima intracelular, perda da atividade celular e o aumento da produção enzimática extracelular.

Figura 4: Produção de invertases por *S. cerevisiae* e isolado 35



Nota: Produção de invertases e viabilidade celular pelas linhagens de *S. cerevisiae* e isolado 35 em meio YEPS com agitação de 150 rpm, variando o tempo de cultivo. **A)** enzimas extracelulares *S. cerevisiae* e isolado 35, **B)** enzimas intracelulares *S. cerevisiae* e isolado 35; **C)** viabilidade celular *S. cerevisiae* e isolado 35.

A utilização da fermentação submersa parece ser a melhor opção para a produção de invertases, Rustiguel (2009) encontrou uma atividade invertásica extracelular em fermentação submersa do fungo *Aspergillus phoenicis* superior a uma fermentação em estado sólido suplementado com farelo de trigo como fonte de carbono,

comprovando que o cultivo submerso pode ser a melhor escolha para esta enzima, até mesmo utilizando fungos filamentosos.

A produção obtida no presente estudo foi superior a encontrada por Bhatti et al. (2007) que relataram sua maior produção de invertase após incubação de 96 horas utilizando o melão como fonte de carbono pelo fungo *Fusarium solani*, obtendo uma atividade invertásica máxima de 9,90 U/mL. Já Matrai e colaboradores (2000), em seus estudos relatam a produção máxima de invertase por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* foi alcançada após 48 h de incubação, Já Rubio e colaboradores encontraram uma produção de invertases máxima após 36 horas de cultivo, tempos de cultivo semelhantes aos encontrados neste estudo;

A maior produção de invertase intracelular (Figura 4B) foi obtida após 24 horas de cultivo da linhagem *S. cerevisiae* obtendo cerca de 35 U/mL, seguida do isolado 35 que produziu cerca de 23 U/mL em 72 horas. O tempo de 72 horas de maior produção enzimática também foi observado por Ashokkumar e colaboradores (2001). Qureshi e colaboradores (2012) obteve uma produção próxima a encontrada neste estudo, de 35,89 U/mL de invertases do fungo *Mucor geophyllus*. Nossos estudos estão de acordo com a literatura mostrando que o cultivo submerso é importante processo para a produção de invertases.

5.2. Caracterização físico-química das invertases da CAT-1 e isolado 35

Os valores encontrados para pH e temperatura ótima das invertases do isolado 35 e *S. cerevisiae* foram 4,0 e 70°C e 4,5 e 50°C respectivamente (Figura 5A e 5B).

O pH ótimo ácido encontrado neste estudo foi similar ao encontrado pela invertase da levedura *Rhodotorula glutinis* que foi de 4,5 (RUBIO, 2006; RUNCO & NAVARRO, 2006). Novaki et al., (2010) em seus estudos também encontrou atividade máxima no pH 4,0 do fungo *Aspergillus casingii*. Andjelkovic et al., (2010) relatam faixa de pH 3,5-5,0 como ótimo para invertase purificada de *S. cerevisiae*. Bora et al. (2005) obtiveram o pH ótimo para invertase igual a 5,0.

Alegre et al. (2009), avaliaram diferentes formas de invertases intra e extracelular do fungo *Aspergillus caespitosus* produzidas em condições distintas de crescimento, obtendo para todas as formas de invertase, valores de pH ótimo na faixa de 4,0-6,0;

A invertase produzida pelo isolado 35 apresentou estabilidade em ampla faixa de pH variando de 3-10. A invertase da linhagem de *S. cerevisiae* apresentou estabilidade apenas de pH 3-7,0 (Figura 5C).

Com relação à estabilidade térmica, a invertase do isolado 35 manteve-se estável de 30 a 75°C enquanto que a invertase da *S. cerevisiae* manteve-se estável apenas de 30 a 50°C (Figura 5D).

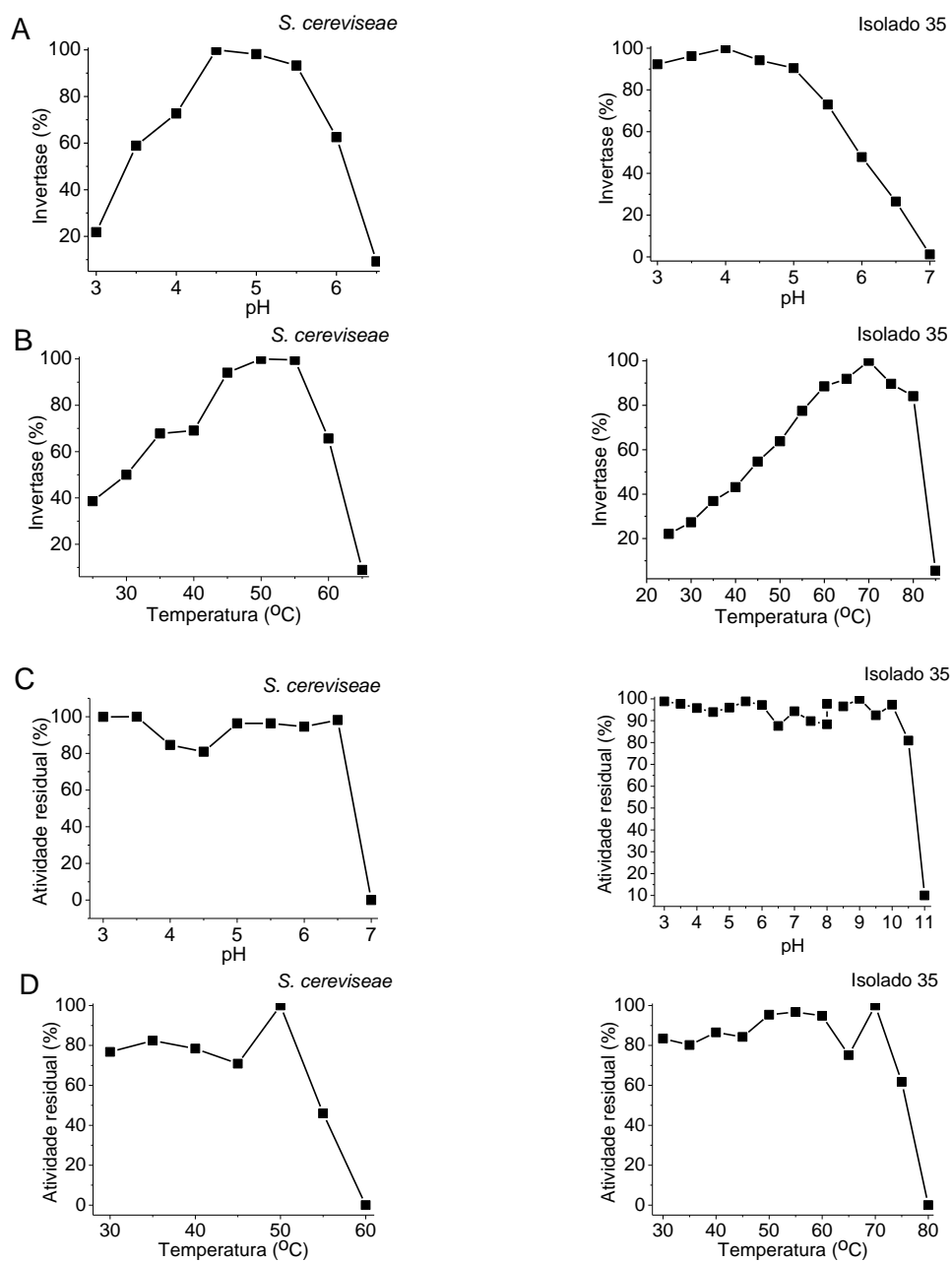
Os resultados apresentados demonstram elevada estabilidade estrutural da enzima produzida pelo isolado 35, características extremamente interessante para aplicação desta enzima em processos industriais. Os dados apresentados ficam ainda mais expressivos quando comparados com características apresentadas por invertases produzidas por outras linhagens mesófilas.

Em seus estudos Novaki (2010) encontrou para invertase purificada de *A. asiellus* temperatura ótima em 70°C, a enzima apresentou estabilidade até 75°C valores semelhantes aos encontrados no presente trabalho para invertases do isolado 35 que manteve 62% de sua atividade após 1 hora a 75°C.

A invertase de *Aspergillus niger* apresentou uma temperatura ótima de 55°C e estabilidade a temperaturas de no máximo 65°C (L'HOCINE et al., 2000). A invertase produzida por *A. ochraceus* que apresentou temperatura ótima de 60°C e meia vida de 60 min a esta temperatura (GUIMARÃES et al., 2007).

Em seus estudos Gargel (2011) avaliou pH e temperatura de estabilidade da enzima produzida pela levedura *cândida stellata* que apresentou estabilidade de pH na faixa de 3 e 8 e na temperatura de estabilidade obteve um bom desempenho até 55°C perdendo sua atividade total a 70°C, apresentando menor estabilidade comparado a invertase do isolado 35.

Figura 5: Caracterização físico-química das invertases *S. cerevisiae* e isolado 35



Nota: Efeito do pH e temperatura sobre a atividade das invertases produzidas por *S. cerevisiae* e isolado 35. **A)** pH ótimo; **B)** temperatura ótima; **C)** pH de estabilidade; **D)** temperatura de estabilidade.

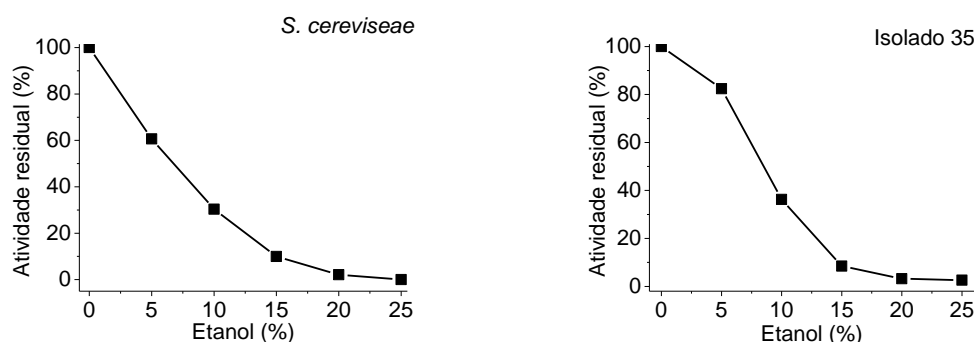
5.3. Avaliação do efeito de etanol sobre *S. cerevisiae* e isolado 35

Foi verificado também o efeito das concentrações de etanol sobre a atividade da enzima, as duas linhagens obtiveram um bom desempenho até 10% de etanol, mantendo atividade ainda em 15% (Figura 6).

Quanto ao efeito de etanol sobre a enzima em seus estudos Gargel (2011) a sua enzima reteve ainda cerca de 40% de sua atividade residual na concentração de 10% de etanol, valores semelhantes aos encontrados neste estudo.

De acordo com a literatura as enzimas podem ser expostas a diferentes concentrações alcoólicas em várias aplicações industriais, portanto a inibição por etanol é uma tendência no estudo de algumas enzimas (OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 6: Avaliação do efeito de etanol sobre *S. cerevisiae* e isolado 35



Nota: Efeito de etanol sobre a atividade das invertases produzidas por *S. cerevisiae* e isolado 35.

5.4. Avaliação do potencial de produção de fruto-oligossacarídeos por *S. cerevisiae* e isolado 35

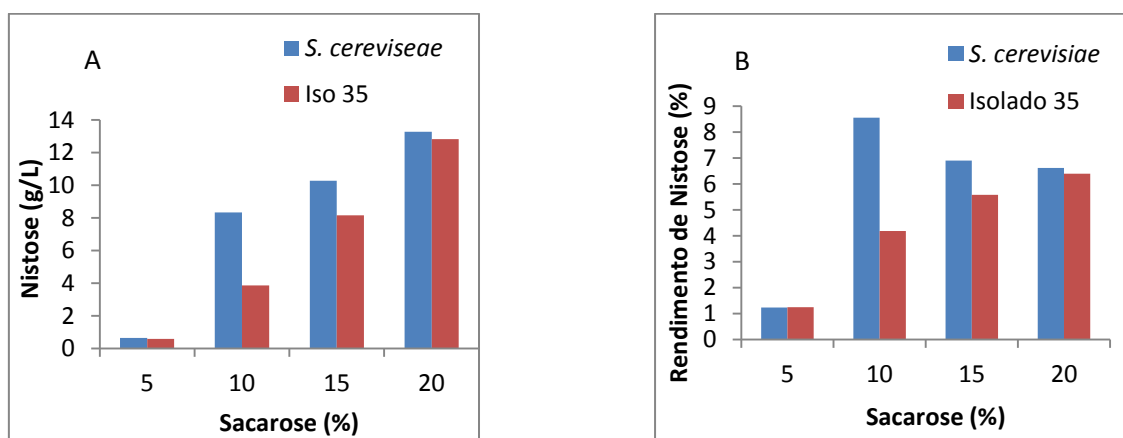
Quanto a produção de fruto-oligossacarídeos, ambas as invertases produzidas apresentaram atividade transferásica, sendo possível observar a produção de nistose, quando incubadas em elevadas concentrações de sacarose. A produção de Kestose-1, não foi observada a presença deste fruto-oligossacarídeo em nenhum dos ensaios realizados.

A produção de nistose pela invertase da levedura *S. cerevisiae* foi maior a medida que a concentração de sacarose aumentou no meio de reação, atingindo cerca 13,27 g/L em 20% de sacarose (Figura 7A). No entanto, o maior rendimento,

considerando conversão de sacarose em nistose, foi obtido nos ensaios contendo 10% de sacarose (Figura 7B).

A invertase produzida pelo Isolado 35 apresentou maior rendimento e produção de nistose, nos ensaios realizados com 20% de sacarose, atingindo cerca 12,82 g/L (Figuras 8A e B), valor muito semelhante ao encontrado para a invertase produzida pela linhagem comercial.

Figura 7: Produção de nistose em diferentes concentrações de sacarose.



Nota: A) Quantidade de nistose expressa em g/L. B) Rendimento da conversão de sacarose em nistose.

As amostras apresentaram ainda glicose, frutose e sacarose residual, sendo a maior concentração de glicose e frutose encontrada nos ensaios realizados com menor concentração de sacarose (5%). Justamente estas amostras, apresentaram menor quantidade de nistose (Anexo I). Estes resultados indicam que em concentrações iguais ou inferiores a 5% de sacarose, ocorre predominante atividade hidrolítica das invertases (hidrólise da sacarose em monômeros de glicose e frutose), sendo observada maior atividade para síntese de fruto-oligossacarídeos (transferásica), nos ensaios realizados com maior concentração de sacarose. Estudos realizados anteriormente confirmam os resultados obtidos no presente trabalho. Vitolo (2004) relata a presença de atividade transferásica de invertases em concentrações de sacarose superior a 10%. Segundo Passos e Park (2003) a atividade transferásica de invertases ocorre por uma reação de transfrutossilacção na presença de elevadas concentrações de sacarose podendo resultar na formação de fruto-oligossacarídeos.

A quantidade de nistose obtida no presente trabalho foi maior que a encontrada por SILVA (2008), sendo de 0,17 g/L para *Kluyveromyces marxianus* e 0,12 g/L para *S.*

cerevisae, mostrando o potencial das linhas selecionadas no presente trabalho. No entanto, ainda é possível variar outros parâmetros que influenciam na produção de fruto-oligossacarídeos, como: pH, temperatura, tempo de reação e outras concentrações de sacarose, visando a otimização do processo, que será desenvolvido em etapas futuras.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As duas linhagens avaliadas apresentaram potencial para produção de invertase nas condições de cultivo adotada no presente trabalho. Ambas as enzimas estão predominantemente ligadas a célula microbiana, sendo liberadas para o meio extracelular apenas nos estágios finais do cultivo, posteriormente a morte celular.

A levedura denominada isolado 35 apresentou maior viabilidade em comparação a linhagem comercial de *S. cerevisiae* e sua invertase apresentou elevada estabilidade estrutural. Estas características são muito apreciáveis para aplicação industrial tanto da levedura como da enzima.

As duas linhagens apresentaram atividade transferásica, resultando na produção de nistose, em diferentes concentrações de sacarose. No entanto, as características descritas para a enzima produzida pelo isolado 35 estimula a continuidade do trabalho, visando etapas futuras a otimização da produção de FOS.

Referências Bibliográficas

- ALEGRE, A. C. P., POLIZELI, M. L. T. M., TORENZI, H. F., JORGE, J. A., GUIMARÃES, L. H. S. Production of thermostable invertases by *aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40 p. 612-622, 2009.
- ANDJELKOVIC, U., PIĆURIĆB, S., VUJČIĆC, Z. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry*, London, v. 120, n. 3, p. 799-804, 2010.
- ASHOKKUMAR, B., NAGARAJAN, K., PARAMASAMY, G. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 331-338, 2001.
- BHATTI, H. N., RASHID, M.H., NAWAZ, R., ASGHER, M., PERVEN, R., JABBAR, A. Purification and characterization of a novel glucoamylase from *Fusarium solani*. *Food Chemistry*, v.103, p.338-343, 2007.
- BASSO, L. C., AMORIM, H. V., OLIVEIRA, A. J., LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. *FEMS Yeast Research Amsterdam*, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: *Interciência*, 2008.
- CABAJ, J., SOLODUCHO, J., JEDRYCHOWSKA, A., ZAJAC, D. Biosensing invertase-based Langmuir-Shaefer films: Preparation and characteristic. *Sensors and Actuators B: Chemical*, p 75-82, 2012.
- CADENA, D. P. G., JERONIMO, R. A. S., MELO, J. M., SILVA, R. A., FILHO, J. L. L., PIMENTEL, M. C. B. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plastic film and ferromagnetic Dacron. *Bioresource Technology*, v.101, p. 1595–1602, 2010.
- CANTARELLA, L., ALFANY, F., CANTARELLA, M. β -D-Fructofuranoside Fructohydrolase. *Handbook of food enzymology*, p. 787–804, 2003.
- EMREGUL, E., SUNGUR, S., AKBULUT, U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. *Food Chemistry*, v. 97, p. 591-597, 2006.
- FAHEINA-JUNIOR, G. S. Produção de celulases por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais 2012. Tese (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- FARRELL, A. E. PLEVIN, R. J., TURNER, B. T., JONES, A. D., O'HARE, M., KAMMEN, D. M. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science* v. 11, p. 506-508, 2006.
- FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. *Química Nova*, v. 32, p. 623-638, 2009.

FREITAS, D. G. C. Efeito da adição de pectina e frutooligossacarídeos como ingredientes funcionais no suco misto de cenoura e laranja. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2000 (Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos).

GARGEL, C. A. Rastreamento de leveduras autóctonas para produção de pectinase, tanase e invertase. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

GIRALDO, M. A. Purificação e caracterização bioquímica da invertase extracelular produzida pelo fungo filamentosso *Aspergillus terreus*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto de Química da Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2011.

GRACIDA-RODRÍGUEZ, J., FAVELA-TORRES, E., PRADO-BARRAGÁN, A., HUERTAOCCHOA, S., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Invertases. In: PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. (Ed.) *Enzyme Technology*, p. 449-464 2005.

GUIMARÃES, L. H. S., TERENCEZI, H. F., POLIZELI, M. L. T. M, JORGE, J. A. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillusochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*. v.42,p.52-57, 2007.

KARKAS, T., ONAL, S., Characteristics of invertase partitioned in poly (ethylene glycol) magnesium sulfate aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal*, v. 60 p. 142-150, 2012.

LEE, S. S., ROBINSON, F. M., WANG, H. Y. Rapid-determination of yeast viability. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, p. 641-649, 1981.

LEITE, R. S. R., ALVES-PRADO, H. F., CABRAL, H., PAGNOCCA, F. C., GOMES, E., DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude – glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology* v. 43 p. 391-395, 2008.

L'HOCINE, L., WANG, Z., JIANG, B., XU, S. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *Journal of Biotechnology*. v.81, p.73-84, 2000.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: LIMA, U. A. et al.(Coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo, Edgard Blücher, v. 3, 2001.

MADIGAN, T. M., MARTINKO, J. M., PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10a edição, São Paulo: Prentice Hall, 2004

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Culturas/Cana – de - Açúcar. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar> Acesso em: 06 fev. 2014.

MARQUEZ, L. D. S. Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resina. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MATRAI, T., SUSAN, M., SUSAN, K., IRENE, S. Invertase production of common storage moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus fumigatus*, *International Journal Food Microbiol*, v. 61 p. 187–191, 2000.

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

NOVAKI, L., HASAN, S. D. M., KADOWAKI, M. K., ANDRADE, D. Produção de Invertase por fermentação em Estado Sólido a partir de farelo de soja. *Engevista*, v. 12, p. 131-140, 2010.

OLIVEIRA, Bruno Motta. Comportamento killer em leveduras associadas à fermentação espontânea do mosto da cana-de-açúcar de produtores de cachaça de alambique da Bahia. 2009.123 f. Tese (mestrado em biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

OLIVEIRA, A. P. A., SILVESTRE, M. A., ALVES-PRADO, H. F., RODRIGUES, A., PAZ, M. F., FONSECA, G. G., LEITE, R. S. R. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. *African Journal of Biotechnology*, v.14, 2015.

PARAZZI-JUNIOR, O. Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase 2006. Tese (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PASSOS, L. M. L., PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural*, v.33, p. 385-390, 2003.

PEREIRA, F. B., GUIMARÃES, P. M. R., TEIXEIRA, J.A., DOMINGUES, L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 112, p. 130 -136, 2011.

PINTO, Laise Cedraz. Aproveitamento de produtos derivados de levedura (*saccharomyces spp.*) para o enriquecimento nutricional de alimentos à base de mandioca (*manihot esculenta crantz*) Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

PIDDOCKE, M. P., KREISZ, S., HELDT-HANSEN, H. P., NIELSEN, K. F., OLSSON, L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 83, p. 453-464, 2009.

PULIGUNDLA, P., SMOGROVICOVA, D., OBULAM, V., KO, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. *Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology*, v. 38, p. 1133-1144, 2011.

QURESHI, A. S., KHUSHK, I., BHUTTO, M. A., DAHOT, M. U., IKRAM-UL-HAQ, BANO, S., IQBAL, H. Production and partial characterization of invertase from *Mucor geophilus* EFRL 03. *African Journal of Microbiology*, v. 11, p. 10736-10743, 2012.

RUBIO, M. C., NAVARRO, A. R. Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiology Technology*. v. 39, p. 601-606, 2006.

RUSTIGUEL, C. B. Produção, purificação e caracterização bioquímica das Invertases do fungo filamentoso *Aspergillus phoenicis*. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. Ribeirão Preto, SP.

SAID, S., PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Cap. 1, p. 1 – 7, Ed. Legis Summa, 2004.

SHAHEEN, I., BHATTI, H. N., ASHRAF, T. Production, purification and thermal characterisation of invertase from a newly isolated *Fusarium sp.* under solid-state fermentation, *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, p.1152-1158, 2008.

SILVA, C.E.V. Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melado de cana-de-açúcar. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2008 (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

SILVEIRA, E. A. Caracterização bioquímica de leveduras industriais produtoras de etanol cultivadas em diferentes açúcares. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

SIQUEIRA, C. R., KOVALTCHUK, E., SILVEIRA, F.J. Frutooligossacarídeos: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeitos na saúde humana e importância na indústria de alimentos. VI Semana de Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UFTPR, v.02, 2008.

STEWART, M. L., TIMM, D. A., SLAVIN, J. L. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system. *Nutrition Research and Practice*. v. 28, p. 329–334, 2008.

TOMOTANI, E., VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption anionic exchange resins. *Process Biochemistry*, p.1325-1331, 2006.

VICENTE, A. A. Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica. (Dissertação de mestrado em biotecnologia) Araraquara, SP, p.145, 2000.

VIEIRA, M. V. Seleção de leveduras com potencial para produção de enzimas de interesse industrial 2012. TCC (Graduação em Biotecnologia). Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.

VITOLO, M. Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*). São Paulo, 1979. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo.

VITOLO, M. In: SAID, S., PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos, São Paulo:Ed. Legis Suma, p. 207-221, 2004.

VUJČIĆ, Z., MILORADOVIĆ, Z., MILORADOVIĆ, A., BOŽIĆ, N. Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel. Food Chemistry, p 236-240, 2011.

WHITAKER, J. R. Enzyme-catalyzed reactions: experimental factors that affect rates. In *Handbook of food enzymology*, eds Whitaker J.R., Voragen A.G.J., Wong D.W.S. (Marcel Dekker, New York). p. 47–64, 2003.

ZANOELO, F. F., POLIZELI, M.L.T.M., TEREZI, H.F., JORGE, J. A. β -glucosidase activity from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. *FEMS Microbiology Letters*, p. 137-143, 2004.

ANEXO I

Tabela 1: Produção de fruto-oligossacarídeos pela invertase da *S. cerevisiae* em diferentes concentrações de sacarose.

Concentração de sacarose	Nistose	Glicose	Frutose	Sacarose residual*
5%	1,23%	52,64%	44,42%	3,69%
10%	8,56%	30,34%	28,32%	32,76%
15%	6,90%	25,41%	16,14%	51,52%
20%	6,62%	29,88%	25,19%	38,29%

*sacarose restante ao final do processo.

Tabela 2: Produção de fruto-oligossacarídeos pela invertase do isolado 35 em diferentes concentrações de sacarose.

Concentração de sacarose	Nistose	Glicose	Frutose	Sacarose residual*
5%	1,24%	50,26%	46,65%	1,82%
10%	4,18%	40,91%	37,99%	16,89%
15%	5,58%	32,71%	28,86%	32,83%
20%	6,4%	23,43%	17,63%	52,49%

*sacarose restante ao final do processo.