



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

ÉDIPO DA SILVA ALMEIDA

**PRODUÇÃO DE ENZIMA INVERTASE POR *ASPERGILLUS niger* EM
FERMENTAÇÃO EM ESTÁDO SÓLIDO**

SUMÉ-PB

2015

ÉDIPO DA SILVA ALMEIDA

**PRODUÇÃO DA ENZIMA INVERTASE DE *ASPERGILLUS niger* EM
FERMENTAÇÃO EM ESTÁDO SÓLIDO**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Professora Dr^a. Michelle Rossana Ferreira Vaz

SUMÉ-PB

2015

A447p ALMEIDA, Édipo da Silva.

Produção de enzimas invertase por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. / Édipo da Silva Almeida. - Sumé - PB: [s.n], 2015.

72 f.

Orientadora: Professora Dr^a. Michelle Rossana Ferreira Vaz.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Engenharia de Biotecnologia. 2. Produção de enzimas. 3. Fermentação. I. Título.

CDU: 60 (043.3)

ÉDIPO DA SILVA ALMEIDA

**PRODUÇÃO DA ENZIMA INVERTASE DE *ASPERGILLUS niger* EM
FERMENTAÇÃO EM ESTÁDO SÓLIDO**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA

Michelle Rossana Ferreira Vaz Nota (10,0)

Prof. Orientador

Dra. Michelle Rossana Ferreira Vaz

Franklin F. de Farias Nóbrega Nota (10,0)

Prof. Examinador 01 – Examinador Interno UATEC-UFCG

Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

Glauciane D. Coelho Nota (10,0)

Prof. Examinador 02 – Examinador Interno UATEC-UFCG

Dra. Glauciane Danusa Coelho

Nota Final (10,0)

Aprovada em 17 de março de 2015

“Aos meus pais Ruy José de Almeida Jr. e Maria Betânia da Silva Brito, e as duas maiores professoras que já tive em minha vida, minhas avós Maria da Silva Brito e Maria de Oliveira Nóbrega in memoriam”.

Dedico!

“Eu aprendi...

... que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;

...que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo que lhe pedimos.”

(H. Jackson Brown Jr.)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, que sempre me apoiou e jamais deixou de confiar em mim, e até mesmo nos momentos em que eu não tive esperança, nunca me abandonou.

Aos meus pais Ruy José de Almeida Jr. e Maria Betânia da Silva Brito, por todo amor, apoio, confiança, carinho e conselhos que foram de total importância para que eu nunca perdesse a esperança de me tornar uma pessoa melhor para mim mesmo e para aqueles que amo. E por toda força para que eu continuasse firme e disposto a superar meus próprios limites e todos os desafios que cruzaram meu caminho ao longo desses cinco anos de graduação.

A minha avó, Maria da Silva Brito, pelo aconchego, carinho, por todas as vezes que me recebeu em sua casa com a mesa farta de guloseimas e os pratos deliciosos que ela fez para mim todas as vezes que voltava para minha cidade. E além de tudo, quero agradece-la por sempre acreditar nessa minha conquista. Vó, seu neto está se formando!

A minha namorada Pâmela Caroline Silva de Oliveira, pelo imenso apoio, carinho, amor que partilhamos juntos a mais de dois anos de fidelidade. E pelas inúmeras vezes que me ofereceu ajuda nas horas difíceis em minha caminhada na elaboração e conclusão deste trabalho.

A minha orientadora, professora Dra. Michelle Rossana Ferreira Vaz, pelos ensinamentos, sugestões, críticas, e por compartilhar toda sua confiança em mim na construção deste trabalho.

A minha grande amiga, companheira, parceira e colega Emanuele Cardoso Dias, que depois de tantos erros, saudades, momentos de angústias, satisfações, felicidades e tristezas; mostrou-me que o carinho de uma boa amizade pode penetrar e seguir além das paredes de uma sala de aula, e nos perseguir por toda uma vida. Valeu Manuzette!

A Gérsia Gonçalves de Melo, pela amizade sincera e sadia dentro e fora da sala de aula. E pelo imenso apoio que me concedeu ao longo desses 5 anos de graduação.

Aos técnicos de laboratório Adriano Marques, Ana Paloma Tavares e Norma Maria de Oliveira, pelo apoio e ajuda na execução dos experimentos deste trabalho.

Aos meus professores de graduação Franklin Nóbrega, Jean Queiroz, Ranoel Gonçalves, Glauciane Coelho, Fabiana Pimentel, Ana Mary da Silva, Humberto Zaidan, Aldre Barros e aos demais professores a quem tive o prazer de ser aluno, meus sinceros agradecimentos por todo os ensinamentos ao longo de minha graduação.

Aos meus colegas de classe, Analu Freitas, Eudócia Carla, Fernanda Cristina, Isabella da Rocha, José Dênis, Luiz Gustavo, Maria Lúcia, Natasha Lorena, Hemerson Viana, Ozires Talysson, Rafael de Sousa, Yuri Vinícius, Vinícius Amador, Rayanne Abreu e Felipe Douglas por compartilharem junto a mim momentos inesquecíveis dentro e fora da sala de aula.

A Universidade Federal de Campina Grande e Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela disponibilidade dos laboratórios e demais materiais para a execução desse trabalho.

As excelentes pessoas que conheci e aos amigos e colegas que conquistei na cidade de Sumé e na Universidade.

A cidade de Sumé, por sua hospitalidade e por me acolher ao longo desses cinco anos de graduação. Guardarei com carinho, cada esquina, cada casa e cada aventura que conheci e vivi nesta cidade.

Aos meus parentes e demais amigos, que colaboraram com essa conquista.

Muito obrigado!

RESUMO

A invertase ou β -D-frutofuranosidase, é a principal enzima utilizada na indústria para a hidrólise da sacarose e para obtenção do xarope de açúcar invertido. Um dos métodos mais utilizados para produção de invertase é por fermentação em estado sólido (FES), assim, este trabalho objetivou-se a produção e a avaliação da atividade da enzima invertase sintetizada pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger* IOC 4003, por fermentação em estado sólido. O inóculo utilizado no processo foi uma solução de água de batata e glicose, já o substrato utilizado para a FES foi o farelo de casca de maracujá. A fermentação ocorreu em erlenmeyers contendo o meio inoculado juntamente com o substrato escolhido, onde todo o processo foi mantido sob incubação a 28°C. O período de fermentação foi de sete dias, onde a cada 24 horas uma amostra do caldo fermentado era separado das demais amostras, onde logo após foi realizado as análises do caldo. Foram determinados os níveis de atividade invertásica ao longo dos períodos da fermentação, o teor percentual de umidade do substrato, a variação do pH no caldo fermentado, o consumo do substrato e a quantificação de proteínas presentes em cada amostra enzimática referentes aos dias de fermentação pelo método de Bradford. A produção de invertase pelo *Aspergillus niger* IOC 4003 mostrou-se satisfatória por fermentação em estado sólido. Pôde-se notar também que os níveis de atividade invertásica foram aumentando durante o período em que se prolongou a fermentação, e esses níveis de atividade foram diretamente proporcionais às quantidades de proteínas encontradas no extrato enzimático para cada dia de fermentação. Os valores de pH permaneceram em níveis adequados para o crescimento do fungo, o que possibilitou a produção da enzima. A produção de enzimas por fermentação em estado sólido confere uma alternativa acessível em termos de sustentabilidade e viabilidade econômica, transformando o resíduo orgânico no produto desejado.

Palavras-chave: invertase, *Aspergillus niger* IOC 4003, fermentação em estado sólido, farelo da casca de maracujá, sustentabilidade.

ABSTRACT

The invertase or β -D-fructofuranosidase is the main enzyme used in industry for the hydrolysis of sucrose and for obtaining invert sugar syrup. One of the methods used for invertase production is by solid-state fermentation (SSF), therefore, this work aims the production and evaluation of the enzyme invertase activity synthesized by the filamentous fungus *Aspergillus niger* IOC 4003, by solid state fermentation. The inoculum used in the process was a solution of water with potato and glucose, and the substrate used for the SSF was the passion fruit shell powder. Fermentation occurred in flasks containing the culture medium inoculated with the chosen substrate, where the whole process was maintained under incubation at 28 °C. The fermentation period was seven days, every 24 hours a sample of the fermentation broth was separated from the other samples, then the analysis of the broth was carried. Were determined invertase activity levels during the fermentation, the percentage humidity of the substrate, the variation of pH in the fermented broth, substrate consumption, and the concentration of proteins in the enzymatics samples by the Bradford method. The invertase production by *Aspergillus niger* IOC 4003 was satisfactory for solid-state fermentation. It can also be noted that the invertase activity levels were increasing during fermentation, and these activity levels were directly proportional to the quantities of proteins found in the enzymatic extract for each day of fermentation. The pH values remained at normal levels for the growth of fungus, which enabled the production of the enzyme. The production of enzymes by solid state fermentation is an affordable alternative in terms of sustainability and economic viability, turning organic waste into the desired product.

Keywords: invertase, *Aspergillus niger* IOC 4003, solid state fermentation, passion fruit shell powder, sustainability.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Albumina Bovina Sérica

DNS – Ácido dinitrosalicílico

DO – Densidade ótica

FES – Fermentação em estado sólido

FOS – Frutooligossacarídeo

FSS – Fermentação em substrato sólido

GF2 – Kestose

GF3 – Nistose

GF4 – 1F-frutofuranosilnistose

HCN – Ácido cianídrico

PG – Poligalacturonase

[S] – Concentração de substrato

w – Teor percentual de umidade

U – Unidade de atividade invertásica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo da chave-fechadura para a ação enzimática da enzima invertase.....	19
Figura 2 – Classificação da enzima invertase.....	22
Figura 3 – Mecanismo de reação catalisada pela enzima invertase.....	23
Figura 4 – Características das hifas em fungos.....	27
Figura 5 – Conidióforo com vesícula. <i>Aspergillus sp.</i> , secreção pulmonar (PAS, 400X).....	30
Figura 6 – Resíduo da casca de maracujá, antes do processo de trituração.....	40
Figura 7 – Resíduo da casca de maracujá, após a trituração.....	41
Figura 8 – Meio de cultura inoculado pelo <i>Aspergillus niger</i> IOC 4003 em câmara de fluxo.....	42
Figura 9 – Recipientes contendo o substrato embebido no meio inoculado....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns tipos comuns de enzimas.....	18
Tabela 2 – Algumas propriedades da invertase externa.....	24
Tabela 3 – Comparação entre fungos e bactérias.....	26
Tabela 4 – Composição nutricional do suco de maracujá (100 mL).....	36
Tabela 5 – Taxa de nutrientes presentes <i>in natura</i> na casca de maracujá (<i>P. edulis</i> ; <i>P. flavicarpa</i>).....	38
Tabela 6 – Composição do meio de cultivo utilizado no processo fermentativo.....	42
Tabela 7 – Níveis de atividade invertásica produzidas por <i>A. niger</i> IOC 4003 em função do tempo de fermentação.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Atividade da enzima invertase (U) produzida pelo *Aspergillus niger* IOC 4003 em função do período de fermentação..... **49**
- Gráfico 2** – Comparação entre o aumento nas taxas de atividade invertásica (U) e o aumento percentual dos valores da atividade..... **50**
- Gráfico 3** – Comparação entre os valores do consumo do substrato e os níveis de atividade invertásica realizado pelo microrganismo na produção da enzima..... **52**
- Gráfico 4** – Níveis percentuais de umidade do resíduo fermentado em função do período de fermentação..... **53**
- Gráfico 5** – Variação dos valores de pH do caldo fermentado em função do tempo decorrido nos períodos de fermentação na produção de invertase..... **55**
- Gráfico 6** – Relação entre a variação nos valores de pH e os níveis de atividade invertásica na produção de invertase..... **56**
- Gráfico 7** – Relação entre a variação do pH, atividade invertásica e umidade do resíduo de substrato na produção de invertase..... **57**
- Gráfico 8** – Relação entre a quantidade de proteínas presentes nas amostras enzimáticas..... **58**
- Gráfico 9** – Relação entre os níveis de atividade invertásica juntamente com as quantidades de proteínas encontradas nas amostras enzimáticas com relação ao tempo de fermentação, na produção de invertase..... **59**

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	ENZIMAS.....	17
2.1.1	Uso e aplicações das enzimas.....	20
2.1.2	A enzima invertase.....	21
2.2	FUNGOS FILAMENTOSOS.....	25
2.2.1	O gênero <i>Aspergillus</i>	28
2.3	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	30
2.3.1	Fatores que influenciam a FES.....	32
2.3.1.1	Microorganismos usados em FES.....	32
2.3.1.2	Meio de cultura e substratos para FES.....	33
2.4	Casca de maracujá como substrato do processo.....	35
3.	OBJETIVOS.....	39
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	PREPARO DO RESÍDUO.....	40
4.2	MICROORGANISMO SELECIONADO E PREPARO DO MEIO DE CULTURA.....	41
4.3	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	43
4.4	EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA.....	44
4.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DO SUBSTRATO.....	44
4.5.1	Consumo de substrato.....	44
4.5.2	Determinação do percentual de umidade das amostras.....	45
4.5.3	Determinação do pH das amostra.....	46
4.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INVERTÁSICA PELO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES POR ÁCIDO DINITROSALICÍLICO.....	46
4.7	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR BRADFORD.....	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INVERTÁSICA.....	49

5.2	CONSUMO DO SUBSTRATO PELO MICRORGANISMO.....	52
5.3	UMIDADE DO RESÍDUO NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	53
5.4	ANÁLISE DA VARIAÇÃO DO pH NA PRODUÇÃO DE INVERTASE.....	55
5.5	ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NO DECORRER DO PROCESSO FERMENTATIVO.....	58
6.	CONCLUSÃO.....	60
7.	REFERÊNCIAS.....	62

1. Introdução

As enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico. Operando em sequências altamente organizadas, as enzimas catalisam as centenas de reações sucessivas pelas quais as moléculas nutrientes são degradadas. A energia bioquímica é então, acumulada, mantida e transformada e as macromoléculas com funções biológicas definidas são sintetizadas a partir de subprodutos precursores simples (NELSON & COX, 2002).

As enzimas estão presentes em todas as células vivas. Os microrganismos são os principais seres vivos produtores de enzimas, isto se deve a grande disposição de atividades catalíticas presente nesses seres vivos, sendo assim, existe de fato, a grande possibilidade da produção de enzimas oriundo de bioprocessos, desde que a simplicidade das exigências nutricionais sejam atendidas (BON *et al.*, 2008).

Industrialmente, a possibilidade da produção de enzimas por microrganismos tem despertado muito interesse, pois tal fato permite o controle moderado de energia, gerando menos subprodutos e resíduos indesejáveis, tornando o processo incluso em um sistema sustentável ecologicamente e ambientalmente amigável (MOURA *et al.*, 2007).

A invertase ou β -D-frutofuranosidase é a principal enzima utilizada industrialmente para a hidrólise da sacarose. A invertase trabalha agindo no terminal não redutor do resíduo β -D-frutofuranosídeo em frutofuranosídeos (MARQUEZ, 2007).

Quando se trata de bioprocessos industriais, a enzima invertase é usada para obtenção do xarope de açúcar invertido (também conhecido como xarope de glicose e frutose), este possui algumas particularidades importantes em relação ao xarope de sacarose, como maior vigor edulcorante (NOVAKI, 2009). O açúcar invertido constitui-se de uma mistura de açúcares em solução composto principalmente por glicose, frutose e sacarose residual, sendo sintetizada pela reação de hidrólise ou inversão da sacarose (MARQUEZ, 2007).

O estudo da enzima invertase possui grande importância prática. O açúcar invertido é largamente empregado na indústria de alimentos, sendo utilizado na fabricação de doces, na panificação e produtos afins, na elaboração de cremes para recheio e de geleias (NOVAKI *et al.*, 2010). Além da fabricação do açúcar invertido, a invertase possui outras aplicações relevantes na indústria alimentícia: como a produção de mel de sacarose; fabricação de licores; na obstrução da cristalização do açúcar na fabricação de sorvetes (EVANGELISTA, 2001), fabricação de produtos para higiene bucal (SAID & PIETRO,

2004), na produção de frutose cristalina (NOVAKI, 2009) e podendo ser utilizado também como adoçante de mesa (GOULART *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, uma especial e preocupante atenção tem sido entregue a diferentes alternativas que coordenem à minimização ou ao reaproveitamento dos resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. (PELIZER *et al.*, 2007). O descarte de resíduos representa um problema que vem sendo crescente ao longo dos anos devido ao aumento desenfreado da produção. Resíduos provenientes da indústria de alimentos abrangem quantidades consideráveis de casca, caroço e outros. Esses materiais, além de fonte de matéria orgânica, servem também como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e reaproveitamento (COELHO *et al.*, 2001).

Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregados (PINTO *et al.*, 2005).

Como um dos métodos mais utilizados para produção de invertase é por fermentação em estado sólido (FES), o interesse nesse tipo de fermentação para produção da enzima invertase advém de sua simplicidade de operação e da possibilidade de aproximação do crescimento natural de muitos microrganismos, principalmente fungos (SCHMIDELL, 2001).

Atualmente a enzima invertase derivada de diversos microrganismos já vem sendo estudada e descrita na literatura. Este trabalho baseia-se na produção e na avaliação da atividade da enzima invertase de *Aspergillus niger* produzida por fermentação em estado sólido, considerando a oportunidade da utilização do farelo da casca de maracujá como substrato principal do processo.

2. Revisão da literatura

2.1 Enzimas

A manutenção da vida na célula decorre da contínua ocorrência de um conjunto de reações químicas, que devem obedecer duas condições imprescindíveis: devem ter alta especificidade de tal forma a gerar produtos definidos, e devem ocorrer em velocidades ajustadas à fisiologia celular; sendo assim, a insuficiência na produção ou remoção de metabólitos pode levar a condições patológicas (MARZZOCO & TORRES, 1999).

Alberts e colaboradores (2010) nos indica que, as enzimas são moléculas extraordinárias que determinam todas as transformações químicas que formam ou quebram ligações covalentes na célula. Elas ligam um ou mais ligantes, denominados substratos, e os convertem em um ou mais produtos quimicamente modificados, fazendo isso muitas vezes em uma rapidez incrível.

A manipulação das enzimas é oriunda de tempos antigos, antes mesmo de sua função e dos microrganismos serem conhecidos, as enzimas já eram utilizadas. Um dos primeiros alimentos que se tem conhecimento, que utilizou enzimas em sua fabricação foi o pão. Pasteur, ao final do século XIX demonstrou a interação das leveduras no processo de fermentação alcoólica e o trabalho que tornou evidente a ação das enzimas nesse processo metabólico (CABRAL *et al.*, 1981).

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que demonstram propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas (NELSON & COX, 2002). As enzimas apresentam o atributo de acelerar intensamente determinadas reações químicas, tanto no sentido da síntese como na degradação de moléculas. São elas, as principais responsáveis pela eficiência da maquinaria química intracelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1997). A variabilidade dos tipos mais comuns de enzimas e suas respectivas funções podem ser vistas na TABELA 1, a seguir.

TABELA 1. ALGUNS TIPOS COMUNS DE ENZIMAS.

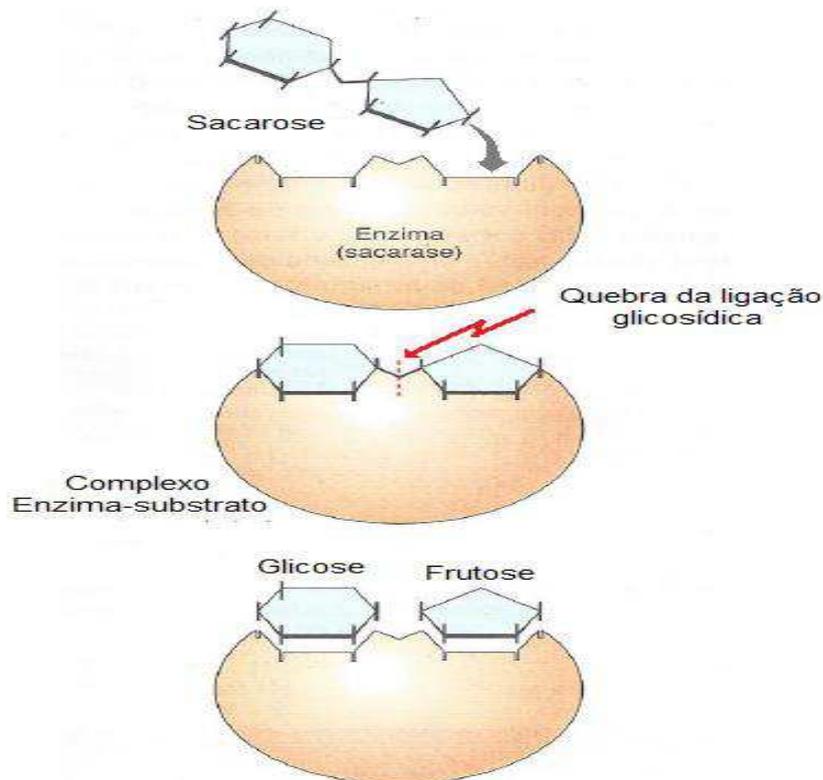
Enzima	Reação Catalisada
Hidrolases	Termo geral para enzimas que catalisam reações de clivagem hidrolítica.
Nucleases	Clivagem de ácidos nucleicos pela hidrólise das ligações entre os nucleotídeos.
Proteases	Clivagem de proteínas pela hidrolise das ligações entre os aminoácidos.
Sintases	Síntese de moléculas em reações anabólicas pela condensação de duas pequenas moléculas.
Isomerases	Catálise do rearranjo das ligações de uma única molécula.
Polimerases	Catálise de reações de polimerização como a síntese de DNA e RNA.
Cinases	Catálise da adição de grupos fosfatos a moléculas. São proteínas cinases são um importante grupo de cinases, que ligam grupos fosfatos a proteínas.
Fosfatases	Catálise da remoção hidrolítica de grupos fosfatos de uma molécula.
Óxido-redutases	Nome genérico de enzimas que catalisam reações em que uma molécula é oxidada enquanto outra é reduzida.
ATPases	Hidrólise de ATP.

Fonte: ALBERTS *et al.* (2010).

Como as enzimas aceleram as reações químicas intracelulares, frequentemente por fatores de milhões de vezes ou mais, sem que haja modificação em sua própria estrutura, as enzimas atuam como catalizadores que permitem as células fazer e desfazer ligações covalentes de forma controlada (NELSON & COX, 2002).

A partir do conhecimento básico de uma estrutura proteica, pode-se entender melhor as propriedades catalíticas das enzimas. A característica que distingue uma reação catalisada por uma enzima é a de ela ocorrer nos limites da cavidade estrutural de seu centro ativo. A superfície do centro ativo da enzima é composta com resíduos de aminoácidos cujos grupos substituintes desses aminoácidos se ligam covalentemente ao substrato específico e catalisam sua reação (NELSON & COX, 2002).

Figura 1 – Modelo da chave-fechadura para a ação enzimática da enzima invertase.



Fonte: Adaptado de AMABIS & MARTHO, (2004).

A relação espacial entre o substrato e a enzima não deve ser vista segundo um modelo rígido de chave-fechadura. Ora a proximidade e a ligação do substrato à enzima altera o balanço de forças responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional da enzima, modificando de maneira conformacional sua estrutura, a estrutura do substrato, fazendo este adquirir uma nova conformação ideal para catálise (TORRES, 2001).

2.1.1 Uso e aplicações das enzimas

As enzimas são obtidas a partir de três grandes fontes: vegetais superiores (malte-amilase, papaína, bromelina); animais superiores (pepsina, renina, enzimas pancreáticas) e microrganismos (invertase, proteases, celulasas, amilases, lipases) (PARK, 1975).

Em meados do século XX, com o crescente avanço tecnológico e científico no estudo da bioquímica findou com o início dos processos de extração de enzimas a partir de células produtoras, como as de microrganismos, que possuem a capacidade de sintetizar diversas enzimas aplicadas em vários processos industriais. Logo, as enzimas ganharam papel de destaque e de grande importância, sendo comercializadas em escala industrial atualmente (SAID & PIETRO, 2004).

Já no século XXI, os catalizadores biológicos promoveram mudanças em vários setores industriais, proporcionando melhorias e benefícios para a humanidade, de tal modo que os catalizadores sintéticos vêm sendo substituídos por enzimas biológicas em processos industriais, haja vista que elas exercem as mesmas funções, porém com várias vantagens, como por exemplo, a redução de custos com energia e tempo de produção (SAID & PIETRO, 2004).

Vale ressaltar que, no setor industrial de produção e aquisição de produtos intermediários de interesse comercial comum, os métodos utilizados no processo muitas vezes empregam catalizadores químicos, estes são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para sua manipulação possuindo também uma baixa especificidade, promovendo assim, a produção de composição mista, que muitas vezes requerem etapas posteriores de processamento e purificação (KRAJEWSKA, 2004).

As enzimas vêm sendo continuamente empregadas na melhoria de processos industriais, tais como clareamento de papel, tratamento de efluentes, produção de açúcar, bem como outros processos, no qual adotam o emprego de novas matérias-primas, grande parte de caráter renovável (BON *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2001).

Neste cenário contextual, adentro a ótica da biotecnologia, o enfoque biotecnológico apresenta-se como uma opção atraente para a exploração de enzimas em diversos tipos de reações e aplicações. Com o aparecimento da tecnologia enzimática na década de 1960, desde então, os processos enzimáticos têm sido utilizados e aplicados em diversos setores, como na elaboração de biossensores, terapia enzimática, síntese enzimática de compostos

bioativos, obtenção de biopolímeros, produção industrial comum como papel, celulose, alimentos, cosméticos, e demais aplicações (KRAJEWSKA, 2004).

Outras aplicações que promovem a produção de produtos com eficiência através do uso de enzimas são citadas por Lima e colaboradores (2001) como, por exemplo, na área farmacêutica na produção de biofármacos, na área médica para limpeza de veias e artérias para transplante, na indústria têxtil e na produção de aminoácidos além de ser matéria-prima para fabricação de detergentes.

Como citado anteriormente, as enzimas biológicas podem ser oriundas dos vegetais, animais ou microrganismos. Contudo, as enzimas provenientes dos microrganismos diferenciam-se das enzimas de animais e vegetais pelo fato de não dependerem diretamente do clima, já que essas podem ser sintetizadas em laboratórios onde existe a possibilidade de controle de todos os fatores que podem interferir na produção (SAID & PIETRO, 2004).

Logo, assim como enzimas de animais e vegetais, extratos enzimáticos de microrganismos, especialmente fungos, têm sido utilizados em diferentes processos industriais, com destaque aos processos fermentativos (RUSTIGUEL, 2009). Nesse processo, as enzimas são produzidas em meios de cultura apropriados ao crescimento do microrganismo (ROVEDA, 2007).

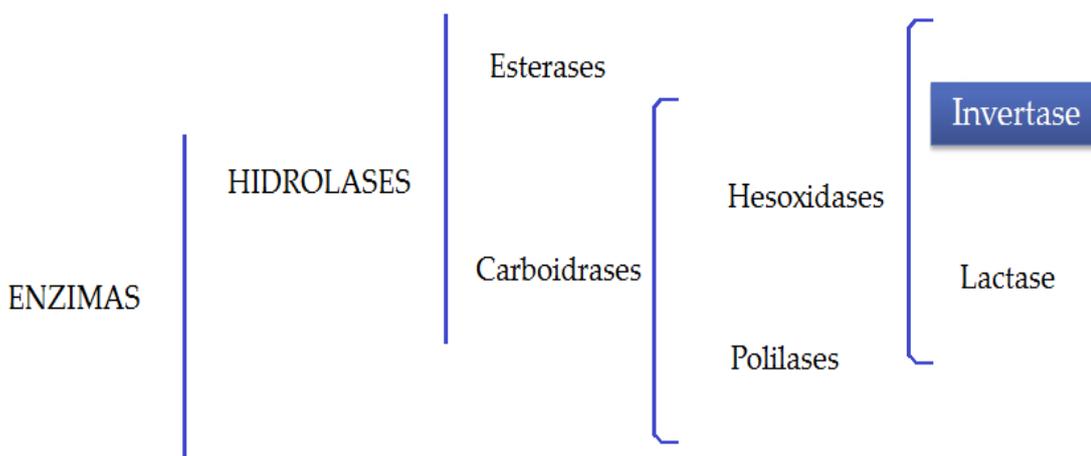
2.1.2 A enzima invertase

Desde os primeiros estudos voltados à enzimologia, a história nos faz saber que uma das primeiras carboidrases a ser objeto de estudo foi a invertase. Sua atividade foi identificada pela primeira vez em 1828 através da observação da fermentação da sacarose em meio aquoso pela levedura de panificação. Desde então, inúmeros experimentos envolvendo o uso de invertase foram desenvolvidos, tal elucidação do aperfeiçoamento do uso da invertase, favoreceu sua utilização como enzima modelo para estudos de catálise enzimática. Sua comercialização teve início no século XX, a partir daí, a enzima invertase caracterizou-se comercialmente como uma enzima multifuncional que pode ser aplicada em diversos sistemas industriais (VITOLLO *et al.*, 2004).

A invertase ou β -D-frutofuranosidase é uma carboidrase classificada na Família GH32 de glicosídeos hidrolases, que inclui mais de 370 membros de enzimas e tem sido relatados em plantas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos (PAIVA-ALEGRE, 2009).

A invertase é a enzima responsável por catalisar a hidrólise da ligação glicosídica da molécula de sacarose na porção β -D-frutofuranosidase em frutofuranosídeos (MARQUEZ *et al.*, 2007), ou seja, a invertase catalisa a hidrólise do terminal não redutor do resíduo β -D-frutofuranosídeo em frutofuranosídeos (ROCHA, 2010), agindo portanto, sobre a sacarose para formar D-frutose (que possui constituição líquida não cristalizável) e D-glicose (que é um açúcar redutor). Além disso, a invertase catalisa reações de transferência com outros aceptores além da água, resultando na formação de oligossacarídeos formados por resíduos de glicose e frutose (VICENTE, 2000). Seu nome convencional se deve ao fato de que a hidrólise da sacarose leva a inversão da rotação óptica do meio reacional, sobretudo em consequência do surgimento de frutose quando observado em polarímetro (DOS SANTOS, 2010).

Figura 2 – Classificação da enzima invertase.



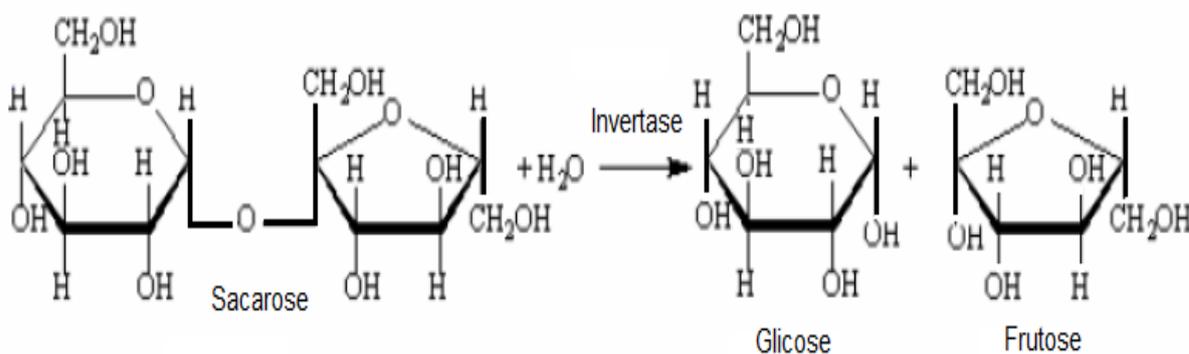
Fonte: Adaptado de BRAVERMAN, (1963) citada por EVANGELISTA, (2008).

Em processos industriais, a invertase, é utilizada principalmente na produção do xarope de açúcar invertido (xarope de glicose e frutose) (NOVAKI *et al.*, 2010). O açúcar invertido é um xarope constituído de glicose, frutose e sacarose residual, resultado da reação de hidrólise da sacarose (AKGOL *et al.*, 2001). O açúcar invertido é amplamente utilizado na indústria de confeitos, na panificação, e produtos afins, e na formulação de cremes para recheios e geleias (SAID & PIETRO, 2004). A invertase possui também como característica marcante ser mais doce que a própria sacarose devido à frutose, podendo ser utilizado diretamente como adoçante de mesa (NOVAKI *et al.*, 2010).

Em diversas aplicações industriais o açúcar invertido apresenta propriedades mais notáveis se comparado à solução de sacarose e o açúcar cristal comum, tais como: maior solubilidade, atuando como inibidores de cristalização; na fabricação de produtos com baixo teor de gordura; apresenta maior doçura do que a sacarose; apresenta alta pureza química; alto controle microbiológico; proporciona a redução das perdas, menor poluição e gastos com controle de operações (SANTANA *et al.*, 2008; ROCHA, 2010).

O modo de atuação da invertase ainda não foi totalmente esclarecido, mas estudos com a enzima têm sugerido o envolvimento de um ânion carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica da enzima (VICENTE, 2000).

Figura 3 – Mecanismo de reação catalisada pela enzima invertase.



Fonte: ROCHA, (2010).

A invertase não somente catalisa a hidrólise de sacarose formando um complexo glicose-frutose, mas em algumas situações também é capaz de catalisar a transfrutoseilação para síntese de frutooligossacarídeos (FOS) como a kestose (GF2), nistose (GF3) e 1F-frutofuranosilnistose (GF4) (NGUYEN *et al.*, 2005). Outras utilidades importantes que empregam o uso da invertase merecem ser apontados, como na fabricação de produtos de higiene bucal com o objetivo de evitar a formação de placas dentárias; na hidrólise da rafinose; no preparo de meios de cultivo para propagação de microrganismos não produtores de invertase e em biosensores (SAID & PIETRO, 2004).

Maior parte da invertase utilizada na indústria é oriunda de leveduras, cerca de 80% das enzimas são externas, os 20% restantes da invertase utilizada na indústria são intracelulares (TABELA 2) (MARQUEZ, 2007). O termo invertase intra e extracelular, é proveniente do fato de que a invertase produzida por leveduras é intracelular e a produzida por fungos é extracelular e, na maioria das vezes, são glicoproteínas contendo cerca de 10 a

50% de carboidratos. Ambas apresentam atividade catalítica semelhante, mas sua composição de aminoácidos é diferente, a invertase externa contém o aminoácido cisteína enquanto a interna não (CABRAL, 1982; VICENTE, 2000).

TABELA 2. ALGUMAS PROPRIEDADES DA INVERTASE EXTERNA.

Propriedades	Invertase externa	Invertase interna
Massa molecular (kg)	270000	135000
% de carboidrato	50	3
Atividade específica U/mg de proteína	2700	2900
K_m [mM] (sacarose)	26	25
pH – Estabilidade	3,0 – 7,5	6,0 – 9,0
pH ótimo - Atividade	3,5 – 5,5	3,5 – 5,5

U = micromol sacarose hidrolisado por minuto.

Fonte: MARQUEZ, (2007).

Invertases têm sido purificadas e caracterizadas em vários microrganismos, incluindo *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, *Aspergillus ficuum*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces species*, *Aspergillus niger* e *Schizophyllum commune* (GOULART *et al.*, 2003).

Algumas bactérias também possuem a capacidade de sintetizar invertase, a atividade invertásica foi explorada em procariotos, sendo estudado primeiramente em cianobactérias, o que permitiu a descrição do primeiro isolamento e caracterização de invertases (alcalina e neutra) neste grupo de organismos (VARGAS *et al.*, 2003).

A invertase também pode ser encontrada em invertebrados, vertebrados, algas verdes, e vegetais (SAID & PIETRO, 2004). Com relação a invertases presentes em plantas, Fotopoulos (2005) relata que existem invertases com isoformas distintas presentes principalmente na parede celular, citosol e no vacúolo. As isoformas ácidas (pH ótimo entre 4,5 a 5,5) estão presentes no vacúolo e apoplasto, enquanto que as isoformas de invertases neutras e alcalinas (pH ótimo 8,0) estão localizadas no citoplasma (HUSSAIN *et al.*, 2009).

Segundo Marquez (2007) a temperatura ideal de atuação da invertase vai depender do grau de purificação da enzima e da concentração do substrato, nesse aspecto o autor cita que já foram encontradas temperaturas entre 33 e 55°C de atuação da enzima.

2.2 Fungos filamentosos

Por muito tempo os fungos foram considerados como vegetais e, tão somente a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino a parte denominado *Fungi*. Os fungos apresentam uma agregação de características que permitem a diferenciação com as plantas: não produzem clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; não apresentam celulose na parede celular, exceto alguns fungos aquáticos e não armazenam amido como substância de reserva. Diante das características mencionadas das quais comprovam as divergências entre fungos e plantas, restam duas alternativas aos fungos para garantirem sua sobrevivência: viverem do saprofitismo ou no parasitismo. Os fungos são, portanto, heterotróficos, ao contrário das algas e das plantas que são organismos clorofilados e autótrofos. A presença de substâncias quitinosas na parede celular da maior parte das espécies fúngicas associada à capacidade de armazenar glicogênio os assemelham aos animais (TRABULSI & ALTERTHUM, 2004; OLIVEIRA, 1999).

Os fungos podem ser considerados obíquos, sendo encontrados em vegetais, animais, nos seres humanos e em abundância no solo participando dos ciclos biogeoquímicos na natureza. A dispersão dos fungos é feita na natureza por várias vias: animais, seres humanos, insetos, plantas e, principalmente, pelo ar atmosférico, através dos ventos. Outra característica interessante, é que os fungos são seres vivos eucarióticos com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos (MADIGAN *et al.*, 2004).

Todas as células fúngicas possuem núcleo com membrana celular, ou seja, são eucarióticas. Os fungos originam-se de uma única célula, ou de um fragmento da hifa, unidades com estruturas variadas. A parede celular fúngica (possui até oito camadas, mede de 200 a 350 nm) é uma estrutura compacta e rígida possuindo como principal função, a proteção contra choques osmóticos. A membrana citoplasmática nos fungos atua como bloqueio semipermeável, no transporte ativo e passivo dos materiais para fora e para dentro

da célula, sendo a membrana, formada por uma região hidrofóbica e outra hidrofílica (TRABULSI & ALTERTHUM, 2004).

TABELA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE FUNGOS E BACTÉRIAS.

	Fungos	Bactérias
Tipo de célula	Eucariótica.	Procariótica
Membrana celular	Esteróis presentes.	Esteróis ausentes, com exceção de <i>Mycoplasma</i>
Parede celular	Glicanas; mananas; quitina (sem peptídeoglicanos).	Peptideoglicana
Esporos	Esporos reprodutivos sexuais e assexuais.	Endósporos (não para reprodução); alguns esporos assexuais reprodutivos.
Metabolismo	Limitado a heterotrófico; aeróbico, anaeróbico facultativo.	Heterotrófico, autotrófico, fotoautotrófico; aeróbico, anaeróbico facultativo, anaeróbico

Fonte: TORTORA *et al.*, (2012).

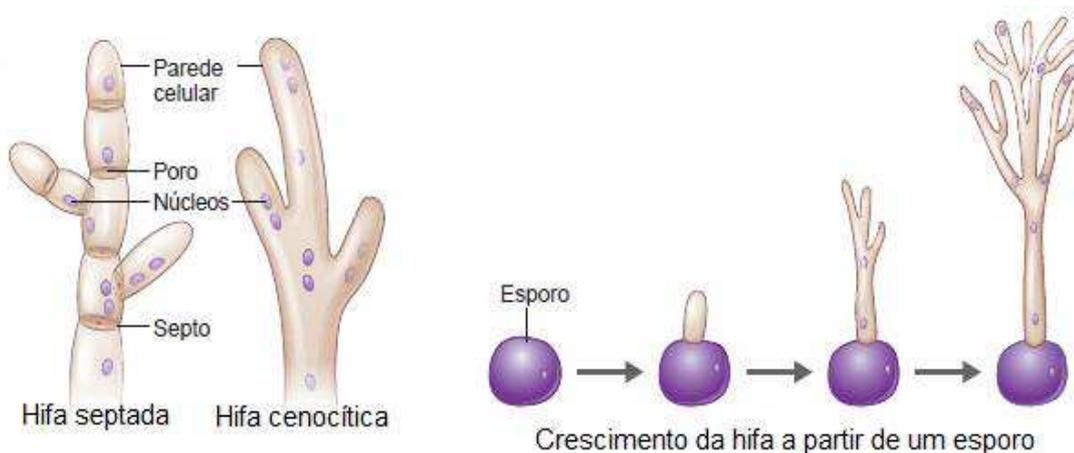
Em fungos filamentosos, o talo (corpo) consiste em filamentos longos de células conectadas; filamentos esses denominados hifas. Hifa é o nome que se usa para designar os filamentos dos fungos. Micélio é o conjunto das hifas. A hifa de um fungo diferencia-se de um filamento bacteriano (bacilos, bastonetes), porque hifa é, geralmente, ramificada, coisa que ocorre raramente em bactérias (OLIVEIRA, 1999).

Na grande maioria dos fungos filamentosos, as hifas possuem paredes cruzadas denominadas septos, que dividem as hifas em compartimentos celulares uninucleadas distintos. Essas hifas são denominadas hifas septadas. As hifas que não possuem septos e se apresentam como células longas e multinucleadas são chamadas de hifas cenocíticas. Hifas responsáveis pela captação de nutrientes são chamadas de vegetativas, já a porção envolvida com a reprodução, é denominada hifa aérea (TORTORA, *et al.*, 2012).

Os fungos filamentosos podem reproduzir-se assexuadamente pela fragmentação de suas hifas. Além do mais, fungos podem reproduzir-se tanto assexuadamente quanto sexuadamente pela formação de esporos. Os esporos assexuais são produzidos pelos fungos por mitose com consequente divisão celular. Os dois tipos de esporos assexuais são

produzidos pelos fungos, um deles é denominado conidiósporo ou conídio, um esporo uni ou multicelular que são produzidos em cadeias na extremidade do conidióforo. Tais esporos são produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* (TORTORA, *et al.*, 2012).

Figura 4 – Características das hifas em fungos. A hifa septada com os septos dividindo as hifas; a hifa cenocítica que não contém septos e o crescimento das hifas a partir do esporo.



Fonte: TORTORA *et al.*, (2012).

Alguns fungos são patogênicos, apesar de que os pilares moleculares e genéticos da patogênese bacteriana e viral sejam bem conhecidos, atualmente o conhecimento sobre a patogenicidade fúngica ainda é restrita e limitada. Poucos fungos são suficientemente virulentos para serem considerados patógenos primários, capazes de iniciar uma infecção em um hospedeiro sadio. Além disso, todos os patógenos fúngicos primários são agentes de infecções respiratórias e nenhum deles é parasita obrigatório (MURRAY *et al.*, 2011). Varo e colaboradores (2007) nos faz saber que no Brasil, a incidência de infecções fúngicas especialmente em hemodialisados vem aumentando gradativamente. E que infelizmente, o conhecimento dos fatores relacionados à epidemiologia dessas infecções ainda é pouco no Brasil.

Os fungos integram um grupo de microrganismos que vem despertando a atenção e os olhares dos microbiologistas para a prática científica. Suas manifestações são evidentes. Como geralmente ocorre em laboratórios, o meio usual para fungos contém concentrações maiores de açúcar, isso se vê naturalmente no dia-dia: quem é que nunca viu manchas verdes ou azuis crescerem sobre frutas cítricas? Ou quem nunca viu bolores brancos ou

acinzentados sobre produtos de padaria em queijos ou no presunto? Todos fazem parte de uma gama de organismos muito diversificado: o reino *Fungi* (PELCZAR JR. et al., 1996).

Os fungos filamentosos apresentam uma série de atributos que os tornam bem mais valorosos do que outros tipos de fungos, quando se trata das suas diversas aplicações, seja na medicina, indústria ou agricultura. Por exemplo, os fungos filamentosos produzem diversos produtos metabólicos, muitos de grande interesse industrial: enzimas, ácidos, álcoois, corantes, aminoácidos, antibióticos e esteróis são alguns exemplos das aplicações dos fungos filamentosos (CARVALHO, 1999).

Fungos filamentosos também têm sido utilizados em sistemas de biorremediação. Tal aplicação se deve as características inerentes a esse microrganismo, uma dessas características é a capacidade de crescer sob as condições de estresse ambiental que limitam o crescimento bacteriano. Assim o contato direto entre o fungo e o contaminante é intenso, promovendo o aumento de sua biodisponibilidade e a biodegradação subsequente (SILVA, 2009).

2.2.1 O gênero *Aspergillus*

No reino *Fungi*, o gênero *Aspergillus* é um dos gêneros mais conhecidos entre os fungos filamentosos, além de ser um dos mais bem pesquisados e estudados pela comunidade científica. Esse gênero abrange fungos de importância econômica, onde muitas espécies foram distinguidas pela morfologia tradicional das colônias. As espécies de *Aspergillus* são saprofágicas, xerófilos, aeróbicos e comumente encontrados em ambientes com altas concentrações de oxigênio (HUBKA *et al.*, 2013; GRUBEN, 2012).

Esses fungos são também amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados no solo, no ar e na água; tanto em animais, inclusive o ser humano, como em vegetais (fitopatogênicos), sendo alguns desses fungos, patogênicos oportunistas. São conhecidos também por sua capacidade de crescerem em substratos com baixa atividade de água. Apresentam geralmente coloração branca com tons amarelados. O gênero inclui cerca de 200 espécies, porém apenas 30 foram identificadas e catalogadas (HUBKA *et al.*, 2013; GRUBEN, 2012).

A diversidade de questões, temas e aplicações biotecnológicas que fungos *Aspergillus* têm levantado nos últimos anos, fez desse gênero, um dos grupos mais bem

aprofundados e estudados, entre os fungos filamentosos, quando se trata de pesquisa e investimento. As sequências do genoma de espécies como: *A. niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus carbonarius* e *A. kawachii* estão disponíveis em bibliotecas genômicas. Entretanto, espécies como: *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus zonatus*, *Aspergillus acidicus* e *Aspergillus wentii* estão atualmente em processo de sequenciamento. Em breve, a elucidação desses genomas vai proporcionar aos pesquisadores o conhecimento biomolecular dessas espécies, tais como o levantamento de novas estratégias de sua utilização em diversos setores da indústria, na medicina e no agronegócio (GRUBEN, 2012).

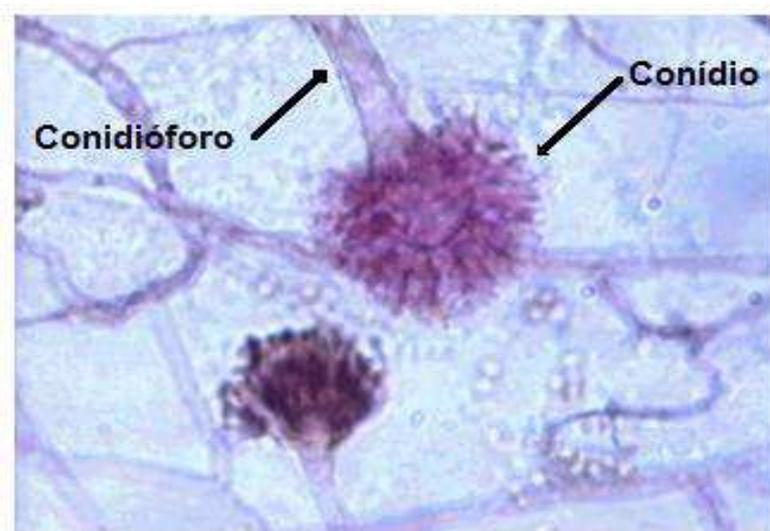
Alguns fungos do gênero *Aspergillus* apresentam aplicações de destaque não somente na produção de enzimas biotecnológicas como também na produção de metabólitos secundários. Entre as espécies conhecidas, destacam-se o *Aspergillus flavus* e o *A. parasiticus*, ambos produtores de metabólitos secundários pertencentes a classe das aflatoxinas, responsáveis por intoxicações cancerígenas em diversas espécies de animais (TANIWAKI, 2003).

Na produção de enzimas, o *A. awamori* possui destaque na síntese das enzimas, amiloglucosidase, alfa-amilase e protease (DOS SANTOS, 2006). Outro fungo do gênero bastante conhecido é o *Aspergillus niger*, além de ser empregado na produção de enzimas como a própria invertase, por exemplo, o *A. niger* também é o principal fungo produtor de enzimas pectinolíticas (OLIVEIRA, 2013), com destaque para a poligalacturonase (PG) (CASTRO, 2009). Além de enzimas, o *A. niger* também possui participação quase que exclusiva na biossíntese de ácido cítrico para utilização de indústrias de alimentos, refrigerantes e biofármacos (LEONEL & CEREDA, 1995).

Algumas espécies de *Aspergillus* são toxigênicas, algumas, por exemplo, causadoras da deterioração em grãos e sementes são capazes de se desenvolver em condições de umidade mais baixas nas sementes (CIRIO & LIMA, 2003). Outras espécies desse gênero são tóxicas ao homem, causando aspergilomas. Apesar de pouquíssimas espécies de *Aspergillus* serem patogênicas ao ser humano, infecções por *Aspergillus* tornou-se recentemente mais frequente, provavelmente em consequência do aumento do uso indevido de antibióticos, esteroides e drogas citotóxicas (GOLIN *et al.*, 1996).

As estruturas morfológicas são características imprescindíveis para a classificação dos fungos. As espécies pertencentes ao gênero de *Aspergillus* produzem o “aspergillum” ou “cabeça aspergillar”, que consiste em uma haste asseptada que termina em uma vesícula, sobre a qual nascem às células conidiogênicas (fiálides e métulas). As fiálides produzem os conídios com diferentes ornamentações e pigmentações. Uma cabeça aspergillar simples é formada por uma vesícula recoberta por células alongadas denominadas fiálides que geram os conídios, que são os esporos assexuais dos fungos filamentosos. O termo conídio significa pó, e são produzidos a partir do conidióforo (ROCHA, 2010; TORTORA *et al.*, 2012).

Figura 5 – Conidióforo com vesícula. *Aspergillus sp.*, secreção pulmonar (PAS, 400X).



Fonte: OLIVEIRA, (1999).

2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

O termo fermentação em estado sólido ou “fermentação em substrato sólido” (FSS) refere-se a sistemas microbiológicos que trabalham sobre ou dentro de uma matriz sólida onde o conteúdo líquido (substrato ou meio) associado à matriz está a um nível de atividade de água que auxilie o crescimento do microrganismo e ao mesmo tempo não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI *et al.*, 2001). Em outras palavras, a FES é o crescimento de microrganismos em material sólido onde há inexistência ou quase inexistência de água (PANDEY *et al.*, 2001).

A fermentação em estado sólido simplesmente reedita os processos microbiológicos naturais, se controlados de forma correta, sintetizam o produto de interesse. Deve-se levar

em consideração também algumas aspectos, como a seleção do microrganismo, o substrato apropriado, a otimização dos parâmetros no processo, o isolamento e a purificação do produto, entre outros fatores (COUTO & SANROMAN, 2006).

Nos dias de hoje no Brasil, a indústria alimentícia produz grande quantidade de resíduos e subprodutos; já no setor agropecuário, as atividades de processamento dos produtos gerados no campo têm ocasionado sérios problemas de poluição no solo, na água superficial e na água subterrânea. Os resíduos sólidos do setor agroindustrial são provenientes principalmente das usinas sucro-alcooleiras, matadouros e do processamento de frutas e hortaliças. Diante desse fato, estudos voltados para minimização e o reaproveitamento desses resíduos sólidos envolve o reaproveitamento de quantidades significativas de cascas, caroços, farelos e outros. Tais materiais além de fonte de matéria orgânica servem como fonte de proteínas, enzimas e outros nutrientes atrativos ao reaproveitamento (COELHO *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2011; DANTAS *et al.*, 2010).

Os resíduos do setor industrial bem como do setor agrícola, após serem gerados, necessitam de um destino apropriado, pois esse não pode ser armazenado no local em que foi produzido. A permanência desses resíduos no meio ambiente podem além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas significativas de matéria-prima e energia, exigindo assim, maiores gastos e investimentos no tratamento e controle da poluição. A preocupação com o meio ambiente levou a viabilização de projetos que levam ao uso sustentável dos resíduos oriundos de sistemas de produção industrial e agrícola (PELIZER *et al.*, 2007).

Diante desse contexto, a FES surge desempenhando um papel fundamental no aproveitamento de resíduos sólidos, dado que, em razão do crescimento microbiano, a partir desses organismos são produzidos diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, como já citado, e elevado valor agregado (PINTO *et al.*, 2005).

A FES apresenta diversas vantagens quanto a sua aplicação, devido a seus aspectos físico-químicos, destaca-se a pequena atividade de água e a formação de gradientes de temperatura, nutrientes e produtos. A heterogeneidade microscópica atuante no substrato, outrora considerado o ponto fraco da FES, hoje, esse parâmetro é considerado como a principal vantagem para o acréscimo de rendimento de produtos gerados, por causar significativas alterações fisiológicas nos microrganismos. Resumindo, a FES é um

bioprocesso que se favorece com o baixo teor de água, gerando um sistema de produção limpo e sustentável (DOS SANTOS *et al.*, 2006).

2.3.1 Fatores que influenciam a FES

Muitas vezes as condições ambientais como, pH e concentração de nutrientes podem afetar bruscamente o desenvolvimento celular e conseqüentemente a geração do produto na FES. Nesse tipo de fermentação, o controle das condições ambientais é mais complicado graças à heterogeneidade das células microbianas e da natureza do meio de cultivo e produtos na fase sólida (SANTOS, 2007). O controle de umidade, temperatura e o pH do meio, além das características do substrato são as variáveis analisadas com maior frequência quando se trata de FES (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

2.3.1.1 Microrganismos usados em FES

Em processos envolvendo FES, os microrganismos podem ser utilizados tanto em seu estado natural, como na forma de culturas puras individuais (PANDEY *et al.*, 2000). Os fungos filamentosos são os microrganismos mais adequados ao processo de FES, estes possuem a capacidade de crescer em baixos valores de atividade de água e altas pressões osmóticas. O próprio crescimento fúngico gera uma vantagem sobre microrganismos unicelulares no processo. O crescimento das hifas no desenvolvimento das espécies filamentosas permite a esses organismos uma rápida colonização dos substratos sólidos, além de uma melhor utilização dos nutrientes disponíveis (OLIVEIRA, 2013).

Os fungos do gênero *Aspergillus* apresenta um bom desempenho, quando se trata de sua utilização em processos envolvendo FES, esses fungos possuem bom crescimento em concentrações elevadas de sal e açúcar. O que remete seu bom desenvolvimento nas condições que um sistema de FES apresenta (PARIS, 2008).

Quando se trata da escolha do microrganismo apropriado para realização de um processo a partir de FES, o fungo *Aspergillus niger*, tem participação ativa em diversos trabalhos. Cepas do fungo *A. niger* são as mais utilizadas na síntese de pectinase e poligalacturonase comercial devido as suas propriedades toxicológicas (MENEZES *et al.*, 2006). Em outro trabalho realizado por Zuñiga e colaboradores (2011), o autor relata que o

A. niger é o melhor fungo filamentosos produtor de endoglicosídases, como consequência, o *A. niger* também é o melhor produtor da enzima celulase por meio de FES, além disso o *A. niger* também é reconhecido pelas elevadas concentrações de β -glicosidase.

Como em todo processo fermentativo, a seleção do microrganismo apropriado é um parâmetro chave para o sucesso da produção desejada. A α -amilase, por exemplo, pode ser sintetizada por, no mínimo, 28 tipos diferentes de culturas microbianas. Já o *Aspergillus niger* tem a capacidade de produzir até 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo do modo de operação da fermentação (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

2.3.1.2 Meio de cultura e substratos para FES

As características físico-químicas do meio de cultivo são de fundamental importância, não somente para o crescimento celular, mas também para o rendimento do produto (BON *et al.*, 2008).

É sempre muito difícil citar as características de microrganismos, sem associá-los a um determinado meio de cultivo. Algumas características relacionadas ao meio, tais como: custo; atendimento as necessidades do microrganismo; não provocar problemas na recuperação do produto, devem ser consideradas na escolha do meio de cultivo (BORZANI *et al.*, 2001).

Na FES, o meio de cultura é composto de substratos sólidos, com um determinado teor de umidade. Portanto, a água irá se tornar um fator limitante, o que não ocorre na fermentação submersa, por exemplo, (PONTES, 2009). Como na FES, o meio mais empregado caracteriza-se como “meio complexo”, esse é formado por resíduos de matéria-prima industrial e agrícola, tais como: melão, sucos de fruta ou legumes (BON *et al.*, 2008).

Na FES, os substratos mais utilizados são os produtos ou subprodutos gerados na agroindústria, esses possuem como características principais: servirem de matriz sólida e fornecer carbono e fontes de energia ao microrganismo, além disso, possuem custo relativamente baixo. O substrato deve possuir algumas características que possibilitem o maior rendimento do processo, de tal maneira que o microrganismo tenha total acessibilidade a todo meio, sendo assim, destacam-se a porosidade, tamanho e formato das partículas (PARIS, 2008; DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

A natureza do substrato sólido na FES, é o fator mais importante no desenvolvimento desse bioprocesso. Na sua seleção, devem ser considerados diversos fatores, principalmente o custo e a sua disponibilidade. As pesquisas estão voltadas para os resíduos agroindustriais a fim de selecionar substratos-padrões mais adequados à FES (DOS SANTOS *et al.*, 2006). Em geral esses substratos são os mais baratos e abundantes, além disso, são normalmente, materiais particulados, e a água presente no meio encontra-se compactada na matriz sólida, ao qual pode ser aproveitada pela cultura microbiana. Bactérias e leveduras crescem normalmente na superfície, enquanto que a estrutura de fungos filamentosos, penetra nas partículas do substrato (ROCHA, 2010).

Os materiais agrícolas, que por suas características naturais são totalmente aceitáveis ao emprego em processos de FES, são geralmente dois: celulósicos (palhas, cascas de frutas processadas, bagaços, etc) e amiláceos (batata, mandioca, banana e seus resíduos, entre outros). No caso de produtos celulósicos, o conteúdo de celulose não se encontra facilmente acessível para uso na fermentação e para seu uso, torna-se necessário o emprego de tratamentos prévios desse material antes de submetê-lo a fermentação. Os substratos amiláceos também necessitam de pré-tratamentos, no entanto são menos drásticos (DOS SANTOS *et al.*, 2006).

Além da celulose, o conteúdo nutritivo inserido no substrato inclui: hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas. A heterogeneidade apresentada pelos substratos, não se refere apenas a complexidade e as variações existentes de matéria-prima, mas também a complexidade da estrutura bioquímica de cada uma das moléculas presentes e a proporção entre essas várias moléculas, que podem divergir de acordo com cada espécie vegetal. Assim, cada substrato tem seu potencial específico, devendo ser minuciosamente analisado (PINTO *et al.*, 2005).

A escolha do substrato para um processo de FES depende do produto final que se deseja obter. Del Bianchi e colaboradores (2001) exemplifica alguns materiais passíveis de se utilizar como substrato, entre eles estão:

- ✓ farelo e palha de trigo, farinha e farelo de soja, bagaço de cana, palha de arroz para produção de enzimas;
- ✓ sorgo, bagaço de milho, maçã e uva, melão e cana-de-açúcar para produção de álcool;

- ✓ resíduos de banana, resíduos sólidos do processamento de mandioca, bagaço de laranja, melaço, vinhaça, polpa de café, polpa de batata-doce para enriquecimento proteico;
- ✓ lactose, sacarose, bagaço de cana e farelo de trigo para produção de antibióticos.

Normalmente esses substratos necessitam de um pré-tratamento para adequá-los as exigências necessárias ao crescimento e a produção do produto final pelos microrganismos. Normalmente emprega-se o esmagamento, quebra, moagem e peneiramento para adequar o meio à granulometria do processo; suplementação e correção do pH pra suprir a falta de algum nutriente e a hidrólise ácida ou alcalina de material celulósico, visando facilitar a atuação enzimática (DEL BIANCHI et al., 2001).

2.4 Casca de maracujá como substrato do processo

A primeira referência ao maracujá no Brasil foi em 1587, no Tratado Descritivo do Brasil, com “erva que dá fruto”. Porém, em 1569, Nic. Monardis foi quem descreveu a primeira espécie de maracujá, denominando-a *Plassifora*, a saber, *Plassifora incarnata* L., mas sob o nome de *Granadilla* (CUNHA, 2013).

O maracujá é nativo da América tropical, sendo mais de 150 espécies de *Plassiforaceas* utilizadas no consumo humano. Geralmente, as espécies mais cultivadas no Brasil e por todo mundo são o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), o maracujá-roxo (*Passiflora edulis*) e o maracujá-doce (*Passiflora alata*). O maracujá é uma fruta de imenso valor nutritivo. A fruta é rica em vitamina C e vitaminas do complexo B (B₁, B₂ e B₅), além de cálcio e fósforo (FIGUEIRA, 2010). Os componentes nutricionais do suco do maracujá podem ser vistos na TABELA 4. A presença desses nutrientes caracteriza o sabor azedo do maracujá. Tais nutrientes garantem o bom funcionamento do organismo de maneira geral. Alguns dos benefícios do consumo do maracujá incluem: o bom funcionamento do aparelho digestivo, equilíbrio do sistema nervoso, crescimento além de reposição e regeneração de células (CAMPOS & SANTOS, 2011).

A planta onde germina o maracujá é o maracujazeiro, trata-se de uma planta trepadeira lenhosa, de clima quente, com crescimento rápido, contínuo, vigoroso e exuberante. O maracujazeiro encontra-se em melhores condições para o seu

desenvolvimento na faixa entre 18 e 35°C, sendo que a faixa entre 21 e 25°C é considerada como a mais favorável ao crescimento da planta. Quantidades de chuva de 1.200 mm anuais, bem distribuídos na época chuvosa são mais que suficiente para o bom desenvolvimento da planta (FARIA, 2001; BORGES & LIMA, 2007; EMBRAPA, 1994).

TABELA 4. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO SUCO DE MARACUJÁ (100 ML).

COMPOSIÇÃO	MARACUJÁ	
	Amarelo	Roxo
Calorias (cal)	53,00	51,00
Proteína (g)	0,67	0,39
Gorduras (g)	0,15	0,05
Carboidrato (g)	13,72	13,60
Fibra (g)	0,17	0,04
Cinza (g)	0,49	0,34
Cálcio (mg)	3,80	3,60
Fósforo (mg)	24,60	12,50
Ferro (mg)	0,36	0,24
Vitamina A (mg)	2.410,00	717,00
Tiamina (mg)	-	-
Riboflavina (mg)	0,101	0,131
Niacina (mg)	2,24	1,46
Vitamina C	20,00	29,80

Fonte: EMBRAPA, (1994).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, seguido do Peru, Venezuela, África do Sul, Sri Lanka e Austrália. O Brasil comporta hoje cerca de 60% da produção mundial dessa fruta, com produção estimada em 664.000 toneladas, sendo que a área de cultivo corresponde a 47.032 hectares por ano. A produtividade média no Brasil gira em torno de 12 a 15 toneladas por hectare. A maior produção de maracujá no Brasil encontra-se situada nas regiões Nordeste, Sudeste e Norte, destacando-se os estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas e São Paulo (FURLANETO *et al.*, 2011; ISHIMOTO *et al.*, 2007).

Apesar de o gênero *Passiflora* ser representado por um grande número de espécies (mais de 400), a produção comercial do Brasil está limitada apenas em uma única espécie: o maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) – devido ao maior rendimento do seu fruto em suco (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Na indústria alimentícia, maracujá sofre muitas perdas durante o processamento, pois apenas 30% de todo o peso do fruto é aproveitado, parcela essa referente à polpa utilizada para extração de suco. De fato, é muito importante que um número cada vez maior de estratégias para o aproveitamento dos resíduos do maracujá seja proposto, o que apenas será possível, com o desenvolvimento de pesquisas nessa vertente. (ISHIMOTO *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Diversas propriedades funcionais da casca do maracujá têm sido estudadas nos últimos anos, especialmente aquelas que possuem teor de níveis significativos de fibras presentes. A casca do maracujá representa cerca de 52% do peso total do fruto (ISHIMOTO *et al.*, 2007). Portanto, a casca não pode ser considerada como resíduo industrial (ROCHA, 2010), dado que, baseando-se em suas características o resíduo da casca do maracujá pode ser estudado com o propósito de sua utilização na composição de matinais e barras; no enriquecimento de produtos alimentícios, como ração animal; adubo; ou matéria-prima para produção de enzimas (FERREIRA *et al.*, 2010).

As cascas são constituídas basicamente por carboidratos, proteínas e pectinas (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Com relação à casca do maracujá, essa é rica em fibras solúveis, principalmente pectina, altamente benéfica ao ser humano. Os componentes da fibra alimentar da casca do maracujá (*Passiflora edulis*) foram quantificados por Matsuura, (2005) e citado por Nascimento e colaboradores (2013) onde: 30,7% das fibras na casca do maracujá era composto por celulose; 27,8% de pectina; 1,6% de hemicelulose e 1,1% de lignina. Outros valores dos nutrientes presentes na casca de maracujá pode ser avaliado na TABELA 5.

Por outro lado, a casca de maracujá possui compostos considerados altamente tóxicos. Os aspectos toxicológicos da casca do maracujá têm sido analisados quanto à presença de glicosídeos cianogênicos, substâncias que produzem o ácido cianídrico (HCN) como produtos de sua hidrólise (NASCIMENTO *et al.*, 2013; ZERAIK *et al.*, 2010).

TABELA 5. TAXA DE NUTRIENTES PRESENTES *IN NATURA* NA CASCA DE MARACUJÁ (*P. edulis*; *P. flavicarpa*).

Nutrientes	Quantidades em 100 g de cascas
Umidade	87,64 g
Cinzas	0,57 g
Lipídeos	0,01 g
Proteínas	0,67 g
Fibras	4,33 g
Carboidratos	6,78 g
Calorias	29,91 kcal
Cálcio	44,51 mg
Ferro	0,89 mg
Sódio	43,77 mg
Magnésio	27,82 mg
Zinco	0,32 mg
Cobre	0,04 mg
Potássio	178,40 mg

Fonte: GONDIN *et al.*, (2005); citado por ZERAIK *et al.*, (2010).

Diversos trabalhos baseados na utilização da casca de maracujá como fonte de substrato para produção de enzimas têm sido desenvolvidos e descritos na literatura. Souza e colaboradores (2010); e Menezes e colaboradores (2006) trabalharam com o fungo *A. niger* na caracterização e produção, respectivamente, da enzima poligalacturonase, produzida através da FES utilizando a casca de maracujá-amarelo (*P. edulis*) como substrato. Outro trabalho que merece destaque foi à pesquisa desenvolvida por Rocha (2010) na otimização da produção de enzimas por FES, utilizando também, a casca de maracujá como substrato para o desenvolvimento microbiano do *A. niger*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a produção e a atividade da enzima invertase do fungo filamentosso *Aspergillus niger* IOC 4003 produzida por fermentação em estado sólido utilizando como substrato, o farelo da casca de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*).

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar graficamente o consumo de substrato realizado pelo microrganismo no processo fermentativo;
- ✓ Determinar os valores percentuais da umidade dos resíduos do substrato na produção da enzima;
- ✓ Determinar os valores do pH para cada coleta da amostra enzimática e sua influencia na produção da mesma;
- ✓ Quantificar as amostras líquidas de enzimas com teores de proteínas desconhecido pelo método de Bradford;

4. Material e métodos

4.1 Preparo do resíduo

A metodologia descrita a seguir foi desenvolvida por Rocha (2010) para o preparo do resíduo e inóculo do microrganismo. O desenvolvimento do trabalho foi conduzido em fermentação em estado sólido, e o meio de cultivo selecionado para a obtenção da enzima foi o resíduo da casca de maracujá.

Figura 6 – Resíduo da casca de maracujá, antes do processo de trituração.



Foto: Emanuele Cardoso

Antes da obtenção do farelo do resíduo, as cascas de maracujá foram recobertas com filme de PVC para conservação do substrato. Em seguida, as cascas foram armazenadas sob refrigeração em geladeira a 5°C.

As cascas de maracujá foram picadas, em pedaços de aproximadamente 3 cm e secas em estufa térmica por um período de 3 dias, sob temperatura de $35\pm 3^{\circ}\text{C}$. Após o período de secagem, as cascas de maracujá foram trituradas em um moinho de facas tipo cróton. O farelo foi novamente armazenado (5°C) em recipiente cuidadosamente fechado. Posteriormente, o substrato foi autoclavado com o objetivo de evitar contaminações.

Figura 7 – Resíduo da casca de maracujá, após a trituração.



Foto: Emanuele Cardoso

4.2 Microrganismo selecionado e preparo do meio de cultura

O microrganismo selecionado foi o *Aspergillus niger* IOC 4003, adquirido na coleção de culturas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os esporos da linhagem selecionada foram conservados em tubos de ensaio devidamente fechados com tampões de algodão envoltos com gaze e papel grosso.

O meio preparado para realização do inóculo foi uma solução de água de batata e glicose. Os valores dos componentes do meio de cultivo e suas respectivas quantidades estão expressos na Tabela 8. O meio foi adicionado em um erlenmeyer de 1L de volume, o pH da solução foi ajustado para 5 com a adição de tampão acetato. Em seguida, este foi tampado com tampão de algodão envolto por gaze e papel grosso. Por fim, o meio foi autoclavado durante 20 minutos a 1,0 atm. O meio foi mantido armazenado sob refrigeração a uma temperatura de $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ antes de proceder com o inóculo.

TABELA 6. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO UTILIZADO NO PROCESSO FERMENTATIVO.

COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA REALIZAÇÃO DO INÓCULO	
Componente	Quantidade
Batata inglesa	200g
Água destilada	1 L
Glicose	20g

Os esporos da cepa de *A. niger* foram retirados do tubo de ensaio por meio da utilização de alça de platina, em seguida, o conteúdo microbiológico foi inoculado no meio de cultura previamente preparado e esterilizado. Todo o processo de inoculação do microrganismo foi realizado em câmara de fluxo devidamente limpa e esterilizada. O meio inoculado foi mantido em repouso por 48 horas em temperatura ambiente de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Figura 8 – Meio de cultura inoculado pelo *Aspergillus niger* IOC 4003 em câmara de fluxo.

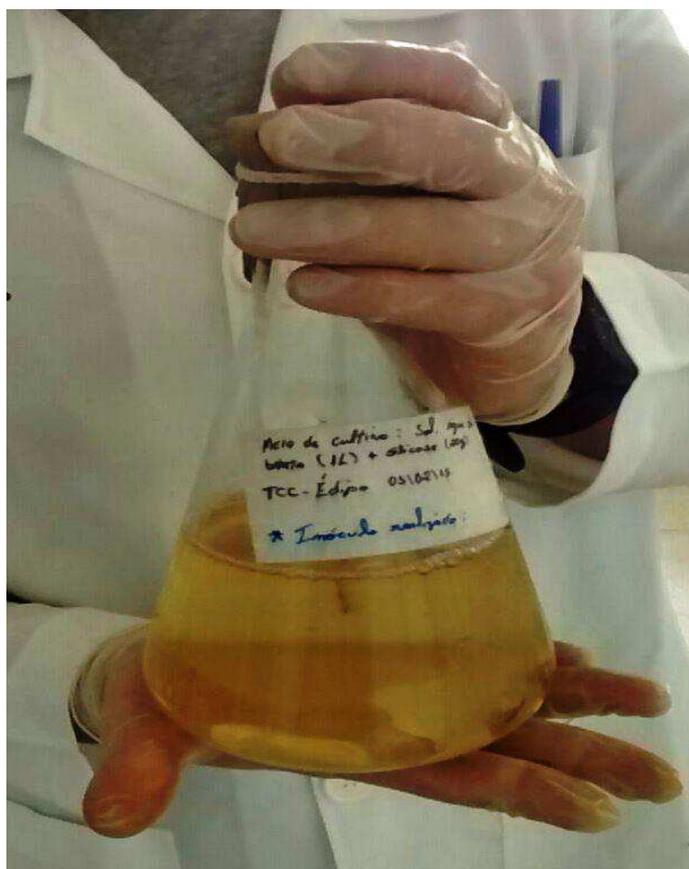


Foto: Emanuele Cardoso

4.3 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação foi realizada em erlenmeyers de 250 mL de volume contendo 3g do conteúdo composto pelo farelo da casca de maracujá. Os resíduos da casca de maracujá foram autoclavados previamente (20 minutos; 1,0 atm) antes da execução da fermentação.

Os resíduos do substrato foram hidratados com 100 mL do meio inoculado previamente na câmara de fluxo. A fermentação ocorreu em períodos subsequentes de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas (7 dias), sendo que a cada 24 horas um erlenmeyer foi descartado e separado dos demais recipientes para posterior análise da solução com a finalidade de determinar a atividade enzimática. A incubação ocorreu em estufa bacteriológica com temperatura ajustada para $28\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Figura 9 – Recipientes contendo o substrato (3g do farelo da casca do maracujá) embebido no meio inoculado.

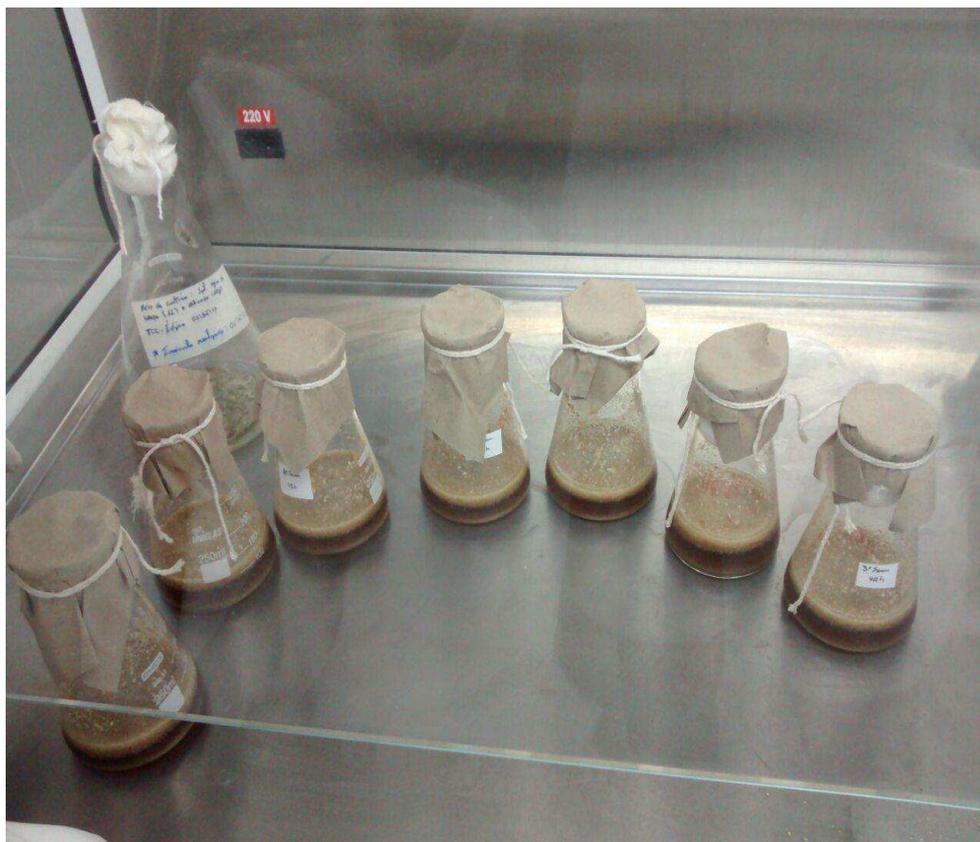


Foto: Emanuele Cardoso

4.4 Extração enzimática

Após a incubação o conteúdo enzimático foi obtido pela adição de 200 mL de água destilada gelada e 4ml de *twen* 80. Posteriormente, a solução foi agitada manualmente com um bastão de vidro por 5 minutos. Posteriormente, a solução foi filtrada a vácuo para em funil de Buchner com papel de filtro qualitativo remoção dos resíduos da amostra (ROCHA, 2010).

4.5 Caracterização físico-química e determinação do consumo do substrato

4.5.1 Consumo de substrato

O modelo selecionado para determinação do consumo do substrato na fermentação é citado por Tortora e colaboradores (2012) e foi desenvolvido por Melo e colaboradores (2014). O processo de monitoramento e determinação do consumo de substrato pelo microrganismo baseou-se em estimar a turbidimetria (determinação da absorbância) do caldo fermentado a cada período de fermentação. Para isso, foi construída uma curva de calibração do meio de cultivo utilizado, para determinação do substrato consumido pelo microrganismo.

Antes da execução da fermentação das sete amostras contendo o meio inoculado com o substrato; preparou-se uma nova solução contendo 30 mL do mesmo meio de cultivo utilizado na FES e os mesmos 3g do substrato também utilizado na FES. Resumindo, a solução preparada foi à mesma utilizada na FES, porém sem o inóculo no meio de cultura. A essa solução, foi dada o nome de solução-mãe, e foi preparada para construção da curva de calibração para determinação do consumo do substrato.

A partir da solução-mãe foram preparados mais 6 alíquotas com 5 mL de solução contendo a solução-mãe diluídas em água destilada. As concentrações de cada alíquota variaram de acordo com a diluição na solução-mãe. A variação das concentrações ocorreu num intervalo entre 0g/mL (solução contendo apenas o meio de cultura) a 0,1g/mL (solução-mãe).

A densidade ótica (DO), também denominado de “absorbância”, foi medida para cada solução referente às alíquotas diluídas. A DO foi medida em espectrofotômetro

ajustado para 480nm. A partir dos valores obtidos após a DO, foi construído uma curva de calibração para o consumo do substrato. Com a plotagem do gráfico, foi obtida a equação da reta que auxiliou na determinação do consumo do substrato na fermentação.

Após cada 24 horas do processo fermentativo, antes de proceder com a filtragem do caldo fermentado, foram coletados 5 mL desse mesmo caldo e em seguida foi medido a absorvância do mesmo em espectrofotômetro (480 nm). Os resultados foram anotados e aplicados na equação da reta resultante da curva de calibração gerada pela solução-mãe. A partir dos resultados coletados, foi possível a determinação do consumo de substrato pelo microrganismo.

4.5.2 Determinação do percentual de umidade das amostras

Na execução desta etapa, coletou-se 2 mL do caldo extraído da fermentação e transferidos para 2 eppendorfs (1,0 ml para cada eppendorf), previamente autoclavados, pesados e identificados de acordo com o período de horas correspondente ao tempo de fermentação.

O extrato foi centrifugado por 10 minutos a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ em rotação máxima. Ao término da centrifugação, a massa foi separada do sobrenadante e esta foi cuidadosamente pesada para determinação da massa úmida da amostra (M_t). Em seguida, após a pesagem, o eppendorf contendo a massa úmida da amostra foi secado em estufa a 90°C para a determinação da massa seca (M_s). O sobrenadante separado, foi cuidadosamente armazenado em tubo falcon para posterior análise do pH.

A determinação do teor de umidade para cada amostra de resíduos após a FES baseou-se na análise das massas dos resíduos úmidos (após a centrifugação) e dos resíduos secos (JÚNIOR, 2012). Os valores em % foram determinados pela Eq. 4.1, a seguir.

$$w = (M_w / M_s) \cdot 100 (\%) \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Sendo:

w : Teor de umidade (%)

M_w : Massa da água da amostra ($M_w = M_t - M_s$) em g

M_s : Massa seca referente a cada amostra (nesse caso as médias das M_s 's) (g)

Mt: Massa total referente as amostras úmidas/antes da secagem (nesse caso as médias das *Mt's*) (g).

4.5.3 Determinação do pH das amostras

A determinação do pH para cada coleta da amostra foi realizada pela análise do sobrenadante resultante após a centrifugação do extrato fermentado correspondente a cada período de coleta. O pH foi mensurado em pHmetro digital devidamente calibrado. Os dados do pH para cada período de coleta foram analisados e expressos graficamente.

4.6 Determinação da atividade invertásica pelo método de determinação dos açúcares redutores por Ácido dinitrosalicílico (DNS)

O método DNS, aborda um método colorimétrico para quantificação de açúcares redutores que envolve a reação da amostra com a participação do reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) quando submetido à temperatura de 100°C por 5 minutos (FONTES, 2009). O método DNS promove a redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e, simultaneamente, na oxidação do grupo aldeído ou cetônico a grupos carboxílicos, com o desenvolvimento da cor laranja-marrom intensos (ROCHA, 2010).

Para formação do reagente DNS, foi necessário a adição de 2,5g de DNS a uma solução de hidróxido de sódio, seguida da adição de uma solução contendo tartarato duplo de potássio e sódio (75g) em água destilada (125 mL), sob aquecimento constante (50°C).

Para determinação das concentrações de açúcares foi construída uma curva padrão de calibração a partir de uma solução padrão de glicose que posteriormente foi diluída em alíquotas com concentrações conhecidas (100 a 700mg/L). A curva padrão é baseada na análise dos valores da absorvância das soluções de mistura entre solução de glicose e DNS, previamente preparadas. Com a determinação da curva padrão, pôde-se determinar o fator de concentração (Eq. 4.2) a partir do coeficiente angular da reta ajustada.

$$\text{Fator de concentração} = \frac{1}{\text{Coef. angular da reta ajustada}} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

A análise da atividade invertásica foi realizada a partir da incubação das amostras enzimáticas (100 µL de amostra enzimática; 500 µL de solução de sacarose 0,1M e 400 µL de tampão acetato 100mM, pH:5,0) a 30°C por 30 minutos em estufa, seguido da adição de 1 mL do reagente DNS para paralização da reação. Uma solução “branco” baseada na solução das amostras enzimáticas também foi preparado, visando evitar uma superestimativa da atividade da enzima. Os grupos redutores foram determinados pela leitura da absorbância em espectrofotômetro (540 nm) das amostras enzimáticas juntamente com a posterior leitura da absorbância da solução “branco” (MOURA *et al.*, 2007).

Uma unidade (U) de atividade de invertase é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de grupos redutores, medidos como glicose, por minuto, nas condições de reação utilizadas. Portanto, os valores da atividade invertásica (U) podem ser definidos pela *Eq. 4.3*:

$$\text{Invertase (U)} = \frac{(\text{Abs. da amostra} - \text{Abs. do branco}) \times \text{Fator de conc.} \times \text{Diluição}}{540} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Onde:

Abs. da amostra: Absorbância da amostra;

Abs. do branco: Absorbância do branco correspondente;

Fator de conc.: Fator de concentração da curva padrão de glicose (mg/L);

Diluição: Diluição do extrato enzimático (se a amostra não for diluída não é necessário adicionar essa variável a equação);

540: fator de conversão para atividade (u.m.ab⁻¹ x min⁻¹).

Os dados referentes à atividade invertásica foram coletados e uma curva de atividade enzimática foi construída graficamente analisando os níveis de atividade enzimática correspondentes a cada amostra coletada em função do tempo de fermentação.

4.7 Quantificação de proteínas por Bradford

Para a determinação da concentração de proteínas presentes nas amostras enzimáticas referentes aos períodos de fermentação, preparou-se uma curva de calibração utilizando

Albumina bovina Sérica (BSA) (Sigma-A3059) como proteína padrão. A curva de calibração foi construída a partir da leitura da absorbância (280 nm) de sete soluções padrão de concentrações conhecidas, elaboradas a partir da solução principal contendo o BSA.

A partir da reta de calibração, obteve-se a equação e o coeficiente de correlação para as sete concentrações de BSA, para a determinação da concentração de proteínas nas amostras enzimáticas.

A determinação da concentração de proteínas em soluções enzimáticas pelo método de Bradford baseia-se no fato do corante ácido Croomassie Brilliant Blue G 250 (principal constituinte do reagente Bradford) ter uma cor vermelha, que muda para azul quando está ligado a uma proteína (BRADFORD, 1976).

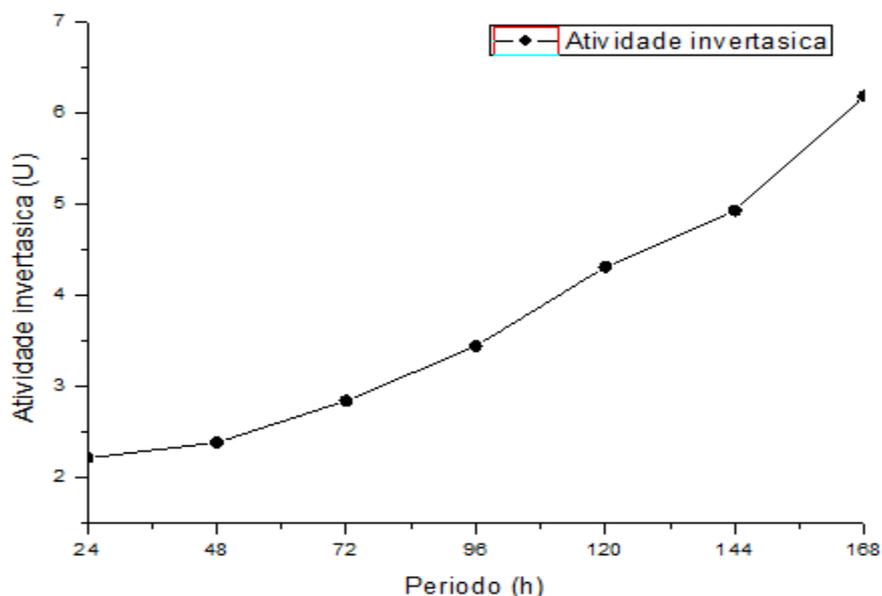
Para indicação das concentrações de proteínas nas amostras, misturou-se 500 µL do reagente Bradford com 500 µL da solução enzimática e leu-se a absorbância em espectrofotômetro (595 nm), contra um branco (500 µL do reagente Bradford com 500 µL de água destilada). Após a determinação dos valores das absorbâncias, foi descontado o valor do branco das demais soluções. A leitura das absorbâncias foi realizada contra água destilada, e a partir da absorbância, foi possível calcular as concentrações de proteínas presentes nas amostras enzimáticas com o auxílio da equação obtida da curva de calibração construída previamente a partir da solução contendo BSA.

5. Resultados e Discussão

5.1 Determinação da atividade invertásica

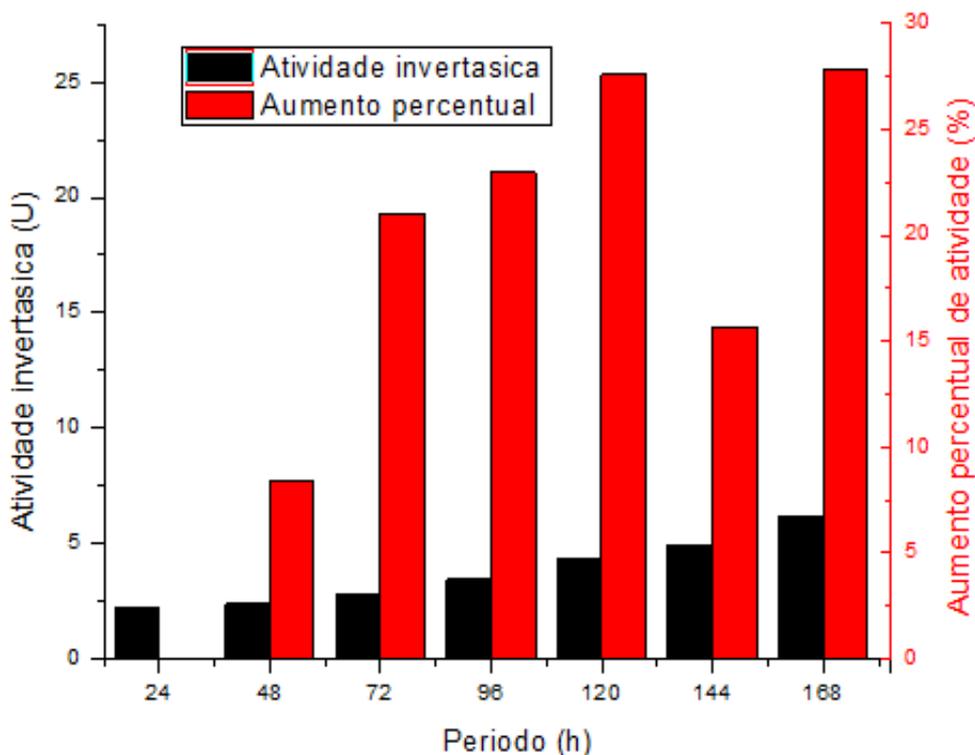
Diante dos resultados obtidos em cada período de fermentação, obteve-se uma taxa média de atividade invertásica de 3,75 U/dia (Figura 5.1), comprovando assim o crescimento do fungo no meio utilizado.

Gráfico 1 – Atividade da enzima invertase (U) produzida pelo *Aspergillus niger* IOC 4003 em função do período de fermentação.



Pode-se notar no Gráfico 1, que a cepa de *Aspergillus niger* utilizada no experimento produziu a enzima de interesse. Nota-se também que os valores da atividade da enzima foram crescentes ao longo dos sete dias em que se prolongou a fermentação, onde se obteve uma média de elevação nos valores de atividade enzimática de aproximadamente 19% por dia de fermentação (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Comparação entre o aumento nas taxas de atividade invertásica (U) e o aumento percentual dos valores da atividade.



Como mostrado anteriormente no Gráfico 1, houve aumento nos níveis de atividade invertásica ao longo dos sete dias de fermentação. O Gráfico 2 mostra que esse aumento nos níveis de atividade, é comprovado pela elevação diária dos valores percentuais dos níveis de atividade, pode-se observar que apenas no período entre o 5º e o 6º dia de fermentação (120-144h) houve diminuição nos níveis percentuais de elevação dos valores de atividade enzimática.

É evidente que a produção da enzima invertase foi satisfatória para a utilização do *Aspergillus niger* IOC 4003 no estudo em questão, contudo, há de se discutir que, diante dos resultados expostos no Gráfico 1, os níveis de atividade não ultrapassaram a escala de 7 unidades de atividade (U) (TABELA 7). O que torna relevante a discussão sobre a efetividade da casca de maracujá como substrato na produção de invertase por *A. niger*, já que os níveis de atividade não foram tão elevados quando comparados ao experimento desenvolvido por Rocha (2010) em que a casca de maracujá não foi utilizada como substrato principal no processo.

TABELA 7. NÍVEIS DE ATIVIDADE INVERTÁSICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

Microorganismo: <i>Aspergillus niger</i> IOC 4003	
Período de fermentação (h)	Atividade invertásica (U)
24	2,21
48	2,38
72	2,84
96	3,44
120	4,31
144	4,93
168	6,10

Com base em estudos realizados por Rocha (2010), pode-se observar que produção das enzimas invertase, amilase, protease, pectinase e celulase, por três cepas diferentes de *Aspergillus niger* utilizando em proporções iguais o farelo de arroz e de maracujá como substratos no processo. Entretanto pode-se concluir que a produção de invertase foi mais acentuada quando houve aumento nas concentrações de resíduo de arroz, do que para maiores concentrações de casca de maracujá.

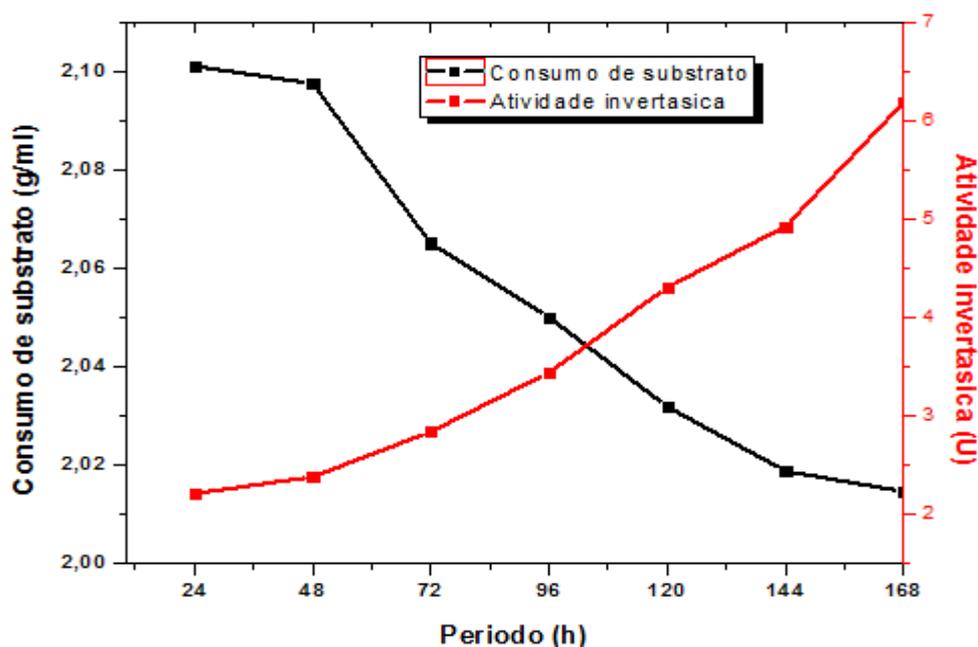
O processamento dos resíduos da casca de maracujá resultou em um farelo bastante fino e de tamanho muito pequeno, o modo de preparo do substrato para sua utilização no processo fermentativo pode ter sido um fator limitante na produção da enzima invertase bem como sua influencia nos níveis de atividade invertásica expostos anteriormente.

O tamanho das partículas do substrato no meio de cultura utilizado é um aspecto importante que possui relação com os níveis de atividade enzimática. O tamanho do resíduo do substrato e sua forma são extremamente importantes em um processo fermentativo. Esses aspectos afetam a relação área superficial e o volume da partícula (MITCHELL *et al.*, 2000). Geralmente, partículas menores do substrato proporcionam uma área superficial maior para o microrganismo. Contudo, uma partícula muito pequena de substrato pode interferir na respiração microbiana, podendo resultar em pouco crescimento. Já partículas maiores proporcionam maior aeração devido aos espaços vazios entre as partículas, porém limitam a superfície para o ataque microbiano (PANDEY *et al.*, 1999).

5.2 Consumo do substrato pelo microrganismo

Diante do Gráfico 3, é evidente que o consumo do substrato pelo microrganismo foi satisfatório quando comparado com os níveis de atividade invertásica.

Gráfico 3 – Comparação entre os valores do consumo do substrato e os níveis de atividade invertásica realizado pelo microrganismo na produção da enzima.



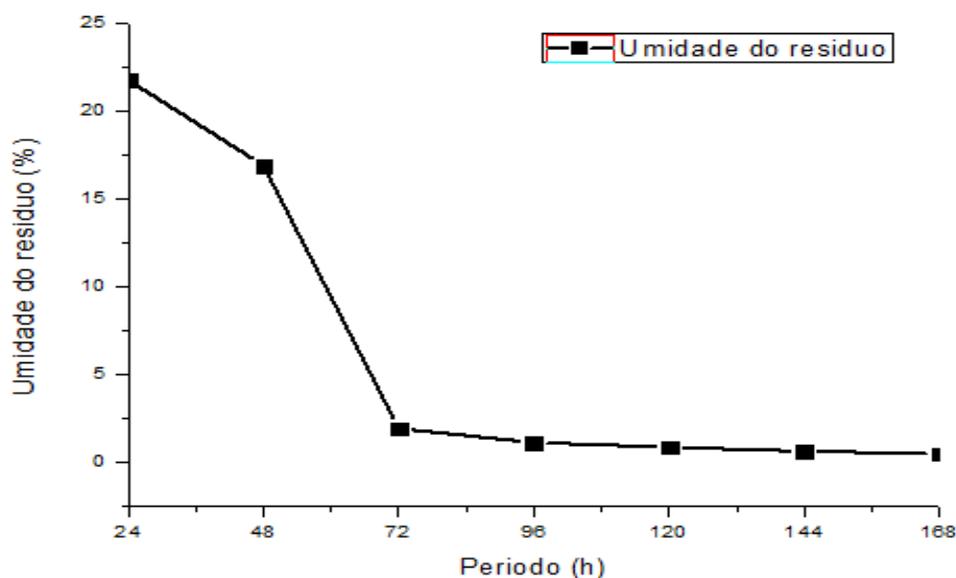
Torna-se evidente a partir do Gráfico 3, que há uma relação inversamente proporcional entre o decréscimo da concentração de substrato presente no meio fermentativo e o aumento constante nos níveis de atividade enzimática. Pode-se notar que, à medida que os níveis de concentração do substrato foram reduzindo diariamente devido ao seu consumo pelo microrganismo, o resultado é o aumento constante nos níveis de atividade invertásica.

Pode-se notar também, que, apesar do período de fermentação ter sido finalizado após 7 dias de processo, os níveis de atividade invertásica continuariam aumentando de modo menos expressivo em decorrência da presença de quantidades consideráveis de substrato (menos de 2,02 g/mL) no período de 168h (7º dia), até o ponto onde a quantidade de substrato não fosse mais suficiente para o crescimento microbiano, com consequente queda nos níveis de atividade invertásica.

5.3 Umidade do resíduo na produção enzimática

O teor de umidade presente no meio de cultivo é uma das principais variáveis que influenciam em um processo fermentativo em estado sólido. A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá apresentar (PARIS, 2008).

Gráfico 4 – Níveis percentuais de umidade do resíduo fermentado em função do período de fermentação.



Nota-se no Gráfico 4, que o nível percentual de umidade nas primeiras 24 horas de fermentação foi de aproximadamente 22%, que está dentro dos padrões normais para processos fermentativos em estado sólido, já que os valores percentuais normais para fermentação em estado sólido variam entre 18 e 85% (DEL BIANCHI *et al.*, 2001, citado por PARIS, 2008).

Do Gráfico 4 pode-se notar também que os níveis percentuais de umidade decresceram drasticamente a níveis bastante baixos ao longo dos 7 dias de fermentação. Nota-se que nas primeiras 48 horas o teor de umidade do resíduo fermentado decresceu 5%, um decréscimo relativamente brando quando comparado com a queda brusca do teor percentual de umidade após 72 horas de fermentação, onde o teor percentual de umidade decresceu para aproximadamente 2,5%. A partir desse período, a queda nos níveis percentuais de umidade permaneceu constante até 168 horas do período de fermentação,

onde o teor percentual de umidade no ultimo período de fermentação permaneceu pouco acima de 1%.

Níveis de umidade muito altos resultam numa diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio e aumento no risco de contaminação. Um substrato umedecido em níveis ideais para desenvolvimento do microrganismo e síntese do produto desejado deve possuir um filme superficial de água que proporcione a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio. Contudo, entre as partículas de substrato deve haver espaços que permitam a difusão de gases e dissipação de calor. Assim, se os níveis de umidade forem elevados, as trocas gasosas entre as partículas do substrato irão diminuir e a temperatura interna do meio fermentado irá aumentar. Em contrapartida, baixo níveis de umidade levam a um crescimento microbiano baixo em relação ao ideal (PARIS, 2008; OLIVEIRA, 2013).

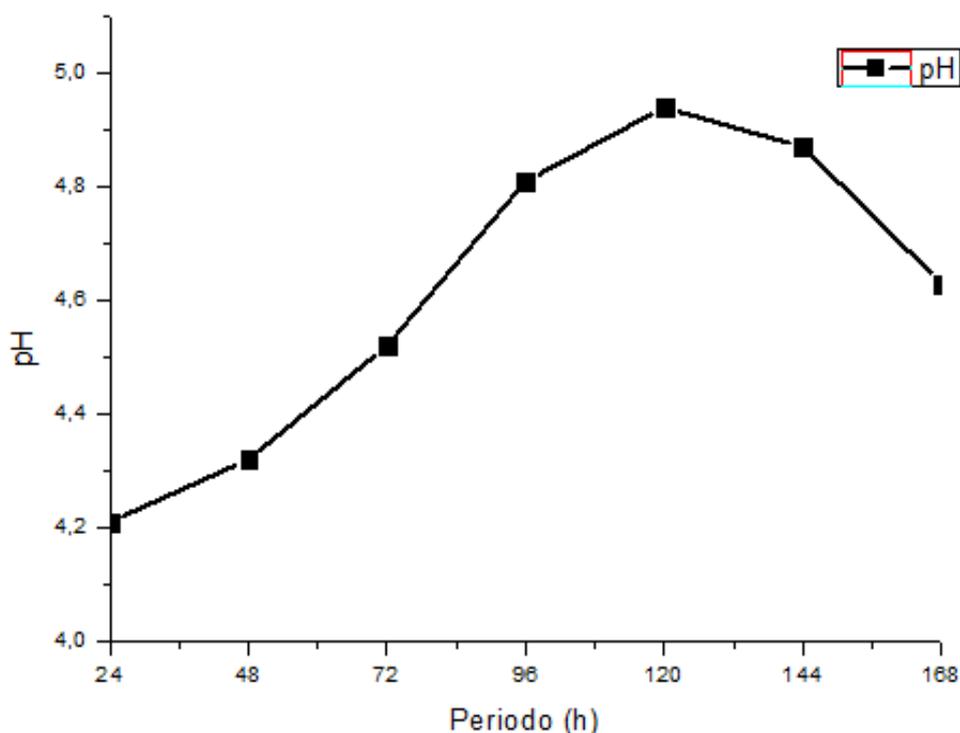
Apesar dos baixos níveis percentuais de umidade apresentados no Gráfico 4, a umidade ótima para o cultivo do microrganismo em FES é dependente da capacidade do substrato em reter água. Oliveira (2013), nos faz saber que o nível de umidade ideal para o cultivo de *A. niger* em arroz é de 40%, enquanto a polpa de café é de 80%. Tais resultados expõe a incerteza de usar a umidade como variável para análise do crescimento microbiano.

Conforme já citado, as cascas de maracujá foram processadas em moinho de facas resultado em um farelo em forma de pó bastante fino e de baixíssima densidade. Desse modo, como a umidade é dependente da capacidade do substrato em reter água, as partículas muito pequenas do substrato podem ter ocasionado sua aglomeração, interferindo na baixíssima retenção de água, tendo como consequência um crescimento celular abaixo dos padrões normais.

5.4 Análise da variação do pH na produção de invertase

Os valores da variação dos valores do pH para cada período do processo fermentativo está expresso no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Variação dos valores de pH do caldo fermentado em função do tempo decorrido nos períodos de fermentação na produção de invertase.



A leitura do pH realizada no caldo fermentado a cada período de fermentação é um fator importante no crescimento microbiano e na produção da invertase. Porém essa variável não é fácil de ser controlada já que a fermentação realizada foi em estado sólido. O primeiro e único controle do pH realizado no experimento foi o ajuste do meio de cultivo ao pH 5,0 com a adição de tampão acetato. Esse valor de pH ajustado ao meio de cultura, é o mais apropriado ao crescimento de fungos em processos fermentativos (OLIVEIRA, 2013).

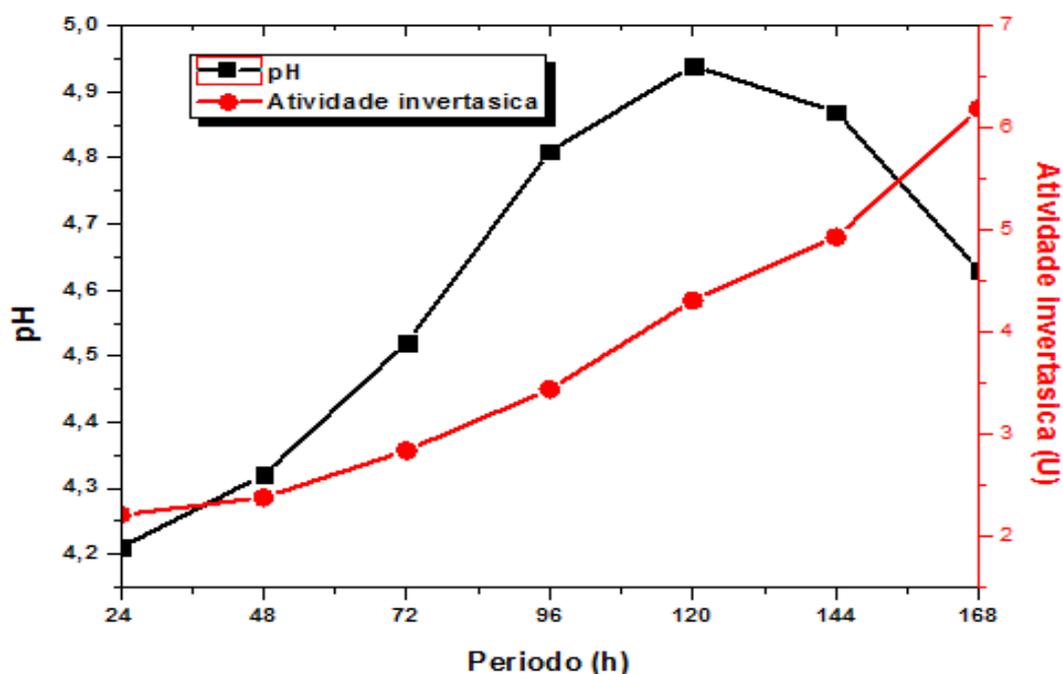
Apesar da dificuldade de monitoramento e controle dos valores do pH em processos envolvendo FES, o Gráfico 5 mostra que os valores de pH para as 168 horas que abrangeram o processo fermentativo esteve entre 4,0 e 5,0. Pode-se observar que, nas primeiras 24 horas de fermentação, a leitura do pH do caldo fermentado apresentou um valor de 4,2. Os valores

de pH foram crescendo ao longo do processo fermentativo, até o ponto de 120 horas (5º dia), onde nesse intervalo foi encontrado o valor mais elevado no pH de 4,8. Nos pontos que abrangeu 144 e 168 horas de fermentação, os valores no pH decresceram, porém permaneceram em níveis adequados para o crescimento do fungo, onde no último período de fermentação, o valor encontrado para o pH foi de 4,6.

Com base em estudos realizados por Oliveira (2013), os fungos preferem pH baixo para manutenção do seu metabolismo nos padrões ideais. Tal informação é comprovada por CASTILHO (1997), que ressalva o fato de que os valores de pH ótimo para produção de enzimas por *Aspergillus niger* são relativamente baixos, variando entre 4,0 e 5,0.

O Gráfico 6 expõe a relação entre a variação do pH no meio, e os níveis de atividade invertásica para produção de invertase pelo fungo *Aspergillus niger* IOC 4003, utilizado no processo. Repare que o aumento nos níveis de atividade podem ser comprovados pela manutenção do pH em valores adequados para o crescimento do microrganismo utilizado.

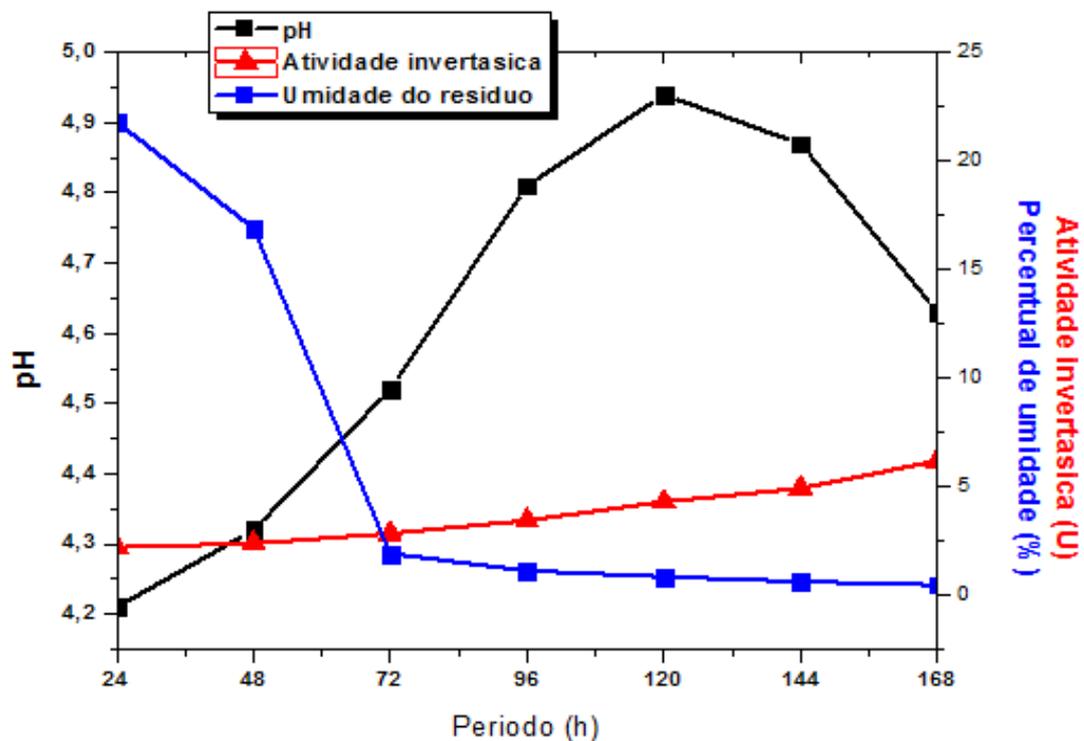
Gráfico 6 – Relação entre a variação nos valores de pH e os níveis de atividade invertásica na produção de invertase.



Pode-se notar que, diante da manutenção dos valores do pH nos padrões ideais para o desenvolvimento do *Aspergillus niger* no meio de cultivo selecionado (entre 4,0 e 5,0), tal fato culminou com o favorecimento da produção da enzima invertase pelo fungo estudado, o que é comprovado pelo aumento constante nos níveis de atividade invertásica.

A relação entre a variação do pH com os níveis de atividade enzimática e a taxa percentual de umidade para o resíduo de substrato pode ser vista no Gráfico 7. Pode-se reparar que mesmo mantendo os valores de pH em níveis ideais, o aumento nos valores da atividade enzimática foi constante, porém em valores abaixo do esperado quando comparado com o trabalho desenvolvido por Rocha (2010). O que pode ser explicado pelo baixo teor percentual de umidade no meio.

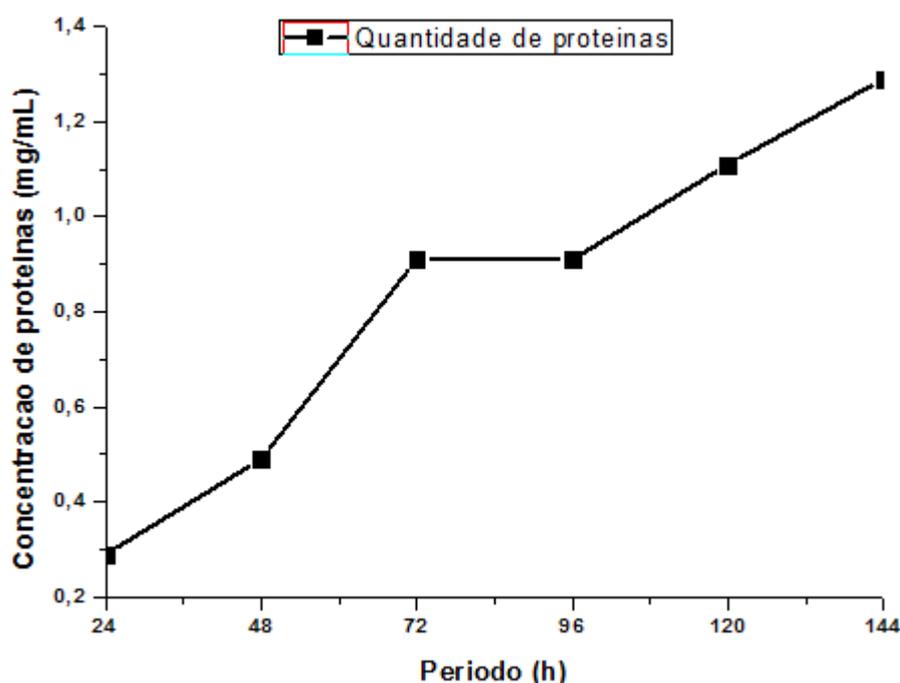
Gráfico 7 – Relação entre a variação do pH, atividade invertásica e umidade do resíduo de substrato na produção de invertase.



5.5 Análise da concentração de proteínas no decorrer do processo fermentativo

Os valores das concentrações (mg/ml) de proteínas presentes nas amostras enzimáticas referentes a cada período de fermentação, estão expostas na Gráfico 8.

Gráfico 8 – Relação entre a quantidade de proteínas presentes nas amostras enzimáticas.

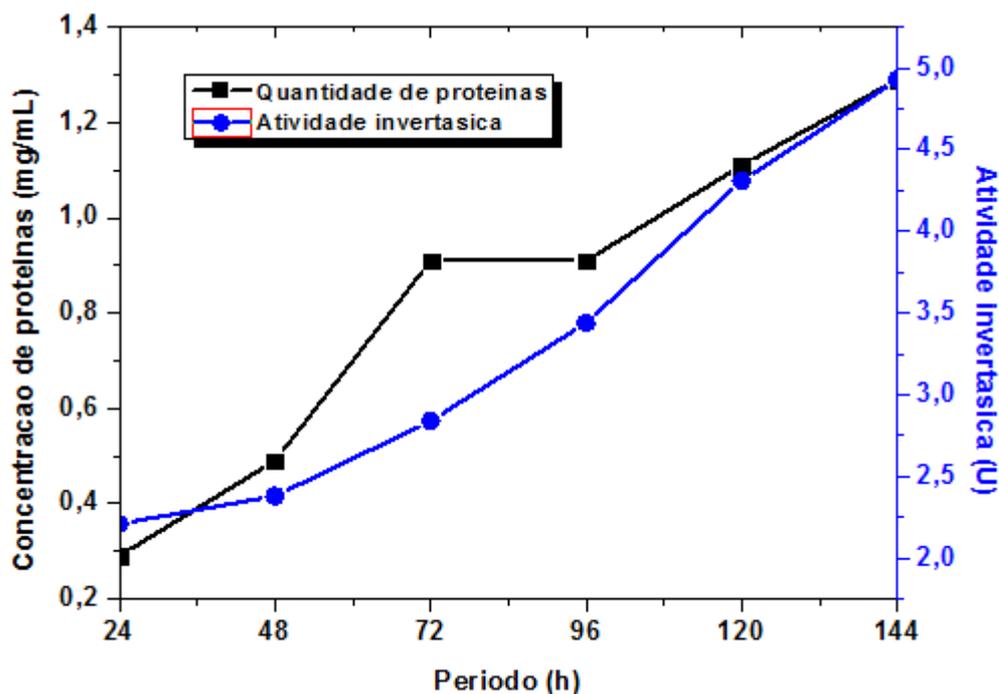


De acordo com o exposto no Gráfico 8, pode-se notar que houve um aumento constante nas quantidades de proteínas encontradas nas amostras enzimáticas. O aumento foi crescente, nas primeiras 24 horas de fermentação a quantidade de proteínas encontrada na amostra foi de cerca de 0,29 mg/ml, seguido de aproximadamente 0,49 mg/ml após 48 horas de fermentação. O aumento mais expressivo nas quantidades de proteínas nas amostras enzimáticas ocorreu no intervalo entre 48 e 72 horas, com aumento de 0,49 mg/ml para 0,91 mg/ml, representando um aumento percentual de 85,7% dos valores referentes as quantidades de proteínas num intervalo de 24h, entre o 2º e o 3º dia de fermentação.

O aumento nas concentrações de proteínas foi crescente culminando com a maior quantidade encontrada no após 144 horas de fermentação, com a concentração de 1,29 mg/ml de proteínas na amostra enzimática.

Ao analisar o Gráfico 1, torna-se evidente a relação entre o aumento nos níveis de atividade invertásica, com as quantidades de proteínas quantificadas nas amostras enzimáticas. Essa relação pode ser vista no Gráfico 9, onde é possível visualizar que, como a produção de invertase pelo fungo *Aspergillus niger* IOC 4003 foi satisfatória, houve um aumento nos níveis de atividade invertásica ao longo dos 7 dias (168 horas) em que se prolongou a fermentação. Logo, é evidente que as quantidades de proteínas encontradas nas amostras enzimáticas também aumentem ao longo de todo período em que ocorreu a fermentação (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Relação entre os níveis de atividade invertásica juntamente com as quantidades de proteínas encontradas nas amostras enzimáticas com relação ao tempo de fermentação, na produção de invertase.



Pode-se notar no Gráfico 9 que, a atividade invertásica está intimamente relacionada à quantidade de proteínas presentes nas amostras enzimáticas coletadas ao longo dos 7 dias de fermentação. Assim, a cada período em que ocorreu um aumento nos níveis de atividade invertásica, conseqüentemente ocorreu também, um aumento na quantidade de proteínas (mg/ml) presentes na mesma amostra enzimática.

6. Conclusão

- A produção da enzima invertase por fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus niger* IOC 4003 foi satisfatória para o cultivo em 28°C;
- A variação do pH no extrato enzimático permaneceu em valores adequados para o crescimento do fungo em questão e conseqüentemente para a produção da enzima de interesse;
- Os níveis de atividade invertásica aumentaram constantemente em pequena escala até o último dia de fermentação. O pico de atividade invertásica revelou um valor de 6,1U para o período de 168 horas de fermentação;
- Os níveis quantitativos de proteína presentes nas amostras enzimáticas teve comportamento gráfico semelhante aos níveis de atividade invertásica, mostrando que ambas as variáveis são dependentes e diretamente proporcionais;
- Os níveis percentuais de umidade das amostras dos resíduos do substrato apresentaram-se bastante baixos, Pôde-se notar que os valores percentuais declinaram ao longo dos dias em que ocorreu a fermentação, começando em níveis percentuais de 22% no primeiro dia de fermentação e caindo para 1% no último dia de cultivo.

Sugestões

- A efetividade da casca de maracujá como substrato na FES para a produção de invertase por *Aspergillus niger* IOC 4003, pode ser questionada diante do fato de que os níveis de atividade invertásica, apesar de crescente ao longo do processo fermentativo, mostraram-se bastante baixos quando comparado a outros trabalhos em que o farelo da casca de maracujá não foi utilizado como substrato principal. Tornase necessário a execução de um novo cultivo em FES com a substituição do maracujá

em outro tipo de resíduo agroindustrial, com o intuito de comparar os valores de produtividade para a enzima invertase;

- Torna-se necessário a elaboração de uma metodologia ou um modelo adequado que promova a quantificação do crescimento celular fúngico durante o processo fermentativo, a fim de realizar a análise da relação entre o crescimento fúngico e os níveis de atividade enzimática;
- É necessário o ajuste no modo de processamento do substrato, com o objetivo de evitar níveis percentuais de umidade de interfiram de forma prejudicial no crescimento do microrganismo e consequentemente interfira negativamente na produção enzimática.

7. Referências bibliográficas

AKGOL, S.; KAÇAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. **Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto móvel magnetic polyvinylalcohol micropheres**. Food Chemistry. v. 74. p. 281-288. 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WALKER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5ªed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Biologia da Célula**. 2ªed. Volume 2. São Paulo: Moderna, 2004. p. 74.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BORGES, A. L.; LIMA; A. A. **Maracujazeiro**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas-BA. p. 166-181. 2007. Catálogo, capítulo 9.

BRADFORD, M. M. **A rapide and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. Anal Biochem. v. 72. p. 248-255. 1976.

CABRAL, J. M. F. **Estudos de imobilização de enzimas pelo método dos metais de transição**. Tese. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 1982.

CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M.; CARDOSO, J. P. **Imobilization of amyloglucosidase on alkalyne derivatives of metal-link activated inorganic supports**. Biotechnology Bioengineering. v. 23. p. 2083-2092. 1981

CAMPOS, G. A.; SANTOS, D. **Maracujá: guia técnico**. Coleção: Como fazer. Palmas: Fundação Universidade do Tocantins – UNITINS. v.1. 2011.

CARVALHO, S. M. S. **Análise das enzimas amilolíticas produzidas por microrganismos isolados do Tarubá.** Dissertação. (Curso de Farmácia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1999.

CASTILHO, L. R. **Recuperação e pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida.** Dissertação. (Programa de Pós-graduação em Engenharia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

CASTRO, R. J. S.; TORRES, M. B. O.; FREITAS, A. C.; PINTO, G. A. S. **Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando torta de girassol como substrato.** In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal-RN, 2009.

CIRIO, G. M.; LIMA, M. L. R. Z. C. **Detection methods of *Aspergillus* genus in corn seeds (*Zea mays* L.) during 270 days storage.** Visão Acadêmica. Curitiba. v. 4. p. 19-23. 2003.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde.** B. CEPPA. Curitiba. v. 19. p. 33-42. 2001.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M. A. **Application of solid state fermentation to food industry – A review.** Journal of Food Engineering. ELSEVIER. v. 76. p. 291-302. 2006.

CUNHA, M. **Produtividade e características de frutos de pomares de maracujá implantados com sementes originais e reaproveitadas do Híbrido BRS Gigante Amarelo.** Dissertação. (Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária), Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L **Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana.** Rev. Brasileira de Produtos Agroindustriais. Campina Grande. v. 12. p. 81-87. 2010.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Fermentação em estado sólido.** In: Schmidell W. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica.** 1. ed. Vol. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

DOS SANTOS, A. F. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

DOS SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; DOS SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. **Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia.** Janus, lorena. ano 3. n. 4. p. 165-182. 2006.

DOS SANTOS, G. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*.** Dissertação. (Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

DWORSCHACK, R. G.; WICKERHAM, L. J. **Production of extracellular and total invertase by *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and other yeasts.** Peoria, Illinois. v. 4. p. 291-294. 1960;

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **A cultura do maracujá.** Brasília-DF: Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical. Textonovo, 1994.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu Rio, 2008.

FARIA, J. O. **A cultura do maracujá.** Horticultura fruticultura. Belo Horizonte: EMATER-MG, 2001.

FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; TAVARES, I. M. C.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. **Applcation of solid state fermentation for the biotransformation of a yellow mombin by product.** Rev. Acad., Ciência Agrária Ambiental. Curitiba. v. 9. p. 207-213. 2011.

FERREIRA, M. F. P.; PENA, R. S. **Estudo da secagem da casca do maracujá amarelo.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. Campina Grande-PB. v. 12. p. 15-28. 2010.

FONTES, C. P. M. L. **Produção de manitol a partir da fermentação do suco de caju utilizando bactérias lácticas heterofermentativas.** Dissertação. (Departamento de Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FOTOPOULOS, V. **Plant invertases: structure, functions and regulation of a diverse enzyme family.** Journal of Biological Research. v. 4. p. 127-137. 2005.

FURLANETO, F. P. B.; MARTINS, A. N.; ESPERANCINI, M. S. T.; VIDAL, A. A.; OKAMOTO, F. **Custo de produção do maracujá-amarelo.** Ver. Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal-SP. v. especial. p. 441-446. 2011.

GOLIN, V.; SPROVIERI, S. R. S.; CANÇADO, J. E. D.; DANIEL, J. W.; MIMICA, L. M. **J. Aspergillosis of the central nervous system.** São Paulo Medical Journal/RPM. v. 5. p. 1274-1277. 1996.

GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R. **Purificação parcial de invertase a partir de *Rhizopus* sp em fermentação semi-sólida.** Alim. Nutr. Araraquara/SP. v. 1. p. 199-203. 2003.

GRUBEN, B. S. **Novel transcriptional activators of *Aspergillus* involved in plant biomass utilization.** Tese. (Department of Microbiology), Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, 2012.

HUBKA, V.; KOLARÍK, M.; KUBÁTOVÁ, A.; PETERSON, S. W. **Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*.** Mycologia. v. 4. p. 912-937. 2013.

HUSSAIN, A.; RASHID, M.; PERVEEN, R.; ASHRAF, M. **Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.).** Plant Physiology et Biochemistry. Elsevier. v. 47. p. 188-194. 2009.

ISHIMOTO, F. Y.; HARADA, A. I.; BRANCO, I. G.; CONCEIÇÃO, W. A. S.; COUTINHO, M. R. **Alternative use of yellow passionfruit skin (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) for the production of cookies.** Rev. Ciências Exatas e Naturais. v. 9. p. 280-292. 2007.

JÚNIOR, I. R. **Controle de obras: Mecânica dos solos.** INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Cuiabá-MT, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular.** 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997.

LAMMENS, W.; LE ROY, K.; VAN LAERE, A.; RABIJNS, A.; VAN den ENDE, W. **Crystal structures of Arabidopsis thaliana cell-wall invertase mutants in complex with sucrose.** J Mol Biol. v. 2. p. 378-385. 2008.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. **Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.** Sci. Agric.; Piracicaba. v. 2. p. 299-304. 1995.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos.** Vol. 3. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** 10ªed. São Paulo: Pearson Brasil, 2004.

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

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica.** 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999.

MELO, G. G.; BRAZ, L. C. C.; AMADOR, V. C.; DIAS, E. C.; ALMEIDA, É. S.; SILVA, D. P.; BEZERRA, R. M.; COELHO, G. D. **Estudos preliminares sobre a atividade adsorptiva do corante vermelho congo pelo fungo *Lentinus crinitus***. In: I SENGEBBIO 2014. Sumé-PB, 2014.

MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P.; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. A. C. L.; COURI, S. **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo**. Ver. Univ. Rural. v. 25. p. 15-27. 2006.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. **Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing**. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. v. 68, p. 61-138, 2000.

MOURA, C. L.; PINTO, G. A.; RODRIGUES, S. **Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos**. Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos 108. ISSN 1677-1915, Fortaleza, 2007.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 6ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

NASCIMENTO, E. M. G. C.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P.; GALDEANO, M. C. **Benefits and risks of using passion fruit peel (*Passiflora edulis*) as an ingredient in food production**. Rev. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo-SP. v. 3. p. 1-11. 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. Lehninger – **Princípios de Bioquímica**. 3ªed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABO, J. M.; BHAT, M. K.; HOSCHKE, A. **Purification and some properties of β -fructofuranosidase form *Aspergillus niger* IMI303386**. Process Biochemistry. v. 40. p. 2461-2466. 2005.

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

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, A. C. **Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga**. Dissertação. (Faculdade de Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2013.

OLIVEIRA, J. C. **Micologia médica**. Rio de Janeiro: Control Lab, 1999.

OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. N.; RUBACK, V. R. **Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa*) para a produção de doce em calda**. Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas-SP. v. 3. p. 259-262. 2002.

PAIVA-ALEGRE, A. C.; POLIZELI, M. L. T. M; TERENCEZI, H. F. T.; 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. ISSN 1517-8382.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes**. Current Science. v. 77. p. 149-162. 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. **New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products**. Process Biochemistry. v. 35. p. 1153-1169. 2000.

PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional.** Dissertação. (Centro de Engenharias e Ciências Exatas), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

PARK, K. Y. **Produção de enzimas. In: Tecnologia das Fermentações.** São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 1975.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2ªed. Vol. 1. São Paulo: Pearson Brasil, 1996.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. **Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental.** J. Technol. Management & Innovation. v. 2. p. 118-127. 2007.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. S.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais.** Comunicado técnico. Embrapa, 2005. ISSN 1679-6535.

PONTES, C. R. **Enriquecimento proteico do bagaço de caju através de fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger*.** Dissertação. (Centro de Ciências Agrárias), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido.** Dissertação. (Faculdade de Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia; Uberlândia, 2010.

ROVEDA, M. **Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa.** Dissertação. (Faculdade de Engenharia e Arquitetura), Universidade de Passo Fundo; Passo Fundo, 2007.

RUBIO, M. C.; RUNCO, R.; NAVARRO, A. R. **Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*.** Phytochemistry. v. 61. p. 605-60. 2002.

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

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

SANTANA, L. N. S.; CABRAL, B. V.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, E. J. **Estudo da imobilização de invertase em resinas de troca iônica e produção de açúcar invertido**. In: XII Seminário de Iniciação Científica. Uberlândia, 2008.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese. (Faculdade de Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica**. 1. ed. Vol. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SILVA, R. R. **Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores**. Tese. (Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente), São Paulo, 2009.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; DA SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. **Characterization of polygalacturonase produced by solid-state fermentation using the residue of passion fruit as substrate**. Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient. Campina Grande-PB. v. 14. p. 98-992. 2010.

TANIWAKI, M. I. I.; FONSECA, I. I.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. **Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção**. Sc. Agric. Piracicaba. v. 1. p. 140-150. 1993.

TORRES, B. B. **Elementos de Enzimologia. In: Borzani et al., Biotecnologia Industrial: Fundamentos.** 1ªed. Vol. 1. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10ªed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 4ªed. São Paulo: Atheneu; 2004. ISBN: 8573796812.

VARGAS, W.; CUMINO, A.; SALERNO, G. L. **Cyanobacterial alkaline/neutral invertases: Origino f sucrose hydrolylis in the plant cytosol.** Planta. v. 216. p. 951-960. 2003.

VARO, D. V.; MARTINS, C. H. G.; CARDOSO, M. J. O.; SARTORI, F. G.; MONTANARI, L. B.; PIRES-GONÇALVES, R. H. P. **Isolation os filamentous fungi from water used in a hemodialysis unit.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 40. p. 326-331. 2007.

VICENTE, A. A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica.** Dissertação. (Instituto de Química), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

VITOLO, M. **Tópicos de Enzimologia industrial. In: Said & Pietro, Enzimas como agentes biotecnológicos.** 1ª ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. **Maracujá: um alimento funcional?** Brazilian Journal of Pharmacognosy. v. 3. p. 459-471. 2010.

ZUÑIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; NETO; V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. **Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido.** Pesq. Agropecuária Brasileira. Brasilia, v. 46. p. 912-919. 2011.