



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Produção de invertases isoladas de leveduras de pêssego:
identificação de leveduras, extração otimizada e caracterização
cinética das invertases livre e imobilizada

MARCELA VEGA FERREIRA
(Química de Alimentos)

PELOTAS
Março de 2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Produção de invertases isoladas de leveduras de pêssago:
identificação de leveduras, extração otimizada e caracterização
cinética das invertases livre e imobilizada

MARCELA VEGA FERREIRA
(Química de Alimentos)

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de
Alimentos da Universidade
Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

PELOTAS
Março de 2016

MARCELA VEGA FERREIRA
(Química de Alimentos)

**Produção de invertases isoladas de leveduras de pêssego:
identificação de leveduras, extração otimizada e
caracterização cinética das invertases livre e imobilizada**

Comitê de orientação:

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi (FAEM/DCTA)
Prof. Dr. Ricardo Peraça Toralles (IFSUL)

Banca examinadora

Prof. Dr. Walter Augusto Ruiz (FURG)

Prof. Dr. Cláudio Rafael Kuhn (IFSUL)

Prof. Dr. Nathan Levien Vanier (UFPEL)

Quando uma pessoa realmente quer alguma coisa, todo o Universo conspira para que possa realizar seu sonho. Basta aprender a ouvir os ditames do coração e decifrar uma linguagem que está além das palavras, mostrando o que os olhos não podem ver.

Paulo Coelho

Agradecimentos

***A Deus**, por cada uma das razões que tenho para viver!*

***A minha família**...meu porto seguro, minha inspiração! Aos meus amados pais **Jose e Francisca**. Aos meus irmãos e sobrinhos que dão um toque único e mágico na minha vida. Em especial ao meu amor **Mauricio** por seu carinho, paciência e apoio incondicional sem igual e sempe igual para realização deste sonho. Família...Eternamente agradecida, porque além da distância, me dão a força necessária para acreditar e acordar todos os dias como se fosse a primeira vez.*

***Aos meus queridos amigos** de ontem, hoje e sempre.*

***Ao Prof. Dr. Ricardo Peraça Toralles** pela valiosa orientação e oportunidade de fazer parte de sua equipe. Meu respeito e admiração pela sua integridade.*

***Ao Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi** pelo voto de confiança para começar este sonho, orientação e conhecimentos.*

***Ao meu querido grupo de trabalho** do IFSUL: **Tariani Lemos e Aline Rössler**, e alunas de estágio voluntário Betina Kuhn, Cloé Pich, Tauani Schultz e Luísa Neves, meu carinho pela amizade, companhia, força, trabalho e dedicação.*

***Ao Prof. Dr. Cláudio Rafael Kuhn** e bolsista Michele Machado pelo apoio na utilização do laboratório de microbiologia do IFSUL.*

*À **Lorena Aguiar** do CAVG pelo seu tempo e disposição para a liofilização das amostras.*

***Ao Programa de Pós-Graduação** em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPEL e Laboratório de Bioquímica do IFSUL.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VI
ÍNDICE DE TABELAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
NOMENCLATURA	XIII
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Hipótese	4
1.2. Objetivos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Pêssego	5
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.3. Invertases	11
2.3.1. Organismos produtores de invertase	12
2.3.2. Utilização da invertase na indústria de alimentos	13
2.3.3. Propriedades da proteína	15
2.3.4. Produção e extração da invertase	16
2.3.5. Purificação da invertase	18
2.3.6. Estudo cinético e propriedades da invertase	19
2.3.7. Imobilização	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

CAPÍTULO 1 **43**

**IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PÊSSEGO E
AVALIAÇÃO DE SEU CULTIVO EM BATELADA PARA PRODUÇÃO DE
INVERTASE** **43**

1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1. Micro-organismos e seu cultivo	48
2.2. Identificação das leveduras	49
2.3. Potencial de crescimento da levedura	49
2.4. Determinação açúcares redutores	50
2.5. Extração da invertase	50
2.6. Atividade da invertase	51
2.7. Pressão osmótica	51
2.8. Análise estatística	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1. Identificação da levedura	51
3.2. Avaliação do cultivo em batelada da <i>S. cerevisiae</i>	56
4. CONCLUSÕES	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

CAPÍTULO 2 **70**

**ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DA SACAROSE POR INVERTASE DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ISOLADA DE PURÊ DE PÊSSEGO E
IMOBILIZADA EM AGAROSE-GLIOXIL** **70**

1. INTRODUÇÃO	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	76

2.1.	Micro-organismo e seu cultivo	76
2.2.	Determinação açúcares redutores	77
2.3.	Efeito da concentração de bicarbonato de sódio e velocidade de agitação na extração da invertase	77
2.4.	Atividade da invertase	79
2.5.	Purificação do extrato bruto por precipitação	79
2.6.	Eletroforese	80
2.7.	pH e temperatura ótima	80
2.8.	Efeito da concentração do substrato e parâmetros cinéticos	80
2.9.	Estabilidade térmica, constante cinética e tempo de meia-vida	81
2.10.	Imobilização	81
2.11.	Análise estatística	83
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.1.	Extração da invertase por autólise de levedura de purê de pêssego	83
3.2.	Efeito combinado da concentração de bicarbonato de sódio e da velocidade de agitação	84
3.3.	Localização do ponto estacionário e análise canônica	86
3.4.	Comparação entre os extratos bruto e liofilizado	86
3.5.	Atividade dos extratos não purificados de invertase	87
3.6.	Purificação da invertase	89
3.7.	Eletroforese	92
3.8.	Efeito do pH e temperatura das enzimas livres	94
3.9.	Parâmetros cinéticos para invertase livre e imobilizada	96
3.10.	Influência do pH de imobilização e parâmetros de imobilização	99

4. CONCLUSÕES	103
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
<u>APÊNDICE - A</u>	<u>110</u>
A1. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL PARA ABORDAGEM DO PROBLEMA	111
A2. CURVA PADRÃO DA DOSAGEM DE AÇUCARES REDUTORES	112
A3. CURVA PADRÃO DA DOSAGEM DE PROTEINAS	113
<u>APÊNDICE- B</u>	<u>114</u>

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Algumas propriedades da invertase interna e externa de <i>S. cerevisiae</i>	22
Tabela 1.1. Leveduras isoladas a partir de pêssego e seu resíduo e identificadas através do sistema API20C AUX.	53
Tabela 1.2. Efeito do período de fermentação e armazenamento nas características de contagem de células viáveis (N), açúcares redutores (AR), atividade da invertase livre (IL) e da invertase no cultivo (IC).	59
Tabela 1.3. Coeficientes de correlação (r) entre o período de tratamento (P), a contagem de colônias (N), o teor de açúcares redutores (AR), a atividade da invertase do cultivo (IC) e livre (IL) para os dois tratamentos de cultivo em batelada: “A” com 20 g de culturas em BDA e “B” com 10 g. A levedura selecionada para o cultivo foi <i>S. cerevisiae</i> (2040032) isolada de purê de pêssego. Pelotas, UFPEL/IFSUL; 2015.	60
Tabela 2.1 Codificação das variáveis reacionais e planejamento do experimento.	78
Tabela 2.2 Matriz do planejamento experimental com os valores codificação, os valores naturais e a resposta.	84
Tabela 2.3. Coeficientes de regressão não linear e de determinação (R ²) do modelo matemático de segunda-ordem para extração da invertase de purê pêssego cv. Jubileu ^a .	85
Tabela 2.4 – Atividade nos extratos de invertase de levedura comercial (ILC), de <i>S. cerevisiae</i> de purê de pêssego (ISC) e de <i>C. guilliermondii</i> de resíduo de pêssego (l _{cg}).	88
Tabela 2.5 – Atividade dos extratos de invertase livre de levedura comercial (ILC), de <i>S. cerevisiae</i> de purê de pêssego (ISC) purificados com solventes orgânicos.	91
Tabela 2.6. Constante de Michaelis-Menten (K _m) e velocidade máxima (V _{máx}) da invertase livre de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de purê de pêssego (ISC) e invertase livre de levedura comercial (ILC).	97
Tabela 2.7. Rendimento de imobilização da ILC (RI), atividade recuperada (AR) para diferentes cargas de proteínas oferecidas ao suporte de agarose-glioxil, com pH 7 e 10, de imobilização a 25°C e 50 rpm.	100
Tabela 2.8. Constante de Michaelis (K _m) e velocidade máxima (V _{máx}) da invertase imobilizada de levedura comercial (ILC)	102
Tabela B1. Análise de variância da curva padrão glicose em DNS e de dosagem de proteína por Lowry.	115
Tabela B2 Análise de variância para o ajuste de um modelo de segunda ordem aos dados experimentais.	115
Tabela B3. Análise de variância do modelo de Michaelis-Menten para ISC e ILC.	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pêssego cultivar Jubileu	6
Figura 2. Imagem da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtida através de microscópio	8
Figura 3. Esquema da estrutura e composição da parede celular da <i>S. Cerevisiae</i> . MP, membrana plasmática; M, mananas; PC, parede celular; G, glucano.	10
Figura 4. Mecanismo de reação catalisada pela invertase.	11
Figura 5. Imagem tridimensional da Invertase octâmera de <i>S. cerevisiae</i> .	13
Figura 6. Modelo atual do metabolismo da sacarose por <i>S. cerevisiae</i> . A sacarose pode sofrer hidrólise pela invertase periplásmica ou ser transportada ativamente pela permease AGT1 e, então, ser clivada pela maltase ou invertase intracelular.	16
Figura 7. Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima	20
Figura 8. Gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk	21
 Figura 1.1 Colônias de leveduras identificadas em purê de pêssego: (a) <i>S. cerevisiae</i> (2040032), (b) <i>R. mucilaginosa</i> (2642073) e (c) <i>T. mucoides</i> (6745776); em testemunha: (d) <i>S. cerevisiae</i> (2044073).	54
Figura 1.2. Colônias de leveduras identificadas em resíduo do processamento de pêssego: (a) <i>S. cerevisiae</i> (2040032), (b) <i>C. guilliermondii</i> (6776277).	54
Figura 1.3. Teste da urease das leveduras: (A) <i>S. cerevisiae</i> (pêssego); (B) <i>C. guilliermondii</i> (resíduo); (C) <i>S. cerevisiae</i> (testemunha) (D) <i>R.mucilaginosa</i> ; (E) <i>T. mucoides</i> .	55
Figura 1.4. Curva de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> (2040032) isolada de purê de pêssego para os dois tratamentos de cultivo em batelada: “A” com 20 g de cultura em BDA e “B” com 10 g. O crescimento da levedura foi conduzido a 30 °C, 150 rpm durante 24 horas de fermentação orbital seguido de 24 dias de armazenamento a frio. Os valores médios da contagem de placas em triplicatas.	57
Figura 1.5. Correlação entre a atividade da invertase do cultivo (IC) e livre (IL) extraída por autólise da <i>S. cerevisiae</i> (2040032) isolada de purê de pêssego. A figura representa a correlação das atividades enzimáticas de ambos tratamentos. Pelotas, UFPEL/IFSUL; 2015.	61
Figura 1.6 Correlação entre crescimento celular em termos log (N) e da atividade da invertase do cultivo obtida do sobrenadante do cultivo em batelada usando <i>S. cerevisiae</i> (2040032) isolada de purê de pêssego. A figura representa a correlação de ambos tratamentos. Pelotas, UFPEL/IFSUL; 2015.	61
 Figura 2.1. Superfície de resposta para efeito interativo de NaHCO ₃ (X1) e da velocidade de agitação (X2) no processo de extração da invertase (ILP) obtida por autólise de <i>S. cerevisiae</i> de purê de pêssego (ISc) da cv. Jubileu. A AR de 100% a 25°C e pH de 5 igual a 14,7 U.mg ⁻¹ .	85

Figura 2.2. Comparação entre os extratos não purificado de invertases ISc não-liofilizada, ILS Sc liofilizada e ILC. Teor de proteína de 1 mg.mL ⁻¹ .	87
Figura 2.3 Efeito da diluição do extrato bruto nas atividades das invertases livres de levedura comercial (ILC), de <i>S. cerevisiae</i> de purê de pêssgo (ISC) e de <i>C. guillermundii</i> de resíduo de pêssgo (ICg).	89
Figura 2.4 Estabilidade do extrato bruto (EB) e purificado (EP) de levedura comercial (ILC), armazenados por 30 dias a 4°C e -20°C.	92
Figura 2.5 Perfil eletroforético de ILC e ISc a partir de seus extratos concentrados com acetona com cerca de 1 mg.mL ⁻¹ de proteína. Inserido: eletroforese em gel de poliacrilamida 6% pH 8,9. A mobilidade relativa foi baseada na migração do marcador de azul de bromofenol. As frações proteicas foram coradas com azul de Coomassie: ILC; ILC; ISc e BSA.	93
Figura 2.6 Efeito do pH na atividade da invertase de <i>S. cerevisiae</i> de purê de pêssgo. Tampão Mcllvaine: citrato (100 mM) - fosfato (200 mM). Temperatura: 25±0,1°C. Enzima: 1,0 mL em 3,0 mL de meio reativo com 40 mM sacarose. Os pontos são a média de 3 repetições±0,95*desvio padrão. 100% de AR é 74,8 ± 9,1 U.mg ⁻¹	94
Figura 2.7 Efeito da temperatura na atividade da invertase de <i>S. cerevisiae</i> de purê de pêssgo (ISc). Tampão Mcllvaine pH 5. Enzima: 1,0 mL em 3,0 mL de meio reativo com 40 mM sacarose. Os pontos são a média de 3 repetições±0,95*desvio padrão. 100% de AR é 224,2 ± 6,5 U.mg ⁻¹ .	95
Figura 2.8 Efeito da temperatura ao longo do tempo na atividade da invertase de <i>S. cerevisiae</i> de purê de pêssgo (ISc) e invertase de levedura comercial a 50°C e nos tempos indicados: ISc (●) e ILC (■).	96
Figura 2.9 Efeito da concentração da sacarose na velocidade de hidrólise da invertase livre de <i>S. cerevisiae</i> de ISc. Tampão Mcllvaine pH 5. Temperatura: 25± 0,1°C. Enzima: 1,0 mL em 3,0 mL de meio reativo. Inserido: gráfico de Lineweaver-Burk. Os pontos representam a média de 3 repetições.	97
Figura 2.10 Efeito da concentração da sacarose na velocidade de hidrólise da invertase de levedura comercial. Tampão Mcllvaine pH 5. Temperatura: 25±0,1°C. Enzima: 1,0 mL em 3,0 mL de meio reativo. Inserido: gráfico de Lineweaver-Burk. Os pontos representam a média de 3 repetições.	98
Figura 2.11 Estabilidade da invertase de ILC. Os extratos purificados foram diluídos em água (◆); em pH 10 (■) e em pH7 (▲). Todos foram incubados durante 24 horas a 25°C e 50 rpm, com uma diluição final de 10% em volume.	99
Figura A1. Fluxograma experimental para abordagem do problema.	111
Figura A2. Curva padrão para açúcares redutores.	112
Figura A3. Curva padrão para proteínas método Lowry.	113

NOMENCLATURA

A	Constante de proporcionalidade
AA	Absorbância da amostra
AB	Absorbância do branco
ANOVA	Análise de variância
A ₀	Atividade inicial da enzima
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AR	Açúcares redutores
ARE	Atividade recuperada
%AR	% atividade relativa
A _t	Atividade após o tempo de aquecimento
B	Coeficiente linear da reta
BDA	Ágar dextrose de batata
BSA	Soro albumina bovina
b ₀	Ponto central do sistema
B _i	Coeficiente linear
B _{ii}	Coeficiente quadrático
B _{ij}	Coeficiente interativo
C	Concentração molar do sal
°C	Graus Celsius
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DNS	3,5 - ácido dinitro salicílico
EB	Extrato bruto

EP	Extrato purificado
F	Fator de diluição
FS	Fermentação líquida submersa
FES	Fermentação em estado sólido
G	Gravidade
g	Gramas
H	Horas
I	Fator de Van't Hoff
IC	Invertase do cultivo
IL	Invertase livre
ILC	Invertase levedura comercial
ICg	Invertase <i>Candida guilliermondii</i> de resíduo de pêssego
Isc	Invertases <i>Saccharomyces cerevisiae</i> purê de pêssego
K	Constante de velocidade de inativação de primeira- ordem
K	Kelvin
kDa	Kilo Dalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten
L	Litros
Log	Logarítmo em base dez
M	Molar
Mg	miligrama

min	Minutos
mL	mililitros
Mm	milímetros
mM	Milimolar
MR	Mobilidade relativa
MSR	Metodologia de superfície de resposta
N	Numero de colonias
P	Pressão osmótica
P	Período de tratamento
pH	Potencial de hidrogênio
P(0)	Teor de proteína no extrato purificado de enzima livre em t=0
P(f)	Teor de proteína no extrato purificado de enzima livre após 24 horas de imobilização.
R	Coeficientes de correlação
R	Constante universal dos gases
Rpm	Revoluções por minuto
S	Segundos
S	Substrato
T	Temperatura
t _{1/2}	Tempo de meia-vida
U	Unidades de atividade
UFC	Unidades formadoras de colônias
V	Volume final do meio reativo

$V_{\max}$	Velocidade máxima
X1	Concentração de bicarbonato de sódio
X2	Velocidade orbital de agitação
X_i	Variáveis independentes
%X	Conversão da glicose
Y_i	Variáveis dependentes

RESUMO

As invertases de origem microbiana são bem conhecidas e têm sido estudadas por um longo tempo, especialmente as provenientes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em purê de pêssego, esta levedura também já foi identificada em diferentes etapas do processamento. Entretanto, não se encontram dados que identifiquem leveduras isoladas de cultivares nacionais com potencial para produção de invertase. Primeiramente foram isoladas espécies de leveduras a partir de purê e resíduo de pêssego cv. Jubileu usando um método de identificação comercial API 20C AUX e uma levedura comercial como testemunha. Das 5 leveduras identificadas, escolheu-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (2040032) por questões legais para estudar o potencial de crescimento, usando dois tratamentos (A e B) de cultivo em batelada com agitação de 150 rpm, 30°C por 24 h. A enzima foi extraída por autólise (ISc), usando um efeito combinado da concentração de NaHCO_3 e agitação orbital através de MSR. A atividade foi determinada por incremento na absorbância a 490 nm usando o método colorimétrico que resulta da reação da glicose-DNS. A condição ótima para extração da invertase livre foi 200 mM de NaHCO_3 como agente autolisante e 200 rpm, o modelo polinomial de segunda ordem explicou o fenômeno de autólise com uma variância explicada superior a 80%. Depois, o extrato bruto foi submetido a uma purificação parcial por precipitação com solventes orgânicos (acetona e etanol). Na separação eletroforética usando azul de Coomassie, duas frações de proteínas foram detectadas para ISc e quatro para ICL. A seguir, as invertases (ISc e ILC) foram imobilizadas covalentemente em glioxil-agarose usando três suportes ativados (2,5, 5 e 10 g) e dois pHs (7 e 10) como tratamentos para avaliar o rendimento da imobilização (RI) e atividade de recuperação (ARE). O K_m foi de 44,8 mM para ISc e 5,2 mM para ILC. A imobilização ótima foi obtida usando tampão pH 10, 50 °C, 50 rpm por 24 h. O suporte ativado de 5 g mostrou uma ARE de 46,4%, RI de 37,5% e $V_{\max}/K_m$ de 65,2 de $\text{U.mg}^{-1}.\text{mM}$. Finalmente, conclui-se que os dados recolhidos neste estudo fornecem evidência para produção de invertase a partir de leveduras de purê e resíduo de pêssego, que pode ser aproveitado para processos biotecnológicos.

ABSTRACT

The microbial invertase are well known and have being studied for a long time, including the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and others. In peach puree, this yeast have already been identified at different stages of processing. Until now, no data is available in the literature on isolation and identification of spoilage yeast in Brazilian peach puree, as well as the relationship among invertase activity with potential for production of invertase. First yeast species were isolated from spoiled Jubileu peach puree and its residue using the API 20C AUX commercial identification method and a commercial yeast as witness. Of the five yeasts identified, *Saccharomyces cerevisiae* (2040032) was chosen for legal reasons to study growth potential in two treatments (A e B) in batch cultivate with 150 rpm, 30°C for 24 h. The enzyme was extracted by autolysis (ISc), using a combined effects of NaHCO₃ concentration and orbital stirring through of a response surface methodology (RSM), and the witness in the standard condition. The activity was followed by an increase in absorbance at 490 nm using the colorimetric method resulting from the glucose-DNS reaction. The optimal conditions for extraction of free-ISc were 200 mM NaHCO₃ as autolysis agent at 200 rpm, and the second order polynomial model explained the phenomenon of autolysis with an explained variance superior to 98%. Later, the crude extract was submitted to partial purification by precipitation with organic solvents (acetone and ethanol). In electrophoretic separation, two-protein fraction were detected for ISc with coomassie blue and four to ICY. Then the invertases (ISc and ICY) were covalently immobilized on glyoxil-agarose using three activated support (2.5, 5 e 10 g) and two pHs (7 and 10) as treatments to evaluate efficiency immobilization (IE), recuperated activity (RA). The K_M was 44.8 mM for ISc and 5.2 mM for ICY. The optimum immobilization was obtained using buffer pH 10, 50°C, 50 rpm for 24h. The activated support of 5 g, showed a IE of 46.7%, RA of 37.5 and V_{max}/K_m of de 65.2 U.mg⁻¹.mM. Finally, it was concluded that the data gathered in this study provides evidence for the production of invertase from peach puree and industrial residue yeasts, which can be used to biotechnological processes.

1. INTRODUÇÃO

O produto final da hidrólise da sacarose são os monossacarídeos glicose e frutose de constituição líquida não cristalizável, conhecido como açúcar invertido é muito importante nas indústrias de alimentos e farmacêutica, pelo seu maior poder adoçante, carácter umectante, solubilidade e, portanto, menor cristalização e endurecimento frente à sacarose (ASHOKKUMAR et al., 2001; GRACIDA, et al., 2005). Esta hidrólise pode ser catalisada por ácidos, resinas trocadoras de cátions ou por enzimas (AKGOL et al., 2001; VICENTE, 2000 e CHEN et al., 2000). O processo enzimático usando invertase é preferível por ser uma reação leve ($4,5 < \text{pH} < 5,0$ e $30\text{ }^{\circ}\text{C} < T < 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) (VITOLLO, 2004) e apresentar grau de cristalização menor. Além disso, não há formação de compostos indesejáveis que afetam cor e sabor durante o “shelf-life” do produto formado – açúcar invertido – como acontece na hidrólise ácida (TOMOTANI e VITOLLO, 2010).

Estas enzimas podem ser encontradas em invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos (DEUNER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; GOULART et al., 2013). No entanto, a maioria das investigações sobre produção de invertase têm sido realizada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por ser um organismo classificado como GRAS (Generally Recognized As Safe) e porque sintetiza ambas as formas da invertase (interna e externa) (BELCARZ et al., 2002).

Em pêssegos e derivados, já foram identificados mais de 160 tipos de micro-organismos em diferentes etapas do processamento da polpa, destacando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* com potencial fermentativo e resitência térmica significativa (GARZA et al., 1994; LOPES et al., 2014). Entretanto, não são encontrados trabalhos que identifiquem leveduras isoladas de cultivares nacionais com potencial para produção de invertase. Recentemente, foi publicado trabalho parcial nessa direção no Congresso Brasileiro de Microbiologia (AVILA et al., 2015).

A produção de invertase pode ser realizada de duas maneiras: fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES). Na FS, o meio de cultura é líquido, com nutrientes necessários para o desenvolvimento do micro-organismo

(GIRALDO, 2011). Na FES, o substrato é insolúvel (geralmente resíduos agroindustriais) e com baixo grau de umidade (BON et al., 2008)

Após o processo de fermentação são aplicados métodos químicos, físicos ou ambos para a extração da enzima. Um processo de extração, conhecido como autólise, consiste na ruptura e degradação das estruturas celulares por atividades das enzimas endo e exo- β -(1,3) glucanases e proteinases sobre glucanos e manoproteínas (constituíntes da capa externa da parede celular das leveduras), resultando em uma parede mais porosa que libera componentes solúveis, onde se encontra a invertase, para o meio extracelular (GUILLOU et al., 1995; TENKANEN et al., 2003).

Posteriormente a extração, as enzimas podem ser separadas e purificadas do meio por filtração, centrifugação, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou por combinação dos métodos citados (ISHIHARA e YAMAMOTO, 2005). O grau de purificação da enzima é função da sua aplicação final e será determinado pelas características físico-químicas, propriedades biológicas, fonte da qual a enzima está sendo purificada e tecnologia de purificação utilizada (KILIKIAN e PESSOA JR., 2001).

A maior parte dos estudos publicados envolvendo purificação de enzimas utiliza processos cromatográficos (SHARMA et al., 2007; ZHANG et al., 2009). No entanto, este processo é difícil de ser escalonado e possui um alto custo. Para minimizar estes custos, existem técnicas como a precipitação com sais e solventes orgânicos que podem ser aplicadas de modo a maximizar a pureza sem acarretar maiores prejuízos no rendimento (MORAES e KALIL, 2009). Como resultado obtém-se a enzima purificada e livre em solução. De modo geral, o seu uso é normalmente inviável em biocatálise industrial, devido à dificuldade de reutilização e menor estabilidade frente à imobilização, além de outros conhecidos fatores que motivam a imobilização de enzimas (CARDOSO et al., 2009; GARCIA-GALAN et al., 2011).

A imobilização da invertase ocorre principalmente por adsorção ou ligação covalente em um suporte (orgânico ou inorgânico) ou aprisionamento em membranas (KOTWAL e SHANKAR, 2009).

O pêssego (*Prunus pérsica* L.) é uma fruta de forte sazonalidade e representa 0,48% do volume total de frutas produzidas no país. Em 2010, produziu-

se 239,1 mil toneladas de pêssego, sendo os principais estados produtores o Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina e Minas Gerais (IBGE, 2010). O Rio Grande do Sul foi o maior produtor nacional, respondendo por 65% da safra de pêssego. Tradicionalmente, a maior parte da produção nacional destina-se ao consumo *in natura* (cerca de 57%). O restante é industrializado como pêssegos em calda, geléias, doces em massa, purê, néctar e suco de pêssego clarificado (TORALLES et al., 2006; TORALLES e VENDRÚSCULO, 2007). Desse processamento a indústria gera uma grande quantidade de resíduos orgânicos ao longo de sua cadeia produtiva, entre 10 e 40% (MARTINS e FARIA, 2002; SOUSA et al., 2011; DANTAS et al., 2012).

A cultivar de pêssego escolhida para este trabalho foi a Jubileu, amplamente cultivada e com características sensoriais favoráveis para elaboração de purê de pêssego (TORALLES et al., 2006; EMBRAPA 2012; LOPES, 2014). Desta forma, conduziu-se um estudo experimental para identificar leveduras a partir de purê de pêssego cv. Jubileu e resíduo industrial, com potencial para produção de invertase através de um sistema de fermentação submersa (FS), seguido de extração por autólise, purificação, caracterização e imobilização da enzima, objetivando a obtenção de dados cinéticos *in vitro* que estabeleçam uma relação ótima de velocidade de hidrólise da sacarose e concentração de invertase.

1.1. Hipótese

Se o escurecimento não enzimático é a principal causa das mudanças do sabor e da cor durante “shelf life” do açúcar invertido produzido por hidrólise da sacarose via ácida, preservá-los – cor e sabor – resulta da realização dessa hidrólise utilizando invertase de leveduras (pão e pêssego) em condições otimizadas de pH, temperatura, concentração de substrato e meio adequado para imobilização.

1.2. Objetivos

Identificar leveduras a partir de purê de pêssego cv. Jubileu e resíduo industrial, com potencial para produção de invertase através de um sistema de fermentação submersa (FS), seguido de extração otimizada, purificação, caracterização e imobilização da enzima, objetivando a obtenção de dados cinéticos *in vitro* que estabeleçam uma relação ótima de velocidade de hidrólise da sacarose e concentração de invertase.

Para tal finalidade o trabalho dividiu-se em dois capítulos consecutivos e o fluxograma experimental para abordagem do prolema encontra-se na figura A1 em anexo:

1. Identificação de leveduras isoladas de purê e resíduo de pêssego e avaliação de seu cultivo em batelada para produção de invertase: identificaram-se cinco leveduras capazes de hidrolisar a sacarose. Desse experimento resultou a escolha de uma *Saccharomyces cerevisiae* para produção de invertase por questões legais. Além disso foi possível definir um sistema de cultivo em batelada levando em consideração: número de colônias (N), açúcares redutores (AR), atividade da invertase livre (IL) e da invertase do cultivo (IC).

2. Estudo cinético da hidrólise da sacarose por invertase de *Saccharomyces cerevisiae* isolada de purê de pêssego e imobilizada em agarose-glioxil: Estudou-se o efeito combinado da concentração de NaHCO_3 e velocidade de agitação para a extração da enzima, seguido da purificação parcial com solventes orgânicos (acetona e etanol), imobilização covalente em glioxil-agarose usando três quantidades de suportes ativados (2,5; 5 e 10) e dois pHs (7 e 10). Também se determinou as constantes cinéticas (K_m e V_{max}) para invertase livre e imobilizada. Desse experimento resultou um modelo matemático polinomial de segunda ordem

que permitiu definir as condições ótimas para extração da invertase; também as condições ótimas de purificação, pH e temperatura para recuperação e atividade da invertase livre. Com relação à imobilização, foi possível definir as condições ótimas de pH, tempo e velocidade orbital de imobilização, bem como, a oferta de suporte visando a ótima recuperação de atividade e especificidade da enzima imobilizada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Pêssego

De acordo com os dados da FAO (2010), a produção mundial de pêssegos e nectarinas são de aproximadamente 15 milhões de toneladas, distribuídas por uma superfície de 1,4 milhão de hectares, crescendo na faixa de 20% a cada 10 anos. A China é o maior produtor mundial, com cerca de 27% de participação na oferta global, seguida da Itália e dos Estados Unidos, que produziram 1,4 milhão e 1,3 milhão de toneladas, respectivamente. No âmbito do Mercado Comum do Cone Sul - Mercosul destacam-se a Argentina e o Brasil, com produções de 280 mil e 230 mil toneladas respectivamente (MAPA, 2009; FACHINELLO et al., 2011; ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2012; SILVA, 2013)

O Rio Grande do Sul é o principal estado brasileiro em produção e em área plantada de pessegueiros, com destaque para a Região Sul, com um total produzido na faixa entre 218 mil e 236 mil toneladas (IBGE, 2012), que se expandiu especialmente na região centralizada pelo município de Pelotas, devido às condições de clima temperado, entre as latitudes 30º N e 45º S, favoráveis à sua adaptação e cultivo, tornando-se esta região a maior produtora brasileira de pêssegos, com 65% do volume nacional (EMBRAPA, 2009).

O pêssego é um fruto climatérico, nativo do Oriente Médio e China que pertence à família das Rosáceas. Todas as cultivares comerciais são da espécie *Prunus persica* (L.) Batsch sendo admitidas três variedades botânicas: (a) vulgaris (pêssego comum); (b) nucipersica (nectarina); e (c) platicarpa (pêssego achatado) (MEDEIROS e RASEIRA, 1998).

Pêssegos são ricos em potássio, fósforo e cálcio. Contêm um alto teor de vitamina C, sendo 10 vezes superior ao teor encontrado na laranja, seguida da niacina e da vitamina A (MAHAN e ESCOTT- STUMP, 2012). Os principais

carotenoides encontrados são caroteno, critoxantina, luteína, violaxantina e zeaxantina (ZAGHDOUDI et al., 2015). Suas peculiaridades de sabor e aroma resultam do equilíbrio de açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, carotenoides e compostos voláteis, fazendo do pêssigo uma fruta muito apreciada e de grande importância comercial, incluindo suas “commodities” derivadas da cadeia produtiva, mas o Brasil possui pequena expressão no comércio internacional de pêssigo *in natura* e processado (GIL et al., 2002; VERSARI, 2002; YAGHINI et al., 2013).

Entre as cultivares de maior produção destacam-se Granada, Jade, Esmeralda, Diamante, Granito, Maciel, Eldorado, Jubileu, BR-6 e Magno (MEDEIROS e RASEIRA, 1998).

A cultivar Jubileu foi disponibilizada pelo Melhoramento Genético da Embrapa Clima Temperado em 1998 (Figura 1). A planta é produtiva em áreas com 250 a 350 horas de acúmulo de frio hibernar (temperatura menor ou igual a 7,2°C). Produz frutos redondos, sem ponta de película amarela, com até 20% de vermelho. A polpa é firme, de sabor doce-ácido, de cor amarela-escura e o caroço é aderente. Os frutos têm tamanho grande com diâmetro, em geral, superior a 6 cm. O conteúdo de sólidos solúveis varia de 12°Brix a 16,6 °Brix (EMBRAPA, 2011).



Figura 1. Pêssigo cultivar Jubileu
Fonte: O autor (2014)

Tradicionalmente, a maior parte da produção nacional de pêssego destina-se ao consumo *in natura*, cerca de 57%. O restante é industrializado como pêssegos em calda, geleias, doces em massa, purê, néctar e suco de pêssego clarificado (TORALLES e VENDRÚSCULO, 2007).

Estudos realizados por Toralles et al. (2006) demonstraram que a Cultivar Jubileu, apresenta características sensoriais favoráveis com relação ao sabor, à textura e à relação doçura/acidez para elaboração de purê de pêssego. O purê é um concentrado de pêssego que visa aumentar a vida de prateleira, reduzir custo de transporte e facilitar a comercialização. No mercado internacional, usualmente é comercializado entre 30-32 °Brix para a elaboração de diversos produtos.

Na industrialização de pêssegos o tempo de produção é crítico desde o ponto de vista ambiental, pois se tem um amplo volume de matéria prima em apenas dois meses, gerando uma grande quantidade de resíduos agroindustriais ao longo de sua cadeia produtiva (SENA e NUNES, 2006).

Segundo Martins e Faria (2002), do total de frutas processadas na produção de sucos e polpas são gerados cerca de 30 a 40% de resíduos. Na produção de compotas na região de Pelotas, há uma perda na forma de resíduos de 10 a 25% (SOUSA et al., 2011; DANTAS et al., 2012). No processamento de pêssegos em calda o maior volume de efluente e carga orgânica gerada é na etapa de descasque químico (ou pelagem) da fruta (SCHIEBER et al., 2001).

Esses resíduos possuem em sua composição vitaminas, minerais, fibras e compostos antioxidantes importantes para as funções fisiológicas. No entanto, na maioria das fábricas, são desperdiçados (MATIAS et al., 2005).

Alguns estudos demonstram a possibilidade de extração de enzimas de interesse comercial, como é o caso de invertase, a partir micro-organismos nativos de frutas e seus resíduos (MORIGUI et al., 1991; SANTOS et al., 1996; MAUREL et al., 2004).

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são organismos unicelulares, dos quais existem cerca de 600 espécies amplamente distribuídas na natureza. A figura 2 mostra a imagem de uma *S. cerevisiae* que é uma levedura que está incluída no Domínio Eukaryota; Reino

Fungi; Filo Ascomycota; Classe Saccharomycetes; Ordem Saccharomycetales; Família Saccharomycetaceae e Gênero *Saccharomyces* (AGGARWAL e MONDAL, 2009).

A reprodução é assexuada por gemulação multilateral (brotamento), onde a nova gêmula é formada na porção lateral da célula-mãe (BOULTON; QUAIN, 2001), ou sexualmente por esporulação (meiose, segregação e formação de haploides) e cruzamento com formação de diploides (PRETORIUS, 2000). Tais células com aproximadamente 3 μm de diâmetro, são capazes de dividir-se a cada 90 minutos em condições adequadas de substrato, sendo a temperatura ótima de seu crescimento entre 20 e 30 °C, com o pH entre 4,5 e 5,5 (PASSARGE, 2004).

Esta espécie de levedura é uma das mais estudadas pela biologia molecular por apresentar alta eficiência na metabolização de açúcares, crescimento rápido, habilidade na produção e consumo de etanol, osmotolêrancia e atividade celular em ambientes ácidos que são fundamentais na sua utilização industrial (ANDRIETTA et al., 2007; BADOTTI, 2008).

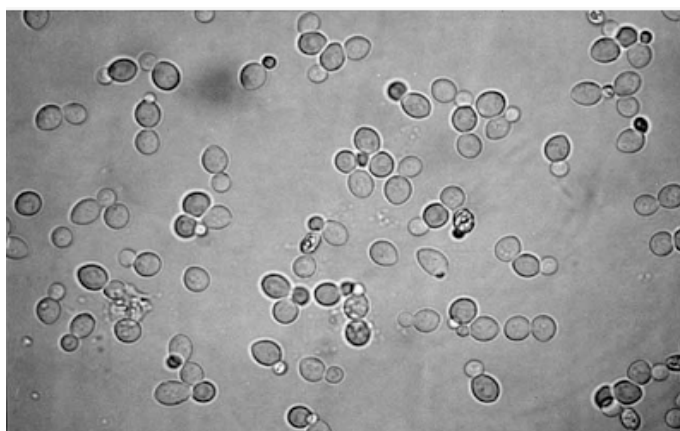


Figura 2. Imagem da *Saccharomyces cerevisiae* obtida através de microscópio
Fonte: www.engquimicasantosp.com.br-650x431 (2016)

Nas leveduras fermentativas predomina a respiração em condições aeróbias efeito de Pasteur, porém, irá ocorrer somente em condições onde o fluxo metabólico da via glicolítica estiver bem reduzido (baixíssimo crescimento celular). É caracterizado por uma supressão da capacidade fermentativa da levedura na

presença de oxigênio e promove um aumento da afinidade pelo sistema respiratório por Piruvato, Acetaldeído e NADH em relação à via fermentativa (PRONK et al., 1996). Por outro lado, em condições anaeróbicas, a via dominante é a fermentação. A levedura *S. cerevisiae*, por efeito de Crabtree, é uma das poucas com capacidade de crescer bem em condições de aerobiose e de anaerobiose, fermentando em ambos os casos desde que não haja concentração baixa de açúcar (DIAZ-MONTAÑO e CÓRDOVA, 2010; NEVOIGT, 2008). Quando a glicose fica abaixo de uma concentração crítica, entre 0,09 e 0,9% em massa, favorece o surgimento do diauxismo e a levedura pode apresentar dois perfis de crescimento, sendo que o segundo perfil de crescimento é acompanhado pelo consumo de outra fonte de carbono não fermentável no meio, geralmente o etanol via aeróbica. Na falta da oferta de uma fonte de carbono, a célula entra em declínio (GALDIERI et al., 2010; RETTORI et al., 2000).

A levedura, por ser um micro-organismo não patogênico, foi classificada como geralmente considerado seguro (GRAS – generally regarded as safe) e com importância relevante no campo biotecnológico devido a sua susceptibilidade a modificações genéticas pela tecnologia do DNA recombinante, que vem sendo bastante facilitado pela publicação, em 1996, do genoma completo da levedura (OSTERGAARD et al., 2000).

Seu cultivo é considerado fácil, tanto no laboratório como em escala industrial, num meio que contenha açúcares, sais, minerais e uma pequena quantidade de extrato de levedura (PEREZ, 2001). As células da levedura têm uma composição química aproximada de 40% de proteínas, 15% de ácidos nucleicos, 25% de polissacarídeos, 15% de lipídeos e 5% de compostos hidrossolúveis como nucleotídeos, aminoácidos, açúcares e enzimas como a invertase, entre outros (CUELLO, 2008; STEFANINI, 2012). Os principais componentes da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* são manoproteínas e β -glucanos em proporções mais ou menos igual e pequenas quantidades de N-acetilglucosamina (CONZELMANN et al., 1988; BALLOU, 1990; RINSUM et al., 1991). A capa de glucano tem a função de suportar e manter a rigidez da parede, no entanto, são as manoproteínas que determinam sua permeabilidade (Figura 3).

As suas colônias apresentam forma convexa e lisa, com uma coloração que varia entre o branco (predominantemente) e o creme (ocasionalmente). Estas leveduras podem formar cadeias simples de células esféricas, elipsoidais ou cilíndricas chamadas de pseudohifas (PRETORIUS, 2000; CHOUDHARY e JOHRI, 2009).

As células de *S. cerevisiae*, sobre condições de estresse (choques térmicos, alta concentração salina e de etanol, estresse oxidativo, baixos valores de pH, escassez de nutrientes e presença de metais pesados no meio) desenvolvem uma rápida resposta molecular sintetizando proteínas específicas, aumentando o nível de trealose e glicerol como mecanismo para reparar danos e proteger as estruturas celulares dos efeitos causados (SWAN; WATSON, 1998; ESTRUCH, 2000).

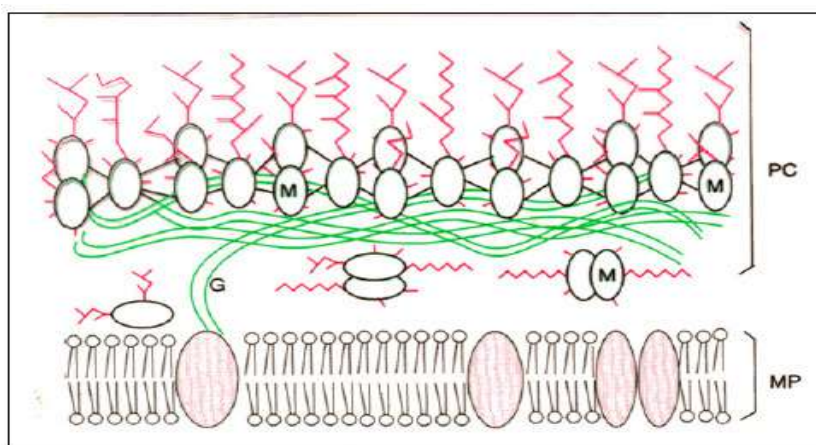


Figura 3. Esquema da estrutura e composição da parede celular da *S. Cerevisiae*. MP, membrana plasmática; M, mananas; PC, parede celular; G, glucano.

Fonte: Hernández (1985)

A identificação de leveduras tradicionalmente tem sido executada por meio de métodos fenotípicos para avaliar características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, mas os resultados não são muito seguros. Recentemente, técnicas genotípicas, incluindo novas técnicas com PCR, tornaram-se o principal caminho para identificar corretamente leveduras (ARAÚJO et al., 2005; GUAMÁN-BURNEO e CARVAJAL-BARRIGA, 2009). O problema dessas técnicas reside na dificuldade extração e purificação do DNA. Por outro lado, um método simples e rápido, baseado na capacidade assimilativa de substratos, conhecido como o API20C AUX,

tem sido amplamente usado para identificar leveduras (SILVA e CANDIDO, 2005; CHEN et al., 2010).

2.3. Invertases

A primeira carboidrase estudada na enzimologia foi a invertase. Sua atividade foi observada pela primeira vez em 1828 quando a levedura de panificação fermentava a sacarose em meio aquoso e isolada pela primeira vez por Berthelot em 1860 (WHITAKER, 2003). Esta enzima foi base para os estudos de catálise enzimática. No século XX teve início a sua comercialização, sendo uma enzima versátil que pode ser utilizada em diversos processos industriais (VITOLO et al., 2004).

A invertase, também conhecida como β -D fructofuranosidase (EC 3.2.1.26), é uma glicoproteína, com alguns resíduos de manose que hidrolisa a ligação osídica (tipo α - β) de carboidratos possuidores de um radical β -fructofuranosil não substituído, sendo a sacarose o substrato preferencial, mais também tem a capacidade de catalisar a hidrólise de rafinose e estaquiose (BELCARZ et al., 2002; FIEDUREK et al.; PARAZZI JUNIOR, 2006), produzindo uma mezcla de frutose e glicose. O mecanismo de reação é baseado no esquema abaixo (Figura 4).

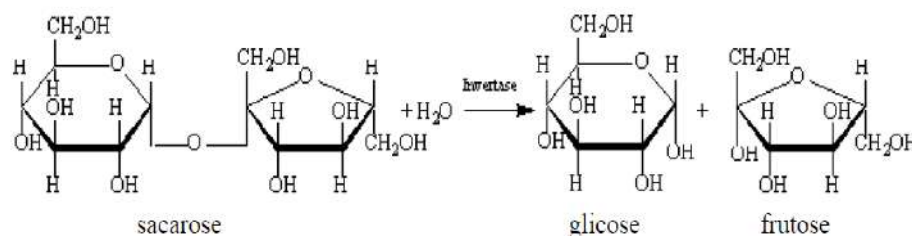


Figura 4. Mecanismo de reação catalisada pela invertase.
Fonte: Rustiguel (2009).

A reação catalítica geralmente ocorre em pH entre 4,6 e 5,0 e temperatura entre 35°C e 50°C, com concentração de substrato da ordem de 120 g/L. Acima desta concentração a solução de sacarose tem a viscosidade aumentada reduzindo a atividade enzimática na presença de água (VITOLO et al., 2004).

O produto final da hidrólise da sacarose são os monossacarídeos glicose e frutose, de constituição líquida não cristalizável conhecida como açúcar invertido

muito importante nas indústrias de alimentos e farmacêutica, pelo maior poder adoçante, maior carácter umectante, maior solubilidade e, portanto, menor cristalização e endurecimento frente à sacarose. A frutose também pode ser utilizada como adoçante para diabéticos (ASHOKKUMAR et al., 2001).

2.3.1. Organismos produtores de invertase

A disponibilidade da enzima em plantas e frutos esta relacionada com o metabolismo de sacarose, osmorregulação e gravitropismo (CANTARELLA, 2003). Nas plantas, a localização subcelular de invertase solúvel é controversa: a enzima é descrita como citoplasmática, apesar de sua natureza glicoproteica, ou como vacuolar (WHITAKER, 2003).

Os micro-organismos produtores de invertase são conhecidos de longa data e continuam a ser estudados após sua descoberta em 1828, especialmente *Saccharomyces cerevisiae* (WICKERHAM, 1958); *Saccharomyces uvarum* (DWORSCHAK e WITEKERHAM, 1958); *Penicillium chrysogenum* (POONAWALLA et al., 1965); *Kluveromyces fragilis* (WORKMAN e DAY, 1983); *Schizosaccharomyces pombe* (MORENO et al., 1985) ; *Candida utilis* (GUIMARAES et al., 2007). As invertases obtidas de *S. cerevisiae* são as mais conhecidas e investigadas (produção e caracterização), devido a essa levedura ser um micro-organismo GRAS e ter mais de 2000 cepas registradas (OSTERGARD et al., 2000; SILVEIRA et al., 2000; SHAFIQ et al., 2002). Além das leveduras, sobretudo na espécie *Saccharomyces cerevisiae*, as invertases são também encontradas em invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos (DEUNER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; GOULART et al., 2013)

Na levedura, a invertase interna está localizada no citoplasma, enquanto que invertase externa é encontrada na parede celular e está associada a uma manana (polissacarídeo presente na parede celular das leveduras), com a função de clivar a sacarose extracelular para obter frutose e glucose (CANTARELLA, 2003; BOFO et al., 2005). Ambas as enzimas são expressas constitutivamente e derivadas de um ou mais genes SUC (NAUMOV et al., 1996; PARAZZI, 2006). A invertase externa é diferenciada por uma sequência de aminoácidos responsáveis de encaminhá-las para o retículo endoplasmático, onde ocorre a glicosilação (inserção de dez unidades de manana por unidade de enzima) (PERLMAN; HALVORSON,

1981; VITOLO, 1989). Após o processo de glicosilação, ela é armazenada em vesículas no Complexo de Golgi sendo finalmente liberada no espaço periplásmico durante a gemulação (reprodução assexuada da levedura) (PERLMAN et al., 1981; BELCARZ et al., 2002). A glicosilação não é essencial para a atividade da invertase, esta confere proteção contra a ação hidrolítica das proteases naturais do micro-organismo e favorece a agregação das frações de invertase em estruturas supramolares como: tetrâmeros, hexâmeros e octâmeros (figura 5), sendo que estes últimos apresentam maior eficiência na conversão da sacarose em glicose e frutose e possibilita a inclusão e fixação da molécula na parede celular (ARRUDA; VITOLO, 1999; SAID; PIETRO 2004). Um aspecto fundamental é o fato da invertase interna não estar sujeita à repressão catabólica por hexoses, ocorrendo o contrário com a invertase externa (REDDY et al., 1990).

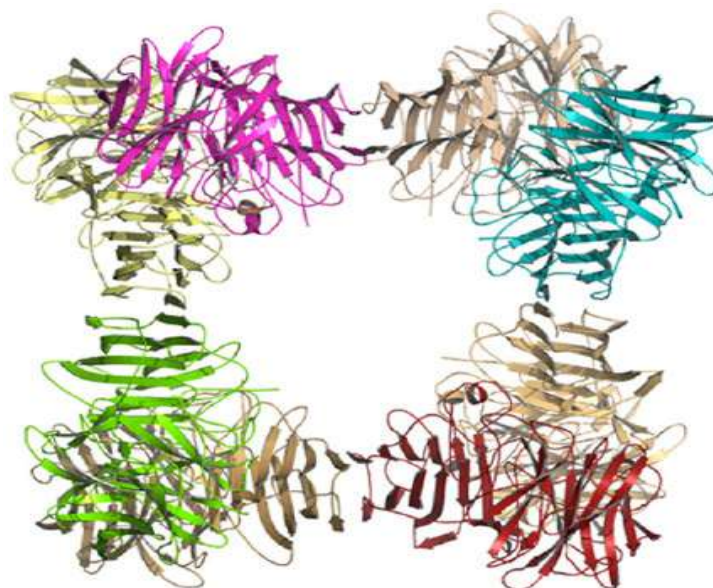


Figura 5. Imagem tridimensional da Invertase octâmera de *S. cerevisiae*.

Fonte: Sainz-Polo (2013).

2.3.2. Utilização da invertase na indústria de alimentos

Atualmente, a invertase é uma das enzimas mais utilizadas na indústria dos alimentos, especialmente na preparação de doces, bebidas e na produção de ácido láctico por fermentação de melaço (ACOSTA et al., 2000). A invertase também é utilizada para hidrólise de sacarose em processos de produção de etanol para evitar

a formação de sorbitol durante o processo de fermentação (LEE e HUANG, 2000). Além disso, essas enzimas podem ser utilizadas para a produção de frutooligosacarídeos (FOS). Tais açúcares não são metabolizados pelo organismo humano. Com valor calórico inferior e com funções prebióticas, promovem vários benefícios à saúde humana, como: a redução de colesterol sérico (YAMAMOTO et al., 1999); o estímulo ao crescimento de flora saudável (HARTEMINK et al., 1997; PASSOS et al., 2003); a promoção de alívio na constipação e desconforto intestinais (YUN, 1996; ANONIMOB, 1999); o estímulo e absorção de minerais, como cálcio, magnésio, sódio, cloreto e fósforo (OHTA et al., 1995; WOLF et al., 1998; LOPEZ et al., 2000); e a prevenção de alguns tipos de câncer (FERNÁNDEZ et al., 2004; NGUYEN et al., 1999).

A hidrólise da sacarose produz uma mistura equimolar de glicose e frutose conhecida como xarope de açúcar invertida o qual tem maior poder edulcorante que a sacarose e é usada na produção de geleias, balas, doces e xaropes, devido ao seu alto poder edulcorante, que é cerca de 40% superior ao da sacarose, e à sua lenta cristalização, ocasionando uma melhoria na textura dos alimentos (GRACIDA et al., 2005). Também, pode ser usado como matéria-prima na obtenção de frutose e ácido glicônico (FILHO, 1999).

Esta hidrólise pode ser realizada por diferentes métodos. Industrialmente o método utilizado para produzi-lo é a hidrólise ácida, formando um produto bastante colorido (devido a formação de hidroximetilfurfural), uma vez que as condições de reação são drásticas (pH baixo e temperaturas elevada) (RODRIGUES et al., 2000). Apesar da hidrólise ácida da sacarose ser viável para obtenção do xarope, o processo enzimático usando invertase é preferível por ser uma reação leve ($4,5 < \text{pH} < 5,0$ e $30^\circ \text{C} < T < 50^\circ \text{C}$) (VITOLLO, 2004) e apresentar grau de cristalização menor. Além disso, não há formação de compostos indesejáveis como furfural no produto (TOMOTANI e VITOLLO, 2010). No entanto, o uso de invertase solúvel não é uma alternativa viável em termos de custos do processo e estabilidade da enzima, o que motiva a numerosas investigações para realizar estudos de imobilização. Principalmente pelo fato de que podem ser reutilizadas (GARCIA-GALAN et al., 2011).

2.3.3. Propriedades da proteína

A massa molecular da invertase varia consideravelmente, tanto em plantas (desde 42 kDa a 504 kDa) como em micro-organismos (37-560 kDa). A natureza do carboidrato ligado a enzima, conhecido como glicosilação, a técnica de purificação e eletroforese empregada para estimativa da massa molecular e o elevado número de cepas de leveduras produtoras de invertase pode ser a melhor explicação para variabilidade na massa molecular (CANTARELLA et al., 2003). Andjelkovic et al. (2010), trabalhando com purificação do extrato bruto de invertase por precipitação com etanol seguido de troca iônica em uma QAE-Sephadex e gel filtração em uma Sephacryl S-200, encontraram 60 kDa, por SDS-PAGE, para quatro isoformas diferentes obtidas de *S. cerevisiae* industriais usadas para produção de pães. Por outro lado, Guimarães et al. (2007), para invertase glicosilada de *A. ochraceus* obteve 135 kDa estimada por gel filtração em uma Sephacryl S-200 e 79 kDa por SDS-PAGE.

Na levedura *S. cerevisiae*, são conhecidas duas formas pela qual a sacarose é metabolizada (Figura 6). Numa delas, a mais utilizada e bem descrita até o momento, a molécula é hidrolisada no ambiente extracelular pela enzima invertase, produzindo glicose e frutose, as quais são posteriormente transportadas para o interior das células por difusão facilitada (sem gasto energético) pelos transportadores Hxtp, e posteriormente consumidas na via glicolítica (SANTOS et al., 1982). Na outra rota, menos caracterizada, a sacarose pode ser diretamente transportada através do co-transporte com íons H^+ , pelos transportadores Malx1p e Agt1p e subsequentemente hidrolisada no ambiente intracelular por ação da enzima invertase intracelular ou por maltases (STAMBUK et al., 2009).

Leveduras que contenham qualquer um dos genes SUC (SUC1-SUC5 e SUC7) são capazes de produzir a enzima invertase pela síntese de dois fragmentos de RNA: um transcrito maior (1,9 kb), contendo a sequência sinal que codifica a enzima glicosilada extracelular, e outro menor (1.8 kb), que codifica a enzima não-glicosilada intracelular (CARLSON e BOTSTEIN, 1982; GROSSMANN e ZIMMERMANN, 1979). Os dois RNAs são transcritos na mesma direção e diferem apenas na região do início da transcrição (porção 5'), a qual codifica o peptídeo sinal para a secreção e glicosilação da enzima extracelular.

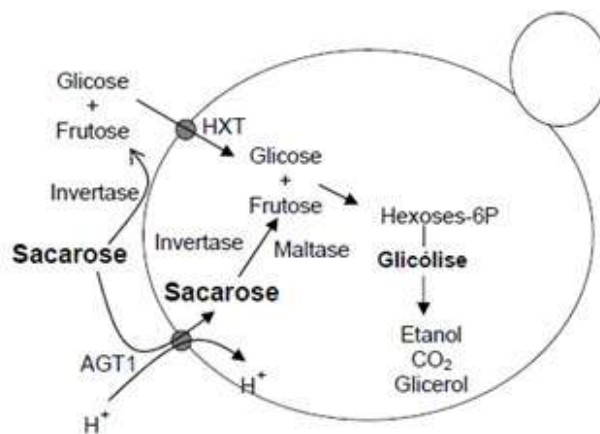


Figura 6. Modelo atual do metabolismo da sacarose por *S. cerevisiae*. A sacarose pode sofrer hidrólise pela invertase periplásmica ou ser transportada ativamente pela permease AGT1 e, então, ser clivada pela maltase ou invertase intracelular. Fonte: Santos (1982).

A invertase extracelular, que é controlada pela repressão por glicose, constitui a fração majoritária da atividade total de invertase (90%), desta forma, acredita-se que seja a rota principal da levedura no metabolismo da sacarose. Por outro lado, a intracelular é independente da glicose e expressada constitutivamente (CARLSON e BOTSTEIN, 1982; GASCÓN e LAMPEN, 1968).

2.3.4. Produção e extração da invertase

A produção de invertase pode ser realizada de duas maneiras, fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES). Na FS, o meio de cultura é líquido com nutrientes necessários para o desenvolvimento do micro-organismo. Esta possui como vantagens, a facilidade de controle das variáveis físico-químicas do processo, maior eficiência de absorção dos nutrientes e secreção de metabólitos pela célula, levando a menores tempos do processo e consequente ganhos em produtividade (GIRALDO, 2011). Por outro lado, na FES o micro-organismo deve se desenvolver em substratos insolúveis (geralmente resíduos agroindustriais) sem disponibilidade de fase líquida livre. Possui como vantagens a simplicidade dos meios de cultivo, a exigência de baixo grau de umidade, que reduz problemas de contaminação, a maiores concentrações de enzima, a estabilidade, a baixo nível de repressão catabólica, a ausência de espuma e a possibilidade de extração imediata

do produto, entre outros (MITCHELL et al., 2000; ROMERO-GÓMEZ et al., 2000; BON et al., 2008).

Muitos trabalhos, sobre produção de invertase têm sido realizados com fermentação submersa usando sacarose e melaço como principal fonte de carbono, em diferentes organismos: *A. fumigatus* (FIEDUREK et al., 2000); *C. utilis* (BELCARZ et al., 2002); *T. clypeatus* (MUKHERJEE et al., 2002); *S. cerevisiae* ATCC 9763 e CB-IX (BOFO et al. 2005); *A. parasiticus* (LUCCA et al. 2013).

Dentre as invertases produzidas por FES merecem destaque os seguintes micro-organismos: *Rhizopus sp.* (GOULART et al., 2003); *A. niger* (ARANDA et al., 2006); *Fusarium sp.* (SHAHEEN et al., 2008); *S. cerevisiae* (BARBOSA, 2009); *Aspergillus casingii* (NOVAKI, et al., 2010).

A extração da invertase de *S. cerevisiae* pode ocorrer através de métodos químicos, físicos ou ambos (GUIMARÃES et al., 2007; BASSON et al., 2010). A autólise é um exemplo de método físico e químico de extração que é amplamente citado (VITOLLO, M., 1979; ANDJELKOVIC et al., 2010; TORALLES et al., 2014). Basicamente consiste na ruptura e degradação das estruturas celulares por atividades das enzimas endo e exo- β -(1,3) glucanases que liberam uma mistura de polissacarídeos de cadeias curtas (oligossacarídeos). Uma fração destes polissacarídeos corresponde as manoproteínas unidas covalentemente ao glucano da parede intacta. Posteriormente, a hidrólise parcial do glucano provoca uma desestabilização da estrutura da parede, que supõe uma liberação de manoproteínas de elevado peso molecular com baixos conteúdos de glicose e que provém majoritariamente da zona periplasmática. Posteriormente segue a degradação dos glucanos da parede pelas β -(1,3)-glucanases que atuam nos restos da parede e no meio extracelular. Finalmente as exo- β -(1,3)-glucanases, solubilizadas no meio, degradam o glucano unido as manoproteínas que por sua vez podem ser hidrolisadas por α -manosidases além de outras proteases que liberam peptidomananos de menor tamanho (CHARPENTIER e FREYSSINET et al., 1989). Guilloux (1995), trabalhando com *S. cerevisiae*, demonstrou que com ruptura e fragmentação do material celular são liberadas moléculas tanto do interior celular como das paredes.

A determinação da atividade da invertase, tanto por métodos físicos quanto químicos, baseia-se na medida da quantidade de glicose e frutose formada (CANTARELLA, 2003). Dentre os métodos físicos, o de mais amplo uso é a polarimetria, a qual mede o desvio do plano da luz polarizada à medida que a sacarose é hidrolisada (RIBEIRO, 2002). Dentre os químicos, a dosagem é feita em termos de açúcares redutores usando os reagentes Fehling, ácido 3,5-Dinitro salicílico (DNS); Somogy-Nelson (SILVA et al, 2003). O método colorimétrico DNS-glicose é o mais citado no estudo da atividade de invertase que é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de substrato (expresso em glucose equivalente) por minuto nas condições do ensaio. Também, a atividade pode ser expressa em termos de atividade específica em μ katal, i.e, a quantidade de enzima que catalisa a quantidade de 1 μ mol de substrato por segundo e por miligrama de proteína determinada pelo método Lowry et al. (CANTARELLA et al., 2003).

2.3.5. Purificação da invertase

Após processos de fermentação e extração da enzima, dependendo da sua aplicação, são necessárias operações de purificação da mesma, que devem ser incluídas no custo final do produto, o qual pode representar até 80 % do valor da produção (GALAEV e MATTIASSON, 2001; GHOSH et al., 2003; MORAES et al., 2009). A purificação de proteínas consiste na separação das proteínas de interesse de uma mistura complexa para sua posterior caracterização, considerando como determinar a quantidade e pureza da proteína necessária para seu posterior uso (MATHEWS et al., 2002, VEANA et al., 2011). Primeiramente, se faz um rompimento da célula do tecido usando um método químico ou físico, geralmente centrifugação ou filtração, para separar o extrato proteico dos restos celulares.

A maior parte dos estudos publicados envolvendo purificação de invertase envolvem processos cromatográficos (LIU et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2009; JEGOU et al., 2009; HUSSAIN et al., 2009; NOVAKI, et al., 2010). Dentro das referenciadas, a filtração em gel, também conhecida como cromatografia de exclusão molecular-CEM, separa de acordo com tamanho. As colunas são recheadas de esferas porosas compostas de um polímero insolúvel altamente hidratado como o dextrano, a agarose ou a poliacrilamida. As marcas comerciais mais usadas são Sephadex, Sepharose e Biogel, normalmente com porosidade de

0,1 mm de diâmetro. As moléculas menores ficam encapsuladas e distribuídas entre as esferas, permitindo a fluidez das moléculas grandes de interesse através da coluna. Por outro lado, a cromatografia de intercâmbio iônico-CII, é a técnica mais usada na separação de frações protéicas baseada em sua carga. As proteínas carregadas positivamente, catiônicas, podem ser separadas em colunas de carboximetil-celulose que são carregadas, negativamente. No entanto, que as proteínas carregadas negativamente aniônicas, são separadas em colunas de dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose) carregadas positivamente (BERG et al., 2002).

No entanto, estes processos cromatográficos são difíceis de ser escalonados e possui um alto custo. Para minimizar estes custos, a otimização de metodologias rápidas e eficazes para o processo de purificação são de grande importância (ISHIHARA e YAMAMOTO, 2005; MORAES e KALIL, 2009). Em relação às técnicas que podem ser aplicadas, de modo a maximizar a pureza sem acarretar maiores prejuízos no rendimento, destacam-se, o emprego de sistema aquoso bifásico (SAB), membranas de afinidade, nanopartículas magnéticas e a precipitação seletiva que induz uma mudança na solução para que as proteínas de interesse ou contaminante alcance seu ponto isoelétrico e precipitem. Nesta técnica são usados sais, solventes orgânicos e polímeros; considerando-se a mais empregada à precipitação salina com sulfato de amônio. A alta solubilidade do sal causa uma competição pela água da solução, causando que as proteínas menos hidrófilas percam água no seu entorno e precipitem em ordem de solubilidade em um fenômeno conhecido como *salting-out* (PRADO-BARRAGAN et al., 1999; SLIVINSKI, 2007).

2.3.6. Estudo cinético e propriedades da invertase

Para estudar a cinética da invertase e estabelecer uma relação ótima entre a velocidade de hidrólise do substrato e a concentração da enzima, assim como o efeito do pH, temperatura e efetores, é necessário, como preâmbulo, considerar que a enzima seja pura e desprovida de atividade parasita. Além disso, considerando que as invertases normalmente apresentam um comportamento michaeliano, então a hipótese de Michaelis-Menten pode ser aplicada. Tal hipótese diz que em todas as reações enzimáticas, a enzima (E) se combina rápida e reversivelmente com o

substrato (S) para formar um complexo (ES) (NELSON e COX, 2006). Sob o ponto de vista cinético, considera-se relevante a formação do complexo ES e a liberação de produto (P) com regeneração da molécula de enzima, sendo que o passo da formação de produto é irreversível (SCHEFFER e GONZÁLEZ, 2003).

Em concentrações relativamente baixas de substrato, V_0 (velocidade inicial) aumenta quase que linearmente com o aumento da $[S]$ (concentração de substrato). Já em altas $[S]$, V_0 aumenta cada vez menos em resposta aos aumentos da $[S]$. Por fim, é alcançado um ponto acima do qual ocorrem aumentos insignificantes de V_0 , à medida que a $[S]$ aumenta (Figura 7). Esse patamar atingido para tais valores de V_0 é muito próximo da velocidade máxima, $V_{máx}$ (NELSON e COX, 2006).

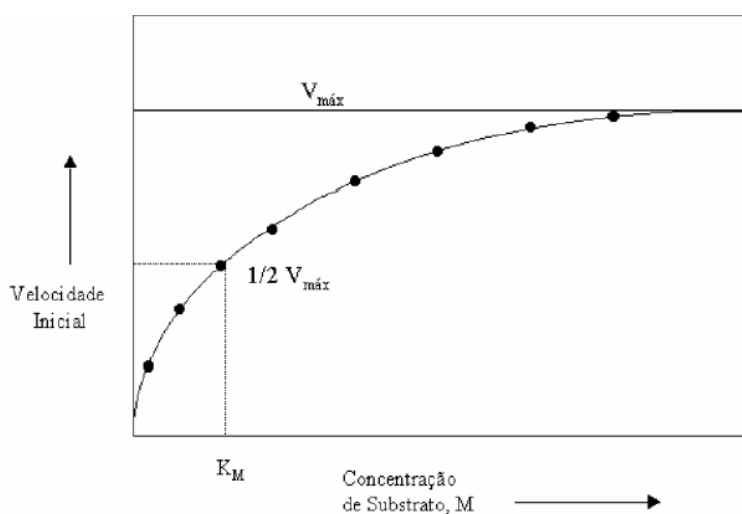


Figura 7. Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima
Fonte: ALMEIDA (2007)

A equação matemática que define a relação quantitativa entre a velocidade de uma reação enzimática e a concentração do substrato, é a equação de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

onde K_m é definido como a concentração de substrato necessária para que a velocidade da reação enzimática seja a metade da máxima ($V_{máx}$). No caso da invertase o valor de K_m normalmente é expresso em milimols de sacarose e a

atividade específica em unidades por miligramas de proteínas, sendo uma unidade igual a 1 µg de glicose por minuto. O pH, a temperatura, o tipo de substrato e o tipo de suporte podem ter influência significativa no valor de K_m (COPELAND, 2000; WHITAKER, 2003)

Através da equação de Michaelis-Menten é possível a transformação em gráfico dos duplos recíprocos ou Lineweaver-Burke, o gráfico de $1/V_0$ versus $1/[S]$ é representado por uma linha reta (Figura 8). Essa linha tem uma inclinação de $K_m/V_{máx}$, um intercepto de $1/K_m$ no eixo de $1/[S]$. O gráfico dos duplos recíproco para velocidade de reações enzimáticas é muito útil na diferenciação de diferentes mecanismos de reação enzimática e na análise de inibidores de enzimas (NELSON e COX, 2006).

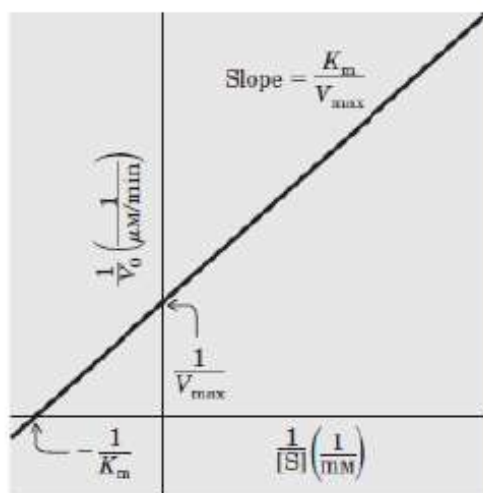


Figura 8. Gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk
Fonte: NELSON e COX (2006)

A tabela 1 mostra algumas das propriedades para invertase obtida de células de *S. cerevisiae* colhidas de fermentação alcoólica de melaço em batelada. A constante de Michaelis-Menten dá uma ideia da afinidade pelo substrato, no caso da invertase interna e externa de *S. cerevisiae* citada, na tabela 1, a afinidade é semelhante. Por outro lado, em rafinose, para invertase interna e externa obtida da mesma levedura, Cantarella (2003) referência 150 mM e 15 mM, respectivamente.

Tabela 1. Algumas propriedades da invertase interna e externa de *S. cerevisiae*

Propriedades	Externa	Interna
Massa Molar (kDa)	270	135
Conteúdo de manana (%)	50	3
Conteúdo de glicosamina (%)	3	0
Atividade específica (U.mg ⁻¹)	2.700	2.900
K _m (mM)	26	25

Fonte: Adaptado de Vitolo. In: Said e Pietro. 2004, cap. 12, p. 212. Enzimas como agentes biotecnológicos.

2.3.7. Imobilização

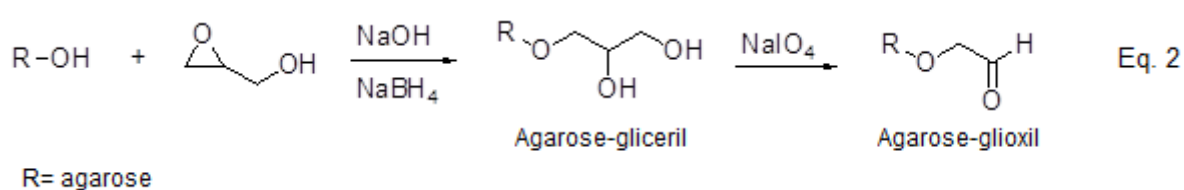
As enzimas destacam-se por possuírem diversas qualidades como: alta especificidade, atóxica, seguras, biodegradáveis, obtidas de fontes renováveis e exigir baixa energia de ativação que resultam em menor consumo de energia (ILLANES, 2008; WOHLGEMUTH, 2010). Apesar de possuir muitas vantagens, o uso de enzimas em processos industriais é limitado devido ao fato de serem catalisadores ainda caros e frágeis. Além disso, quando utilizadas em forma livre elevam substancialmente o custo do processo frente à forma imobilizada (ILLANES, 2008).

A invertase está catalogada dentro das enzimas solúveis de alta demanda. Assim é possível encontrar diferentes métodos para obtenção e extração desta enzima a partir de micro-organismos comerciais. No entanto, após extração, a invertase encontra-se em forma glicolisada, dificultando a purificação.

A imobilização não minimiza os custos de purificação, mas tem mostrado ser uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades da enzima livre, tais como: atividade e seletividade; reutilização; produção contínua, melhoria de estabilidade com o tempo de meia-vida; utilização de pequeno volume de amostra evitando contaminações e fácil separação da enzima dos produtos de reação (GUISAN, 2006; CARDOSO et al., 2009; GARCIA-GALAN et al., 2011). Por exemplo, Tumturk et al. (2000) reportaram que a invertase imobilizada em um dímero de poliamina pode ser reutilizada até 50 vezes com manutenção de sua atividade inicial; Tanriseven e Dogan (2001), obtiveram resultados semelhantes para reutilização de invertase de *S. cerevisiae* imobilizada em cápsulas de gel de alginato de cálcio. Andjelkovic et al. (2015), trabalhando com imobilização de

invertases em nanoargilas, demonstraram que esta técnica preserva a atividade catalítica e a estabilidade térmica da enzima, com ligeiro aumento do valor de K_m . Por outro lado, Amaya-Delgado et al. (2006), para invertase imobilizada em nylon-6, demonstraram que o método de imobilização não afeta significativamente o valor de K_m . A imobilização consiste em reter ou ligar enzimas ou sistemas enzimáticos em uma região definida do suporte. Nesse processo é importante preservar a atividade catalítica (RODRIGUES et al., 2000). As enzimas podem ser imobilizadas em géis hidrofílicos, como ágar, agarose, alginato, carragenina, ou em matrizes poliméricas semipermeáveis ou em celulose (HUERTA-OCHOA, 2004; TOMOTANI et al., 2006; CASTILLO, 2008). A agarose é um polissacarídeo extraído de algas vermelhas, e sua estrutura química forma géis muito resistentes. Estes géis têm uma estrutura macro-reticular com uma malha muito aberta, cuja estrutura é mantida por ligação de hidrogênio e sem grupos iônicos, o que confere sua característica neutra e inerte (VINUEZA, 2012). Possui hidroxilas livres nas quais podem ser ligados “braços” químicos para imobilização de enzimas.

A imobilização da invertase ocorre principalmente por adsorção ou ligação covalente em um suporte ou aprisionamento em membranas (KOTWAL e SHANKAR, 2009). A imobilização por ligação covalente a um suporte ocorre em duas etapas (Eq. 2). A primeira etapa envolve a reação da agarose com o glicidol em presença de Hidróxido de sódio (NaOH) e Boridreto de sódio (NaBH_4) resultando agarose-gliceril que por oxidação em presença de periodato de sódio produz um gel de agarose-glioxil, que é o suporte pronto para imobilizar a invertase (CARAVANTE, 2013).



Explicando de uma forma detalhada, sobre os suportes agarose-glioxil, a imobilização ocorre através das regiões da superfície da enzima, que possui maior densidade de grupos aminos primários da proteína com o suporte previamente ativado, de modo que na superfície apresentem uma monocapa de aldeídos ligeiramente afastados da parede do suporte e totalmente expostos ao meio reacional (GUISÁN, 1988). Em um primeiro passo, ocorre a formação de enlaces

tipo base de Schiff (grupos iminos) entre os ϵ -NH₂ lisinas e os grupos aldeídos do suporte. Os aminoácidos lisinas são normalmente abundantes na superfície proteica e são muito reativos como nucleófilos, quando estão desprotonados ou expostos ao meio. Para que ocorra esta reação, torna-se necessário trabalhar com pH próximo o superior ao pKa dos grupos ϵ -NH₃⁺ (pH 10,05).

Esta primeira interação entre a enzima e o suporte ocorre pelo menos através de dois pontos e a enzima deve se auto-orientar para a região mais rica em grupos aminos reativos. Isto leva a formação de uma união fraca e reversível. Em um seguinte passo, reduzem-se as bases de Schiff a enlaces amino secundários com boroidreto de sódio. Esta redução permite, além de estabilizar o enlace enzima-suporte, converter todos os grupos aldeídos remanescentes em grupos hidroxilas, dando lugar a uma matriz inerte e hidrofílica (3). Quando não se faz o bloqueio dos grupos reativos remanescentes, poderá ocorrer um numero de reações indesejadas ou não controladas, que desestabiliza a proteína e porem leva a inativação da enzima (GUISAN et al., 1997).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA N, BELDARRAÍN A, RODRÍGUEZ L e ALONSO Y. Characterization of recombinant expressed in methylotrophic yeast. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Malden, v. 32, n. 3, p.179-187, 2000.

AGGARWAL, M.; MONDAL, A. K. **Debaryomyces hansenii: Na Osmotolerant and Halotolerant Yeast**. In: T. Satyanarayana and G. Kunze. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. 1st Ed. New Delhi: Springer, 2009. p. 67.

AKGÖL, S. KAÇAR, Y. DENIZLI, A. ARICA, M. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. **Food Chemistry**, Davis, v. 74, n. 3, p. 281-288, 2001.

ALMEIDA, A. C. S. **Estudo do processo contínuo para produção de açúcar invertido por via enzimática**. 2003. 85 f. Dissertação de mestrado (mestrado em engenharia química) – Centro de Tecnologia e Geociência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

AMAYA-DELGADO, L., HIDALGO-LARA, M. E., e MONTES-HORCASITAS, M. C. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. **Food Chemistry**, Davis, v. 99, p. 299–304, 2006.

ANDJELKOVIĆ, U.; PIĆURIĆ, S.; VUJČIĆ, Z. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. **Food Chemistry**, Davis, v. 120, n. 1, p.799-804, 2010.

ANDJELKOVIĆ, U.; MILUTINOVIĆ-NIKOLIĆ, A.; JOVIĆ-JOVIČIĆ, N.; BANKOVIĆ, P.; BAJT, T.; MOJOVIĆ, Z.; VUJČIĆ, Z.; JOVANOVIĆ, D. Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilization on modified beidellite nanoclays. **Food Chemistry**, Davis, v. 168, n. 1, p.262-269, 2015.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol -30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Campinas, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

ANÔNIMO B. Latest research on elderberry pro.eimer's disease, phosphatidylserine. Disponível na Internet <http://www.nutririondynamics.net>. Capturado em 20 dez 1999.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul, Ed. Gazeta Santa Cruz, 128 p., 2012.

ARANDA, C.; ROBLEDO, A.; LOERA, O.; ESQUIVEL, J. C. C.; RODRIGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. Fungal Invertase expression in solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 2, p. 229-233, 2006.

ARAUJO, C. R.; MIRANDA, K.C.; PASSOS, X.S; SOUZA, L.K.H.; LEMOS, J.A; KHRAIS, C.H.A; COSTA, C.R; SILVA, M.R.R.; FERNANDES, O.F.L. Identificação das leveduras do género Candida por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMagar™ Candida. **Revista de Patología Tropical**, Goiânia, v. 34, n.1, p.37-42, 2005.

ARRUDA, L.; VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.81, n. 1, p. 23-33, 1999.

ASHOKKUMAR, B., N.KAYALVIZHI AND GUNASEKARAN, P. Optimization Of Media For Â Fructofuranosidase Production By Aspergillus Niger In Submerged And Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**, Davis, v. 37, n. 4, p.331-338, 2001.

AVILA, T. L.; TORALLES, R.P; KUHN, C.R.; FERREIRA, M; V.; ROMBALDI C.V. Identification of yeast isolated from its spoiled peach purre and evaluation of yeast growth potential in batch cultivate for invertase production. In: 28º Congresso de Basilerio de Microbiologia, 2015, Centro de Conveções de Florianópolis. Anais... Florianópolis: SBM, 2015.

BADOTTI, F.; DÁRIO, M.G.; ALVES, S.L.A.; CORDIOLI, M.L.A.; MILETTI, L.C.; ARAUJO, P.S. AND STAMBUK, B.U. Switching the mode of sucrose utilization by Saccharomyces cerevisiae. **Microbial Cell Factories**, London, v. 7, n. 4, p.1-11, 2008.

BALLOU, C. E. **Yeast cell wall and cell surface molecular biology of the yeast Saccharomyces**: Methabolism and gene expresion Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

BARBOSA, E. F. Avaliação da atividade de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em polianilina sobre o caldo de cana. 2009. 62f. Dissertação (Mestrado em Biologia) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

BASSON, C.E.; GROENEWALD, J-H.; KOSSMANN, J; CRONJÉ, C.; BAUER, R. Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. **Food Chemistry**, Davis, v. 121, n. 4, p. 1156–1162, 2010.

BELCARZ, A.; GINALSKA, G.; LOBARZEWSKI, J. e PENEL, C. The novel nonglycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1594, n. 1, p. 40–53, 2002.

BERG JM, TYMOCZKO JL, STRYER L. Chapter 4: **Exploring proteins**. Biochemistry. 5th. edition. WH Freeman, New York: 2002.

BERTHELOT, M. Sur la fermentation glucosigne du sucre de canne. **CR Acad Sci**, Paris, v. 50, n. 1, p. 980–984, 1860.

BOFO, D.C.S.; CASTRO, H.F; MEDEIROS, M.B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana de açúcar. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, V SIPAL, p. 121-124, 2005.

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

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. 1ed. Blackwell Science Ltd., 2001.643p.

BRASIL, MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). PRODUÇÃO INTEGRADA NO BRASIL. Produção integrada de frutas e sistema agropecuário de produção integrada no Brasil, 1008p., 2009.

CANTARELLA, L.; ALFANI, F.; CANTARELLA, M. β -D-Fructofuranoside Fructohydrolase. In J. R. Whitaker, A.G. J. Voragen, D. W. S. Wong (Eds.), **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 787-804.

CARAVANTE, A. L. C. **Produção de açúcar invertido utilizando biorreator com invertase imobilizada em sabugo de milho**. 2013. 46f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2013.

CARDOSO, C.L. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p175–187, 2009.

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. **Journal Cell**. Maryland, v. 28, n. 1, p.145-154,1982.

CASTILLO, J. M. F. **Estudio de oligomerizacion de invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* mediante entrecruzamiento intermolecular**. 2008. 81 f. Trabajo de grado (Graduación em química) – Escuela de Química, Universidade Industrial de Santander, Bucaramanga, 2008.

CHARPENTIER, C. AND FREYSSINET, M. The mechanism of yeast autolysis in wine. **Yeast**, Chichester v. 5, n. spec., p181–186, 1989.

CHEN, Y.; KANG, E.T.; NEOH, K. G.; TAN, K.L. Covalent immobilization of invertase onto the surfasse-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. **European Polymer Journal**, Netherlands, v. 36, n. 10, p. 2095-2103, 2000.

CHEN, L-S.; MA, Y.; MAUBOIS, J-L.; CHEN, L-J.; LIU, Q-H.; GUO, J-P. Identification of yeast from raw milk and selection for some specific antioxidante properties. **International Journal of Dairy Technology**, Hoboken, v. 63, n. 1, p. 47-52, 2010.

CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B. N. **Basidiomycetous Yeasts**: Current Status. In: T. Satyanarayana and G. Kunze. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. 1st Ed. New Delhi: Springer, 2009.19-43 p.

CONZELMANN, A., PUOTI, R., LESTER, L., DESPONDS, C. Two different types of lipid moieties are present in glycosyl phosphatidylinositol-anchored membrane

proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 11, n. 2, p. 457- 466, 1988.

COPELAND, R. A. **Enzymes**: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis. 2 ed. New York: Wiley-VCH, 2000. p. 397.

CUELLO, I. C. **Identificación y análisis funcional de genes de *Saccharomyces cerevisiae* implicados en la fosforilación de N-oligosacáridos**. 2008. 226p. Tesis (Doctorado Avances em el Estudio de Organismos Uni-y Pluricelulares) Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología. Extremadura, 2008.

DANTAS, S. T.; SARON, E. S.; KIYATAKA, P. H. M.; SOARES, B. C.; GATTI, J. A. B.; DANTAS, F. B. H. Estudo da influência de danificações mecânicas provocadas em latas de pêssego em calda no desenvolvimento de corrosão interna. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 343-351, 2012.

DEUNER, S.; FERREIRA, L. S.; BACARIN, M. A.; BERALD, C. M. P.; ZANATTA, E. R. Caracterização parcial da invertase ácida solúvel em tubérculos de batata: Energia de ativação e efeito de inibidores. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 1, p. 45-50, 2005.

DÍAZ-MONTAÑO, D.M.; FAVELA-TORRES, E.; CÓRDOVA, J. Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of Agave tequilana juice by addition of yeast extract. **Journal Science Food Agriculture**, New Delhi, v. 90, n. 2, p 321-328, 2010.

DWORSCHACK, R. G and WICKERHAM, L. J. Production of Extracellular Invertase by the Yeast, *Saccharoromyces uvarum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 76, n. 1, p. 449-456, 1958.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Produção de pêssego no Sul do RS em debate. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/abril/4-semana/producaode-pessegono-sul-do-rs-em-debate/>. Acesso em: 20 nov de 2015.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/ Pessego/ CultivodoPessegueiro /cap05_fotos.htm. 2011 Acesso em 25 set. 2015.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p.469-486,2000.

FACHINELLO J. C., PASA M. DA S., SCHMITZ, J. D.; BETEMPS, D. L., Situação e Perspectiva da fruticultura de Clima Temperado no Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 109-120, Out., 2011.

FAO. FAOSTAT 2010. Disponível em:<http://faostat.fao.org> Acesso em: 05/11/2015.

FERNÁNDEZ, R. C.; MAREMA, B. G.; JUÁREZ, A. e MARTÍNEZ J. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Malden, v. 79, n. 3, p. 268-272, 2004.

FIEDUREK, J. PIELECKI, J. SKOWRONEK, M. Direct methods for selecting mutants with increased production of invertase from mutagenised cultures of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Basic Microbiology**, Jena, v. 40, n. 2, p.111-118, 2000.

FILHO, U.C.; HORI, C.E.; RIBEIRO, E.J.Influenceofthe reaction products in the inversion of sucrose by invertase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v.16, n.2, 1999.

GALAEV, I.Y.; MATTIASSON, B. **Protein purification by affinity ultrafiltration**, In: WANG, W.K. (Ed.). Membrane Separations in Biotechnology. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. Cap. 2, p. 243-263.

GALDIERI, L.; MEHROTRA, S.; YU, S.; VANCURA, A. Transcriptional regulation in yeast during Diauxic Shift and stationary phase. **Journal of Integrative Biology**, New York, v. 14, n. 6 p. 629–638, 2010.

GARCIA-GALAN, C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, Heidelberg, v. 353, n.16, p. 2885-2904, 2011.

GASCON S.; LAMPEN J.O. Purification of the internal invertase of yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 243, n. 7, p.1567-72, 1968.

GHOSH, R. Novel cascade ultrafiltration configuration for continuous, high-resolution protein–protein fractionation: a simulation study. **Journal of Membrane Science**, New York, v. 226, n. 1-2, p. 85–99, 2003.

GIL, M.I. et al. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.50, n.17, p.4976-4982, 2002.

GIRALDO, M. A. **Purificação e caracterização Bioquímica da Invertase Extracelular produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus terreus***. 2011. 126f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2011.

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

GOULART, A. J.; SANTOS, A. F.; TAVANO, O. L.; VINUEZA, J. C; CONTIERO, J.; MONTI, R. Glucose and Fructose Production by *Saccharomyces cerevisiae* Invertase Immobilized on MANAE-Agarose Support. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 2, p. 169–175, 2013.

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

GROSSMANN, M.K.; ZIMMERMANN, F.K. Structural genes of internal invertases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Genetics and Genomics**, Chennai, v. 175, n. 2, p. 223-229, 1979.

GUAMÁN-BURNEO, C.; CARVAJAL-BARRIGA, J. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. **Universitas Scientiarum**, Bogotá, v. 14, n. 2-3, p. 187–197, 2009.

GUILLOUX-BENATIER, M., GUERREAU, J. AND FEUILLAT, M. Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and the metabolism of wine

microorganisms. **American Journal Enology Viticulture**, Davis, v. 46, n. 4, p. 486-492, 1995.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Production and characterization of thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, Maryland Heights, v. 42, n. 1, p. 52–57, 2007.

GUIMARAES LHS, SOMERA AF, TERENCE HF, POLIZELI MLTM. **Production of β fructofuranosidases**. J A Jorge Process Biochem. 2009. 44:237–241

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilizationstabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375- 382.1988.

GUISÁN, J. M.; BASTIDA, A.; BLANCO, R. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUNCEDA, E. **Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose – Strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment**. In: Immobilization of enzymes and cells. BICKERSTAFF, G. F. Totowa: Humana Press, v.31, p.277 287, 1997.

GUISÁN, J. M. **Immobilization of enzymes as the XXI century begins: Na already solved problem or still an exciting challenge**. In: Immobilization of enzymes and cells. appud GUISÁN, J. M.. Totowa: Humana Press, 2006. v.1, p.1-13.

HARTEMINK, R.; VANLAERE, K.M.J.; ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, Wageningnen, v.383, p.367-374,1997.

HERNÁNDEZ, L.M. Estudio de la produccion, localización y ruta secretora de la actividad exo-1,3- β -D-glucanásica em *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento de Microbiologia. Badajoz, Universidad de Extremadura, Extremadura, 1985.

HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; PAGNOCCA, F. C.; VINTURIM, T. M.; MANSOR, A. P. Micro-organismos contaminantes de polpas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n.1, p. 32-37, 1997.

HUERTA-OCHOA, S. **Reactores enzimáticos**. 1a edición. Ed. UAM. México, D.F. 2004. 13, 49 p.

HUSSAIN A, RASHID MH, PERVEEN R, ASHRAF M. Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Plant Physiol Biochem**, New York, v.47,n. 3, p.188–194, 2009.

IBGE. Estatísticas 2012: Lavouras Permanentes. Acesso em: 20 out. 2015.

ILLANES, A. **Enzyme Production**. In: (Ed). *Enzyme Biocatalysis*: Springer Netherlands, 2008. p. 57-106. ISBN 978-1-4020-8360-0.

ISHIHARA, T.; YAMAMOTO, S. Optimization of monoclonal antibody purification by ion-exchange chromatography_Application of simple methods with linear gradient elution experimental data. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1069, n. 1, p. 99–106, 2005.

JEGOU S, CONREUX A, VILLAUME S, HOVASSE A, SCHAEFFER C, CILINDRE C, DORSSELAER AV, JEANDET P. One step purification of the grape vacuolar invertase. **Analytica Chimica Acta**, New York, v.638, n. 1, p. 75–78, 2009.

KILIKIAN, B.V., PESSOA JR. A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. In: SCHMIDEL W. et al. *Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica*. 1. ed., v. 2 São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 21. p. 493-521.

KOTWAL, S.M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. **Biotechnology Advances**, New York, v.27, n. 4, p.311-322, 2009.

LEE, W.C. HUANG, C. T. Modelling of ethanol production using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal**, New York, v. 4, n. 3, p. 217-227, 2000.

LIU CC, HUANG LC, CHANG CT, SUNG HY. Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells. **Food Chemistry**, Davis, v. 96, n. 4, p.621–631, 2006.

LOPES, A. M.; TORALLES, R. P.; ROMBALDI, C. V. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in Jubileu clingstone peach and yeast isolated

from its spoiled puree. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 1, p.150-156, 2014.

LOPEZ, H.W. et al. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. **Journal Nutritional Biochemistry**, Clermont-Ferrand, v.11, n. 10, p.500-508, 2000.

LUCCA, A. L.; JOAO, A. J.; GUIMARAES, L. H. S. Extracellular β -D-fructofuranosidase from *Aspergillus parasiticus*: Optimization of the production under submerged fermentation and biochemical characterization. **African Journal of Biotechnology**, Ebène, v. 12, n. 38, p. 5678-5687, 2013.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause**: alimentos, nutrição e dietoterapia. 13a ed. São Paulo: Saunders, 2012. 48 p.

MARTINS, C.R.; FARIAS, R.M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.9, n.1, p.83-93, 2002.

MATHEWS, C.K; VAN, H.K.E e AHERN, K.G. **Bioquímica 3a ed**. Madrid: Addison Wesley, 2002.168-170 p.

MATIAS, M.F.O.; OLIVEIRA, E.L.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M.A. Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale* L) and guava (*Psidium guajava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, p.143-150, 2005.

MAUREL, K.; LEITE, G. B.; BONHOMME, M.; GUILLIOT, A.; RAGEAU, R.; PÉTEL, G.; SAKR, S. Trophic control of bud break in peach (*Prunus persica*) trees: a possible role of hexoses. **Tree Physiology**, Oxford, v. 24, n. 5 p. 579–588, 2004.

MEDEIROS, A. R. M; RASEIRA, M. C. B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília: Embrapa, 352p. 1998.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, Davis v. 35, n. 10 p. 1211-1225, 2000.

MORAES, C. C.; KALIL, S. J., Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract. **Bioresource Technology**, New York, v. 100, n. 21, p. 5312–5317, 2009.

MORENO, S.; RUIZ, T.; SANCHEZ, Y.; VILLANUEVA, J. R; RODRIGUEZ, L. Subcellular localization and glycoprotein nature of the invertase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 1, p. 370-374, 1985.

MORIGUCHI, T.; SANADA, T.; YAMAKI, S. Properties of acid invertase purified from peach fruits. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 1, p 95-97, 1991.

MUKHERJEE, S; BASAK, S.; KHOWALA, S. Regulation (Alteration) of activity and conformation of sucrase by coaggregation with cellobiase in culture médium of *Termitomyces clypeatus*. **Biotechnology Progress**, Malden, v.18, n. 2, p. 404-408, 2002.

NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S.; SANCHO, ED.; KORHOLA, M.P. Polymeric SUC genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 135, p. 31-35, 1996.

NGUYEN, D., MATTES, F., HOSCHKE, A., REZESSY-SZABÓ, J. Y BHAT, M., Production, purification e identification of fructooligosaccharides produced by β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 21, n. 3, p.183-186, 1999.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 40 ed. São Paulo: Savier, 2006. 190- 237 p.

NEVOIGT, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.72, n.3, p. 379-412, 2008.

NOVAKI, L.; HASAN, S.D.M.; KADOWAKI, M.K.; ANDRADE, D. Produção de invertase por fermentação em estado solido a partir de farelo de soja. **ENGEVISTA**, Rio Janeiro, v.12, n.2, p. 131-140, 2010.

OHTA, A. et al. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.41, n. 3, p.281-291, 1995.

OLIVEIRA, D.P.; OLIVEIRA, L.E.M.; FILHO, N.D. Optimization of invertase assay conditions rubber tree plants (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 687–692, 2006.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.

PARAZZI JUNIOR, O. GALLO, G. R. Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase. 2006. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz. Piracicaba. 2006.

PASSARGE, E. **Genética**: texto e atlas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 456 p.

PASSOS, L. M. L. PARK, Y. K; Fructooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PÉREZ, M., SÁNCHEZL., PIAD, R., BOCOURT, D., MILIÁN, G., ALFONSO, G., ORMAZA, M., TAMBARA, J. Caracterización físico química de un hidrolizado enzimático de *Saccharomyces Cerevisiae* y su comparación con diferentes tipos de hidrolizados. **Revista de Salud Animal**, Ciudad de México, v. 23, n. 3, p.153-159, 2001.

PERLMAN, D.; HALVORSON, H., O. Distinct repressible mRNAs for cytoplasmatic and secreted yeast invertase are encoded by a single gene. **Cell**, Cambridge, v.25, n.2, p. 525-536, 1981.

POONAWALLA, F. M.; PATEL, K. L; IYENGAR, M. R. S. Invertase production by *Penicillium chrysogenum* and other fungi in submerged fermentation. **Applied Microbiology**, Wageningnen, v. 13, n. 5, p. 749-754, 1965.

PRADO-BARRAGAN, L.A; HUERTA, O.S; RODRIGUEZ, S.G e SAUCEDO, C.G. **Avances en purificación y aplicación de Enzimas en Biotecnología**. Editorial Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, 1999.

PRETORIUS L.S. Tailoring wine yeast for the new Millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, Chichester, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

PRONK JT, YDE, S. H; VAN, D. JP. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v.12, n. 16, p.1607-33, 1996.

REDDY, A.; MACCOLL, R.; MALEY, F. Effect of oligosaccharides and chloride on the oligomeric structures of external, internal and deglycosylated invertase. **Biochemistry**, Moscow, v. 29, n. 10, p. 2482-2487, 1990.

RETTORI, D.; VOLPE, P.L.O. Microcalorimetria: Uma técnica aplicável ao estudo de diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 257–261, 2000.

RIBEIRO, R.R. **Copolímeros de enxerto de microestrutura controlada para imobilização da invertase**. 2002. 122p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

RINSUM, J., FRANS, M., HERMAN, V. Cell Wall Glucmannoproteins of *S. cerevisiae* mnn9. **Yeast**, Chichester, v. 7, n. 7, p. 717-726, 1991.

RODRIGUES, M. V. N.; RODRIGUES, R. A. F.; SERRA, G. E. ANDRIETTA, S. R.; FRANCO, T. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n.1, p.103-109, 2000.

ROMERO-GÓMEZ, S.J.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v.22, n. 15, p.1255-1258, 2000.

RUSTIGUEL, C. B.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. A novel silver-activated extracellular β -D-fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal Molecular Catalysis Enzymatic**, New York, v. 67, n. 1-2, p. 10-15, 2010.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 500 p.

SAINZ-POLO, M.A.; RAMIREZ-ESCUADERO, M.; LAFRAYA, A.; GONZALEZ, B.; MARIN-NAVARRO, J.; POLAINA, J.; SANZ-APARICIO, J. Three-dimensional Structure of *Saccharomyces* Invertase. Role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 288, n. 14, p.9755-9766, 2013.

SANTOS, E.; RODRIGUEZ, L.; ELORZA, M.V.; SENTANDREU, R. Uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 216, n. 2, p. 652-660, 1982.

SANTOS, E.A.; OLIVEIRA, R. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 33-40, 1996.

SHAHEEN, I.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, T. Production, purification and thermal characterization of Invertase from a newly isolated *Fusarium sp.* Under solidstate fermentation. **International Journal Food Science Technology**, Malden, v. 43, n. 7, p. 1152-1158, 2008.

SCHEFFER, J.F.; GONZÁLEZ, F.H.D. **Enzimologia clínica em medicina veterinária**. 2003 21f. Monografia em clínica veterinária. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2003.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. Byproducts of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. **Trends Food Science Technology**, Cambridge, v.12, n.11, p.401-413, 2001.

SENA, R.F.; NUNES, M.L. Utilização de resíduos agroindustriais no processamento de rações para carcinicultura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Bahia, v.7, n.2, p.94-102, 2006.

SHAFIQ, K.; SIKAND, A. e LKRAM, H. Effect of Different mineral nutrients on invertase production by *Sacharomyces cereisiae* GCB-K5. **Biotechnology**, New York, v. 1, n.1, p. 40-44, 2002.

SHARMA, A. D.; GILL, P. K. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. **Journal of Food Engineering**, New York, v. 79, n. 4, p. 1172–1178, 2007.

SILVA, R. N., MONTEIRO, V. N., ALCANFOR, J. D. X., ASSIS, E. M., ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 337-341, 2003.

SILVA J. O.; CANDIDO R.C. Avaliação do sistema API20 AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 3, p. 261-263, 2005.

SILVA, M. M. Agentes Coadjuvantes na Preservação das Características Físico-químicas, Sensoriais e Microbiológicas de Pêssego[*Prunus persica*(L.) Batsch] Minimamente Processado. 2013. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

SILVEIRA, M.C., E.M. OLIVEIRA, E. CARVAJAL AND BON, E.P. Nitrogen regulation of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. Role of the URE2 gene. **Applied Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, v. 84, n. 86, p. 247-254. 2000.

SLIVINSKI, C. T. Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido. 2007. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2007.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.3, p. 554–559, 2011.

STAMBUK, B. U.; ARAÚJO P.S.; BASSO, L.C; AMORIM, H.V.; TRICHEZ, D.; ALVES-JR,S.L.; KLINKOWSTROM, A.M.; MILETTI, L.C.; MACHADO, L.O; BADOTTI F.; ESPIRITO-SANTO, J.C.A.; SCHLOGL, P.S.; DARIO, M.G. Processo para modificar geneticamente leveduras *Saccharomyces*, e seu uso em processos fermentativos de produção de metabolitos. **INPI PI 0901254-0**. 2009.

STEFANINI, I.; Dapporto, L.; Legras, J.-L.; Calabretta, A.; Di Paola, M.; De Filippo, C.; Viola, R.; Capretti, P.; Polsinelli, M.; Turillazzi, S.; Cavalieri, D., "Role of social

wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution". **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109 n. 33, p.13398–403, 2012.

SWAN, T.M.; WATSON, K. Stress tolerance in yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, n. 1, p. 191-197, 1998.

TANRISEVEN, A. DOĞAN, S. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. **Process Biochemistry**, Davis, v. 36, n. 11, p. 1081-1083, 2001.

TENKANEN, M., NIKU-PAAVOLA, M-L, LINDER, M., VIKARI, L. **Cellulases in Food Processing**. In J. R. Whitaker, A.G. J. Voragen, D. W. S. Wong (Eds.), Handbook of Food Enzymology. New York: Marcel Dekker, 2003. P. 775-772.

TOMOTANI, E. J AND VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic Exchange resin. **Process Biochemistry**, Davis, v. 41, n. 6, p. 1325-1331, 2006.

TOMOTANI, E.J.; VITOLO, M. Inverted sugar syrup attained from sucrose hydrolysis using a membrane reactor. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 3, p.571-577, 2010.

TORALLES, R. P.; MALGARIM, M. B.; VENDRUSCOLO, J. L.; CANTILHANO, F. R. F.; TREPTOW, R. O. Um estudo para compreender a preferência e aceitação de purês de pêssegos Brasileiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p 397-401, 2006.

TORALLES, R. T.; VENDRUSCOLO, J. L. Processamento do purê e néctar de pêssego. Comunicado Técnico 159, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007.

TORALLES, R.P.; KUHN, C.R.; SILVA, P.; RUIZ, W.A. Extração e Caracterização Parcial de Invertase de Levedura de Purê e Resíduo de Pêssego. **Revista Brasileira de tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v.8, n. 2, p.1399–1415, 2014.

TÜMTÜRK, H. ARSLAN, F. DISLI, A. TUFAN, Y. Immobilization of invertase attached to a granular dimer acid-co-alkyl polyamine. **Food Chemistry**, Davis, v. 69, n. 1, p. 5-9, 2000.

VEANA F. Invertasa del Genero *Aspergillus* y su impacto biotecnológico, **Biotecnología**, Cuernavaca, v.15, n. 1, p.11-29, 2011.

VERSARI, A.; CASTELARI, M.; PARPINELLO, G. P.; RIPONI, C.; GALASSI, S. Characterisation of peach juices obtained from cultivars Redhaven, Suncrest and Maria Marta grown in Italy. **Food Chemistry**, Davis, v. 76, n. 2, p. 181-5, 2002.

VICENTE, A. A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica**. 2000. 199p. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 2000.

VINUEZA, J. C. G. Imobilização Multipontual das Peroxidasas da casca da soja e chuchu em suportes alternativos de pó de sabugo de milho e celulose bacterina. 2012. 119p. Tese (Doutorado em Alimentoss e Nutrição), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 2012.

VITOLO, M. **Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*)**. 1979. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

VITOLO, M. **Efeito do pH e da aeração sobre a atividade invertásica de células intactas de levedura obtidas por cultivo descontínuo**. 1989. 140p. Tese (Livre Docência)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

VITOLO, M. Invertase. SAID, S., PIETRO R.C.L.R. (Eds.). **Enzymes as biotechnological agents**. Ribeirão Preto: Leggis Summa, 2004. 207-221 p.

WHITAKER, J. R. **Protein Structure and Kinetics of Enzyme Reaction: A Historical Perspective**. In J. R. Whitaker, A.G. J. Voragen, D. W. S. Wong (Eds.), *Handbook of Food Enzymology*. New York: Marcel Dekker, (2003). p. 16-25.

WICKERHAM, L. J. Evidence of the production of Extracellular Invertase by certain strains of yeasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 76, n. 1, p. 439-448, 1958.

WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, New York, v. 21, n. 6, p. 713-724, 2010.

WOLF, B.W.; FIRKINS, J.L.; ZHANG, X. Varying dietary concentrations of fructooligosaccharides affect apparent absorption and balance of minerals in growing rats. **Nutrition Research**, Columbus, v.18, n.10, p.1791-1806, 1998.

WORKMAN, E. and DONAL, F. D. Purification and properties of the β -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **FEBS LETTERS**, Heidelberg, v. 160, n. 1-2, p. 16-20, 1983.

YAGHINI, H.; SHIRANI, M.; ARCHANGI, A.; SORKHEH, K.; CHALESHTORI, S. B.; SANGI, S. E.; KHODAMBASHI, M.; TAVAKOLI, F. Phenotypic diversity and relationships of fruit quality traits in inter-specific almond x peach backcrosses breeding progenies. **Euphytica**, Netherlands, v.194, n. 3, p.305-324, 2013.

YAMAMOTO, Y. et al. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. **Journal Nutritional Biochemistry**, Osaka, v.10, n. 1, p.13-18, 1999.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. **Enzymes and Microbial Technology**, Kyungbuk, v.19, n. 2, p.107-117, 1996.

ZAGHDOUDI, K.; PONTVIANNE, S.; FRAMBOISIER, X.; ACHARD, M.; KUDAIBERGENOVA, R.; AYADI-TRABELSI, M.; KALTHOUM-CHERIF, J.; VANDERESSE, R.; FROCHOT, C.; GUIAVARCH, Y. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Food Chemistry**, Davis, v.184, n. 1, p. 131-139, 2015.

ZHANG, T.; GONG, F.; PENG, Y.; CHI, Z. Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase. **Process Biochemistry**, Davis, v. 44, n. 12, p.1335-1339, 2009.

CAPÍTULO 1

IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PÊSSEGO E AVALIAÇÃO DE SEU CULTIVO EM BATELADA PARA PRODUÇÃO DE INVERTASE

IDENTIFYING YEAST ISOLATED FROM PEACH AND ASSESSMENT OF ITS BATCH CULTURE FOR INVERTASE PRODUCTION

RESUMO

As invertases de origem microbiana são conhecidas e têm sido bastante estudadas, especialmente as provenientes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em purê de pêssego, esta levedura também já foi identificada em diferentes etapas do processamento. Entretanto, não foram encontrados dados sobre a identificação de leveduras isoladas de cultivares nacionais, bem como a relação entre a atividade da invertase com a curva de crescimento e a fonte de carbono. O primeiro objetivo foi isolar espécies de leveduras a partir de purê pêssego cv. Jubileu e de resíduo industrial usando um método de identificação comercial API 20C AUX e uma levedura comercial como testemunha. O segundo objetivo foi estudar o potencial de crescimento de uma levedura usando dois tratamentos de cultivo em batelada: “A” com 20 g de culturas em BDA e “B” com 10 g. Os parâmetros selecionados foram: número de colônias (N), açúcares redutores (AR), atividade da invertase livre (IL) e da invertase do cultivo (IC). As culturas “stock” foram mantidas em BDA, pH 5 e cultivadas em batelada com agitação de 150 rpm, 30°C por 24 horas; armazenadas a 4 °C para posterior extração da enzima. O extrato enzimático foi obtido usando bicarbonato de sódio (NaHCO_3) como agente de autólise. A atividade foi acompanhada por incremento na absorbância a 490 nm usando método colorimétrico resultante da reação glicose-DNS. Das 5 leveduras identificadas, escolheu-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (2040032) por questões legais. Esta teve um crescimento logarítmico até as 18 horas iniciais de fermentação, seguido de uma fase estacionária durante 17 dias de armazenamento refrigerado e, após, uma fase de declínio para ambos os tratamentos. Os açúcares decresceram com uma conversão superior a 98% ao final da fase “Log”. A IL apresentou maior atividade no final da fase “Log” e correlação inversa com a IC. Finalmente, concluiu-se que o tratamento “A” é mais eficaz do que o “B” para a produção de invertase.

Palavras-chave: invertase, *Saccharomyces cerevisiae*, autólise

ABSTRACT

The microbial invertase are known and have being studied for along time, including the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and others. In peach puree, this yeast have already been identified at different stages of processing. Until now, no data is available in the literature on isolation and identification of spoilage yeast in Brazilian peach puree, as well as the relationship among invertase activity with the production of cells and carbon source. The first objective of this work was to investigate the yeast species isolated from spoiled Jubileu peach puree and industrial residue using the API 20C AUX commercial identification method and commercial yeast as witness. The second objective was to study the yeast growth potential in two treatments (TA=20g and TB=10 g stock culture) in batch cultivate for invertase production. The parameters selected were: number of colonies (N), reducing sugars (RS), free-invertase activity (FI), and cultivation-invertase activity (CI). The stock cultures were maintained in PDA at pH 5 and batch-cultured with 150 rpm stirring at 30 °C for 24 h, then they were stored at 4 °C for subsequent enzyme extraction. The enzyme extract was obtained using sodium bicarbonate (NaHCO₃) as autolysis agent. The activity was followed by an increase in absorbance at 490 nm using the colorimetric method resulting from the glucose-DNS reaction. Of the five yeasts identified, *Saccharomyces cerevisiae* (2040032) was chosen for legal reasons. It showed logarithmic growth up to 18 h of fermentation followed by a stationary phase for 17 days of refrigerated storage and then a decline phase for both treatments. Sugars decreased with a conversion rate above 98% at the end of the log phase. The FI was more activity than that CI in the log and mortality phase. In a general way, the FI inversely correlated with CI. Finally, it was concluded that treatment “A” is more effective than “B” to produce invertase.

Keywords: Invertase, *Saccharomyces cerevisiae*, autolysis.

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são microorganismos unicelulares com reprodução vegetativa a qual se faz principalmente por gemulação. Possuem parede celular e são facilmente diferenciadas das bactérias em virtude de suas maiores dimensões e propriedades morfológicas. Cada espécie tem uma forma característica, mas, mesmo em culturas puras, há consideráveis variações de tamanho e de forma das células individuais, dependendo da idade e do ambiente (CHOUDHARY e JOHRI, 2009).

As flores e frutas são importantes micro-habitats para uma variedade de espécies de leveduras devido a sua favorável concentração de açúcar e pH. As leveduras encontram-se presentes principalmente nas frutas maduras e apodrecidas devido à visitação de insetos vetores e o vento (MELO et al., 2007; ALEKLETT et al., 2014). Sendo assim, são micro-organismos eucariotos ubíquos com papel ativo em frutas in natura e derivados (FAZIO, 2006; SILVA et al., 2011). Em polpas e concentrados de frutas, as leveduras mais frequentemente isoladas são do gênero *Saccharomyces*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces* e *Candida* (SANCHO et al., 2000).

O gênero *Saccharomyces* é o mais investigado e chamativo para trabalhar por ser um organismo classificado como GRAS (Generally Recognized As Safe) e referência para células eucarióticas em biologia, além de sua ampla aplicação biotecnológica (OSTERGAARD et al., 2000). As suas colônias apresentam uma coloração que varia entre o branco (predominantemente) e o creme (ocasionalmente), apresentando forma convexa e lisa. As leveduras podem formar pseudohifas, que consistem em cadeias simples de células esféricas, elipsoidais ou cilíndricas. Reproduzem-se na maioria das vezes por gemulação multilateral, onde a nova gêmula é formada na porção lateral da célula-mãe (PRETORIUS, 2000; CHOUDHARY e JOHRI, 2009).

A identificação correta de novas leveduras isoladas é fundamental e de interesse tanto para aplicações biotecnológicas como clínica. A identificação tradicional tem sido executada por meio de métodos fenotípicos para avaliar características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, mas os resultados não são muito seguros. Varias técnicas genotípicas, incluindo novas técnicas com

“Polymerase Chain Reaction (PCR)”, marcadores moleculares e sequenciamento de DNA tornaram-se o principal caminho para identificar corretamente leveduras (ARAÚJO et al., 2005; GUAMÁN-BURNEO e CARVAJAL-BARRIGA, 2009). O problema dessas técnicas é o esforço para a extração e purificação do DNA. Por outro lado, um método simples, baseado na capacidade assimilativa de substratos, conhecido como o API20C AUX, tem sido amplamente usado para identificar leveduras (SILVA e CANDIDO, 2005; CHEN et al., 2010).

A levedura *S. cerevisiae*, por efeito de Crabtree, é uma das poucas com capacidade de crescer bem em condições de aerobiose e de anaerobiose, fermentando em ambos os casos desde que não haja concentração baixa de açúcar (DIAZ-MONTAÑO e CÓRDOVA, 2010; NEVOIGT, 2008). Quando a glicose fica abaixo de uma concentração crítica, entre 0,09 e 0,9% em massa, favorece o surgimento do diauxismo e a levedura pode apresentar dois perfis de crescimento, sendo que o segundo perfil de crescimento é acompanhado pelo consumo de outra fonte de carbono não fermentável no meio, geralmente o etanol via aeróbica. Na falta da oferta de uma fonte de carbono, a célula entra em declínio (GALDIERI et al., 2010; RETTORI et al., 2000).

Outra característica importante dessa levedura é sua resistência térmica e vários estudos têm avaliado a inativação da *S. cerevisiae* em alimentos, tais como os estudos de Guerrero-Beltrán e Barbosa-Cánovas (2006) com néctar de manga, Reveron *et al.* (2003) com cerveja Pilsen, Guerrero-Beltrán e Barbosa-Cánovas (2005) com suco de maçã e Lopes et al. (2014) com levedura de purê de pêssego. Tais propriedades são particularmente importantes para a sua vasta utilização industrial, que abrange a produção de pães, enzimas, bebidas alcoólicas e não alcoólicas (BEUCHAT et al., 2005; CHAVES-LÓPES et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

As enzimas obtidas a partir dessas leveduras têm sido bastante estudadas, incluindo a frutohidrolase frutofuranosidase (EC 3.2.1.26), conhecida como invertase, que catalisa a hidrólise da sacarose, produzindo uma mistura de glicose e frutose chamada açúcar invertido, que é usado nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Além das leveduras, sobretudo na espécie *S. cerevisiae*, as invertases são também encontradas em invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias,

vegetais e fungos (DEUNER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; GOULART et al., 2013). Em *S. cerevisiae* foram identificadas 2 diferentes formas de invertase: uma não glicosilada, que se encontra no citoplasma, e outra localizada no espaço periplasmática, que é glicosilada, se encontra ligada à parede celular da levedura, sendo a extracelular a forma predominante (BOFO et al., 2005; CANTARELLA et al., 2003). A *Candida utilis* também apresenta essas duas isoformas (GUIMARÃES et al., 2007).

O purê de pêssego concentrado é uma “commodity” usualmente comercializado no mercado internacional e de ampla aplicação alimentar, sendo que já foram identificados e quantificados vários micro-organismos em diferentes etapas do processamento, destacando-se a levedura *S. cerevisiae* com potencial fermentativo e resistência térmica significativa (GARZA et al. 1994a, BIAN et al. 1994; TORALLES e VENDRUSCULO, 2007; LOPEZ et al. 2014), mas não existem trabalhos que identifiquem leveduras isoladas de cultivares nacionais com potencial para produção de invertase, considerando a relação entre atividade da invertase com a curva de crescimento e a fonte de carbono. Para tal finalidade, o primeiro objetivo foi isolar espécies de leveduras a partir de purê pêssego Cv. Jubileu e resíduos industriais de pêssego, usando um método de identificação comercial API 20C AUX e uma levedura comercial como testemunha. No segundo, escolheu-se uma das leveduras identificadas para estudar o seu potencial de crescimento usando dois tratamentos de cultivo em batelada (“A” com 20 g de culturas em BDA e “B” com 10 g), para ambos os tratamentos foram avaliados os parâmetros: número de colônias (N), açúcares redutores (AR), atividade da invertase livre (IL) e da invertase do cultivo (IC), em tempo de fermentação (0, 18 e 24 horas) e período de armazenamento a frio (1, 10, 17 e 24 dias).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismos e seu cultivo

Os micro-organismos usados nesta pesquisa foram isolados a partir de purê de pêssego a 22°Brix, fornecidos por Lopes et al. (2014), conforme processamento de Toralles e Vendrusculo (2007). O resíduo industrial de pêssego foi obtido de indústria local, Icalda S.A. As culturas foram mantidas em placas de ágar de

dextrose de batata (BDA), pH 5 e contadas como descrito por Siqueira (1995), após 5 dias de incubação a 25°C. A contagem inicial das colônias foi de 22×10^2 UFC/mL⁻¹ para purê de pêssego e $4,6 \times 10^6$ UFC/mL⁻¹ para resíduo. A parte experimental foi conduzida no laboratório de tecnologia de alimentos do IFSUL-Pelotas-RS, Brasil.

2.2. Identificação das leveduras

Uma colônia de cultura recente foi assepticamente transferida para tubos contendo 2 mL de solução fisiológica esterilizada e ajustado a uma turbidez equivalente à escala 2 de McFarland. Uma gota desta suspensão foi adicionada ao meio basal do API 20C AUX e homogeneizado. Posteriormente, foi preenchido cada poço do painel de identificação e incubado em câmara úmida, previamente preparada, e colocado em estufa a 30°C por até 72 horas, com leituras de 48 e 72 horas. Considerou-se como resultado positivo e negativo, respectivamente, a presença ou ausência de opacidade nos poços de cada carboidrato. Obteve-se um código de sete dígitos, cuja interpretação foi realizada com o auxílio do catálogo analítico Apilab Plus, Bio-Mérieux. Cada levedura isolada foi submetida ao teste da hidrólise da uréia que considera urease-positiva aquelas que liberam a amônia que alcaliniza o meio que contém vermelho de fenol, mudando a cor para rosa-fucsina. A confirmação da identificação de hifas foi realizada em agar arroz com tween 80 (LACAZ et al., 2002).

2.3. Potencial de crescimento da levedura

O potencial de crescimento da levedura foi conduzido usando dois tratamentos de cultivo em batelada: “A” com 20 g de cultura em BDA e “B” com 10 g. Para cada tratamento, o cultivo foi conduzido com 20 g.L⁻¹ de glicose, (NH₄)₂SO₄ 1 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 2 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,5 g.L⁻¹; FeSO₄ 0,5 g.L⁻¹ e peptona 5 g.L⁻¹ dentro de um frasco erlenmeyer sobre agitação orbital em shaker (Quimis-Q816M22) a 150 rpm, 30 °C durante 24 horas. Posteriormente, as colônias foram armazenadas a 4°C para análise e extração da enzima. As variáveis selecionadas foram: número de colônias (N), açúcares redutores (AR), atividade da invertase livre (IL) e da invertase do cultivo (IC), que foram acompanhados nos tempos 0, 18 e 24 horas de fermentação; 1, 10, 17 e 24 dias armazenamento.

2.4. Determinação açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados por dois métodos devido aos limites de quantificação. No tempo zero de fermentação, usou-se o método de Eynon-Lane, como descrito pela AOAC (2000). Para os demais tempos, utilizou-se o método colorimétrico da glicose usando 1 mL 3,5-dinitrosalicílico (DNS, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Alemanha), 1 mL de meio de cultura e 1 mL de água, seguido de banho-maria fervente por 5 minutos. No branco, foi utilizada água destilada no lugar do meio de cultura. Todas as medidas foram conduzidas em triplicatas. A transmitância resultante dessa reação foi medida a 490 nm, utilizando um espectrofotômetro AJX-1000 UV/VIS. A massa de glicose no meio reativo, foi determinada através da curva padrão de glicose Equação 1.1:

$$m_{\text{glicose}} = \frac{(AA - AB) + B}{A} \times V \times F \quad (1.1)$$

onde AB é a absorbância do branco, AA é a absorbância da amostra, B é o coeficiente linear da reta, A é a constante de proporcionalidade; V é o volume final do meio reativo, em mL, e F é o fator de diluição. Os valores de A e B encontram-se no Apêndice A.

2.5. Extração da invertase

Os extratos enzimáticos foram obtidos usando o método de extração com NaHCO_3 , conhecido como autólise. Para cada 100 g biomassa são utilizados 300 mL de solução de NaHCO_3 a 200 mM usando um frasco erlenmeyer em shaker (200 rpm) a 40°C por 24 horas. Após, centrifugou-se a amostra a 2025 x g durante 10 minutos para obter o líquido sobrenadante claro que corresponde ao extrato enzimático como fonte de invertase liberada por autólise, ou seja, invertase livre (IL). Posteriormente, determinou-se o teor de proteínas por método Lowry a 750 nm, utilizando BSA como padrão (Acros, New Jersey, USA), armazenado a -20 °C e sua curva padrão encontra-se no Apêndice A. O sobrenadante após a centrifugação a 2025 x g por 10 minutos do cultivo em batelada, sem sofrer autólise, foi denominado como extrato de invertase do cultivo (IC).

2.6. Atividade da invertase

A atividade enzimática da invertase foi determinada por estimativa colorimétrica da glicose usando reagente DNS. A transmitância resultante dessa reação foi medida a 490 nm por espectrofotometria. Tanto para invertase IL como para IC, o meio reacional continha 1,0 mL de tampão McIlvaine pH 5.0; 1,0 mL de solução de sacarose como substrato e 1,0 mL de extrato enzimático. A mistura reativa final continha 40 mM de substrato. A reação foi conduzida em pH de 5,0 a 25°C. Após, foi dosado o teor de glicose. No branco, foi utilizado 1,0 mL de água deionizada em substituição ao substrato na mistura reativa. A atividade enzimática foi calculada na parte linear da curva. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que causa o incremento de $1\mu\text{g glicose}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.7. Pressão osmótica

A pressão osmótica foi calculada segundo a equação:

$$p = CRTi \quad (1.2)$$

p é a pressão osmótica (atm), C é a concentração molar do sal, R é a constante universal dos gases ($0,082 \text{ atm}\cdot\text{L}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), T é a temperatura (K) e i é o fator de Van't Hoff igual a 2.

2.8. Análise estatística

O Software estatística v. 6.0, foi utilizado para calcular os coeficientes de regressão linear, coeficiente de determinação e análise de variância (ANOVA), bem como para gerar os gráficos em duas dimensões. Os intervalos de confiança dos coeficientes foram calculados multiplicando o erro padrão por Student-t (t_{n-2}), ajustado aos graus de liberdade ($p \leq 0,05$) (GACULA e SINGH, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação da levedura

Na tabela 1.1 são apresentadas algumas leveduras isoladas em purê de pêssego da cv. Jubileu e resíduo industrial, identificadas com alta exatidão, usando o sistema API 20C AUX (Tabela 1.1). Para o purê de pêssego e o resíduo industrial identificou-se a espécie *Saccharomyces cerevisiae* com 95,2% e 90,0%

respetivamente de exatidão, e ambas com perfil numérico (2040032). Na testemunha também foi identificada à espécie *S. cerevisiae* com perfil numérico diferente (2044073).

Na amostra de purê de pêssego, também foram identificadas outras duas leveduras: *Rhodotorula mucilaginosa* (2642073) e *Trichosporon mucoides* (6745776) (Tabela 1.1). A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* foi identificada com 85,7% de acerto e cor salmão; a *Trichosporum mucoides* foi identificada com maior exatidão (90,5%) e cor amarelo creme, ambas urease positiva (Tabela 1.1; figura 1.1), o que esta de acordo com Chen et al. (2010) para o teste da hidrólise da uréia. Beckenkamp (1997), trabalhando com amostras de polpas de frutas pasteurizadas, também identificou os gêneros *Rhodotorula* e *Trichosporon*. Sancho et al. (2000) identificaram *Rhodotorula mucilaginosa* em polpa de pêra. Guamán-Burneo e Carvajal-Barriga (2009), trabalhando com diferentes espécies de leveduras do gênero *Rhodotorula*, observaram para *Rhodotorula mucilaginosa* diferentes tonalidades de salmão e rosa, quando cultivadas em ágar CPM por 72 horas a 20, 30 e 37°C. Silva e Candido (2005), trabalhando com o mesmo sistema de identificação para leveduras, demonstraram que o sistema API 20C AUX identificou corretamente 92% das 50 espécies de leveduras testadas.

Tabela 1.1. Leveduras isoladas a partir de pêssego e seu resíduo e identificadas através do sistema API20C AUX.

Fonte levedura	Sistema API				Teste uréase
	Perfil	Espécie	Hifa	%Acerto	
Purê de pêssego	2040032	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Não	95,2	Negativo
	6745776	<i>Trichosporon mucoides</i>	Sim	90,5	Positivo
	2642073	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Não	85,7	Positivo
Resíduo industrial de pêssego	2040032	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Não	90,0	Negativo
	6776277	<i>Candida guilliermondii</i>	Sim	90,5	Negativo
Comercial	2044073	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Não	90,0	Negativo

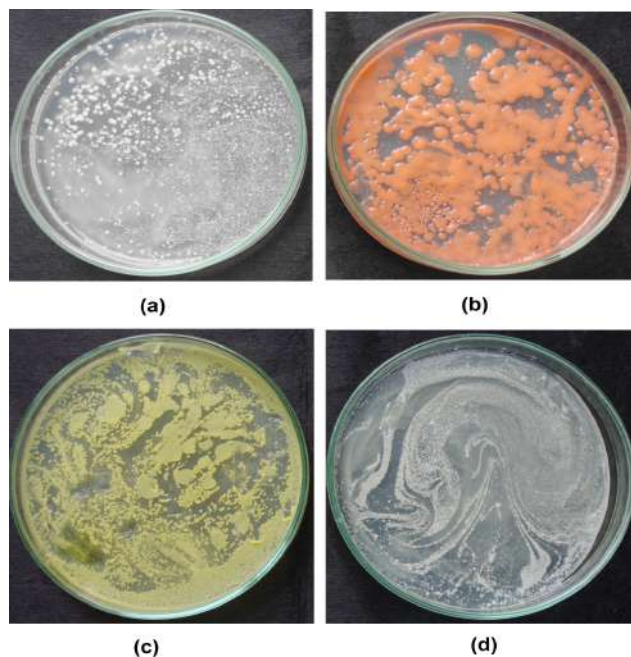


Figura 1.1 Colônias de leveduras identificadas em purê de pêssago: (a) *S. cerevisiae* (2040032), (b) *R. mucilaginosa* (2642073) e (c) *T. mucoides* (6745776); em testemunha: (d) *S. cerevisiae* (2044073).

Na amostra de resíduo industrial de pêssago, além da *S. cerevisiae*, também foi identificada a levedura *Candida guilliermondii* com perfil numérico de 6776277 (Tabela 1.1 e Figura 1.2) com 90,5% de acerto. Songpim et al. (2011) usando metodologia Taguchi e MSR, demonstraram o potencial de *Candida guilliermondii* TISTR 5844 para produção de invertase e inulinase.

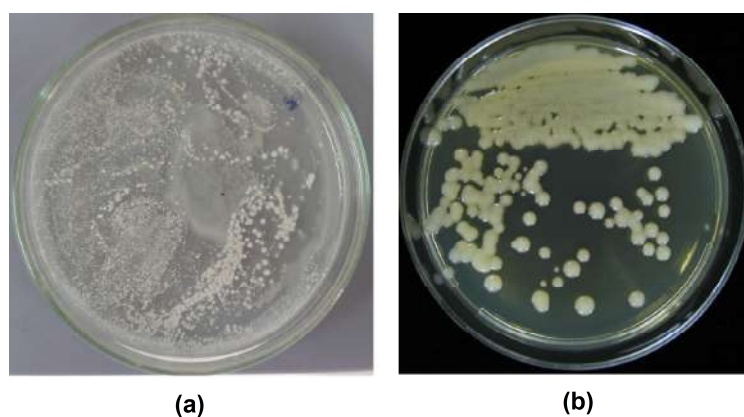


Figura 1.2. Colônias de leveduras identificadas em resíduo do processamento de pêssago: (a) *S. cerevisiae* (2040032), (b) *C. guilliermondii* (6776277).

Testes qualitativos adicionais, como o da urease, foram realizados para confirmar a identidade da levedura (figura 1.3), observou-se a cor rosa-fúcsia (bispo) considerado positiva para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e *Trichosporon mucoides* e negativa com cor amarelada para as leveduras *Candida guilliermondii* e *Saccharomyces cerevisiae*. A agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Módulo VII do Manual de microbiologia confirma que as leveduras do gênero *Rhodotorula* são urease positiva, além de apresentar colônias com pigmento avermelhadas o salmão (LEVY, 2004).

Entre as leveduras identificadas, todas são sacarose e rafinose positiva (Tabela 1.1). Estes resultados são atribuídos à ação de invertase da levedura (CANTARELLA et al., 2003). Contudo, foi escolhido para verificar o potencial de produção de invertase a *S. cerevisiae* com perfil numérico 2040032 devido as recomendações da Resolução-RDC Nº 26 de 2009, que estabelece a lista de enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem microbiana (BRASIL, 2006).

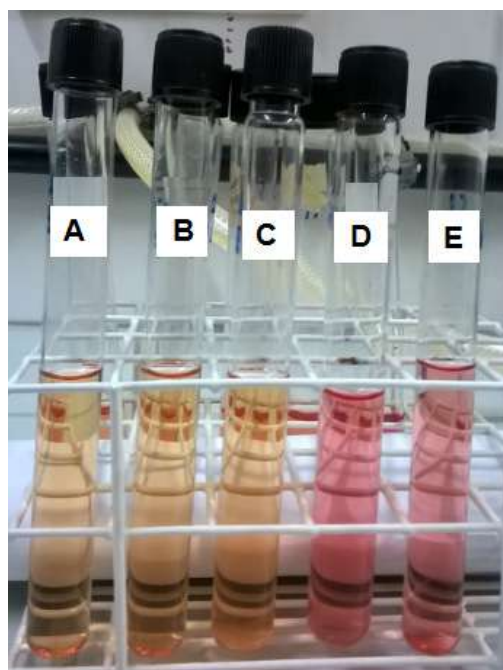


Figura 1.3. Teste da urease das leveduras: (A) *S. cerevisiae* (pêssego); (B) *C. guilliermondii* (resíduo); (C) *S. cerevisiae* (testemunha) (D) *R.mucilaginosa*; (E) *T. mucoides*.

3.2. Avaliação do cultivo em batelada da *S. cerevisiae*

O efeito do período de fermentação e armazenamento do cultivo em batelada da *S. cerevisiae* (2040032) variou amplamente para contagem de colônias, teor de açúcares redutores (AR), atividade da invertase livre (IL) e do cultivo (IC) (Tabela 1.2). Com relação à contagem de colônias, observou-se, para os dois tratamentos, um ganho significativo ($p < 0,05$) e crescente até 17 dias de armazenamento, sendo que a contagem de colônias foi maior para o tratamento de cultivo em batelada A ($5,0 \times 10^7$) frente ao B ($3,8 \times 10^7$) no 17º dia de cultivo. Após, observou-se queda na contagem para ambos os tratamentos, sendo a maior queda observada para “B”, inicialmente inoculado com 70% da contagem inicial de A ($N = 4,3 \times 10^6$). Em média, observou-se durante o período de fermentação e armazenamento que o tratamento A foi 42% superior ao tratamento B para contagem de células viáveis. Em ambos os sistemas (Figura 1.4) houve crescimento muito rápido inicial até 18 horas cultivo — fase log — seguido de uma fase estacionária até o décimo sétimo dia para sistema de cultivo B.

Por outro lado, o tratamento A continuou crescendo até 10 dias só que com uma velocidade de crescimento menor que a fase logarítmica. Após 17 dias, a levedura entrou na fase de declínio para ambos os tratamentos. Segundo Lima *et al.* (2001) o declínio é acompanhado de “lise” celular, autólise ou rompimento dos micro-organismos, provocada pela ação de enzimas intracelulares.

Quanto aos açúcares redutores, considerando a concentração inicial de cerca de 20 g.L^{-1} , observou-se uma conversão superior a 97 % no período de fermentação para ambos tratamentos. Aqui, a glicose é a principal fonte de carbono e, o seu alto consumo correspondeu a um crescimento exponencial na fase log (Figura 1.4). Souza (2013), trabalhando com a cinética otimizada de fermentação de mandioca doce, também demonstrou que o crescimento celular, na fase log, é acompanhado de alto consumo de açúcares redutores, além da produção de CO_2 e etanol. No período de armazenamento, a concentração de açúcares manteve-se baixa e sugerindo uma cinética de ordem zero ao longo de todo período de armazenamento para ambos os tratamentos (Tabela 1.2). Além disso, a partir das 18 horas até 24 dias de armazenamento, a concentração de glicose ficou abaixo da concentração crítica que favorece o surgimento do diauxismo e a levedura pode

apresentar dois perfis de crescimento. Guidi et al. (2010), trabalhando com efeito de diferentes concentrações de glicose no diauxismo de uma *S. cerevisiae* do tipo selvagem, observaram uma curva livre de diauxismo para concentração inicial de 20% m/v de glicose, mas para 2% m/v não. Haurie et al. (2003) também observou o diauxismo para 2% m/v inicial de glicose. Nesta concentração inicial de glicose, observou-se entre o primeiro e décimo dia de armazenamento ($p < 0,05$), um segundo perfil de crescimento que foi significativo para o tratamento A. Mielniczki-Pereira et al. (2008) observou esse fenômeno entre 16 e 20 horas de fermentação usando uma *Saccharomyces cerevisiae* do tipo selvagem. Por outro lado, Gray et al. (2004) cita que pode acontecer após 1 dia.

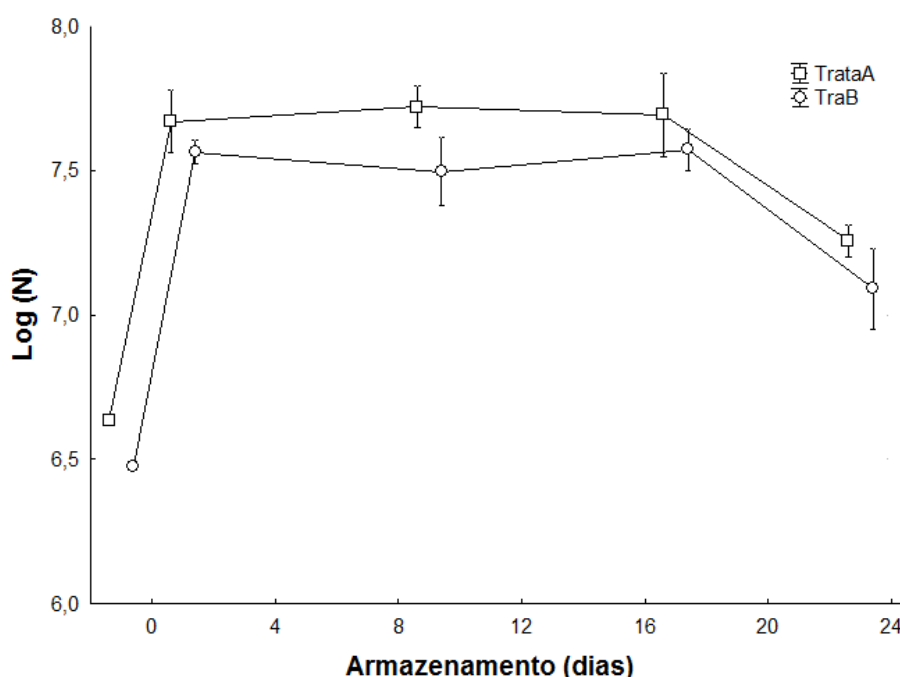


Figura 1.4. Curva de crescimento da *S. cerevisiae* (2040032) isolada de purê de pêssego para os dois tratamentos de cultivo em batelada: “A” com 20 g de cultura em BDA e “B” com 10 g. O crescimento da levedura foi conduzido a 30 °C, 150 rpm durante 24 horas de fermentação orbital seguido de 24 dias de armazenamento a frio. Os valores médios da contagem de placas em triplicatas.

Quanto à atividade da invertase no sobrenadante do cultivo em batelada, IC, os maiores valores foram observados entre décimo e décimo sétimo dia, sendo que o tratamento A ($27,1 \text{ U.mL}^{-1}$) no décimo dia de armazenamento ($p < 0,05$) foi superior aos demais valores (Tabela 1.2). Por outro lado, no final da fase log e na fase de

declínio, observamos os menores valores para atividade da invertase no cultivo (IC). Esta enzima é conhecida de longa data e muitos consideram a atividade no sobrenadante do cultivo em batelada, aqui denominada de IC, como uma invertase extracelular, incluindo invertase de *Aspergillus parasiticus* (LUCCA et al., 2013); invertase de *Aspergillus ochraceus* (GUIMARÃES et al., 2007); invertase de *Penicillium chrysogenum* (PONAWALLA et al., 1965). Segundo Myers et al. (1997), a expressão do gene que codifica a invertase é reprimida em concentrações altas de glicose livre. Foi observada alta concentração de glicose livre somente no início da fase log que pode estar relacionado com a baixa atividade IC observada após 24 horas de fermentação (Tabela 1.2). Na tabela 1.3, encontrou-se uma correlação inversa e significativa entre atividade IC e AR para ambos os tratamentos.

Para invertase livre (IL), extraída da biomassa do cultivo de *S. cerevisiae*, isolada de purê de pêssego, nenhuma contagem de células viáveis foi detectada após 24 horas de autólise. A máxima atividade foi observada para o tratamento A, após 24 horas de fermentação, com uma atividade específica de $15,7 \text{ U.mL}^{-1}$ ($20,0 \text{ U.mg}^{-1}$) em pH de 5 a 25°C . Nas mesmas condições reacionais, Toralles et al. (2014) encontraram $8,86 \text{ U.mg}^{-1}$ trabalhando com leveduras não identificadas obtidas do purê de pêssego da cv Jubileu e técnica de extração otimizada com invertase de levedura comercial, que recomendava uma pressão osmótica de 5,1 atm. Este trabalho usou uma pressão osmótica de 10,3 atm que equivale a uma concentração de NaHCO_3 200 mM. Por outro lado, não se observou atividade da invertase livre entre 10 e 17 dias de armazenamento. Tal fato é indicativo de ausência de autólise celular e, por tanto, o extrato enzimático sem atividade para invertase. Segundo Galdieri et al. (2010), nesse período as células estacionárias são resistentes ao calor e variação osmótica pela acumulação de moléculas de reserva como as trealosas que protegem a célula contra diferentes tensões. Sugerem-se trabalhos futuros que respondam as ótimas condições de autólise da invertase de *S. cerevisiae* de pêssego quanto à pressão osmótica, velocidade de agitação e tempo de extração.

Tabela 1.2. Efeito do período de fermentação e armazenamento nas características de contagem de células viáveis (N), açúcares redutores (AR), atividade da invertase livre (IL) e da invertase no cultivo (IC).

Variável	Tratamento ^b	Período de ^a												CV médio (%)
		Fermentação/cultivo (horas)						Armazenamento (dias)						
		0		18		1		10		17		24		
N (UFC.mL ⁻¹)	A	4,3x10 ⁶	aD	5,5x10 ⁷	aA	4,1x10 ⁷	aB	5,3x10 ⁷	aAB	5,0x10 ⁷	aAB	1,8x10 ⁷	aC	8,39
	B	3,0x10 ⁶	aC	3,7x10 ⁷	bA	3,7x10 ⁷	bA	3,2x10 ⁷	bA	3,8x10 ⁷	bA	1,2x10 ⁷	bB	7,59
AR (mg.L ⁻¹)	A	19732	a A	521,0	aB	492,6	aB	371,0	aB	465,5	aB	483,2	bB	4,93
	B	20235	aA	532,8	aB	470,1	bB	474,9	aB	373,3	aB	505,6	aB	4,96
IC (U.mL ⁻¹)	A	-	-	-	-	5,91	bB	27,1	aA	10,51	bB	13,94	aB	14,2
	B	-	-	-	-	7,97	aB	14,35	bA	14,53	aA	0,00	bC	2,71
IL (U.mL ⁻¹)	A	-	-	-	-	15,73	aA	0,00	aC	0,00	aC	7,21	bB	14,1
	B	-	-	-	-	4,86	bB	0,00	aC	0,00	aC	11,1	aA	7,38

a Valores médios seguidos da mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p<0,05).

b Os tratamentos A e B foram conduzidos 30°C e 150 rpm durante 24 horas de fermentação orbital em batelada, diferindo apenas no número de placas inoculadas no meio de cultura. O armazenamento foi conduzido 4°C e 24 dias para ambos tratamentos.

Tratamentos de cultivo em batelada: “A” com 20 g de culturas em BDA e “B” com 10 g.

A levedura selecionada para o cultivo foi *Saccharomyces cerevisiae* (2040032) isolada de purê de pêssego. Pelotas, UFPEL/IFSUL; 2015.

Os coeficientes de correlação calculados para período de fermentação e armazenamento, contagem de colônias (N) e log (N), teor de açúcares redutores (AR), conversão da glicose (%X), atividade da invertase do cultivo (IC) e atividade da invertase livre (IL), para os dois sistemas de tratamentos de cultivo em batelada, encontram-se na Tabela 1.3, figuras 1.5 e 1.6. Observou-se uma correlação positiva e significativa entre os teores de AR com a atividade da IL no tratamento “A” ($r = 0,5$, $p < 0,005$) e no tratamento “B” ($r = 0,62$, $p < 0,005$), porém inversa para N, Log (N), IC e %X para ambos os tratamentos. Para o período, observou-se correlação positiva somente com conversão da glicose (%X) para ambos tratamentos. Entre as atividades da IL e IC, a correlação também foi inversa (figura 1.5). Por outro lado, observou-se correlação positiva entre crescimento celular em termos de Log (N) e IC (figura 1.6). Nas figuras 1.5 e 1.6, os dados para os tratamentos A e B foram plotados juntos objetivando mostrar a correlação entre as variáveis.

Tabela 1.3. Coeficientes de correlação (r) entre o período de tratamento (P), a contagem de colônias (N), o teor de açúcares redutores (AR), a atividade da invertase do cultivo (IC) e livre (IL) para os dois tratamentos de cultivo em batelada: “A” com 20 g de culturas em BDA e “B” com 10 g. A levedura selecionada para o cultivo foi *S. cerevisiae* (2040032) isolada de purê de pêssego. Pelotas, UFPEL/IFSUL; 2015.

	Tratamento A		Tratamento B	
	P	AR	P	AR
N	0,16ns	-0,75*	0,15ns	-0,76 *
IC	0,10 ns	-0,72*	-0,45ns	-0,64*
IL	-0,42 ns	0,50*	0,46 ns	0,62*
%X	0,66*	-1,00*	0,66*	-1,00*
LogN	0,38	-0,90*	0,37	-0,90*

* significativo a $p \leq 0,05$ e $n=24$; ns= não significativo.

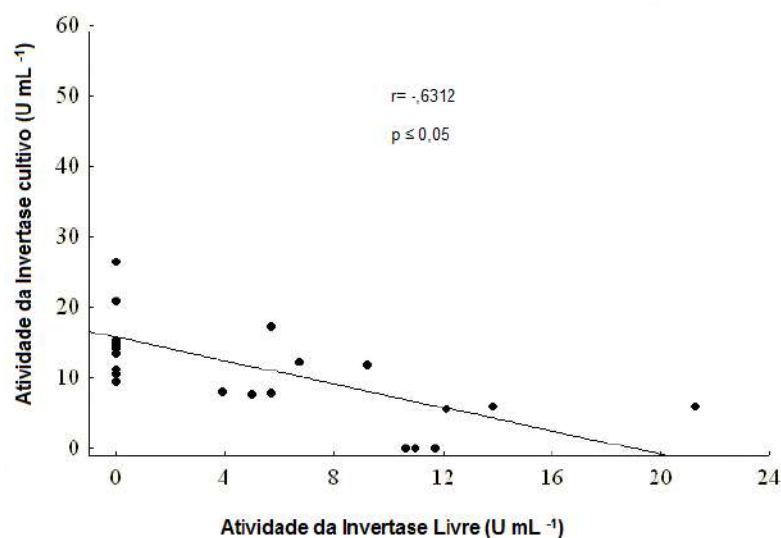


Figura 1.5. Correlação entre a atividade da invertase do cultivo (IC) e livre (IL) extraída por autólise da *S. cerevisiae* (2040032) isolada de purê de pêssego. A figura representa a correlação das atividades enzimáticas de ambos tratamentos. Pelotas, UFPEL/IFSUL; 2015.

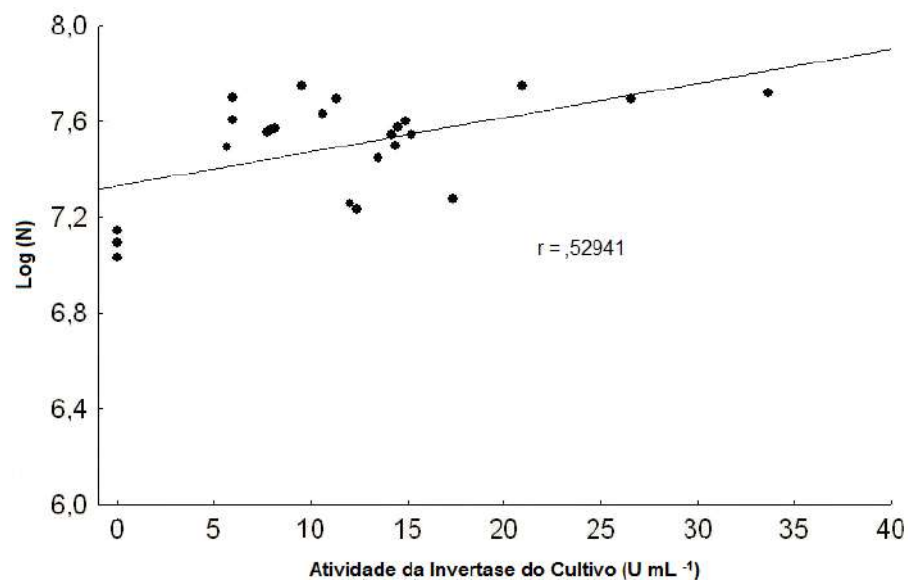


Figura 1.6 Correlação entre crescimento celular em termos log (N) e da atividade da invertase do cultivo obtida do sobrenadante do cultivo em batelada usando *S. cerevisiae* (2040032) isolada de purê de pêssego. A figura representa a correlação de ambos tratamentos. Pelotas, UFPEL/IFSUL; 2015.

4. CONCLUSÕES

(1) Na amostra de purê de pêssego a 22°Brix, foram identificadas três diferentes tipos de leveduras e no resíduo industrial, duas. Escolheu-se a *Saccharomyces cerevisiae* com perfil numérico (2040032) por questões legais, para avaliar o potencial de seu cultivo para produção de invertase, apesar das demais também serem produtoras.

(2) A *S. cerevisiae* teve um crescimento logarítmico até as 18 horas iniciais de fermentação. Depois, mostrou uma fase estacionária durante 17 dias de armazenamento refrigerado e, após, uma fase de morte para ambos os tratamentos, sendo que o “A”, aparentemente, desenvolveu diauxismo após 1 dia de fermentação.

(3) Os açúcares redutores decresceram com uma conversão superior a 97% ao final da fase “Log”. A IL apresentou maior atividade na fase “Log” e na fase de declínio em relação a IC, sendo que no declínio acontece uma lise celular espontânea que pode ter favorecido a produção de IL. De modo geral, a forte correlação inversa entre AR e IC permite dizer que baixo teor de açúcares redutores, após um dia de fermentação, favoreceu a produção de invertase no cultivo, sendo IC inversamente proporcional a IL. Tal fato se deve a que no diauxismo e na fase estacionária as células acumulam invertases, mas são resistentes a autólise.

Finalmente, concluiu-se que a produção de invertase do cultivo está correlacionada com o crescimento celular e o número de células viáveis, com o tratamento A superior ao longo de todo período de fermentação e armazenamento. A atividade da invertase livre dobra quando dobramos a pressão osmótica em relação ao valor citado na literatura e a sua produção por autólise da biomassa é recomendada após 1 dia de fermentação ou na fase de declínio nas seguintes condições de autólise em batelada: 200 mM NaHCO₃, 200 rpm, 24 horas a 40 °C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKLETT, K.; HART, M.; SHADE, A. The microbial ecology of flowers: an emerging frontier in phyllosphere research. **Botany**, Cairo, v. 92, n. 4, p. 253-266, 2014.

AOAC – **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Willian Horwitz. 17 ed. Rockyville: ed. Maryland: AOAC International, 2000. p. 1018.

ARAUJO, C. R.; MIRANDA, K.C.; PASSOS, X.S; SOUZA, L.K.H.; LEMOS, J.A; KHRAIS, C.H.A; COSTA, C.R; SILVA, M.R.R.; FERNANDES, O.F.L. Identificação das leveduras do género *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMagar™ *Candida*. **Revista de Patología Tropical**, Goiânia, v. 34, n.1, p.37-42, 2005.

BECKENKAMP, L. W. **Leveduras isoladas de polpas de frutas industrializadas**. 1997. 63 p. Dissertação (Mestrado em Criptógamos)- Universidade Federal de Pernambuco, 1997.

BEUCHAT, L.R. **Traditional fermented foods**. In: M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 2nd Ed. Washington, DC: ASM Press, 2005. p. 701–720.

BIAN, Y.; GONZALEZ, A.R. Effects of pasteurization or sodium benzoate on long-term storage stability of peach puree. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v. 17, n. 4, p. 299-310, 1994.

BOFO, D.C.S.; CASTRO, H.F; MEDEIROS, M.B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana de açúcar. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, V SIPAL, p. 121-124, 2005.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução de Diretoria Colegiada Nº 3.029, de 16 de abril de 1999. Dispõe sobre o Regulamento Técnico da lista de enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao

consumo humano conforme a sua origem. Diário Oficial da União, 21 ago. 2006. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

CANTARELLA, L.; ALFANI, F.; CANTARELLA, M. **β -D-Fructofuranoside Fructohydrolase**. In J. R. Whitaker, A.G. J. Voragen, D. W. S. Wong (Eds.), Handbook of Food Enzymology. New York: Marcel Dekker, (2003). pp. 787-804.

CHAVES-LÓPES,C.; SERIO, A.; GRANDE-TOVAR, C-D.; CUERVO-MULET, R.; DELGADO-OSPINA, J.; PAPARELLA, A. Tradicional fermented foods and beverages from a microbiological and nutricional perspective: The Colombian heritage. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v. 13, n. 5, p. 1031-1047, 2014.

CHEN, L-S.; MA, Y.; MAUBOIS, J-L.; CHEN, L-J.; LIU, Q-H.; GUO, J-P. Identification of yeast from raw milk and selection for some specific antioxidante properties. **International Journal of Dairy Technology**, Hoboken, v. 63, n. 1, p. 47-52, 2010.

CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B. N. **Basidiomycetous Yeasts**: Current Status. In: T. Satyanarayana and G. Kunze. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. 1st Ed. New Delhi: Springer, 2009. P. 19-43.

DÍAZ-MONTAÑO, D.M.; FAVELA-TORRES, E.; CÓRDOVA, J. Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of Agave tequilana juice by addition of yeast extract. **Journal Science Food Agriculture**, New Delhi, v. 90, n. 2, p 321-328, 2010.

DEUNER, S.; FERREIRA, L. S.; BACARIN, M. A.; BERVALD, C. M. P.; ZANATTA, E. R. Caracterização parcial da invertase ácida solúvel em tubérculos de batata: Energia de ativação e efeito de inibidores. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 1, p. 45-50, 2005.

FAZIO, M.L.S. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em polpas congeladas de frutas**. 2006. 117 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Estadual Paulista, 2006.

GABRIEL, J. R. Estudo da hidrólise de carboidratos em meio neutro, utilizando uma mistura de ésteres derivados dos óleos de mamona. 2009. 48 p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade de São Paulo, 2009.

GACULA JR., M. C.; SINGH, J. **Statistical methods in food and consumer research**. 2^a ed. Orlando: Academic Press, Inc., 2008. 808 p.

GALDIERI, L.; MEHROTRA, S.; YU, S.; VANCURA, A. Transcriptional regulation in yeast during Diauxic Shift and stationary phase. **Journal of Integrative Biology**, New York, v. 14, n. 6 p. 629–638, 2010.

GARZA, S.; TEIXIDO, J. A.; SANCHIS, V.; VIÑAS, I.; CONDON, S. Heat resistance of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from spoiled peach puree. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Maryland Heights, v. 23, n. 2, p. 209–213, 1994.

GOULART, A. J.; SANTOS, A. F.; TAVANO, O. L.; VINUEZA, J. C.; CONTIERO, J.; MONTI, R. Glucose and Fructose Production by *Saccharomyces cerevisiae* Invertase Immobilized on MANAE-Agarose Support. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 2, p. 169–175, 2013.

GRAY, J. V.; PETSKO, G. A.; JOHNSTON, D. R.; RINGE, D.; SINGER, R. A.; WERNER-WASHBURNE, M. “Sleeping Beauty”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, n. 2, p. 187–206, 2004.

GUAMÁN-BURNEO, C.; CARVAJAL-BARRIGA, J. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. **Universitas Scientiarum**, Bogotá, v. 14, n. 2-3, p. 187–197, 2009.

GUERRERO-BELTRÁN, J. A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia Coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. **Journal of Food Process Engineering**, Singapore, v. 28, n. 5, p. 437–452, 2005.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and polyphenoloxidase in mango nectar treated with UV Light. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 2, p. 362–368, 2006.

GUIDI, F.; MAGHERINI, F.; GAMBERI, T.; BORRO, M.; SIMMACO, M.; MODESTI, A. Effect of different glucose concentrations on proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Maryland Heights, v. 1804, n. 7, p. 1516-25, 2010.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Production and characterization of thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, Maryland Heights, v. 42, n. 1, p. 52–57, 2007.

HAURIE, V.; BOUCHERIE, H.; SAGLIOCCO, F. The Snf1 protein kinase controls the induction of genes of the iron uptake pathway at the Diauxic Shift in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 278, n. 46, p. 45391–45396, 2003.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9a ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEVY, C. E. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. ANVISA. Gerência de investigação e prevenção das infecções e dos eventos adversos. Brasília: ANVISA-MS; Campinas: Laboratório de Microbiologia – Centro Infantil Boldrini, 2004. p. 370-376.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C; AMORIM, H.V. **Produção de etanol**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, v. 3, cap. 1. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. p. 593.

LOPES, A. M.; TORALLES, R. P.; ROMBALDI, C. V. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in Jubileu clingstone peach and yeast

isolated from its spoiled puree. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 1, p.150-156, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, Rockville, v.193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUCCA, A. L.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L.H.S. Extracellular β -D-fructofuranosidase from *Aspergillus parasiticus*: Optimization of the production under submerged fermentation and biochemical characterization. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 12, n. 38, p.5678-5687, 2013.

MELO, D.L.F.M.; SANTOS, F.C.; JUNIOR, A.M.B.; SANTOS, P.O.; CARNELOSSI, M.A.G.; TRINDADE, R.C. Identification of Yeast Isolated from the Pulp in nature and the production of Homemade “Umbu” Wine. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 5, p. 887-892, 2007.

MIELNICZKI-PEREIRA, A.A; SCHUCH, A.Z; BONATTO, D.; CAVALCANTE, C.F; VAITSMAN, D. S; RIGER, C.J; ELEUTHERIO, E.C.A; HENRIQUES, J.A.P. The role of the yeast ATP-binding cassette Ycf1 p in glutathione and cadmium ion homeostasis during respiratory metabolism. **Toxicology Letters**, Porto Alegre. v.180, n. 1, p. 21-27, 2008.

MYERS, D. K.; LAWLOR, D. T. M.; ATTFIELD, P. V. Influence of Invertase activity and Glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 1, p. 145-150, 1997.

NEVOIGT, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.72, n.3, p. 379-412, 2008.

OLIVEIRA, D.P.; OLIVEIRA, L.E.M.; FILHO, N.D. Optimization of invertase assay conditions rubber tree plants (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 687–692, 2006.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n.1, p. 34-50. 2000.

PONAWALLA, F.M; PATEL K.L.; IYENGAR, M.R.S. Invertase Production by *Penicillium chrysogenum* and other Fungi in Submerged Fermentation. **Applied Microbiology**, Malden, v 13, n. 5, p. 749-754 ,1965

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, Malden, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

RETTORI, D.; VOLPE, P.L.O. Microcalorimetria: Uma técnica aplicável ao estudo de diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 257–261, 2000.

REVERON, I.M.; BARREIRO; SANDOVAL, A.J. Thermal Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* in Pilsen Beer. **Journal of the Institute of Brewing**, Malden, v. 109, n. 2, p. 120–122, 2003.

SANCHO, T.; GIMÉNEZ-JURADO, G.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Zymological indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates. **Food Microbiology**, Maryland Heights, v.17, n. 6, p. 613-624, 2000.

SILVA J. O.; CANDIDO R.C. Avaliação do sistema API20 AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 3, p. 261-263, 2005.

SILVA, T.; RETO, M.; SOL, M.; PEITO, A; PERES C.M; PERES C.; MALCATA F.X. Characterization of yeast from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. **LWT-Food Science and Technology**, Zürich, v.44, n. 6, p.1349–1354, 2011.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Brasília: EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995. p. 159.

SONGPIM, M.; VAITHANOMSAT, P.; VANICHSRIRATANA, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.. Enhancement of Inulinase and Invertase production from a newly isolated *Candida guilliermondii* TISTR 5844. **Kasetsart Journal (Nat.Sci.)**, Thailand, v. 45, n. 4, p. 675-685, 2011.

SOUZA, L.S.S. **Avaliação do processo de produção de etanol pela fermentação do caldo de Mandiocaba** (*Manihot esculenta* Crantz). 2013. 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Pará, 2013.

SOUZA, L.S.S.; PEREIRA, A.M.; FRANÇA, L.F.; CORREA, N.C.F. **Otimização dos parâmetros operacionais da fermentação alcoólica da mandioca doce** (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Brasileira de produtos Agroindustrial*, Campina Grande, v.16, n. 2, p.147–154, 2014.

TORALLES, R. T.; VENDRUSCOLO, J. L. Processamento do purê e néctar de pêssego. Comunicado Técnico 159, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007.

TORALLES, R.P.; KUHN, C.R.; SILVA, P.; RUIZ, W.A. Extração e Caracterização Parcial de Invertase de Levedura de Purê e Resíduo de Pêssego. **Revista Brasileira de tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v.8, n. 2, p.1399–1415, 2014.

CAPÍTULO 2

**ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DA SACAROSE POR
INVERTASE DE *Saccharomyces cerevisiae* ISOLADA DE PURÊ
DE PÊSSEGO E IMOBILIZADA EM AGAROSE-GLIOXIL**

**KINETICS STUDIES OF SUCROSE HYDROLYSIS BY
Sacchaomyces cerevisiae INVERTASE FROM SPOILED PEACH
PURE YEASTS AND IMMOBILIZED ON GLIOXIL-AGAROSE**

RESUMO

A extração por autólices, purificação parcial, caracterização cinética e imobilização de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (ISc) isolada de purê de pêssego cv. Jubileu e invertase de levedura comercial (ILC) como testemunha foram estudados. As invertases de leveduras foram isoladas e identificadas usando o API 20 C AUX. Subsequentemente, as culturas estoques foram mantidas em ágar batata dextrose (BDA), armazenadas a 4 °C e pH 5 para posterior cultivo em batelada (150 rpm a 30 °C por 24h) e, em seguida armazenadas a 4 °C até extração da invertase. O efeito combinado da concentração de NaHCO₃ e agitação orbital para a extração da ISc livre e a definição das condições ótimas para produção da enzima foram determinados usando uma metodologia de superfície de resposta (MSR), e a testemunha na condição padrão. Depois, o extrato bruto foi submetido a uma purificação parcial por precipitação com solventes orgânicos (acetona e etanol). A seguir, as invertases (ISc e ILC) foram imobilizadas covalentemente em glioxil-agarose usando três suportes ativados (2,5, 5 e 10 g) e dois pHs (7 e 10) como tratamentos para avaliar a eficiência da imobilização (EI) e atividade de recuperação (ARE). A atividade foi determinada por incremento na absorbância a 490 nm usando o método colorimétrico que resulta da reação da glicose-DNS. A condição ótima para extração da invertase livre foi 200 mM de NaHCO₃ como agente autolisante e 200 rpm. O modelo polinomial de segunda ordem explicou o fenômeno de autólice com uma variância explicada superior a 80%. O pH e a temperatura ótima foram 5 e 50°C, respectivamente, sendo que ambas as enzimas livres foram afetadas pela desnaturação de calor. O K_m foi de 44,8 mM para ISc e 5,2 mM para ILC. Na separação eletroforética, duas frações de proteínas foram detectadas para ISc e quatro para ILC. A imobilização ótima foi em pH 10 durante 24 h a 50 °C, 50 rpm; o suporte ativado de 5 g, ARE de 46,4%, RI de 37,5% e V_{max}/K_m de 65,2 de U.mg⁻¹.mm⁻¹. Finalmente, conclui-se que o método de imobilização não aumenta o valor do K_m, este é dependente da carga de suporte oferecida e do pH de imobilização.

Palavras-chave: pêssego, autólice otimizada, invertase, imobilização

ABSTRACT

The extraction for autolysis, partial purification, kinetic characterization and immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* invertase (ISc) isolated from spoiled Jubileu peach puree and invertase from commercial yeast (ICY) as witness were studied. The yeasts invertases were isolated and identified using the API 20 C AUX. Subsequently, the stock cultures were maintained on potato dextrose agar (PDA) slants at 4 °C and pH 5 for later use for batch-culture (150 rpm at 30 °C for 24 h) and, then they were stored at 4 °C for subsequent invertase extraction. The combined effects of NaHCO₃ concentration and orbital stirring on the extraction of free-ISc, and the definition of the optimum conditions for the free-ISc production were determined using response surface methodology (RSM), and the witness in the standard condition. After, the crude extract was submitted to partial purification by precipitation with organic solvents (acetone and ethanol). Then the invertases (ISc and ICY) were covalently immobilized on glyoxil-agarose using three activated support (2.5, 5 e 10 g) and two pHs (7 and 10) treatments to evaluated immobilization efficiency (IE), recuperated activity (RA). The activity was followed by an increase in absorbance at 490 nm using the colorimetric method resulting from the glucose-DNS reaction. The optima conditions for extraction of free-ISc were 200 mM NaHCO₃ as autolysis agent at 200 rpm. The second order polynomial model explained the phenomenon of autolysis with an explained variance superior to 80%. The pH and the optimum temperature were 5.0 and 50 °C on sucrose, and both free enzymes were affected for the heat denaturation. The K_M was 44.8 mM for ISc and 5.2 mM for ICY. In the electrophoretic separation, two-protein fraction was detected for ISc and four for ICY. The optimum immobilization was obtained in buffer pH 10, immobilization time of 24 at 50 °C, 50 rpm, activated support of 5 g, RA of 46.7%, IE of 37.5 and V_{max}/K_m of 65.2 U.mg⁻¹.mM. Finally, it was concluded that the method of immobilization did not increase the K_m value, this is dependent on the offered load support and of the pH immobilization.

Keywords: peach, optimized autolysis, invertase, immobilization.

1. INTRODUÇÃO

Em pêssegos, já foram identificados mais de 160 tipos de micro-organismos em diferentes etapas do processamento de polpa de pêssego, destacando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* com potencial fermentativo e resitência térmica significativa (GARZA et al., 1994; LOPES et al., 2014).

As enzimas obtidas a partir dessas leveduras têm sido bastante estudadas, incluindo a *frutohidrolase frutofuranosidase* (EC 3.2.1.26), conhecida como invertase, que catalisa a hidrólise da sacarose produzindo uma mistura de glicose e frutose chamada açúcar invertido que é usado na indústria de alimentos e farmacêutica. Além das leveduras, sobretudo na espécie *Saccharomyces cerevisiae*, as invertases são também encontradas em invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos (DEUNER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; GOULART et al., 2013). Em *S. cerevisiae* foram identificadas duas diferentes formas de invertase: uma não glicosilada, que se encontra no citoplasma, e outra localizada no espaço periplasmático, que é glicosilada, e encontra-se ligada à parede celular da levedura, sendo a extracelular a forma predominante (CANTARELLA et al., 2003; BOFO et al., 2005). A *Candida utilis* também apresenta essas duas formas (GUIMARÃES et al., 2007).

A atividade ótima das invertases geralmente ocorre em pH entre 4,6 e 5,0 e temperatura entre 35°C e 50°C, com concentração de substrato da ordem de 120 g/L⁻¹. Acima desta concentração a solução de sacarose tem a viscosidade aumentada, reduzindo a atividade enzimática na presença de água (VITOLLO et al., 2004; SANTOS, 2010). Em leveduras de purê de pêssego cv Jubieu, a atividade ótima da invertase foi demonstrada por Toralles et al. (2014), na temperatura entre 20–40°C e 5–6 de pH, sem, isolar e identificar as leveduras. Com a realização do presente trabalho foi possível isolar e identificar três leveduras diferentes para o purê de pêssego e duas para o resíduo industrial de pêssego, como demonstrado no Capítulo 1.

As massas moleculares das invertases variam consideravelmente: em plantas desde 42 kDa a 504 kDa; em micro-organismos 37-560 kDa (CANTARELLA et al., 2003). A natureza do carboidrato ligado a enzima, conhecido como

glicosilação, a técnica de purificação e eletroforese empregada para estimativa da massa molecular e o elevado número de cepas de leveduras produtoras de invertase pode ser a melhor explicação para variabilidade na massa molecular desta enzima (GUIMARÃES et al., 2007 e ANDJELKOVIC et al., 2010).

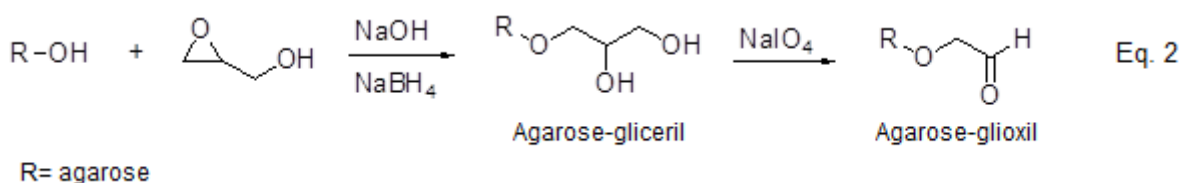
Muitos trabalhos têm sido citados sobre leveduras produtoras de invertase utilizando fermentação submersa (FS) e sacarose ou melaço como principal fonte de carbono (BELCARZ et al., 2002; BOFO et al., 2005; MUKHERJEE et al., 2005). Porém, uma técnica que vem sendo utilizada é a fermentação em estado sólido (FES), que consiste no cultivo de micro-organismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas. A FES, quando comparada com a FS, é vantajosa porque apresenta menor repressão catabólica, alta produtividade e concentração da enzima. Entretanto, *in vitro*, a fermentação descontínua em estado líquido para produção de biomassa, com potencial para produção de invertase, tem sido bastante utilizada (MITCHELL et al., 2000; ROMERO-GÓMEZ et al., 2000; PALMA, 2003).

Ao final da fermentação, a invertase não se encontra livre, necessitando, portanto, de um processo de extração. A autólise é um processo bastante empregado que, resumidamente, consiste na ruptura e degradação das estruturas celulares por atividade de enzimas degradativas, principalmente, as endo- e exo- β -(1,3) glucanases. O processo de autodigestão pode ser iniciado pela aplicação de condições controladas de pH, temperatura, velocidades de agitação, potencial osmótico entre outros, que pode provocar morte celular sem inativar tais enzimas. Uma série de desordens acontecem dentro das células, resultando na solubilização dos componentes celulares e na desintegração da membrana celular; assim, os componentes solúveis, onde se encontra a invertase, escoam para meio extracelular (GUILLOUX-BENATIER et al., 1995; TENKANEN et al., 2003). A literatura pertinente não relata a interação dessas variáveis para avaliar a extração da invertase de levedura de pêssego por autólise.

Após a extração, a enzima encontra-se livre, porém glicosilada e, dependendo de sua aplicação, são necessárias operações de purificação antes do estudo de sua cinética completa seja na forma livre ou imobilizada. As técnicas de precipitação com solvente seguido de separação em colunas cromatográficas são

bem citadas e suficientes para preparar a enzima principalmente para caracterizar as isoformas de invertase e sua imobilização (ZHANG et al., 2004; GUIMARÃES et al. 2007, VEANA et al., 2011).

Uma alternativa para produção de açúcar invertido é a hidrólise enzimática usando invertase imobilizada que consiste em reter ou ligar enzimas ou sistemas enzimáticos em uma região definida de um suporte. Nesse processo é importante preservar a atividade catalítica, de modo a permitir seu uso de maneira repetida e contínua. A imobilização da invertase ocorre, principalmente, por adsorção ou ligação covalente em um suporte ou aprisionamento em membranas (KOTWAL e SHANKAR, 2009). Neste trabalho fez-se imobilização por ligação covalente a um suporte, em duas etapas. A primeira etapa envolve a reação da agarose com o glicidol em presença de NaOH e NaBH₄ resultando agarose-gliceril (Eq. 2.0) e sua oxidação em presença de periodato de sódio para dar gel de agarose-glioxil, que é o suporte pronto para imobilizar a invertase. Este tipo de mecanismo confere uma maior estabilidade, dificultando a soltura da enzima do suporte e permitindo a utilização de substrato mais concentrado (CARAVANTE, 2013).



Comercialmente, a imobilização permite aproveitar a atividade enzimática por mais tempo, montar um biorreator com enzimas imobilizadas, melhorar a estabilidade de enzima, operar de forma contínua, entre outras (GUISÁN, 2006).

Na imobilização de invertases, foi encontrado divergências com relação ao valor da constante Michaelis-Menten (K_m) após a imobilização. Alguns autores citam que a imobilização provoca um aumento do seu valor e outros, por sua vez, relatam que a imobilização não aumenta o valor de K_m . Neste trabalho implantou-se um estudo para extrair, purificar parcialmente, caracterizar e imobilizar invertases obtidas de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISc) usando como testemunha levedura comercial (ILC). Para *C. guilliermondii* de resíduo de pêssego (ICg) realizaram-se alguns testes preliminares para determinar seu potencial na produção de invertase. Desta maneira o presente trabalho objetivou:

(1) estudar o efeito combinado da concentração de NaHCO_3 (50-350 mM) e da velocidade de agitação (50-350 rpm) no processo de extração da invertase ISc. Desse experimento resultou um modelo matemático polinomial de segunda ordem que permitiu definir as condições ótimas para extração da invertase e obtenção de um extrato bruto;

(2) avaliar os efeitos da concentração do extrato enzimático bruto para três enzimas: ISc; ICg e ILC. A partir desse estudo foi possível definir a diluição ótima do extrato bruto (EB) usando como resposta a atividade da IL e teor de proteína no EB;

(3) Purificar parcialmente a invertase ISc e ILC com solventes orgânicos (Acetona e álcool) e identificar suas frações proteicas por eletroforese horizontal. Com esse estudo conseguiu-se obter um extrato purificado e definir o solvente mais efetivo na recuperação da atividade específica, bem como definir as frações proteicas presentes no extrato purificado;

(4) Caracterização cinética da enzima livre e imobilizada covalentemente em glioxil-agarose usando três quantidades de suportes ativados (2,5; 5 e 10) e dois pHs (7 e 10). Através desse estudo foi possível definir as condições ótimas de pH, temperatura, estabilidade ao calor e as constantes cinéticas (K_m e V_{max}) para invertase livre e imobilizada. Além disso, para invertase imobilizada, definiu-se as condições ótimas de pH, tempo e velocidade orbital de imobilização, bem como, a oferta de suporte visando a ótima recuperação de atividade e especificidade da enzima imobilizada. Em todos os experimentos a invertase de levedura comercial foi testemunha.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e seu cultivo

O micro-organismo usado foi isolado a partir de purê de pêssego a 22°Brix fornecido por Lopes et al. (2014) e identificada como *Saccharomyces cerevisiae*, pelo sistema API 20C AUX, com 95% de exatidão e perfil numérico 2040032. As culturas foram mantidas em placas de ágar de dextrose de batata (BDA), pH 5 e contadas como descrito por Siqueira (1995), após 5 dias de incubação a 25°C. No purê, a contagem inicial das colônias foi de 22×10^2 UFC/mL⁻¹. O crescimento da

levedura foi conduzido usando cultivo em batelada com 20 g de cultura em BDA, 20 g.L⁻¹ de glicose, (NH₄)₂SO₄ 1 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 2 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,5 g.L⁻¹; FeSO₄ 0,5 g.L⁻¹ e peptona 5 g.L⁻¹ sobre agitação de 150 rpm orbital a 30 °C durante 24 horas. Após, foi feita uma nova semeadura já com as leveduras identificadas e isoladas como *S. cerevisiae* e com uma contagem inicial de cerca de 10⁶ UFC/mL⁻¹. Posteriormente, armazenadas a 4°C para extração da enzima. Para *Candida guilliermondii* obtida a partir de resíduo de pêssego seguiu-se o mesmo procedimento.

2.2. Determinação açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método colorimétrico da glicose usando 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Alemanha), 1 mL de meio reacional e 1 ml de água, seguido de banho-maria fervente por 5 minutos. No branco, foi utilizada água destilada no lugar do meio reacional. Todas as medidas foram conduzidas em triplicatas. A transmitância resultante dessa reação foi medida a 490 nm, utilizando um espectrofotômetro AJX-1000 UV/VIS. A massa de glicose no meio reativo foi determinada através da curva padrão de glicose Equação 2.1:

$$m \text{ glicose} = \frac{(AA-AB)+B}{A} \times V \times F \quad (2.1)$$

onde *AB* é a absorbância do branco, *AA* é a absorbância da amostra, *B* é o coeficiente linear da reta, *A* é a constante de proporcionalidade; *V* é o volume final do meio reativo, em mL, e *F* é o fator de diluição. Os valores de *A* e *B* encontram-se no Apêndice A.

2.3. Efeito da concentração de bicarbonato de sódio e velocidade de agitação na extração da invertase

Para analisar o efeito combinado da concentração de NaHCO₃ (X1) e da velocidade de agitação (X2), na extração da enzima, um planejamento rotacional composto central (BARROS NETO et al. 1995), foi adaptado para duas variáveis e cinco níveis (Tabela 2.1). Os extratos enzimáticos foram obtidos usando um método de extração com bicarbonato conhecido como autólise. Para cada 100 g de

biomassa, são utilizados 300 mL de solução em diferentes concentrações de NaHCO₃ e velocidade de agitação (Tabela 2.1).

A extração foi conduzida em shaker Quimis por 24 horas a 40°C. Após, centrifugou-se a amostra a 2025 x g durante 10 minutos para obter o líquido sobrenadante que corresponde ao extrato enzimático bruto que, foi armazenado a -20 °C. No extrato centrifugado foi determinado o teor de proteínas por Lowry, utilizando BSA como padrão (Acros, New Jersey, USA). Para testemunha foi realizado o mesmo planejamento.

Tabela 2.1 Codificação das variáveis reacionais e planejamento do experimento.

Código de nível	Concentração de NaHCO ₃ (X ₁)	Velocidade agitação (X ₂)
	(mM)	(rpm)
- 1,414	50	50
-1	100	100
0	200	200
1	300	300
1,414	350	350

O planejamento experimental foi configurado com quatro pontos axiais, quatro pontos cúbicos, três pontos centrais (Tabela 2.1). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata. Uma função polinomial de segunda ordem (Equação 2.2) foi ajustada aos dados experimentais:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{i,i} X_i^2 + \sum b_{i,j} X_i \cdot X_j \quad (2.2)$$

sendo: Y_i= variável resposta; X_i ou X_j= variáveis entrada; b₀= ponto central do sistema; b_i= coeficiente linear; b_{ii}= coeficiente quadrático e b_{ij}= coeficiente interativo. A variável resposta foi definida em termos de atividade relativa (AR %) em relação à máxima atividade encontrada para ISc e determinada como descrito no item 2.4.

O ponto estacionário foi determinado através da equação:

$$X_s = -\frac{1}{2} B^{-1} \cdot b \quad (2.3)$$

sendo: X_s = é o ponto estacionário; b = é um vetor ($k \times 1$) dos coeficientes de regressão de primeira ordem e B = é uma matriz simétrica ponto central ($k \times k$). Na diagonal, têm-se os coeficientes de regressão de segunda ordem e fora da diagonal os coeficientes de interação.

Uma análise canônica foi feita objetivando facilitar a interpretação dos resultados do ponto estacionário e definir se é um ponto de máximo, mínimo ou sela, usando o seguinte modelo:

$$\hat{Y} = Y_s + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (2.4)$$

Y_s = é a resposta do ponto estacionário; w_i = são as variáveis independentes transformadas e λ_i = são autovalores da matriz B .

2.4. Atividade da invertase

A atividade enzimática da invertase foi determinada por reação dos açúcares redutores com DNS. A transmitância resultante dessa reação foi medida a 490 nm, utilizando um espectrofotômetro AJX-1000 UV/VIS. O meio reacional continha 1,0 mL de tampão McIlvaine pH 5.0; 1,0 mL de solução de sacarose como substrato e 1,0 mL de extrato enzimático. A mistura reativa final continha 40 mM de substrato. A reação foi conduzida em pH de 5,0 a 25°C. Após, foi dosado o teor de AR. No branco, foi utilizado 1,0 mL de água deionizada em substituição ao substrato na mistura reativa. A atividade enzimática foi calculada na parte linear da curva. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que causa o incremento de $1\mu\text{g glicose} \cdot \text{min}^{-1}$. O teor de proteínas por Lowry, utilizando BSA como padrão (Acros, New Jersey, USA).

2.5. Purificação do extrato bruto por precipitação

A recuperação da invertase foi feita através da precipitação com o solvente orgânico etanol e acetona. O solvente gelado foi adicionado ao extrato bruto numa proporção de 3:1. Esta mistura foi mantida sob-refrigeração por 15 min e após este período de tempo foi centrifugada por 10 min a $2025 \times g$. O precipitado obtido foi secado e resuspendido em água destilada. As proteínas solúveis e a atividade enzimática foram determinadas como descrito no item 2.4

Para a precipitação com sulfato de amônio foi testada a concentração de 55%. O sulfato de amônio foi adicionado lentamente ao extrato enzimático sob agitação e resfriamento, após a adição do sal a mistura foi mantida em repouso *overnight* a 4°C e, então, centrifugada a 2025 x *g* por 30 min. O precipitado foi ressuspendido em água deionizada, dialisado em sacos de celulose (12000-16000 Da e 25 Å) durante 12 h com trocas periódicas de água. Em seguida foram determinadas a atividade enzimática e o teor de proteína.

2.6. Eletroforese

Os extratos purificados de invertase de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISc) e de levedura comercial (ILC) foram submetidos a eletroforese horizontal de gel de poliacrilamida (6%) usando tampão (pH=8.3) que foi preparado de acordo com o método de SCANDALIOS (1969). Amostras de extrato enzimático (1000 µg/mL⁻¹) de 40 µL foram colocadas em cada espaço do gel. Uma voltagem de 100-110V foi aplicada durante 4 horas. A eletroforese foi conduzida a 4°C. As frações proteicas foram coradas em azul de Coomassie durante 24 horas seguido de descolorimento com solução metanol-ácido acético-água. Os géis foram posteriormente escaneados.

2.7. pH e temperatura ótima

O efeito do pH na atividade das invertases foi determinado a 25 °C, na faixa de pH entre 3 e 8, usando tampão *Mcllvaine* apropriado. O pH ótimo foi utilizado em todos os outros experimentos. Para estudar o efeito da temperatura, a atividade foi determinada entre 10 e 80 °C, usando banho termostatzado e circulante (Nova Ética). O meio reativo e o extrato enzimático foram pré-aquecidos separadamente por 1 minuto, em tubos com tampa (d.i 9mm, parede 1mm), na temperatura testada e, então, a enzima foi adicionada.

2.8. Efeito da concentração do substrato e parâmetros cinéticos

A sacarose, entre 0-100 mM de concentração final no meio reacional, foi utilizada como substrato para estudar o seu efeito na atividade das invertases nas condições ótimas de pH e temperatura de 25°C e 50°C. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas por regressão não

linear. O comportamento linear dos dados foi investigado por Lineweaver e Burk (1934).

2.9. Estabilidade térmica, constante cinética e tempo de meia-vida

Porções (1000 µL) de solução do extrato enzimático (1,0 mg.mL⁻¹) foram previamente aquecidas (50°C) em tubos com tampa (i.d 9mm, parede 1mm) para diferentes períodos de tempo. Posteriormente, condicionou-se meio reacional e a atividade restante foi determinada usando o mesmo procedimento descrito anteriormente no item 2.4. Desta maneira, a desnaturação térmica das invertases foi monitorada para cada tempo de aquecimento. As constantes de velocidade de desnaturação de primeira-ordem (k) foram determinadas a partir das inclinações das curvas de desnaturação de acordo com Eq. 2.5

$$\log\left(\frac{A_t}{A_o}\right) = -(k/2.303)t \text{ ou } \ln\left(\frac{A_t}{A_o}\right) = -kt \quad (2.5)$$

onde A_o é a atividade inicial da enzima e A_t é a atividade após o tempo de aquecimento. As inclinações foram determinadas por regressão linear.

O tempo de meia-vida (t_{1/2}), que é o tempo para atividade enzimática diminuir de A_o até ½A_o em uma reação de primeira-ordem, foi determinado através da Eq. 2.5 como

$$k \cdot t_{\frac{1}{2}} = -\ln\left(\frac{\frac{1}{2} A_o}{A_o}\right) = -\ln(1/2) = \ln 2$$

Consequentemente

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k} \quad (2.6)$$

O principal ponto a ser observado sobre a Eq. 2.6 é que, para uma reação de primeira-ordem, o tempo de meia-vida é independente da concentração inicial.

2.10. Imobilização

O suporte agarose-glioxil foi preparado por esterificação da agarose com glicidol e posterior oxidação com periodato de sódio de acordo a metodologia

proposta por Komesu (2009). Para 105 g de agarose adicionou-se 30 mL de água destilada, 50 mL de solução de Hidróxido de sódio (NaOH 1,7 M) com 1,425 g de borohidreto de sódio (NaBH₄) e 36 mL de glicidol sob agitação durante 15 h a 25°C. Filtrou-se à vácuo e lavou-se com água destilada até o gel atingir pH 7. Suspendeu-se os 150 mL do gel obtido (gliceril-agarose) em água destilada em uma proporção 1/10 ($V_{\text{gel}}/V_{\text{total}}$ de suspensão). Para 20 g de suporte (1:10), adicionou-se 0,7704 g de periodato de sódio (NaIO₄) e se manteve por agitação durante 2 h. Lavou-se com água destilada e secou-se a vácuo. A eficiência da formação do suporte de agarose-glioxil, foi determinada pelo periodato (IO₄⁻) não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril. A evolução da oxidação foi acompanhada pela medida da absorbância a 560 nm, que foi definida por varredura, usando um sistema reacional contendo KI, NaHCO₃ saturado com adição de NaIO₄. A imobilização da invertase em agarose-glioxil foi realizada a 25°C, 50 rpm durante 24h em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 e tampão bicarbonato de sódio 100 mM pH 10, testando quatro quantidades de suporte glioxil-agarose (0, 2,5, 5 e 10 g).

Uma alíquota de 1 mL do meio reacional contendo tampão de imobilização e enzima foi retirada para medida de atividade inicial (branco de imobilização). Adicionou-se na suspensão de imobilização boroidreto de sódio (1 mg /mL suspensão), durante 30 minutos com agitação (100 rpm), 25 °C, com posterior centrifugação e reconstituição com tampão acetato de sódio 200 mmol/L pH 5. A atividade da invertase livre e imobilizada foi medida no sobrenadante e acompanhada por estimativa colorimétrica da glicose usando 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e sacarose como substrato. A hidrólise foi conduzida a 25 °C e pH de 5 como definido por Toralles et al. (2014). A concentração de proteínas foi determinada pelo método Lowry.

O rendimento da imobilização em termos de proteína foi calculado seguindo a equação 2.7

$$RI(\%) = \frac{Po - Pf}{Po} \quad (2.7)$$

Onde Po equivale à proteína inicial da enzima livre (controle) e Pf, á proteína após 24 h de imobilização.

A atividade recuperada no derivado foi calculada conforme a seguinte relação:

$$ARE = \frac{\text{Atividade (U.mL}^{-1}\text{) final}}{\text{Atividade (U.mL}^{-1}\text{) inicial}} \times 100 \quad (2.8)$$

2.11. Análise estatística

O Software Statistica v. 6.0 foi utilizado para calcular os coeficientes de regressão não linear, coeficiente de determinação e análise de variância (ANOVA), bem como para gerar os gráficos em duas e três dimensões. Os intervalos de confiança dos coeficientes foram calculados multiplicando o erro padrão por Student-t (t_{n-2}), ajustado aos graus de liberdade ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Extração da invertase por autólise de levedura de purê de pêssego

Na Tabela 2.2, tem-se o delineamento com as condições aplicadas e os resultados experimentais para avaliar a extração da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* de purê de pêssego (ISc), em termos de percentual de atividade relativa (% AR). No ensaio 5, com uma concentração de 200 mM de NaHCO₃ e 200 rpm, foi onde se observou maior extração por autólise com uma %AR de 100% que corresponde a uma atividade específica 17,4 U.mL⁻¹ em pH de 5 a 25°C. Os ensaios 2, 6, 7 e 8 não diferiram do ensaio 5 ($p < 0,05$), sendo que os ensaios 6 e 7 são repetições do ponto central. Quando comparados os ensaios 2 e 8, com condições experimentais quase inversas, fica evidente a dependência pelo efeito combinado de ambas as variáveis: concentrações de NaHCO₃ e velocidade de agitação.

A literatura não relata a interação dessas variáveis para avaliar a extração da ISc; portanto, comparações não são possíveis. Entretanto, o conhecido trabalho de Vitolo et al. (1979) propõe como condição ideal de autólise a 200 rpm, 150 mM de NaHCO₃ a 45°C para invertase de levedura de pão. Em condições semelhantes usadas neste trabalho, foi encontrada uma % AR de cerca de 20%.

Tabela 2.2 Matriz do planejamento experimental com os valores codificação, os valores naturais e a resposta.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis naturais		Y ^a
	X1	X2	X1 (mM)	X2 (rpm)	
1	-1	-1	100	100	38,2 b
2	+1	-1	300	100	98,5 a
3	-1	+1	100	300	32,0 b
4	+1	+1	300	300	0,0 c
5	0	0	200	200	100 a
6	0	0	200	200	97,8 a
7	0	0	200	200	99,3 a
8	-1,414	0	50	200	99,3 a
9	0	+1,414	200	350	0,0 c
10	+1,414	0	350	200	0,0 c
11	0	-1,414	200	50	24,3b

Y^a= valor médio da variável resposta em termos de atividade relativa (%AR), sendo que 100% de AR corresponde a uma atividade 17,4 U.mL⁻¹ em pH de 5 a 25°C. Valores médios seguidos da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p<0,05).

3.2. Efeito combinado da concentração de bicarbonato de sódio e da velocidade de agitação

As influências linear, quadrática e interativa das concentrações de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (X₁) e velocidade de agitação orbital (X₂) na extração da invertase estão na Tabela 2.3. O modelo expresso pela Equação 1, com coeficiente de determinação (R²) de 0,80, foi estatisticamente significativo para regressão (p≤0,05), dados mostrados em Apêndice B.

Tabela 2.3. Coeficientes de regressão não linear e de determinação (R²) do modelo matemático de segunda-ordem para extração da invertase de purê pêssego cv. Jubileu^a.

Coeficientes	Valores ^b
Intercepta (b ₀)	91,5 ±3,44 **
B1	-12,4 ±2,10**
B2	-16,9 ±2,10**
B11	-21,1 ±2,50**
B22	-36,4 ±2,50**
B12	-21,3 ±3,00**
R ²	0,80

^a $Y=b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1.X_2$; onde X_1 = concentração NaHCO₃ e X_2 = velocidade de agitação. Significante ($p < 0,01$). ^bValores ± intervalo de confiança a $p= 0,05$. ^{NS} Não significativo; * Significativo ($p \leq 0,05$); **Significativo ($p \leq 0,01$). Valores médios seguidos da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

O efeito interativo das concentrações de NaHCO₃ e da velocidade de agitação na extração da invertase por autólise avaliado através da sua atividade ficou evidente na Figura 2.1. Este tipo de informação é de grande validade para a otimização do processo extração da invertase. A faixa de concentrações de NaHCO₃ e velocidade de agitação, respectivamente, onde ocorreu o máximo de extração da invertase, ficou entre 100–250 mM e 100-250 rpm.

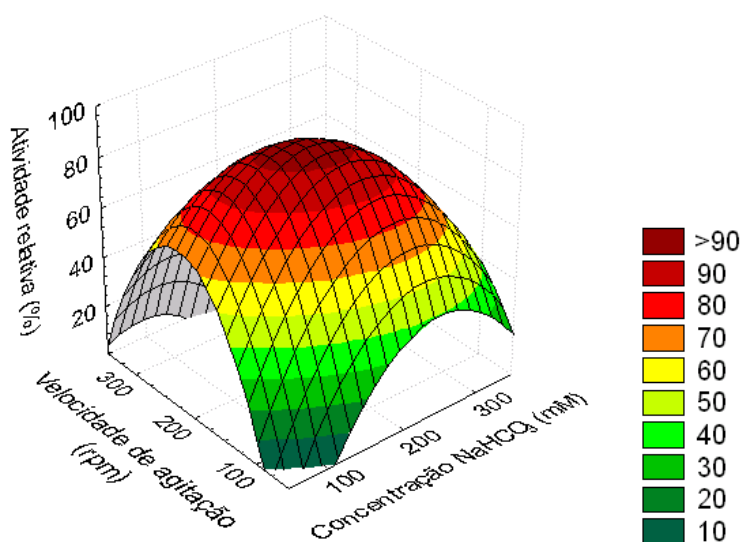


Figura 2.1. Superfície de resposta para efeito interativo de NaHCO₃ (X₁) e da velocidade de agitação (X₂) no processo de extração da invertase (ILP) obtida por autólise de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISc) da cv. Jubileu. A AR de 100% a 25°C e pH de 5 igual a 14,7 U.mg⁻¹.

3.3. Localização do ponto estacionário e análise canônica

O modelo ajustado da Equação 2.2 é

$$Y_i = 91,0 - 12,4X_1 - 16,9X_2 - 21,1X_1^2 - 36,4X_2^2 - 21,3X_1X_2$$

Para o modelo acima, o ponto estacionário, determinado através da Equação 2.3 é dado por:

$$X_s = \begin{pmatrix} -0,20 \\ -0,18 \end{pmatrix}$$

Em termos de variáveis naturais, o ponto estacionário é dado por:

$$X_1 = -0,20 \cdot 100 + 200 = 180$$

$$X_2 = -0,18 \cdot 100 + 200 = 182$$

onde X_1 é concentração NaHCO_3 e X_2 é a velocidade de agitação orbital no shaker.

Para expressar o modelo ajustado na forma canônica, primeiro, temos que encontrar os autovalores que são as raízes do determinante da equação $B-\lambda I$:

$$\left| \begin{pmatrix} -21,1 - \lambda & \frac{-21,3}{2} \\ \frac{-21,3}{2} & -21,1 - \lambda \end{pmatrix} \right| \rightarrow \lambda^2 + 42,2 \cdot \lambda + 331,79$$

As raízes desta equação são iguais a: $\lambda_1 = -10,33$ e $\lambda_2 = -33,41$. Como todas as raízes características possuem sinal negativo, pode-se dizer que o ponto estacionário trata-se de um ponto de máxima extração.

3.4. Comparação entre os extratos bruto e liofilizado

Fazendo um estudo comparativo entre o extrato não purificado obtido por autólise de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISc) não-liofilizada e liofilizada, figura 2.2, ambos com uma concentração de cerca de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de proteína e nas condições do ensaio 5, observou-se um aumento de cerca de duas vezes na atividade da ISc liofilizada ($37,1 \text{ U.mL}^{-1}$). Para invertase de levedura comercial (ILC)

– testemunha – procedendo de uma autólise a 100 mM de NaHCO_3 , 200 rpm e 45°C , observou-se $201,5 \text{ U.mL}^{-1}$ na mesma concentração de proteína.

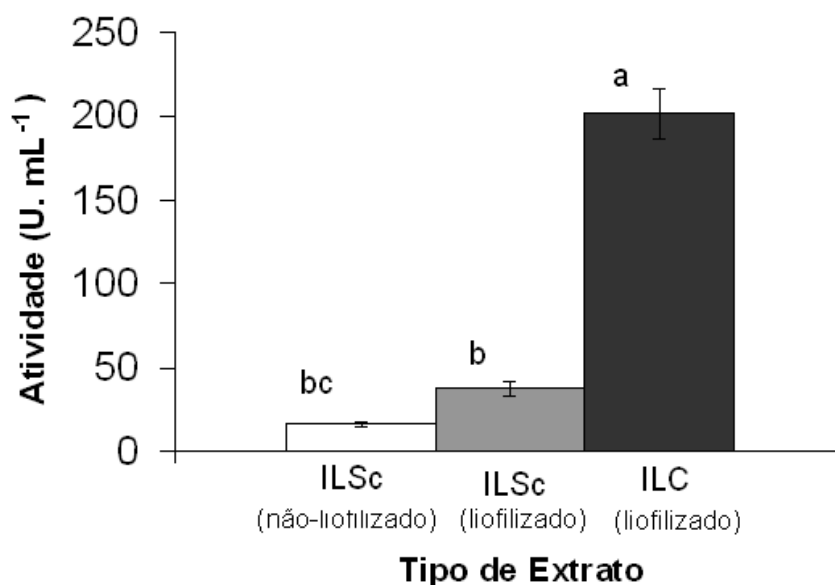


Figura 2.2. Comparação entre os extratos não purificado de invertases ISc não-liofilizada, ISc liofilizada e ILC. Teor de proteína de 1 mg.mL^{-1} .

3.5. Atividade dos extratos não purificados de invertase

Na Tabela 2.4 tem-se os resultados do efeito do extrato enzimático em diferentes diluições. Os extratos são originários de uma autólise realizada em batelada usando NaHCO_3 200 mM como agente de autólise sob agitação orbital de 200 rpm durante 24 horas a 40°C , com exceção da invertase de levedura comercial (ILC) que procedeu uma autólise a 100 mM de NaHCO_3 , 200 rpm e 45°C . Para o extrato de invertase de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISc), não se observou diferença significativa entre o extrato bruto ($73,5 \pm 9,5$) e sua diluição de 50% em volume ($70,2 \pm 3,7 \text{ U.mL}^{-1}$). Para extrato de invertase de *C. guilliermondii* de resíduo de pêssego (lcg), também não se observou diferença significativa entre o extrato bruto ($37,9 \pm 2,1$) e sua diluição de 50% em volume ($39,5 \pm 4,8$). Para ambos extratos de ISc e lcg, escolheram-se o extrato com maior diluição porque renderam uma quantidade maior em volume para desenvolver os demais experimentos, com exceção para eletroforese.

Tabela 2.4 – Atividade nos extratos de invertase de levedura comercial (ILC), de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISC) e de *C. guilliermondii* de resíduo de pêssego (ICg).

Extrato enzimático ^a	Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)					
	Invertases					
%(V/V)	ILC		ISC		ICg	
100	20,0 ± 2,41	Efg	73,5 ± 9,5	c	37,9 ± 2,1	de
50	42,6 ± 18,5	D	70,2 ± 3,7	c	39,5 ± 4,8	de
20	100,9 ± 3,9	B	37,1 ± 4,4	de	20,1 ± 1,4	efg
10	201,5 ± 15,1	A	26,2 ± 4,9	def	9,4 ± 2,7	fg
1	43,8 ± 6,0	D	1,4 ± 0,9	e	3,3 ± 1,2	e

100% em volume: extrato enzimático bruto centrifugado preparado como descrito no item 2.3; os demais extratos foram preparados por diluição com água destilada a partir do extrato enzimático bruto centrifugado na concentração de 100% em volume. Valores médios seguidos da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Para invertase de levedura comercial (ILC), testemunha identificada como *S. cerevisiae*, a maior atividade foi observada na diluição de 10% em volume ($201,5 \pm 15,1$) seguido da 20% em volume ($100,9 \pm 3,9$), sendo que ambas foram significativamente superiores às demais atividades tanto para ISC como ICg ($p \leq 0,05$). Quanto a diluição, os resultados são condizentes com os valores encontrados por Toralles et al. (2014) para invertase de levedura comercial, porém não é possível comparações com ISC e ICg porque os autores não trabalharam com invertases obtidas de leveduras isoladas.

A Figura 2.3 foi construída a partir dos dados experimentais da Tabela 2.4. A máxima atividade específica de $201,5 \pm 15,1$ U.mL⁻¹ e 930 µg.mL⁻¹ de proteína tomou-se com 100% de atividade relativa (%AR) para invertase de levedura comercial (ILC). Quando comparado com essa atividade, a invertase de ISC mostrou cerca de 35% desse valor e a ICg cerca de 20%. Para diluição de 1% do extrato tanto o teor de proteína quanto o teor de açúcares redutores ficaram abaixo dos limites de quantificação (Apêndice A).

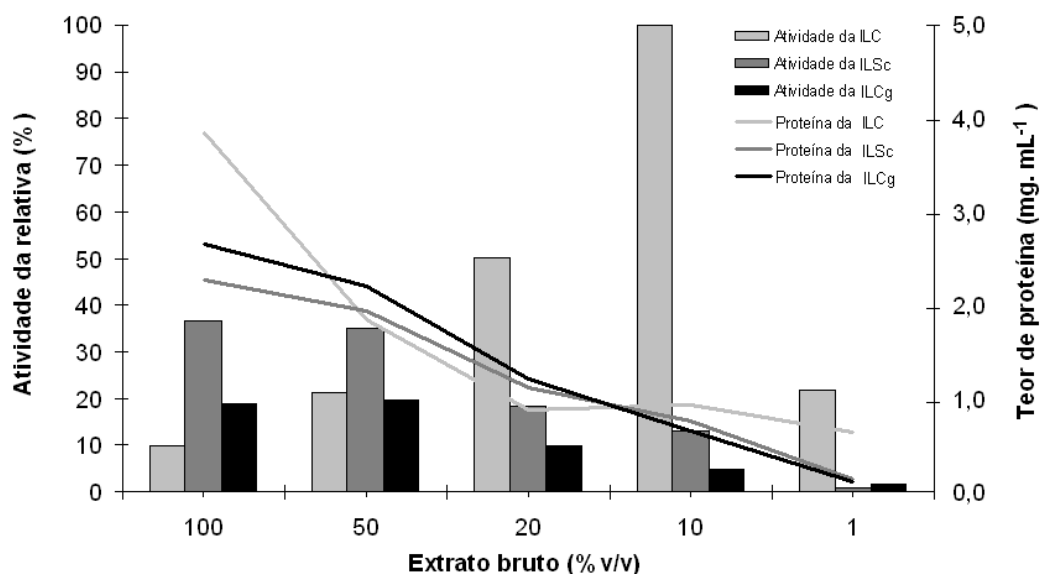


Figura 2.3 Efeito da diluição do extrato bruto nas atividades das invertases livres de levedura comercial (ILC), de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISC) e de *C. guilliermondii* de resíduo de pêssego (ICg).

Para extrato de invertase obtida de levedura comercial, usando um processo de extração combinando sucessivas macerações em meio etéreo, Santos (2010) encontrou $46,51 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteína. Aqui, os valores observados para o extrato bruto de ILC, 100% em volume, foi $20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $384 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteína respectivamente.

3.6. Purificação da invertase

Na Tabela 2.5 estão apresentados os resultados obtidos através da purificação com etanol e acetona para a recuperação das invertases por precipitação, usando uma proporção de 3:1 (solvente: extrato bruto). Os resultados obtidos estão baseados na escolha das diluições mais adequada definidas no item 3.5.

Na comparação do extrato de ISC a 50% em volume (com atividade específica de $36,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), com as precipitações utilizando os solventes acetona e etanol, obtiveram-se fatores de purificação de 2,1 vezes (89,9%) para o etanol e 3,0 vezes (86,1%) para a acetona, sendo as atividades de $63,1$ e $60,4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente equivalentes as atividades específicas de $74,9$ e $108,4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Para testemunha, ILC, com extrato diluído a 10% em volume, o álcool também foi mais efetivo, com uma atividade de $275,6 \text{ U.mg}^{-1}$ e um fator de recuperação de 1,3 e um rendimento de cerca de 70%, apesar das diferenças não serem significativas entre os solventes para ambas as enzimas. Andjelkovic et al. (2010) obteve um rendimento de 79,2 % para invertase purificada de extrato bruto obtido por autólise de levedura de pão comercial.

Frequentemente, a precipitação por sulfato de amônio é utilizada para separação de misturas complexas de proteínas, baseando-se na concentração de sal necessária para precipitar diferentes proteínas, sendo frequentemente encontrada na literatura como um processo de purificação. Para ISc, testou-se 55% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e obteve-se um fator de purificação de 1,6 vezes e um rendimento de cerca de 94%, mas não se optou por esse método de recuperação porque é mais trabalhoso que precipitação com solvente. Moriguchi et al. (1991), trabalhando com purificação de invertase ácida de extratos de polpa de pêssego, obteve um rendimento de 94% com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em quantidade suficiente para fornecer 55 % de saturação.

Tabela 2.5 – Atividade dos extratos de invertase livre de levedura comercial (ILC), de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISC) purificados com solventes orgânicos.

Invertases										
	ILC					ISc				
	Atividade	Atividade específica	Proteína	Recuperação		Atividade	Atividade específica	Proteína	Recuperação	
	(U.mL ⁻¹)	(U.mg ⁻¹)	(µg.mL ⁻¹)		%	(U.mL ⁻¹)	(U.mg ⁻¹)	(µg.mL ⁻¹)		%
EB*	201,5 ± 15,1 a	216,8 ± 16,3b	930	1,0	100	70,2 ± 3,7 a	36,2 ± 1,9c	1937	1,0	100
Acetona	145,3 ± 1,4 b	201,0 ± 2,0 b	723	0,93	72,1	63,1 ± 7,7 a	74,8 ± 9,1 b	843	2,1	89,9
Álcool	140,1 ±12,6 b	275,6 ± 24,6a	508	1,3	69,5	60,4 ± 7,2 a	108,4 ± 12,9a	557	3,0	86,0

*EB é o extrato 10% em volume para ILC e 50% para ISc. Valores médios seguidos da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p<0,05).

Quanto a estabilidade, após 30 dias armazenados a -20°C , observou-se uma perda máxima de 7% para extrato bruto de ISc e nenhuma perda significativa para os extratos purificados após 30 dias. Para a testemunha houve perda de atividade entre 7,60% e 13,4 %, sendo que a purificação usando álcool foi onde se observou a maior perda (Figura 2.4). Para extrato bruto de ILC armazenado sob refrigeração 4°C , a perda após 30 dias de armazenamento foi 49%. Novaki et al. (2010), tanto para extratos de invertase recuperados com sulfato de amônio como com solvente a partir de extrato bruto de *Aspergillus casingii*, observaram de 30% a 40% de perda na atividade durante o tempo de estocagem em freezer.

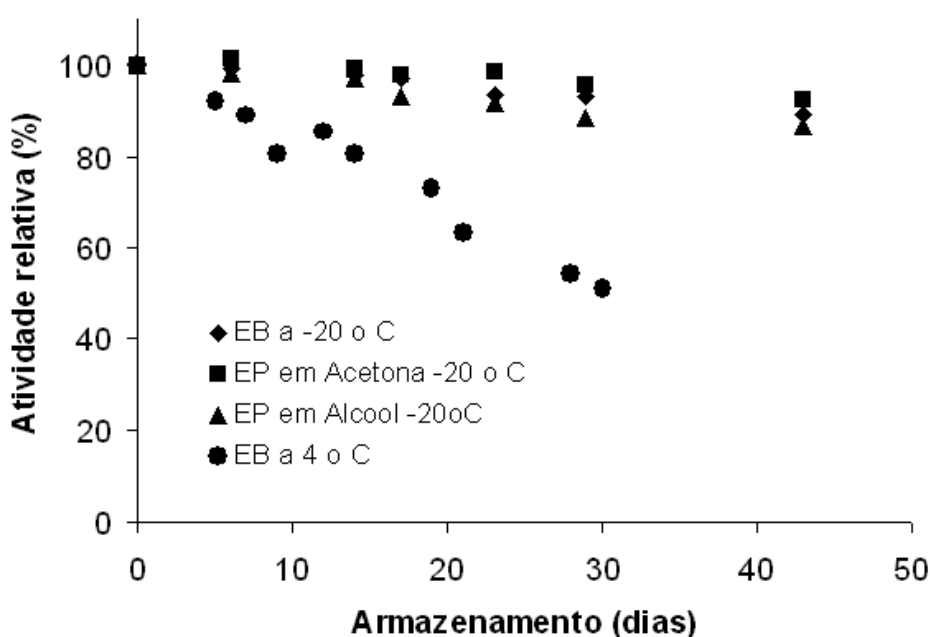


Figura 2.4 Estabilidade do extrato bruto (EB) e purificado (EP) de levedura comercial (ILC), armazenados por 30 dias a 4°C e -20°C .

3.7. Eletroforese

Duas frações proteicas foram separadas a partir do extrato concentrado com acetona para ISc e para ILC usando eletroforese de gel de poliacrilamida 6% com tampão de corrida 8,9, sendo ambas coradas com solução de azul de Coomassie 0,1 % m/v (Figura 2.5). Tanto para ISc como para ILC, testemunha, foram identificados uma banda com 0,1 e outra com 0,3 de mobilidade relativa (MR). Para ILC, o interessante é que quando modificam-se as suas condições originais de

autólise de uma solução 100 mM NaHCO₃, 200 rpm, 45°C e 24 horas para 300 mM NaHCO₃, 100 rpm, 40°C e 24 horas, uma terceira (MR=0,5) e quarta banda (MR=0,65) aparecem bem nítidas para ILC além das outras já citadas. Nestas condições, para o extrato bruto de ILC, observou-se uma atividade 282,7 U.mL⁻¹ que é 1,4 vezes maior do que atividade encontrada para extrato bruto para condições de autólise escolhidas como padrão de extração para ILC.

O padrão BSA (INLAB), fração V, com massa molecular de 66KDa, teve um MR de 0,5. Tal fato indica que a fração ILC com uma banda (MR= 0,50) tem uma massa molecular próxima a 66 KDa. Estudos de Andjelkovic et. al (2010), também para invertase de levedura de pão comercial, encontraram quatro isoformas com atividade e todas com massa molecular de 60 kDa. Goulart et al. (2003) indicaram pelos menos duas isoformas presentes em fração proteica com atividade de invertase a partir *Rhizopus sp.*

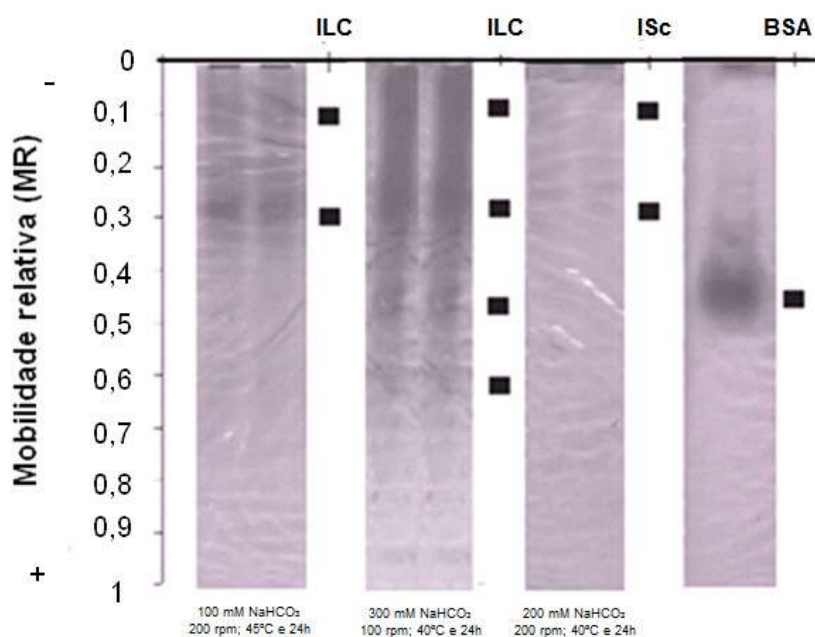


Figura 2.5 Perfil eletroforético de ILC e ISc a partir de seus extratos concentrados com acetona com cerca de 1 mg.mL⁻¹ de proteína. Inserido: eletroforese em gel de poliacrilamida 6% pH 8,9. A mobilidade relativa foi baseada na migração do marcador de azul de bromofenol. As frações proteicas foram coradas com azul de Coomassie: ILC; ILC; ISc e BSA.

3.8. Efeito do pH e temperatura das enzimas livres

Na figura 2.6 tem-se o efeito do pH na atividade hidrolítica da ISc (de purê de pêssego). A hidrólise da sacarose foi realizada durante 10 minutos a 25°C e uma concentração final de 40 mM sacarose no meio reacional. A máxima atividade para ISc foi observado em 5,0. No pH ótimo, a atividade relativa (AR) de 100% corresponde a uma atividade específica $74,8 \pm 9,1 \text{ U.mg}^{-1}$. Akgol et al. (2008), trabalhando com invertase de levedura de pão livre e imobilizada, o pH ótimo ficou na faixa 5 a 6.

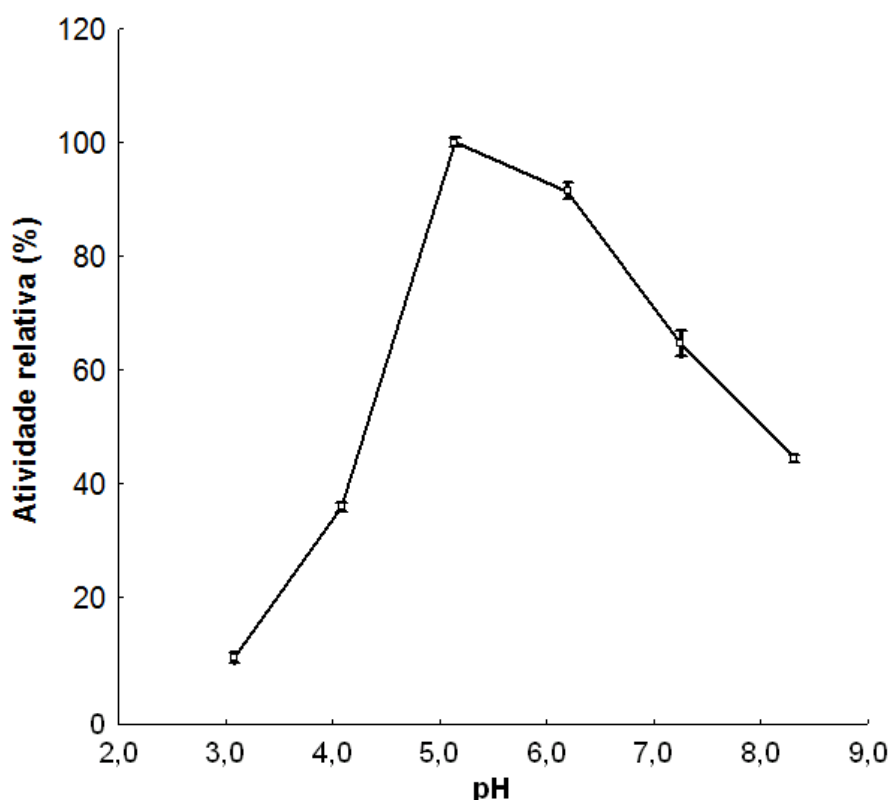


Figura 2.6 Efeito do pH na atividade da invertase de *S. cerevisiae* de purê de pêssego. Tampão Mcllvaine: citrato (100 mM) - fosfato (200 mM). Temperatura: $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Enzima: 1,0 mL em 3,0 mL de meio reativo com 40 mM sacarose. Os pontos são a média de 3 repetições $\pm 0,95$ *desvio padrão. 100% de AR é $74,8 \pm 9,1 \text{ U.mg}^{-1}$

A temperatura ótima foi 50°C para ISc (Figura 2.7). A estabilidade foi diminuindo a partir do ponto ótimo, sendo que na temperatura de 70°C nenhuma atividade residual foi detectada para ISc. Os resultados apresentados aqui estão de acordo com os observados por Emrugul et al. (2006) para dependência da temperatura de invertase [EC 3.2.1.26] obtidas da Sigma Chemical Co.

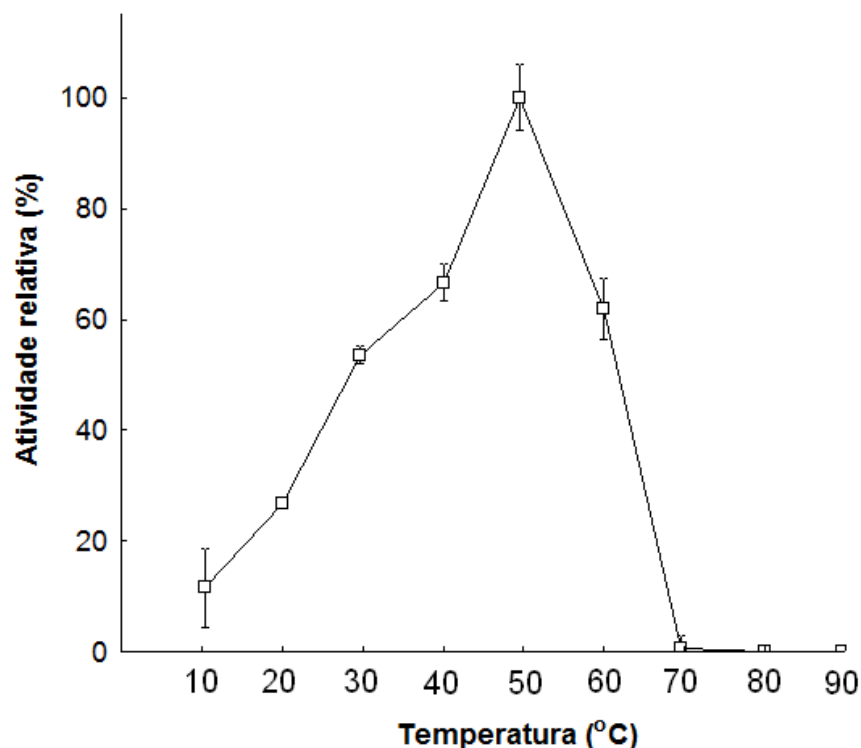


Figura 2.7 Efeito da temperatura na atividade da invertase de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISc). Tampão Mcllvaine pH 5. Enzima: 1,0 mL em 3,0 mL de meio reativo com 40 mM sacarose. Os pontos são a média de 3 repetições $\pm 0,95 \times$ desvio padrão. 100% de AR é $224,2 \pm 6,5 \text{ U.mg}^{-1}$.

Toralles et al. (2014), trabalhando com invertases obtidas por autólise de levedura de pão e purê de pêssego, encontraram que para ambas as enzimas, o pH ótimo ficou na faixa de 5,0 a 6,0. Por outro lado, a temperatura ótima para invertase obtida de levedura comercial de pão ficou entre 40 e 50°C, mas para invertase de levedura de purê de pêssego entre 20 e 40°C usando extratos brutos de leveduras não identificadas. Fato que motivou a realização deste trabalho com invertase de purê de pêssego, porque é uma importante característica para produção de açúcar invertido com controle do escurecimento não enzimático.

O estudo da estabilidade é um fator importante para aplicação industrial de reações catalisadas por enzimas. A figura 2.8 mostra a estabilidade da ISc e ILC, em termos de atividade relativa, a 50°C que foi a ótima temperatura encontrada para ambas enzimas. Para ISc, a desnaturação seguiu um aparente modelo cinético de primeira ordem com uma constante cinética (k) de $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ e um tempo de

meia-vida ($t_{1/2}$) de 92 min. A ILC também seguiu uma cinética de primeira ordem com k de $9,9 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ e $t_{1/2}$ de 70 min. Até 30 minutos, ambos apresentaram uma atividade residual de cerca de 80%, mas acima desse tempo observou-se um afastamento gradual na estabilidade da testemunha frente invertase ISc. Barbosa (2009), para invertase de levedura comercial, demonstrou que a enzima é estável na faixa de 40-50°C durante 60 minutos, porém, a 60°C a forma livre exibiu menos de 40% de atividade após 60 minutos.

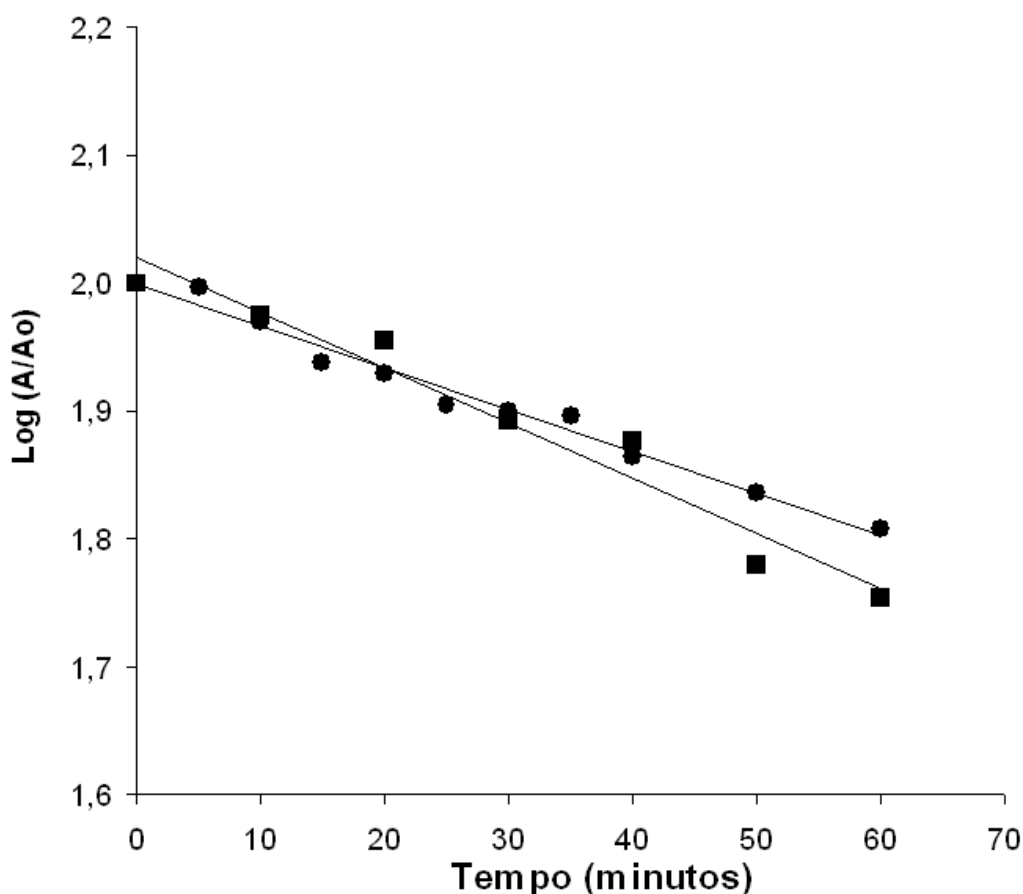


Figura 2.8 Efeito da temperatura ao longo do tempo na atividade da invertase de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISc) e invertase de levedura comercial a 50°C e nos tempos indicados: ISc (●) e ILC (■).

3.9. Parâmetros cinéticos para invertase livre e imobilizada

Os parâmetros cinéticos para a velocidade de hidrólise da sacarose foram determinados para invertase livre de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISc) e de levedura comercial (ILC) por regressão não linear (Tabela 2.6).

Tabela 2.6. Constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) da invertase livre de *Saccharomyces cerevisiae* de purê de pêssego (ISc) e invertase livre de levedura comercial (ILC).

Parâmetros	Invertase livre	
	<i>S. cerevisiae</i> ^a	Levedura comercial
K_m^a (mM)	$44,8 \pm 1,42^{**}$	$6,61 \pm 0,19^{**}$
V_{max}^a (U.mg ⁻¹)	$181,0 \pm 3,22^{**}$	$300,0 \pm 0,94^{**}$
V_{max}/K_m	4,05	45,4
R^2	0,98	0,99

^a valor $\pm$ intervalo de confiança a $p=0.05$. ^{**}Significativo ($p \leq 0,01$). ^{ns} Não significativo.

Para ISc, observou-se um comportamento hiperbólico entre velocidade de hidrólise (U.mg⁻¹) versus concentração de sacarose (mM) durante o caminho da reação, sugerindo uma cinética de Michaelis-Menten (Figura 2.9). Os pontos experimentais foram confirmados pela linearidade do gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 2.9, inserida). Os valores da constante aparente de Michaelis ($K_{m,ap}$) e da velocidade máxima (V_{max}) foram 44,8 mM de sacarose e 181,0 U.mg⁻¹, respectivamente.

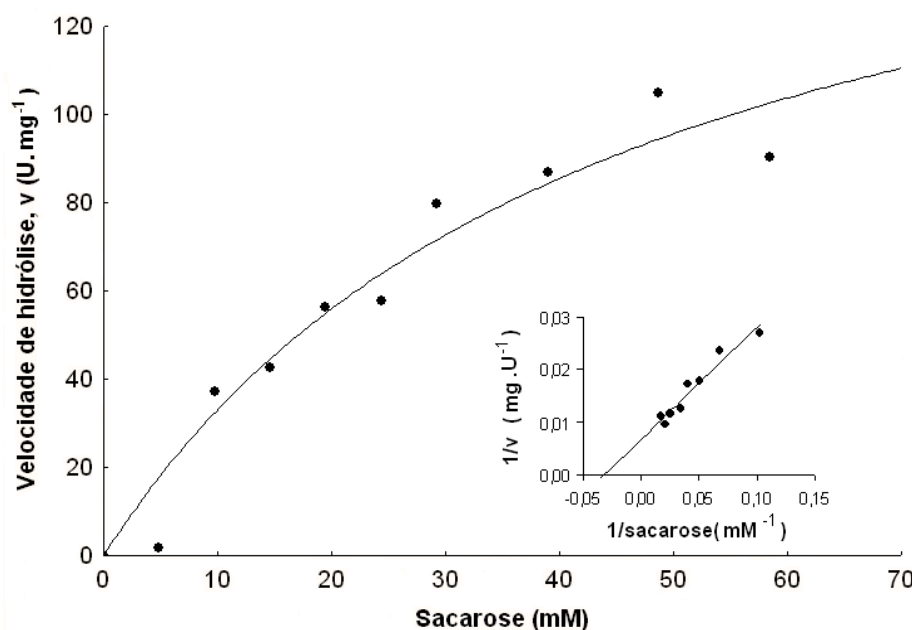


Figura 2.9 Efeito da concentração da sacarose na velocidade de hidrólise da invertase livre de *S. cerevisiae* de ISc. Tampão Mcllvaine pH 5. Temperatura: $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Enzima: 1,0 mL em 3,0 mL de meio reativo. Inserido: gráfico de Lineweaver-Burk. Os pontos representam a média de 3 repetições.

Quando a ILC, testemunha, foi usada como catalisador para hidrólise da sacarose (0-60mM), o gráfico da velocidade hidrólise versus concentração de sacarose foi hiperbólico somente na primeira parte da curva (Figura 2.10). Após, a atividade decresce para uma concentração de sacarose maior do que cerca de 40 mM. Esta inativação pode ser resultado de uma inibição clássica por substrato. Os pontos também foram confirmados por Lineweaver-Burk (Figura 2.10, inserida). Os valores $K_{m,ap}$ V_{max} foram 6,61 mM de sacarose e 300 U.mg⁻¹, respectivamente. A velocidade de hidrólise mediada pela ILC (Figura 2.10) foi pelo menos 1,5 vezes maior do que a da ISc (Figura 2.9). Nas mesmas condições de hidrólise, Toralles et al. (2014) encontram um K_m de cerca de 24 mM e V_{max} de 47 U.mg⁻¹ para extrato bruto ILC. Comparando os coeficientes de especificidades (V_{max}/K_m) de ambos extratos de ILC, pode-se afirmar que a purificação aumenta 3-4 vezes a afinidade pela sacarose e cerca de 10 vezes a especificidade. A 60°C e 5,5 de pH, Amaya-Delgado (2006) encontraram um K_m de 24 mM e V_{max} de 1,06 mol.min⁻¹ para invertase comercial de *S. cerevisiae* sem purificação adicional. Tal fato mostra que a constante de Michaelis-Menten é dependente da purificação, pH e da temperatura.

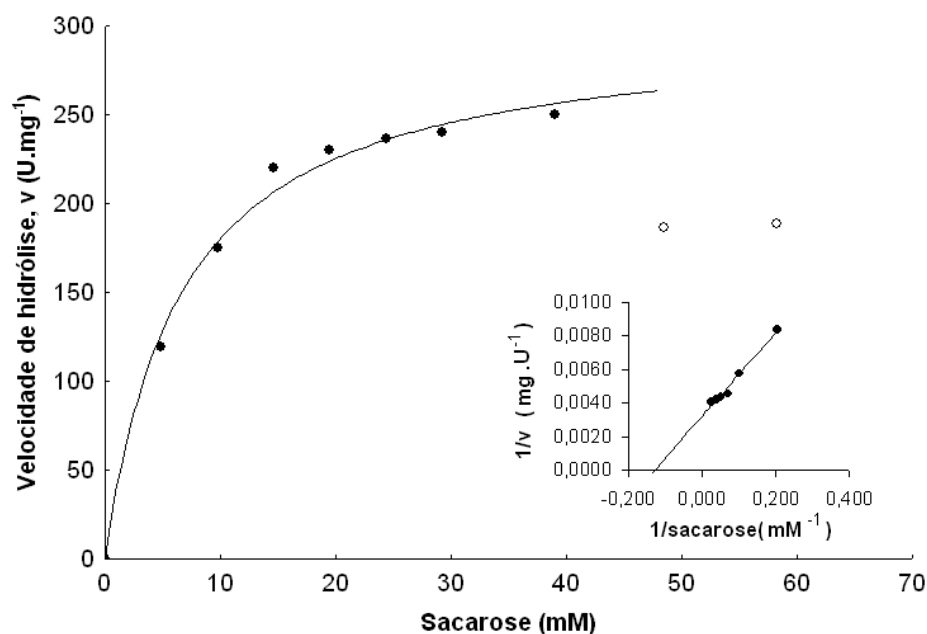


Figura 2.10 Efeito da concentração da sacarose na velocidade de hidrólise da invertase de levedura comercial. Tampão Mcllvaine pH 5. Temperatura: 25±0,1°C. Enzima: 1,0 mL em 3,0 mL de meio reativo. Inserido: gráfico de Lineweaver-Burk. Os pontos representam a média de 3 repetições.

O modelo de Michaelis-Menten foi estatisticamente significativo ($p \leq 0,01$) para descrever a hidrólise da sacarose para ambas enzimas (Apêndice B-Tabela B3), porque os valores de F calculados foram 11 e 76 vezes maior para ISc e ILC, respectivamente, do que o valor listado. Como regra prática, um modelo tem significação estatística quando o valor de F calculado é pelo menos 3-5 vezes maior do que o valor listado (GACULA e SINGH, 2008).

3.10. Influência do pH de imobilização e parâmetros de imobilização

Na figura 2.11 tem-se a estabilidade do extrato de invertase livre de levedura comercial de pão (ILC) a 10% em volume, testemunha, durante 24 horas, a 25°C e 50 rpm de agitação orbital, teve como objetivo avaliar a perda de atividade da enzima livre durante a sua imobilização. Após 24 horas de incubação, o extrato diluído em água reteve 80% de sua atividade inicial, seguido do extrato diluído em pH 10, retendo 47% da atividade da invertase; no pH 7 apenas 26%.

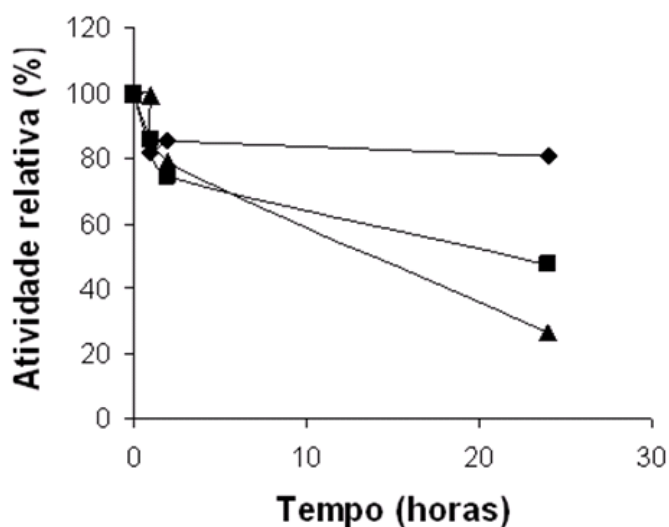


Figura 2.11 Estabilidade da invertase de ILC. Os extratos purificados foram diluídos em água (◆); em pH 10 (■) e em pH7 (▲). Todos foram incubados durante 24 horas a 25°C e 50 rpm, com uma diluição final de 10% em volume.

As invertases apresentam uma ampla faixa de atuação para pH como mostra a Figura 2.11. No pH 10, apesar da atividade ser baixa, mostrou-se estável. Segundo Komesu et al. (2009), tal propriedade e pH facilitam a imobilização

multipontos em diversos suportes, pois esse pH favorece à presença de grupos -NH₂, não iônicos, na superfície da enzima e, assim, favorável à imobilização.

Na Tabela 2.7 tem-se os parâmetros de imobilização da ILC utilizando gel de agarose-glioxil como suporte. Pode-se observar que na “carga” oferecida de proteína de 5,6 mg por grama de gel, em pH 10, foi onde se observou melhor rendimento de imobilização (44,7%) em termos de proteína fixada do suporte, mas tanto para a carga 1,4 como 2,8 mg de proteína por grama de gel, em pH 10, favoreceram maior recuperação de atividade. Por outro lado, a maior atividade (36 u.mL⁻¹) foi observada em pH 7, carga 3,0 mg de proteína por grama gel e atividade 180 U.mL.g gel⁻¹.

Tabela 2.7. Rendimento de imobilização da ILC (RI), atividade recuperada (AR) para diferentes cargas de proteínas oferecidas ao suporte de agarose-glioxil, com pH 7 e 10, de imobilização a 25oC e 50 rpm.

Gel ^a (g)	Carga ^b (mg/g gel ⁻¹)	pH	Recuperação (%)	RI (%)	Atividade (U.mL ⁻¹)	Atividade (U.mL ⁻¹ . gel ⁻¹)
0,00	14,8	7,0	100	0	316,9	---
2,50	5,9	7,0	2,30	29,6	7,40	74,4
5,00	3,0	7,0	11,4	37,1	36,0	180,2
10,00	1,5	7,0	3,50	30,6	11,0	27,5
0,00	14,1	10,0	100	0	35,9	---
2,50	5,6	10,0	30,3	44,7	10,9	108,7
5,00	2,8	10,0	46,4	37,5	16,7	83,3
10,0	1,4	10,0	47,4	30,9	17,0	42,5

^aGel= gel de agarose-glioxil; ^bCarga= carga oferecida de proteína (mg) por gel de agarose-glioxil (g).

Os maiores valores para rendimento e recuperação da atividade foram observados em pH 10 concordando com a teoria dos grupos -NH₂ explicado anteriormente e, também, devido a estabilidade neste pH ser maior (Figura 2.11). Santos (2010), também trabalhando com invertase obtida de levedura comercial Fleischmann, encontrou rendimento superior para bagaço de cana (59,83%) e inferior para sabugo de milho (21,40 %), sendo que ambos os resíduos agroindustriais foram submetidos a mesma técnica de imobilização resultando em suporte de resíduo-glioxil. O sistema de imobilização gel de agarose-glioxil como

suporte tem sido usado para outras enzimas. Komesu et al. (2009) comunicaram um RI de 60,5% e 66,8% de recuperação da atividade da xilanase comercial (EC 3.2.1.8), usando quitosana 2.5% ativada com epicloridrina.

Os resultados aqui apresentados foram todos obtidos fixando as condições reacionais de hidrólise da sacarose a 25°C, pH 5 e concentração final de sacarose no meio reacional de 40 mM, mas para cada condição de imobilização, apresentada na Tabela 2.7, conforme apresentado na Tabela 2.8, existe um comportamento cinético diferenciado entre enzima imobilizada e a concentração do substrato ofertado. Para adição de 5 gramas de gel de agarose-glioxil como suporte, a afinidade foi maior em pH 10 do que em pH 7 quando comparados os valores K_m (Tabela 2.8). Os valores $V_{m\acute{a}x}/K_m$, que é chamado de coeficiente de especificidade, foram de cerca de 65,2 e 35,4 $U.mg^{-1}.mM^{-1}$, respectivamente, indicando que a invertase imobilizada, em suporte de agarose-glioxil em pH 10, tem cerca do dobro de especificidade do que a imobilizada em pH 7. Também nessa carga de gel foi que observou uma cinética favorável quando comparado com as demais cargas.

Alguns autores citam que a imobilização aumenta significativamente o valor de K_m (AKGÖL et al., 2001; RIBEIRO e VITOLO, 2005; ANDJELKOVIĆ et al., 2015). Por exemplo, Emregul et al. (2006), trabalhando com imobilização de invertase em gel de poliacrilamida em pH 7,2, encontraram 86 mM e 166 mM para invertase livre e imobilizada, respectivamente. Eles alegaram que o aumento de cerca de 1,92 no valor de K_m pode ser devido ao limitado acesso das moléculas de sacarose ao sítio ativo da enzima imobilizada. Tal fato pode ser a sua distribuição ao longo da camada do polímero utilizado para imobilização e sua modificação conformacional. No presente trabalho, os resultados indicam que a técnica de imobilização usada não afeta o valor de K_m quando comparados os valores da tabela 2.8 com os valores para invertase livre da tabela 2.6, mas sim a carga ofertada, em miligramas de proteínas por grama gel, e, também, o pH de imobilização (Tabela 2.7).

Tabela 2.8. Constante de Michaelis (Km) e velocidade máxima (Vmáx) da invertase imobilizada de levedura comercial (ILC)

Parâmetros	Invertase imobilizada em agarose-glioxil					
	2,5 ^a	pH 7 5,0	10	2,5	pH 10 5,0	10
K _m ^a (mM)	98,6 ± 18,3**	5,95 ± 0,27**	39,6 ± 3,54**	27,7 ± 8,70 **	1,27 ± 0,31 **	18,1 ± 3,45 **
V _{max} ^a (U.mg ⁻¹)	180 ± 21,2**	211 ± 2,01**	168,3 ± 6,82**	55,4 ± 4,82 **	81,4 ± 1,00 **	114 ± 5,89 **
V _{max} /K _m	1,82	35,4	4,24	2,00	65,2	6,33
R ²	0,98	0,90	0,93	0,98	0,97	0,98
Inibição	>78 mM	>58 mM	> 78 mM	>98 mM	>117 mM	>98 mM

^a valor ± intervalo de confiança a p=0.05. **Significativo (p≤0,01). ^{ns} Não significativo.

4. CONCLUSÕES

(1) A função polinomial de segunda ordem explicou a extração da invertase livre obtida por autólise de *Saccharomyces cerevisiae* de purê de pêssego cv. Jubileu (ISc) com uma variação explicada em torno da média de 80%. O efeito interativo da concentração NaHCO_3 (X1) e velocidade de agitação (X2) no processo de extração indicou efeito linear e quadrático. O ponto estacionário é um ponto de máxima extração da ISc em 186 rpm e a 176 mM NaHCO_3 , diferindo do ponto central em menos 15%.

(2) Os extratos não purificados de invertase livre de ISc e de ICg têm ótima atividade na diluição 50% v/v e a levedura comercial (ILC) – testemunha – na diluição 10%.

(3) A invertase ISc tem ótima atividade em pH 5 a 50°C. O tratamento térmico reduziu significativamente a atividade enzimática da ISc a partir do ponto ótimo, sendo que a desnaturação térmica após 30 minutos a 50°C é semelhante para as enzimas.

(4) A recuperação da atividade da ISc foi superior da ILC para ambos agentes precipitantes, sendo que o álcool foi mais efetivo do que a acetona. Por outro lado, a estabilidade do extrato bruto é superior no armazenamento a -20°C do que 4°C para ambas as enzimas e o extrato purificado com acetona mostrou-se mais estável após 30 dias de armazenamento -20°C do que o extrato purificado com etanol.

(5) Na eletroforese, duas frações proteicas foram detectadas para ISc e quatro para testemunha, sendo 66 kDa a terceira banda (MR=0,5) equivalente ao valor em kDa do padrão BSA.

(6) As invertases livres de ISc e ILC mostraram comportamento Michaeliano e seus dados cinéticos também seguiram o modelo linear de Lineweaver-Burk, sendo que no caso da testemunha, a purificação aumenta 3-4 vezes a afinidade pela sacarose e cerca de 10 vezes a especificidade.

(7) Nas condições de imobilização (24 horas, 25°C e 50 rpm), a invertase livre ILC é mais estável em pH=10. Também nesse pH é maior a recuperação da atividade após sua imobilização e o rendimento em termos de proteína fixada no suporte agarose-glioxil. As maiores atividades específicas e especificidades foram observadas para as cargas ofertadas de 2,8 e 3,0 miligramas de proteína por grama de gel, respectivamente, no pH 10 e 7.

(8) A técnica de imobilização não aumenta o valor de K_m como citado por alguns autores, mas, sim, a carga ofertada de proteína por grama de gel e o pH de imobilização.

(9) A levedura *Candida guilliermondii* é produtora de invertase e poderia encontrar aplicações em biotecnologia de alimentos, uma vez sejam estudadas suas melhores condições de temperatura, pH, extração, purificação e caracterização.

Finalmente, pode-se afirmar que o NaHCO_3 é um agente de autólise efetivo e sua utilização é uma boa alternativa na extração da invertase, principalmente se for combinado com a velocidade adequada de agitação no shaker (no binômio 200 rpm e 200 mM de NaHCO_3). A liofilização da biomassa antes da autólise dobra a atividade da ISc nas mesmas condições. De modo geral, a imobilização em agarose-glioxil pH 10 melhorou as características cinéticas da testemunha e deve ser testada para ISc e ICg.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKGÖL, S. KAÇAR, Y. DENIZLI, A. ARICA, M. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. **Food Chemistry**, Davis, v. 74, n. 3, p. 281-288, 2001.
- AMAYA-DELGADO, L., HIDALGO-LARA, M. E., e MONTES-HORCASITAS, M. C. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. **Food Chemistry**, Davis, v. 99, p. 299–304, 2006.
- ANDJELKOVIĆ, U.; PICURIĆ, S.; VUJČIĆ, Z. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. **Food Chemistry**, Davis, v. 120, n. 1, p.799-804, 2010.
- ANDJELKOVIĆ, U.; MILUTINOVIĆ-NIKOLIĆ, A.; JOVIĆ-JOVIČIĆ, N.; BANKOVIĆ, P.; BAJT, T.; MOJOVIĆ, Z.; VUJČIĆ, Z.; JOVANOVIĆ, D. Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilization on modified beidellite nanoclays. **Food Chemistry**, Davis, v. 168, n. 1, p.262-269, 2015.
- BELCARZ, A.; GINALSKA, G.; LOBARZEWSKI, J. e PENEL, C. The novel nonglycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1594, n. 1, p. 40–53, 2002.
- BARBOSA, E. F. Avaliação da atividade de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em polianilina sobre o caldo de cana. 2009. 62f. Dissertação (Mestrado em Biologia) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 303 p.
- BOFO, D.C.S.; CASTRO, H.F; MEDEIROS, M.B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana de açúcar. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, V SIPAL, p. 121-124, 2005.

CANTARELLA, L.; ALFANI, F.; CANTARELLA, M. **β -D-Fructofuranoside Fructohydrolase**. In J. R. Whitaker, A.G. J. Voragen, D. W. S. Wong (Eds.), Handbook of Food Enzymology. New York: Marcel Dekker, (2003). pp. 787-804.

CARAVANTE, A. L. C. **Produção de açúcar invertido utilizando biorreator com invertase imobilizada em sabugo de milho**. 2013. 46f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2013.

DEUNER, S.; FERREIRA, L. S.; BACARIN, M. A.; BERVALD, C. M. P.; ZANATTA, E. R. Caracterização parcial da invertase ácida solúvel em tubérculos de batata: Energia de ativação e efeito de inibidores. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 1, p. 45-50, 2005.

EMREGUL, E.; SUNGUR, S.; AKBULUT, U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. **Food Chemistry**, Davis, v. 97. n.4, p.591-597, 2006.

GACULA Jr., M. C.; SINGH, J. **Statistical methods in food and consumer research**. 2a ed. Orlando: Academic Press, Inc., 2008. 808 p.

GARZA, S.; TEIXIDO, J. A.; SANCHIS, V.; VIÑAS, I.; CONDON, S. Heat resistance of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from spoiled peach puree. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Maryland Heights, v. 23, n. 2, p. 209–213, 1994.

GOULART, A. J.; SANTOS, A. F.; TAVANO, O. L.; VINUEZA, J. C; CONTIERO, J.; MONTI, R. Glucose and Fructose Production by *Saccharomyces cerevisiae* Invertase Immobilized on MANAE-Agarose Support. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 2, p. 169–175, 2013.

GUILLOUX-BENATIER, M., GUERREAU, J. AND FEUILLAT, M. Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and the metabolism of wine microorganisms. **American Journal Enology Viticulture**, Davis, v. 46, n. 4, p. 486-492, 1995.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Production and characterization of thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, Maryland Heights, v. 42, n. 1, p. 52–57, 2007.

GUISÁN, J.M. **Immobilization of enzymes as the 21st century begins**: an already solved problem or still an exciting challenge. In: GUISÁN, J.M. (Ed.). Immobilization of Enzymes and Cells. Totowa: Humana Press, 2006. Cap.1, p. 1-13.

KOMESU, A.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P.W.; GIORDANO, R.C. **Imobilização da enzima xilanase em agarose e quitosan utilizando diferentes protocolos de ativação**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA DA UFU, 8., Uberlândia, Minas Gerais-BR. 2009.

KOTWAL, S.M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. **Biotechnology Advances**, New York, v.27, n. 4, p.311-322, 2009.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constant. **Journal of the American Chemical Society**; v. 56, p. 658, 1934. <http://dx.doi.org/10.1021/ja01318a036>

LOPES, A. M.; TORALLES, R. P.; ROMBALDI, C. V. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in Jubileu clingstone peach and yeast isolated from its spoiled puree. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 1, p.150-156, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, Rockville, v.193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, Davis v. 35, n. 10 p. 1211-1225, 2000.

MORIGUCHI, T.; SANADA, T.; YAMAKI, S. Properties of acid invertase purified from peach fruits. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 1, p 95-97, 1991.

MUKHERJEE, S; BASAK, S.; KHOWALA, S. Regulation (Alteration) of activity and conformation of sucrase by coaggregation with cellobiase in culture médium of *Termitomyces clypeatus*. **Biotechnology Progress**, Malden, v.18, n. 2, p. 404-4081,2002.

NOVAKI, L.; hasan, s.d.m.; kadowaki, m.k.; andrade, d. Produção de invertase por fermentação em estado solido a partir de farelo de soja. **ENGEVISTA**, Rio Janeiro, v.12, n.2, p. 131-140, 2010.

OLIVEIRA, D.P.; OLIVEIRA, L.E.M.; FILHO, N.D. Optimization of invertase assay conditions rubber tree plants (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 687–692, 2006.

PALMA, M.B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. Tese (Doutorado em Engenharia Química),- Centro Tecnológico, Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

RIBEIRO, R.R.; VITOLO, M. Anion Exchange resin as support for invertase immobilization. **Revistas Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.26, n. 3, p.175-179, 2005.

ROMERO-GÓMEZ, S.J.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v.22, n. 15, p.1255-1258, 2000.

SANTOS, A. F. **Imobilização de invertase comercial de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana de açúcar**. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2010.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, n.1, p.37-39, 1969.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Brasília: EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995. p. 159.

TENKANEN, M., NIKU-PAAVOLA, M-L, LINDER, M., VIIKARI, L. **Cellulases in Food Processing**. In J. R. Whitaker, A.G. J. Voragen, D. W. S. Wong (Eds.), *Handbook of Food Enzymology*. New York: Marcel Dekker, 2003. P. 775-772.

TORALLES, R.P.; KUHN, C.R.; SILVA, P.; RUIZ, W.A. Extração e Caracterização Parcial de Invertase de Levedura de Purê e Resíduo de Pêssego. **Revista Brasileira de tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v.8, n. 2, p.1399–1415, 2014.

VEANA F. Invertasa del Genero *Aspergillus* y su impacto biotecnológico, *Biotecnología*, Cuernavaca, v.15, n. 1, p.11-29, 2011.

VITOLO, M. **Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*)**. 1979. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

VITOLO, M. Invertase. SAID, S., PIETRO R.C.L.R. (Eds.). **Enzymes as biotechnological agents**. Ribeirão Preto: Leggis Summa, 2004. 207-221 p.

ZHANG, L.; ZHAO, C.; ZHU, D.; OHTA,Y.; and WANGA, Y., Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, New York, v. 35, n. 2, p. 272–275, 2004.

APÊNDICE - A

A1. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL PARA ABORDAGEM DO PROBLEMA

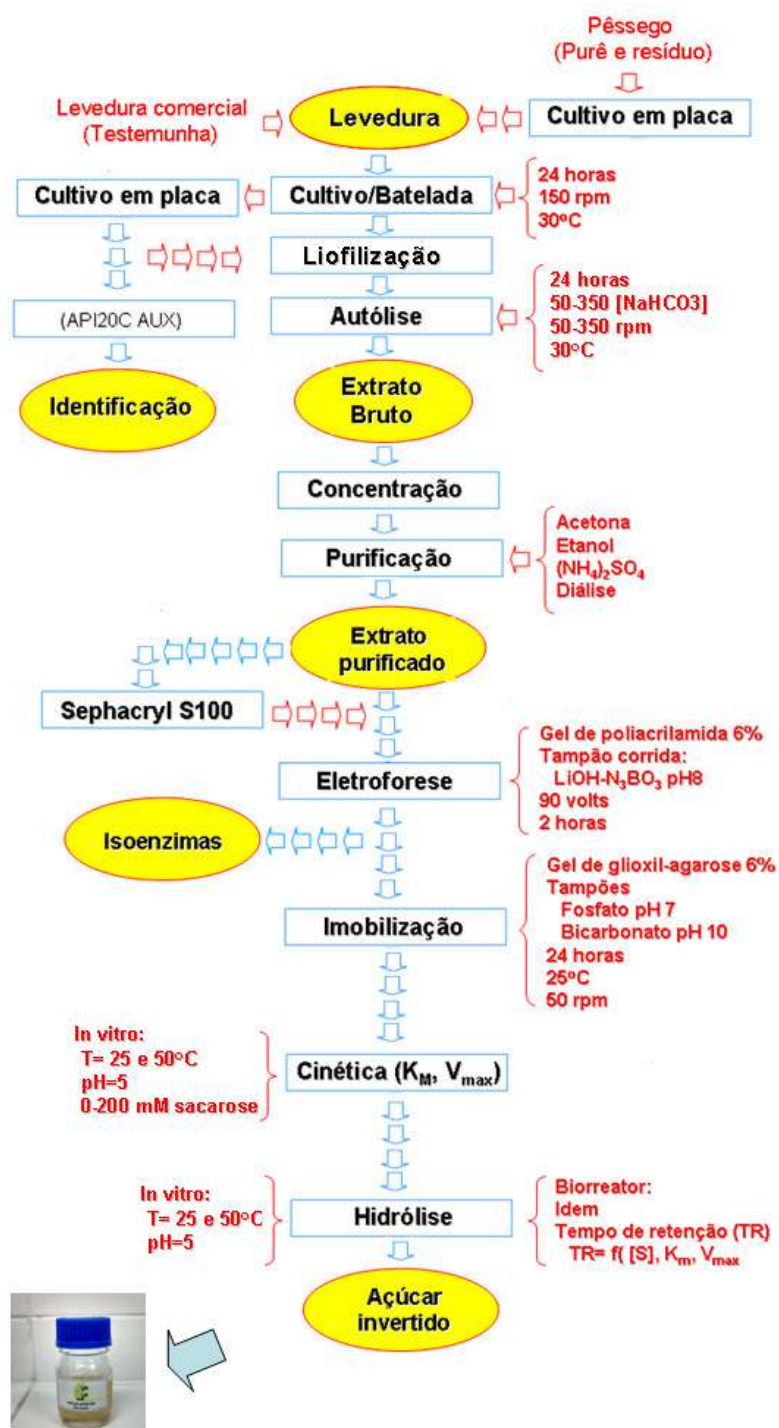


Figura A1. Fluxograma experimental para abordagem do problema.

A2. CURVA PADRÃO DA DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES

Os açúcares redutores foram determinados, usando glicose como padrão, a partir da Figura A1 — curva padrão da glicose usando DNS A 490 nm. A constante de proporcionalidade (A) entre a absorbância e a concentração de glicose e coeficiente linear da reta (B) foram calculadas por regressão linear, sendo que os pontos de símbolo aberto não foram usados na regressão (Figura A1). O valor de A foi significativo ($p \leq 0,01$) e com intervalo de confiança de $1,69 \pm 0,3$. O valor de B não foi significativo. Os Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) iguais a $32,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e $108,4 \text{ mg.L}^{-1}$. Gabriel (2009), usando o mesmo método do DNS, obteve uma curva semelhante com um coeficiente de inclinação “A” igual a 1,72274.

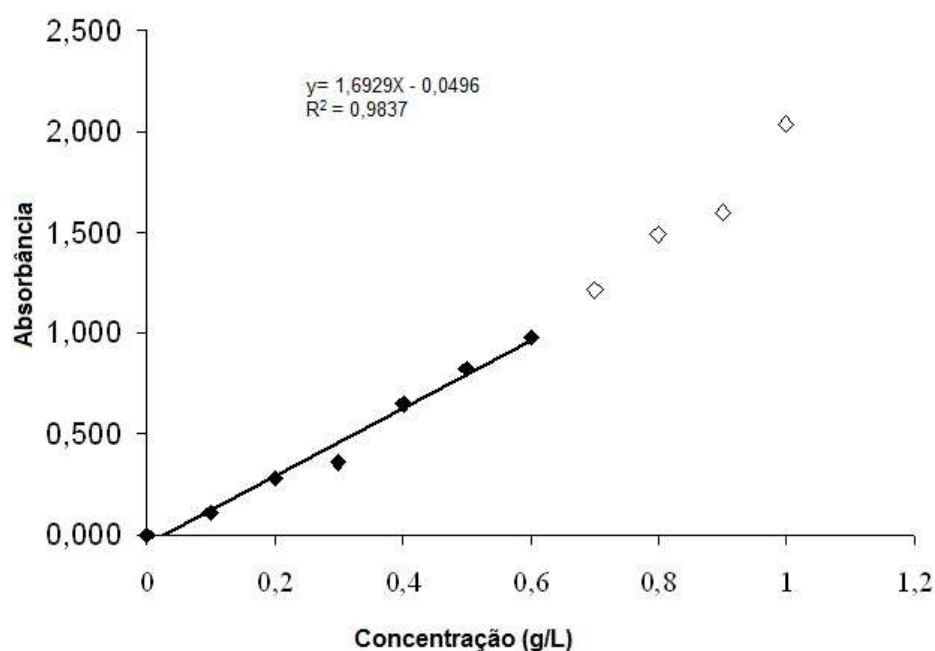


Figura A2. Curva padrão para açúcares redutores.

A3. CURVA PADRÃO DA DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Na figura A2 tem-se a curva de calibração para quantificação de proteínas pelo método Lowry usando Albumina de Soro Bovino (BSA) como padrão. A medida de absorbância foi realizada a 750 nm.

A constante de proporcionalidade (A) entre a absorbância e a concentração de BSA e coeficiente linear da reta (B) foram calculadas por regressão linear. O valor de A foi significativo ($p \leq 0,01$) e com intervalo de confiança de 0,0016. Os Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) iguais a $72,6 \text{ mg.L}^{-1}$ e $242,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

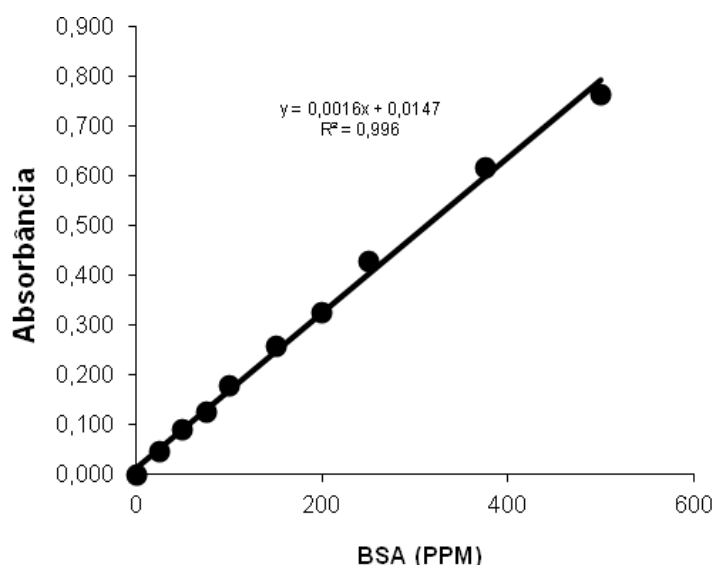


Figura A3. Curva padrão para proteínas método Lowry.

APÊNDICE- B

Tabela B1. Análise de variância da curva padrão glicose em DNS e de dosagem de proteína por Lowry.

Fonte de variação	Modelo de Lambert-Beer					
	Soma quadrática (SQ)		Graus de liberdade (GL)		Média quadrática (MQ)	
	Glicose	Proteína	Glicose	Proteína	Glicose	Proteína
Enzima						
Regressão	0,802412	0,57068	1	1	0,802414	0,57068
Resíduo	0,013277	0,0023	5	8	0,002655	0,00029
Total	0,815691	0,5728	6	9		
$F_{\text{cal}}(1,5 \text{ e } 1,8)$	302,1788	1984,46				
R^2	0,98	0,99				

$F_{\text{tab}}(1,8)=11,26$ no nível de confiança de 99%.

Tabela B2 Análise de variância para o ajuste de um modelo de segunda ordem aos dados experimentais.

Origem da variação	Modelo: $Y = b_o + \sum b_i X_i + \sum b_{i,i} X_i^2 + \sum b_{i,j} X_i \cdot X_j$			
	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	F_{cal}
Modelo	46022,69	5	9204,54	22,9
Linear	10543,61	2		
Quadrática	30012,11	2		
Interações	5466,97	1		
Resíduo	10864,59	27	402,39	
Erro puro	385,98	24		
Total	51346,33	33		

$F(5;27)=2,57$; $F(3;24)= 3,01$

Tabela B3. Análise de variância do modelo de Michaelis-Menten para ISC e ILC.

Fonte de variação	Modelo: $V_o = (V_{max} \times A_o) / (K_m + A_o)$					
	Soma quadrática (SQ)		Graus de liberdade (GL)		Média quadrática (MQ)	
Substrato	ISc	ILC	ISc	ILC	ISc	ILC
Regressão	10047,286098	61733,653836	1	1	10047,286098	61733,653836
Resíduo	654,037479	354,077864	8	6	81,754685	59,012977
Total	10701,323578	62087,7317	9	7		
F _{cal}	122,895539	1046,1030				
R ²	0,939	0,994				

F_{tab}(1,8)=11,26 e F_{tab}(1,6)=13,75 no nível de confiança de 99%.