

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMO AMAZÔNICO PRODUTOR DE
INVERTASE.**

Bolsista: **Flávia de Carvalho Paiva**, CNPq

MANAUS

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

RELATÓRIO PARCIAL

PIB-B/0010/2009

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMO AMAZÔNICO PRODUTOR DE
INVERTASE.**

Bolsista: Flávia de Carvalho Paiva, CNPq

Orientadora: Leonor Alves de Oliveira da Silva

MANAUS

2010

RESUMO

A Invertase é uma enzima de grande importância para a indústria, que catalisa a hidrólise da sacarose produzindo uma mistura de glicose e frutose. A região Amazônica apresenta uma ampla diversidade microbiana para contribuir com o setor industrial através de estudos enzimáticos de microrganismos, mostrando-se como um vasto campo de estudos. Neste contexto este trabalho teve como objetivo selecionar um microrganismo amazônico produtor de invertase, além de determinar as condições ótimas de cultivo para a produção da enzima pelo microrganismo selecionado. Foram utilizados microrganismos, entre leveduras e fungos filamentosos, isolados de diversos ambientes da região amazônica, os quais foram purificados e preservados em água destilada, glicerol 15% e óleo mineral. Os microrganismos obtidos, ainda não identificados, foram selecionados quanto a produção de invertase, através da determinação da atividade invertásica pelo método de Miller (1959). O modo de cultivo (estacionário ou em agitação), o tempo de cultivo (em dias), a fonte de carbono (farelo de trigo, sabugo de milho, bagaço de cana e melação de cana), o pH ótimo e a temperatura ótima de produção foram avaliados tendo em vista que esses parâmetros apresentam influência sobre a produção de enzimas. Foram obtidos 12 microrganismos, destes cinco demonstraram atividade invertásica, onde o fungo F7 foi selecionado por apresentar a atividade mais alta. E as condições ótimas de cultivo para a produção de invertase pelo fungo selecionado foram determinadas como: melação de cana como melhor substrato indutor de invertase, condições estacionárias, melhor tempo de cultivo em nove dias de produção, pH ótimo igual a 5,0 e 30 °C a temperatura ótima. Gerando um resultado 100% melhor do que a produção de invertase sem as condições ótimas de cultivo, onde a atividade invertásica passou de 4,44 U/mL para 8,75 U/mL.

PALAVRA-CHAVE: Invertase, sacarose, açúcar invertido, microrganismos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REFERENCIAL TEÓRICO	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Obtenção dos microrganismos	12
3.2. Purificação e conservação dos microrganismos	12
3.2.1. Cultura monospórica	12
3.2.2. Conservação das linhagens	14
3.3. Seleção do microrganismo produtor de invertase	15
3.4. Determinação de invertase	16
3.5. Determinação da concentração de proteínas	17
3.6. Determinação do melhor modo e tempo de cultivo e da melhor fonte de carbono para a produção de invertase	18
3.7. Determinação do pH ótimo e temperatura ótima de produção	18
4. RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO	19
4.1. Obtenção dos microrganismos	19
4.2. Purificação e conservação dos microrganismos	19
4.3. Seleção de microrganismo produtor de invertase	21
4.4. Determinação das condições ótimas de cultivo para produção de invertase	24
4.4.1. Determinação da Fonte de carbono ideal e melhor modo e tempo de cultivo	24
4.4.2. Determinação do pH ótimo e Temperatura ótima de produção	28
4.4.3. Produção de invertase nas condições ótimas de cultivo	29
5. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

Tudo vale a pena se a alma não é pequena.

Fernando Pessoa

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos bastante específicos, normalmente de natureza protéica, apresentando variados usos e quando comparados aos catalisadores químicos, apresentam benefícios como alta especificidade, condições suaves de reação e redução de problemas ambientais e toxicológicos (COELHO *et al.*, 2008). Atualmente, estão inseridas no mercado mundial, sendo aplicadas em diversos setores, como por exemplo, na indústria de química fina, farmacêutica, de detergentes, de bebidas e alimentos, metodologia analítica, têxtil e de papel e celulose.

As hidrolases são as enzimas mais utilizadas em processos industriais, catalisam a quebra de grandes biopolímeros em pequenas unidades (KIRK IN OLIVEIRA *et al.*, 2006). A Invertase é uma hidrolase de grande importância para a indústria, que catalisa a hidrólise da sacarose produzindo glicose e frutose. A principal fonte comercial da invertase é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, mas esta enzima também é produzida por outros microrganismos, a produção de invertase por fermentações microbianas oferece muitas vantagens

A região Amazônica apresenta uma ampla diversidade microbiana para contribuir com o setor industrial através de estudos enzimáticos de microrganismos, mostrando-se como um vasto campo de estudos. Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo geral selecionar um microrganismo amazônico produtor de invertase. E como objetivos específicos avaliar quantitativamente o potencial da invertase excretada pelos microrganismos isolados da Região Amazônica. E determinar as condições ótimas de cultivo para a produção de invertase pelo microrganismo previamente selecionado, determinando melhor modo e tempo de cultivo (estacionário ou em agitação e dias de produção), fonte de carbono, pH e temperatura ótimos de produção.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A Invertase ou β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) é uma hidrolase que hidrolisa a sacarose produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose denominada açúcar invertido. Esta enzima hidrolisa a sacarose em frutofuranosídeos através da catalise do terminal não redutor do resíduo β -D-frutofuranosídeo, e ainda, catalisa reações de transferência com outros aceptores, além da água, resultando na formação de glicose e frutose, assim como demonstra a Figura 1 (VICENTE *IN* MARQUEZ, 2007).

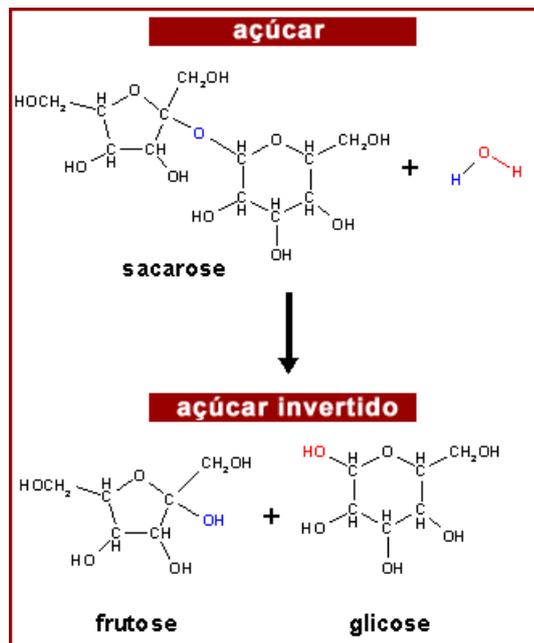


Figura 1: Reação enzimática da invertase. Fonte:

Entre as diversas aplicações da invertase, destaca-se principalmente a indústria de alimentos, com a fabricação de xarope de glicose e frutose (açúcar invertido) por meio de substratos ricos em sacarose como açúcar de beterraba, açúcar de cana-de-açúcar ou melaço. São muito utilizadas nos processamentos de bebidas carbonatadas, sucos concentrados, xaropes medicinais, doces e molhos, onde o açúcar invertido é mais eficiente pela sua

estabilidade em altas concentrações, em função da sua alta solubilidade, permitindo maior vida de prateleira dos produtos (MARQUEZ, 2007).

A sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) é um dissacarídeo composto de uma molécula de α -D-glicose e uma molécula de β -D-frutose ligadas por uma ligação β -1,2 (Figura 2). É um açúcar encontrado com frequência na natureza e bastante presente na dieta humana (Almeida et al., 2005).

O açúcar invertido é um xarope composto de glicose e frutose resultante de uma reação de hidrólise da sacarose, a qual é chamada de reação de inversão, pois o xarope de açúcar invertido desvia um feixe de luz polarizada para a esquerda, enquanto as soluções de sacarose desviam esse feixe para a direita (Cabral, 1989 *IN* Marquez, 2007). De acordo com Marquez (2007), tem aplicação em vários processos industriais, pois quando comparado a solução de sacarose apresenta diversos benefícios, como por exemplo:

- Retém umidade mesmo em ambientes muito secos;
- Apresenta maior solubilidade, inibindo a cristalização, aumentando a sua vida de prateleira e reduzindo custos;
- Reduz o ponto de congelamento;
- Evita o ressecamento em produtos com baixo teor de gordura;
- Possui viscosidade baixa, conferindo plasticidade a sorvetes, cremes e fondants;
- Oferece maior doçura relativa do que a sacarose;
- É mais facilmente incorporado em preparos industriais.

Existem várias fontes de invertase, tais como, leveduras, fungos, bactérias, insetos, mamíferos e vegetais, mas a principal fonte de produção industrial são os microrganismos, principalmente as leveduras, nessas últimas a enzima se apresenta em duas formas, 80% são

externas, localizadas entre a membrana plasmática e a parede celular, e 20% são intracelulares, desprovidas de carboidratos e localizadas no protoplasma. (CABRAL, 1982; ISIK *et. al.*, 2003; VICENTE IN MARQUEZ, 2007).

A produção de enzimas por fungos, bactérias e leveduras oferecem muitas vantagens, como: crescimento rápido em espaço limitado; sua produção independe de variações sazonais; utilização de substratos baratos, como resíduos agrícolas e agroindustriais; diversidade bioquímica; possibilidade de se aumentar o rendimento pela otimização das condições de cultivo e através da manipulação genética das linhagens. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal fonte comercial para produção de invertase, (GODFREY & WEST, 1996; RAO *et al.*, 1998; SCHIMID *et al.*, 2001; KIRK *et al.*, 2002).

Além disso, as enzimas microbianas apresentam benefícios como menor custo de produção, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais e oferece um largo espectro de características físico-químicas (MANFIO IN OLIVEIRA *et al.* 2006). Deste modo, a triagem e identificação de microrganismos amazônicos produtores de enzimas de importância industrial, como a invertase, e a seleção das condições ótimas de produção e caracterização bioquímica dessas enzimas, constitui linhas de pesquisas importantes, que podem ser úteis aos mais variados processos industriais.

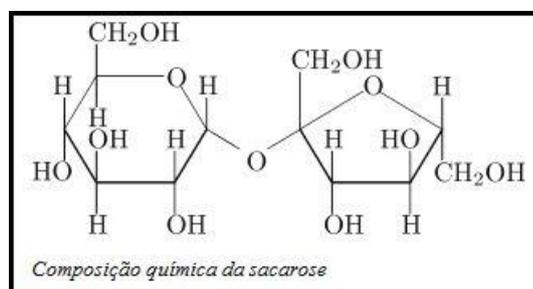


Figura 2: Composição química da Sacarose.
Fonte: Portal do Professor

No estudo das atividades metabólicas de microrganismos e da produção de produtos microbianos, além do isolamento e das condições adequadas de cultivo, a purificação, a conservação e a identificação das linhagens (taxonomia) são importantes etapas a serem consideradas. A purificação dos isolados tem como função obter isolados puros, livres de qualquer contaminação e capazes de manter suas características metabólicas naturais, garantindo a sobrevivência, a estabilidade e a pureza dos microrganismos, evitando a mutação dos mesmos e, conseqüentemente, a modificação das suas características naturais.

Os métodos utilizados na preservação e conservação de microrganismos são muitos, os quais vão desde os métodos a curto prazo (repique contínuo) até os métodos de médio prazo (água destilada e óleo mineral) e a longo prazo (liofilização). No entanto, o método de preservação deve ser eficiente para o tipo de microrganismo que se trabalha. Por isso, a escolha da metodologia mais adequada deve se basear na natureza do microrganismo (características morfológicas, de crescimento e patogênicas) e nas vantagens e desvantagens de cada método (DHINGRA & SINCLAIR *IN* MELO, 2009).

É importante que o método de conservação utilizado mantenha a viabilidade e as propriedades originais do microrganismo, evitando a perda de células e das características de interesse no processo de preservação e durante o armazenamento; mantenha a pureza, evitando chances de contaminação; e evite grandes custos. Além disso, é interessante avaliar o tamanho do acervo levando em consideração o espaço disponível e a manutenção necessária.

Os métodos de preservação em óleo mineral e em água destilada atuam diminuindo a atividade metabólica. Onde, as culturas submersas em óleo mineral têm o seu consumo de oxigênio reduzido de 10% em cerca de poucas horas e a conservação em água destilada visa atingir a hipobiose com a diminuição do metabolismo e formação de estado latente da célula devido à falta de fontes nutritivas. Algumas vantagens e desvantagens de ambos os métodos estão descritas na Tabela 1.

O método de conservação em glicerol a 15% foi proposto por Howard (1956) e nada mais é do que uma suspensão de células reprodutivas, mantidas congelada, onde o glicerol atua como um crioprotetor. Este método garante uma melhor reativação do microrganismo conservado por manter alta viabilidade, além da facilidade e praticidade no manuseio (MELO, 2009).

Tabela 1: Vantagens e desvantagens da preservação de microrganismos em água destilada e em óleo mineral.

Método	Vantagens	Desvantagens
Cultura submersa em óleo mineral	<ul style="list-style-type: none"> - Baixo custo de equipamento; - Evita contaminação por ácaros. 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessidade de mais transferências até que a cultura revigore; - Requer espaço para armazenamento.
Água destilada	<ul style="list-style-type: none"> - Boa taxa de viabilidade; - Evita contaminação por ácaros. 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitado a organismos que aderem ao ágar (Castellani); - Dificuldade da retirada dos cubos na reativação (Castellani); - Crescimento durante a estocagem; - Requer espaço para armazenamento; - Riscos de contaminação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos microrganismos

Foram utilizados microrganismos, entre leveduras e fungos filamentosos, da biblioteca microbiana do Laboratório de Microbiologia e Fermentação do CAM (Centro de Apoio Multidisciplinar) da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, onde está sendo desenvolvido este trabalho, tais microrganismos foram isolados de diversos ambientes da região amazônica em trabalhos anteriormente desenvolvidos por grupos de pesquisa do laboratório. Em primeiro instante, as leveduras foram mantidas em meio sólido YPD (Yeast Peptone Dextrose) e os fungos filamentosos em meio BDA (Batata Dextrose Agar) para posteriormente serem purificados e preservados.

3.2. Purificação e conservação dos microrganismos

Após a reativação dos microrganismos em meios sólidos, como descrito no item 3.1., realizou-se a purificação e conservação dos microrganismos.

3.2.1. Cultura monospórica

A cultura monospórica foi realizada com o objetivo de se obter uma nova colônia do microrganismo a partir de uma única célula ou conídio, por meio de uma diluição sucessiva seguida de plaqueamento de acordo com Azevedo & Costa (1973), como descrito a seguir:

- uma alçada de células reprodutivas do microrganismo foi transferida para um tubo de ensaio contendo 2,0 mL de Tween 80 a 0,02% (solução de esporos);

- Em seguida foi transferido 1,0 mL dessa solução de esporos para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de água destilada estéril (solução mãe);
- Da solução mãe seguiu-se a diluição sucessiva, onde foi transferido 1,0 ml para outro tubo com 9,0 mL de água, obtendo-se a primeira diluição (diluição 10^{-1}), depois transfere 1,0 mL da 1ª diluição para outro tubo contendo 9,0 mL de água (diluição 10^{-2}) e assim sucessivamente até a diluição 10^{-5} . Após as diluições, 50 μ L das diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} foram plaqueados em triplicata em meio sólido apropriado para o microrganismo, 48 horas depois foi selecionado a colônia oriunda de uma única célula ou conídio, em duplicata inoculou-se a colônia pura do microrganismo em meio sólido, as quais foram incubadas a temperatura ambiente até o crescimento para seguir com a preservação, como descrito a Figura 3.

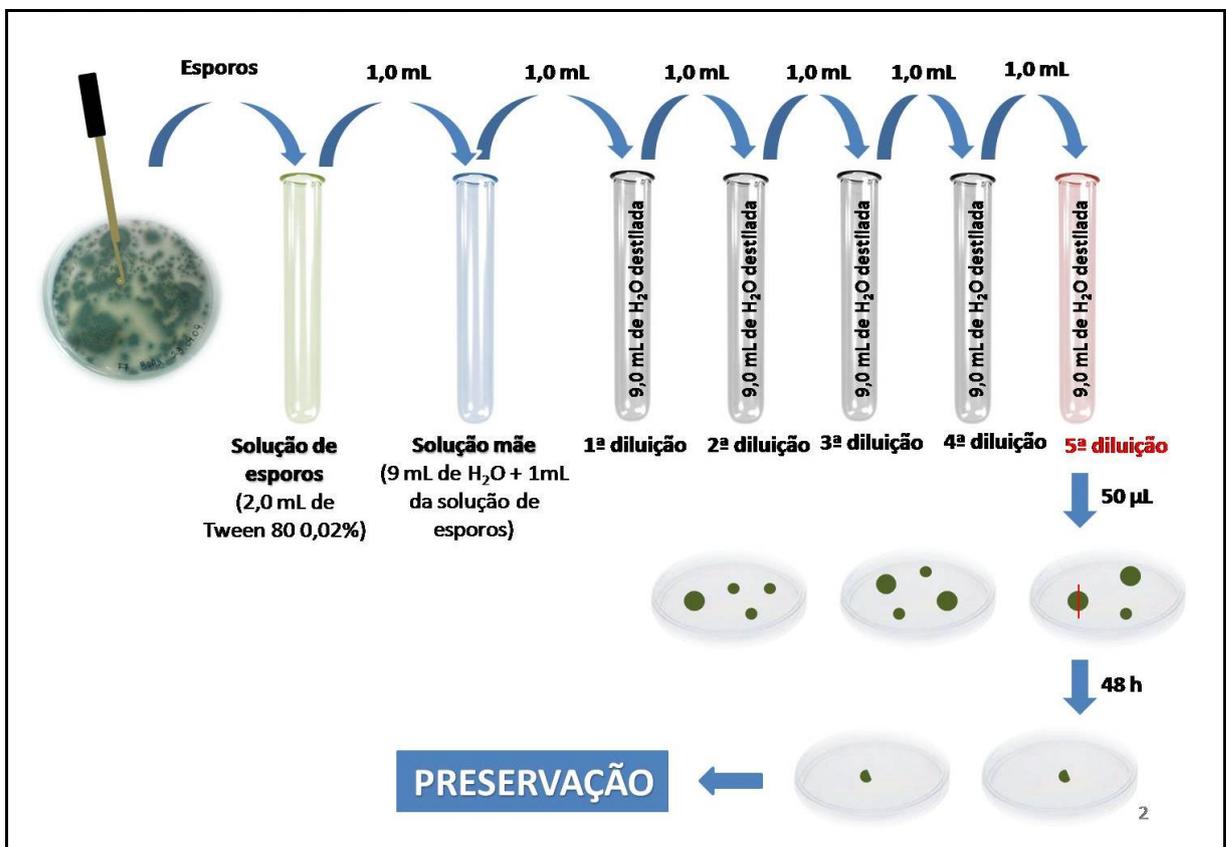


Figura 3: Esquema da técnica cultura monospórica.

3.2.2. Conservação das linhagens

A conservação ou preservação dos microrganismos foi realizada por três métodos diferentes: em água destilada (Castellani, 1939); em glicerol 15%; e em óleo mineral. A conservação em água destilada foi realizada através do armazenamento de blocos de meio de cultura sólido contendo colônias do microrganismo em recipientes de vidro de 5,0 mL estéreis contendo 3,0 mL de água destilada autoclavada e mantidos a temperatura ambiente.

Em glicerol 15% a preservação se deu através da suspensão de células reprodutivas do microrganismo em microtubos estéreis de 2,0 mL contendo 1,5 mL de glicerol 15% e mantidos congelados. A conservação em óleo mineral foi realizada somente para os fungos, onde estes foram inoculados em tubos de ensaio de 5,0 mL contendo meio de cultura sólido inclinado (BDA) e após o crescimento do fungo foi adicionado óleo mineral estéril até cobrir toda a colônia crescida e mantidos a temperatura ambiente em local seco e limpo.

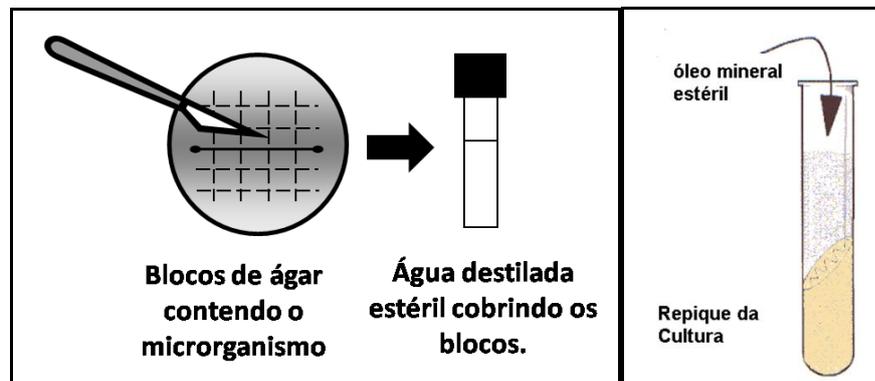


Figura 4: Conservação em água destilada e em óleo mineral.

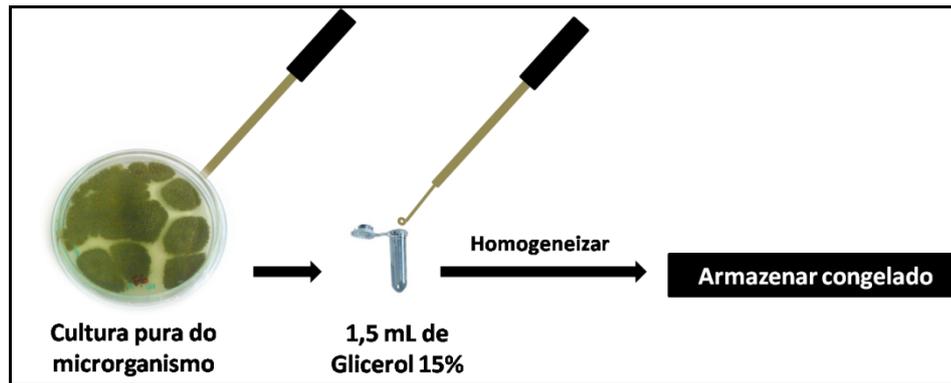


Figura 5: Conservação em glicerol a 15%.

3.3. Seleção de microrganismo produtor de invertase

Os microrganismos obtidos, ainda não identificados, passaram por uma seleção quantitativa para determinação das suas capacidades em produzir invertase. Foi obtido o extrato enzimático bruto, para isso uma solução de células contendo 1×10^7 células/mL dos microrganismos foram inoculadas nos seguintes meios líquidos para crescimento e produção de invertase:

- Para fungos filamentosos: meio sintético Czapeck contendo 3 g/L de nitrato de sódio (NaNO_3), 1,0 g/L de fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4), 0,5 g/L de sulfato de magnésio (MgSO_4), 0,5 g/L de cloreto de potássio (KCl), 0,01 g/L de sulfato ferroso hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 30 g/L do substrato sacarose como fonte de carbono e 1000 mL de água destilada;
- Para leveduras: meio líquido YPD, contendo 20 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de leveduras, 20 g/L de sacarose e 1000 mL de água destilada.

Após o inóculo dos microrganismos, os meios líquidos foram mantidos por sete dias em condições estacionárias a temperatura ambiente, posteriormente a esse período, os meios fermentativos foram submetidos a uma homogeneização em banho de ultra-som por aproximadamente um minuto e depois a biomassa foi separada do extrato enzimático por filtração a vácuo. Obtendo-se assim, o extrato enzimático bruto, o qual foi utilizado na determinação da atividade enzimática de invertase e na determinação da concentração de proteínas totais.

3.4. Determinação de invertase

A determinação da atividade enzimática de invertase foi realizada em triplicata através da determinação de açúcares redutores pelo método do Ácido dinitrosalicílico (DNS) proposto por Miller (1959), o qual apresenta as seguintes etapas:

- 1) Incubação das amostras: em tubos de ensaio foi adicionado 500 μ L de solução de sacarose 0,1 M e 400 μ L de tampão acetato 50 mM pH 5,0, em triplicata, homogeneizado e mantido por 5 minutos a 30°C, para aclimatação. Depois, foi adicionado 100 μ L do extrato enzimático bruto, homogeneizado e incubado a 30 °C por 30 minutos. Para paralisar a reação, foi adicionado 1,0 mL do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) e homogeneizado.
- 2) Branco das amostras: para se evitar uma super estimativa da atividade da enzima foi necessário fazer um branco para cada amostra. Em tubo de ensaio contendo 500 μ L de solução de sacarose 0,1 M e 400 μ L de tampão acetato 50 mM pH 5,0, foi adicionado 1,0 mL de DNS e homogeneizado. Em seguida, foi adicionado 100 μ L da amostra enzimática e homogeneizado.

- 3) Determinação dos grupos redutores: após a adição do DNS, os tubos foram aquecidos em banho-maria com água fervente durante 5 minutos, em seguida foram colocados em recipiente com água à temperatura ambiente. Foi adicionado 8,0 mL de água destilada, homogeneizado e efetuou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.
- 4) Cálculo da atividade de invertase: uma unidade (U) de atividade de invertase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de grupos redutores, medidos como glicose, por minuto, nas condições de reação utilizadas.

$$\text{Invertase U} = \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times \text{Fator} \times \text{Diluição}}{540}$$

Onde: $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ = Absorbância da amostra;

$\text{Abs}_{\text{branco}}$ = Absorbância do branco correspondente;

Fator = Fator de concentração da curva-padrão de glicose (mg/L);

Diluição = Diluição do extrato enzimático;

540 = Fator de conversão para atividade ($\text{u.m.a.}^{-1} \times \text{min}^{-1}$).

3.5. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada, em triplicata, pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina como padrão, através da incubação de 700 μL de água destilada, 100 μL do extrato enzimático e 200 μL do reagente de Bradford por cinco minutos a temperatura ambiente e realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Para se evitar uma super estimativa na determinação da

concentração de proteínas foi feito um branco para cada amostra, seguindo o mesmo procedimento descrito acima, mas adicionando 100 µL do tampão acetato 50 mM pH 5,0 no lugar do extrato enzimático.

3.6. Determinação do melhor modo e tempo de cultivo (cinética enzimática) e da melhor fonte de carbono para a produção de invertase

O modo de cultivo (estacionário ou em agitação), tempo de cultivo ideal (em dias) e a fonte de carbono foram avaliados. Tendo em vista que esses parâmetros apresentam influência sobre a produção de enzimas, sendo a escolha do substrato indutor apropriado e do melhor modo e tempo de cultivo importantes fatores para a eficiência da produção de enzimas. Deste modo, o microrganismo foi cultivado em diferentes modos de cultivo (estacionário ou em agitação) e fontes de carbono, onde serão utilizados como substratos os seguintes resíduos agroindustriais: bagaço de cana, melaço de cana, farelo de trigo e sabugo de milho. A fim de se determinar qual o modo de cultivo mais apropriado e quais fontes de carbono induzem a maior produção de invertase. Para isso, foi retirado 1,0 mL do extrato enzimático bruto a cada 24 horas durante nove dias de cultivo para determinação da atividade enzimática de invertase e de proteínas por ensaios quantitativos, os quais foram realizados em triplicata.

3.7. Determinação do pH ótimo e temperatura ótima de produção do complexo enzimático

Os efeitos desses parâmetros foram avaliados em meio de cultura contendo a melhor fonte de carbono indutora de invertase selecionada anteriormente. A influência do pH de cultivo foi verificada no meio líquido, utilizando diferentes sistemas tamponantes (3,0; 3,5;

4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0). Da mesma forma estudou-se o efeito de diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 30 °C, 40 °C e 50 °C) sobre a produção das enzimas pelo microrganismo selecionado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção dos microrganismos

Foram obtidos doze microrganismos leveduras e fungos filamentosos provenientes da biblioteca microbiana do Laboratório de Microbiologia e Fermentação do CAM (Centro de Apoio Multidisciplinar) da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, onde foi desenvolvido este trabalho, sendo estes microrganismos isolados da região amazônica em trabalhos anteriormente desenvolvidos por grupos de pesquisa do laboratório. Além disso, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que foi empregada como controle positivo para produção de invertase (Tabela 2).

4.2. Purificação e conservação dos microrganismos

Em face da possível contaminação das linhagens estudadas por outros microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) todos os isolados obtidos foram submetidos à cultura monospórica (técnica de purificação) para obtenção de isolados puros, livres de qualquer contaminação e capazes de manter suas características metabólicas naturais. Onde, a pureza total das linhagens foi obtida a partir de uma única célula reprodutiva do microrganismo, através de uma diluição sucessiva seguida de plaqueamento como descrito no item 3.2.1.

Para manter os microrganismos por certo período de tempo e garantir a sua utilização neste estudo, após a purificação os microrganismos foram conservados por meio dos métodos de preservação em água destilada (Castellani, 1939), cultura submersa em óleo mineral e por congelamento em glicerol 15% (Figura 6).

Tabela 2: Origem dos microrganismos utilizados neste estudo.

Código do isolado	Microrganismo	Origem
F6	Fungo filamentoso	Solo da UFAM
F7	Fungo filamentoso	Solo da UFAM
F15	Fungo filamentoso	Solo da UFAM
L1	Levedura	Mamão
L2	Levedura	Macaxeira
L3	Levedura	Banana prata
L5	Levedura	Macaxeira
L8 (C+)	Levedura	-
F1	Fungo filamentoso	Solo
F5	Fungo filamentoso	Solo
F18	Fungo filamentoso	Solo
F29	Fungo filamentoso	Solo
F33	Fungo filamentoso	Solo



Figura 6: Conservação dos microrganismos. (a) Preservação em água destilada; (b) Cultura submersa em óleo mineral; (c) Glicerol 15%.

4.3. Seleção de microrganismo produtor de invertase

A seleção do microrganismo produtor de invertase iniciou com a obtenção do extrato enzimático bruto de cada linhagem, através da fermentação em meio líquido Czapeck contendo o 2 % de sacarose como substrato (item 3.3).

Posteriormente, o extrato enzimático obtido foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976) e da determinação da atividade enzimática de invertase extracelular através da dosagem de açúcares redutores, pelo método do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Onde, uma unidade de atividade de invertase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de glicose, por minuto, nas condições de reação utilizadas.

Os valores obtidos para a atividade de invertase estão indicados na Tabela 3. Dos doze microrganismos avaliados cinco demonstraram atividade invertásica, onde a levedura L5 e o fungo F7 apresentaram as melhores atividades. Estes resultados confirmam outros autores que demonstraram a produção de invertase por microrganismos.

PAIVA-ALEGRE *et al.* (2006) ao estabelecerem os melhores parâmetros físico-químicos para a produção de invertases pelo fungo filamentoso *Aspergillus caespitosus*, e determinar as melhores condições de ensaio, determinaram que o fungo *A. caespitosus* foi um

bom produtor de invertases, intracelulares e extracelulares, com elevadas temperaturas de atividade. No estudo da produção de Invertase pelo fungo *Alternaria* sp. por Fermentação Semi-Sólida, Sangaletti *et al.* (2003) demonstraram que o microrganismo, apresentando atividade de 20 U/mL após o quarto dia de fermentação.

Breda *et al.* (2002) ao investigarem a produção de invertase extracelular pelo fungo *S. ampelinum*, alcançaram resultados satisfatórios utilizando como fonte de carbono gérmen de trigo, o qual induziu a produção de invertase extracelular tanto no meio líquido Khouvine quanto no meio Czapeck com valores respectivos de 5,90 e 4,73 U/mL. E, na produção de invertase pelo fungo filamentosso *Paecilomyces variotii* por fermentação em substrato sólido, Giraldo *et al.* (2008) afirmaram que, o fungo estudado foi um bom produtor de invertase na presença do substrato farelo de soja, apresentando elevada temperatura de atividade.

De acordo com os resultados (Tabela 3), para dar continuação do estudo proposto, o microrganismo proveniente da Região Amazônica produtor de invertase selecionado foi o fungo filamentosso de código F7, o qual obteve a melhor atividade de invertase (4,44 U/mL), em comparação com os outros microrganismos avaliados, inclusive demonstrou maior atividade invertásica do que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (3,07 U/mL), considerada controle positivo para a produção de invertase. No entanto, todos os microrganismos avaliados quanto à produção de invertase cresceram muito bem em meio Czapeck líquido contendo 2% de sacarose como substrato, porém nem todos apresentaram uma produção de invertase significativa, ficando claro que os microrganismos podem ser capazes de fermentar a sacarose mesmo sem atividade invertásica, mas novos estudos são necessários para otimizar a hidrólise da sacarose por fungos e leveduras, estes resultados confirmam DÁRIO *et al.* (2008), que trabalhando com Fermentação de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deletadas no gene *SUC2*, observaram a mesma situação.

Tabela 3: Atividades enzimáticas de invertase excretadas pelos microrganismos avaliados.

Microrganismo (código)	Atividade (U/mL)	Desvio padrão	Observação
F1	0,00	0,00	Descartado
F5	0,00	0,00	Descartado
F6	0,00	0,00	Descartado
F7	4,44	0,28	Selecionado
F15	0,00	0,00	Descartado
F18	0,00	0,00	Descartado
F29	0,00	0,00	Descartado
F33	0,00	0,00	Descartado
L1	1,02	0,02	Reservado
L2	0,11	0,00	Descartado
L3	0,30	0,00	Descartado
L5	2,93	0,29	Reservado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Controle positivo)	3,07	0,07	Padrão

4.4. Determinação das condições ótimas de cultivo para produção de invertase

4.4.1. Determinação da Fonte de carbono ideal e melhor modo e tempo de cultivo

Após a seleção de um microrganismo amazônico produtor de invertase, foi determinado melhor fonte de carbono, tempo e modo de cultivo, pH ótimo e temperatura ótima de cultivo, a fim de determinar as condições ótimas de cultivo para a produção de invertase pelo fungo F7.

Para selecionar a fonte de carbono mais apropriada na indução do complexo invertásico extracelular, bem como o melhor modo e tempo de cultivo, o fungo F7 foi cultivado em triplicata por nove dias em meio Czapeck líquido contendo 2% dos resíduos agroindustriais farelo de trigo, sabugo de milho, bagaço de cana e melaço de cana, mantido em condições estacionárias e em agitação a 28 °C, onde a cada 24 horas foram coletadas amostras do extrato enzimático bruto para avaliação da produção de invertase pelo método de Miller (1959) e de proteínas totais pelo método de Bradford (1976).

Considerando a produção de invertase em função do tempo de cultivo, o fungo filamentososo F7 cresceu muito bem em meio Czapeck líquido na presença das quatro diferentes fontes de carbono avaliadas (farelo de trigo, sabugo de milho, bagaço de cana e melaço de cana), tanto em agitação quanto em modo estacionário, onde em 24 horas de cultivo já se observava um bom desenvolvimento fúngico e o crescimento máximo foi notado com 72 horas de cultivo, mantendo-se estável até o quinto dia e diminuindo a seguir, provavelmente devido a exaustão dos nutrientes. Entretanto, em alguns ensaios mesmo com a observação do crescimento fúngico não houve produção de invertase dados semelhantes foram observados por DÁRIO *et al.* (2008),.

Ao avaliar a influência da fonte de carbono na produção de invertase, na presença de farelo de trigo o fungo F7 demonstrou atividade invertásica em condições estacionárias, mas não em agitação, no primeiro modo de cultivo o pico de produção de invertase foi no oitavo dia de cultivo (192 horas) com 1,30 U/mL (Figura 7). Em Sabugo de milho o fungo também não apresentou atividade invertásica em agitação, mas demonstrou produção de invertase a partir do quinto de cultivo, o pico da atividade foi obtido no oitavo dia com 0,77 U/mL (Figura 8). Com bagaço de cana como fonte de carbono o fungo selecionado não apresentou atividade invertásica em nenhum dos dois modos de cultivo (Figura 9). O melaço de cana foi o melhor substrato para a produção de invertase pelo fungo F7, o qual demonstrou atividade invertásica tanto em agitação quanto em condições estacionárias, no entanto em agitação os resultados oscilaram bastante, apresentando vários picos de atividade, já no modo estacionário foi observada uma produção de invertase crescente e mais alta com pico no último dia de cultivo (5,91 U/mL), mas como o melaço de cana é rico em sacarose é provável que este valor continuasse a crescer se o tempo de cultivo fosse superior a nove dias (Figura 10).

Através destes resultados determinou-se que para melhor produção de invertase pelo fungo selecionado a fonte de carbono ideal é o resíduo agroindustrial melaço de cana, o melhor modo de cultivo é o estacionário e o melhor tempo de cultivo é nove dias (216 horas).

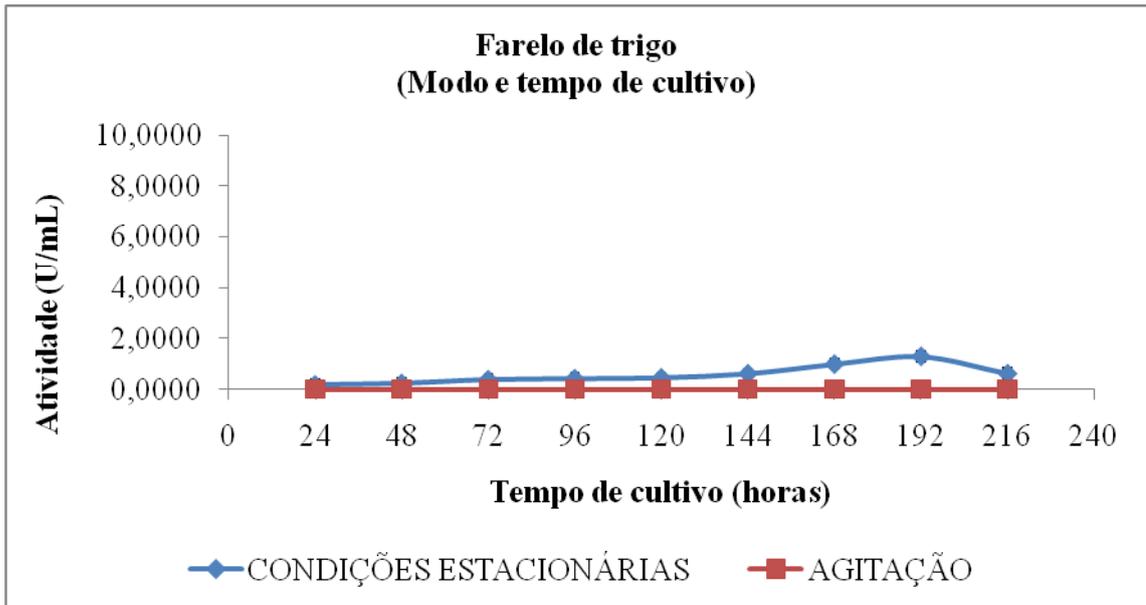


Figura 7: Produção de invertase pelo fungo F7 em meio Czapek líquido contendo Farelo de trigo como fonte de carbono, melhor modo (estacionário e agitação) e tempo de cultivo.

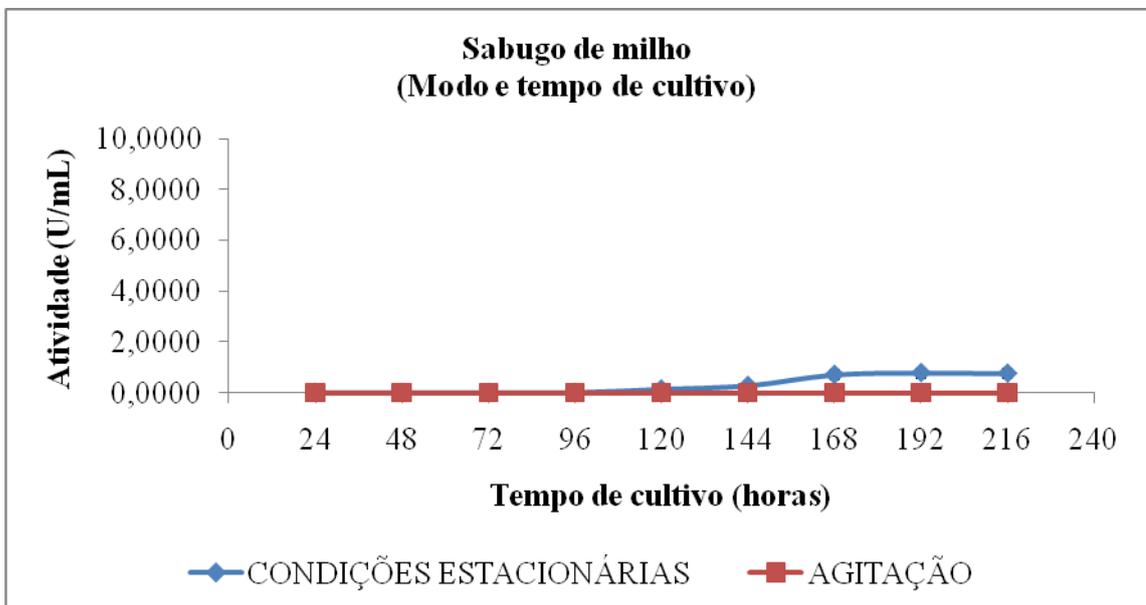


Figura 8: Produção de invertase pelo fungo F7 em meio Czapek líquido contendo Sabugo de milho como fonte de carbono, melhor modo (estacionário e agitação) e tempo de cultivo.

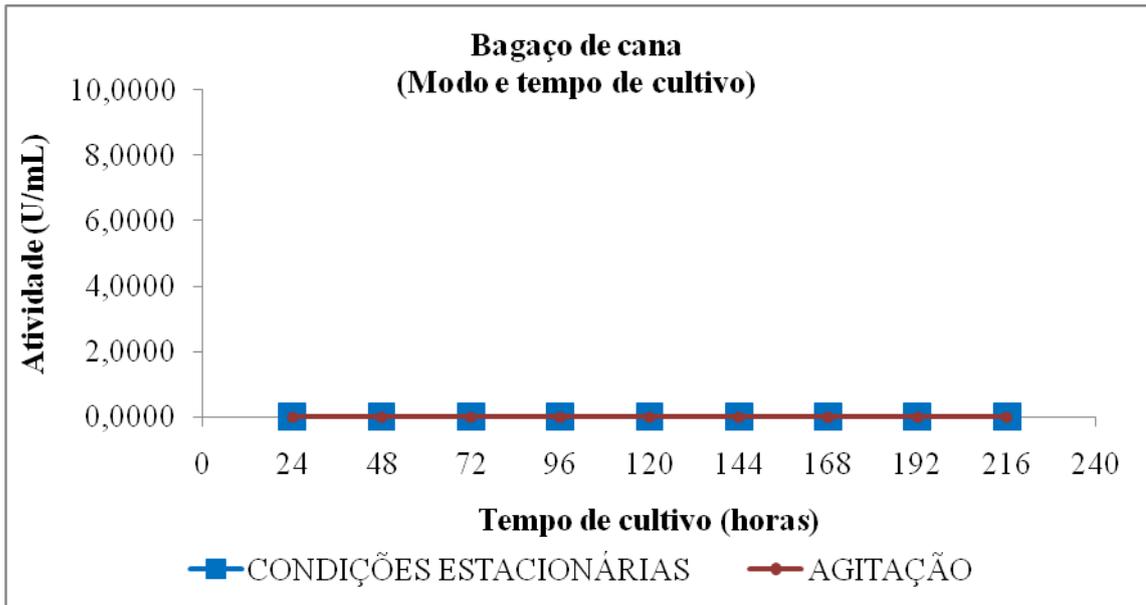


Figura 9: Produção de invertase pelo fungo F7 em meio Czapek líquido contendo Bagaço de cana como fonte de carbono, melhor modo (estacionário e agitação) e tempo de cultivo.

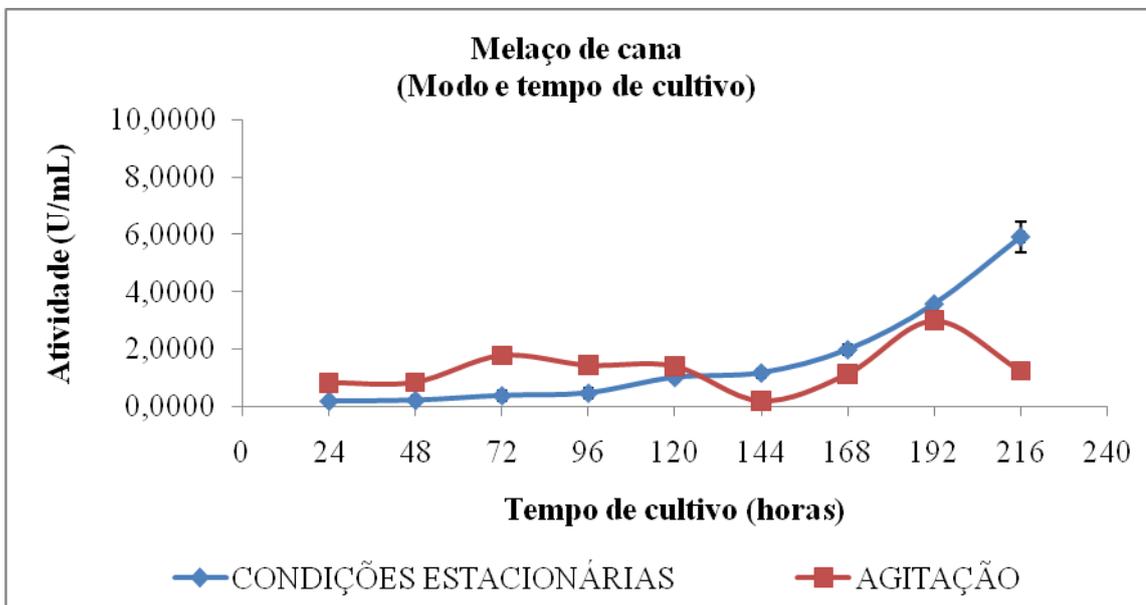


Figura 10: Produção de invertase pelo fungo F7 em meio Czapek líquido contendo Melaço de cana como fonte de carbono, melhor modo (estacionário e agitação) e tempo de cultivo.

4.4.2. Determinação do pH ótimo e Temperatura ótima de produção

Para determinar o pH ótimo para produção de invertase pelo microrganismo selecionado, o fungo F7 foi cultivado por nove dias em meio Czapek líquido contendo melão de cana, em condições estacionárias, a temperatura ambiente, em diferentes faixas de pH (3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0). O fungo F7 demonstrou atividade invertásica em todas as faixas de pH avaliadas, com melhores atividades nas faixas de pH 4,5, 5,0 e 6,0. E pico de atividade em pH 5,0 com 5,27 U/mL e 80,89 U/mg de proteína (Tabela 4).

Tabela 4: Produção de invertase pelo fungo F7 em diferentes faixas de pH, para determinação do pH ótimo de produção.

pH	Atividade (U/mL)		Atividade específica (U/mg de proteína)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
3,0	1,06	0,02	15,14	0,24
3,5	2,63	0,03	39,75	0,92
4,0	2,79	0,02	40,57	0,32
4,5	4,81	0,03	67,78	0,71
5,0	5,27	0,10	80,89	1,62
5,5	3,54	0,19	51,72	3,25
6,0	4,31	0,15	58,39	1,04
6,5	2,72	0,09	37,63	1,22
7,0	2,58	0,06	38,11	0,85
7,5	1,73	0,02	23,45	0,95
8,0	2,54	0,02	35,29	0,95

Para determinar a Temperatura ótima para produção de invertase o fungo F7 foi cultivado por nove dias em meio Czapek líquido contendo melação de cana, em condições estacionárias e em diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 30 °C, 40 °C e 50 °C). Nas temperaturas de 40 e 50 °C não houve produção de invertase, nem mesmo crescimento fúngico no meio de cultivo. Porém, a temperatura ambiente e a 30 °C o fungo F7 cresceu bem no meio de cultivo e demonstrou boa atividade invertásica, onde a melhor atividade foi observada na produção de invertase a 30 °C no valor de 4,78 U/mL e 69,20 U/mg de proteína (Tabela 5).

Tabela 5: Produção de invertase pelo fungo F7 em diferentes temperaturas, para determinação da temperatura ótima de produção.

Temperatura	Atividade (U/mL)		Atividade específica (U/mg de proteína)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Temperatura ambiente	3,61	0,22	58,81	2,13
30 °C	4,78	0,20	69,20	3,50
40 °C	0,00	0,00	0,00	0,00
50 °C	0,00	0,00	0,00	0,00

4.4.3. Produção de invertase nas condições ótimas de cultivo

O fungo F7 foi cultivado nas condições ótimas para a produção de invertase (em meio líquido Czapek contendo melação de cana, em condições estacionárias, pH 5,0 e a 30 °C), os resultados obtidos demonstraram que a determinação das condições ótimas de cultivo

melhorou 100% a produção de invertase pelo fungo selecionado em comparação com a produção invertásica em meio Czapeck contendo sacarose como fonte de carbono, a temperatura ambiente e sem o pH ajustado (Figura 11). Onde, a atividade invertásica passou de 4,44 U/mL para 8,75 U/mL e a atividade específica modificou de 3,88 U/mg de proteína para 143,31 U/mg de proteína, esta última demonstrando um aumento de 37 vezes.

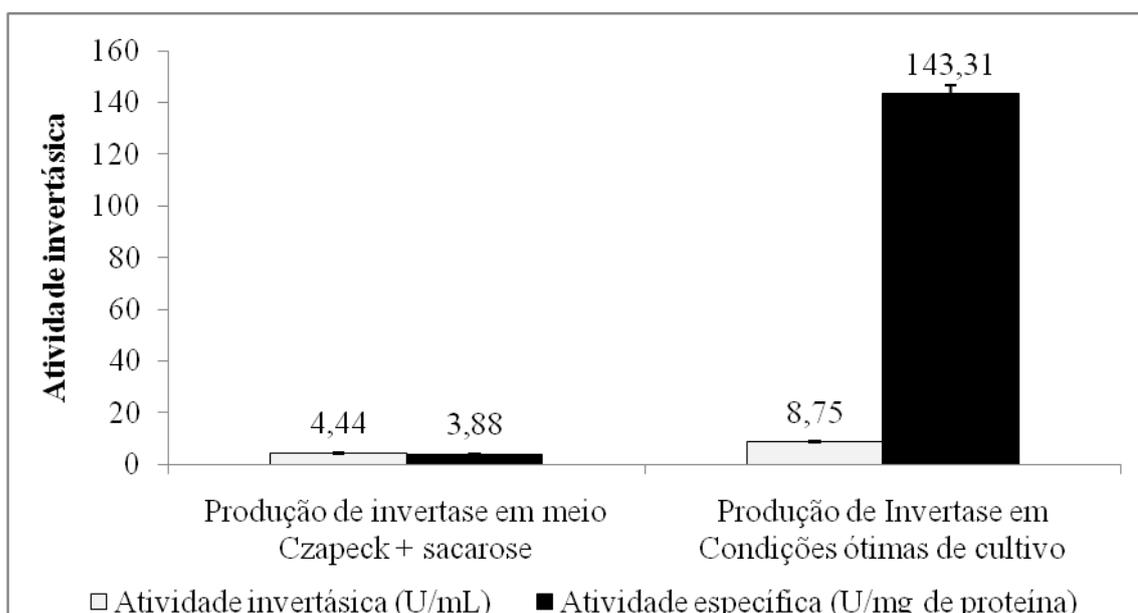


Figura 11: Comparação da produção de invertase pelo fungo F7 em condições ótimas de cultivo e em meio Czapeck contendo sacarose, a temperatura ambiente e sem o pH ajustado.

Para melhor aproveitamento destes resultados, futuramente o microrganismo selecionado, o fungo F7, terá a sua espécie reconhecida.

Devido a dificuldade de encontrar na literatura trabalhos semelhantes a metodologia utilizada de otimização da produção de invertase por fungos filamentosos em meio líquido contendo o melaço de cana de açúcar como fonte de carbono, os resultados obtidos nestas etapas do presente trabalho apresenta-se pouco referenciado.

5. CONCLUSÃO

- A região Amazônica oferece uma ampla diversidade microbiana para contribuir com estudos enzimáticos.
- Dentre os doze microrganismos avaliados quanto a produção de invertase, entre fungos e leveduras, o fungo filamentosso F7 se destacou demonstrando a melhor atividade invertásica em comparação com os outros microrganismos analisados e também a levedura *Saccharomyces cerevisiae* considerada controle positivo para a produção de invertase.
- Determinou-se que para a produção de invertase pelo fungo F7 a melhor fonte de carbono é o resíduo agroindustrial melaço de cana, o melhor modo de cultivo é estacionário e o melhor tempo de cultivo é nove dias (216 horas).
- O pH ótimo de produção de invertase é 5,0.
- A Temperatura ótima para produção de invertase é 30 °C.
- A produção de invertase pelo fungo selecionado em condições ótimas de cultivo duplicou em comparação a produção de invertase antes da otimização das condições de cultivo.
- O fungo selecionado apesar de ainda não ter sua espécie reconhecida, demonstrou resultados bastante satisfatórios em relação a produção de invertase, confirmando a Região Amazônica como um amplo campo de estudos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

ALEGRE, A. C. P. ; MLTM Polizeli ; HF Terenzi ; JA Jorge ; GUIMARAES, L. H. S. . Invertases produzidas pelo fungo filamentoso *Aspergillus caespitosus* em meios suplementados com farelo de trigo. In: XIV Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SSICUSP), 2006, Ribeirão Preto - SP. Livro de Resumos, 2006.

AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. 1973. Exercícios práticos de genética. São Paulo, Editora Nacional, 288p.

ALMEIDA, A. C. S.; ARAÚJO, L. C.; COSTA, A. M.; ABREU, C. A. M.; LIMA, M. A. G. A.; PALHA, M. L. A. P. F. Hidrólise da Sacarose Catalisada pela Invertase Auto Imobilizada em Células Intactas de *Cladosporium cladosporioides*. *Electronic Journal of Biotechnology*. v. 8, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248, 1976.

BREDA, A. E. ; MARESE, A. C. M. ; KNOB, A. ; BARBIERI, K. C. ; SILVA, S. A. V. ; KADOWAKI, M. K. . Estudo da produção da invertase extracelular pelo fungo *Sphaceloma ampelinum*. In: XI Encontro Anual de Iniciação Científica, 2002. XI Encontro Anual de Iniciação Científica, 2002.

CASTELLANI, 1939. A viability of some pathogenic in fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.* 42, 225-226.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; DIAS, B. Tecnologia enzimática. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, Ribeiro. Rj: EPUB, 2008.

GIRALDO, M. A. ; MLTM Polizeli ; JA Jorge ; GUIMARAES, L. H. S. Produção de invertase pelo fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* em fermentação em substrato sólido (FSS). In: XVI Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP - SIICUSP, 2008, Ribeirão Preto. CD de Resumos, 2008.

GODFREY, T.; WEST, S. Introduction to industrial enzymology. In: GODFREY, T.; WEST, S. Industrial enzymology. New York: Macmillan Publishers, Inc., 2 ed., p.1-8, 1996.

HOWARD, D.H. 1956. The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth. J. Bacteriol. 71, 625.

MARQUEZ, L. D. S. Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia. Minas Gérias, 2007.

MELO, Laryssa da Silva. Identificação molecular e produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma* spp. 2009. 47f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

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

OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. Revista Ciência Tecnologia de Alimentos, Campinas, out.-dez, 2006.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology, v.13, p.345-351, 2002.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 597-635, 1998.

SANGALETTI, N.; CADORIN, T.L.; HENDGES, D.H.; DARTORA, D.F.; ONOFRE, S.B.; ALENCAR, S.M. Produção de Invertase de *Alternaria* sp. por Fermentação Semi-Sólida. In: Simpósio Nacional de Fermentações SINAFERM 2003, 2003, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina-Engenharia de Alimentos e Engenharia Química, 2003.

SCHIMID, A et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature, 409: 258-268, 2001.