

## 74687 - ANÁLISE DA PRODUÇÃO DA ENZIMA INVERTASE A PARTIR DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS NÃO CONVENCIONAIS

*Emanuele Cardoso Dias<sup>1</sup>, Gerbeson Carlos Batista Dantas<sup>2</sup>, Henriqueta Monalisa Farias<sup>3</sup>, Analu Freitas de Souza Brito<sup>4</sup>, Caroline Targino Alves da Silva<sup>5</sup>, Débora Karenine Lacerda Gervásio<sup>6</sup>, Michelle Rossana Ferreira Vaz<sup>7</sup>.*

<sup>1</sup>Mestranda em Biotecnologia pela UFPB, João Pessoa. E-mail:

dias\_sigma@hotmail.com

<sup>2</sup>Graduando em Engenharia civil UFRSA, Angicos. E-mail:

gerbeson\_dantas@hotmail.com

<sup>3</sup>Graduanda em Engenharia de Biotecnologia pela UFCG, Sumé. E-mail:

monalisa\_miller@hotmail.com

<sup>4</sup> Mestranda em produtos Naturais e sintéticos bioativos pela UFCG/UFPB. E-mail:

analu\_sbrito@hotmail.com

<sup>5</sup> Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail:

carolinetargino.as@gmail.com

<sup>6</sup> Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail:

deborakarenine94@gmail.com

<sup>7</sup> Professora do Departamento de Engenharia Química – UFPR, Paraná. E-

mail:mrossanavaz@gmail.com

**RESUMO:** A invertase pode ser conhecida como  $\beta$ -D frutofuranosidase e, por conseguinte uma hidrolase que pode ser descoberta em uma ampla variedade de organismo procaríoto e eucarioto. Na indústria é a principal enzima utilizada na hidrólise da sacarose e também na obtenção do xarope de açúcar invertido. Para esta produção de enzima, a fermentação mais utilizada nas produções científicas é a fermentação em estado sólido. Nesse contexto, este trabalho objetivou-se em analisar o rendimento da fermentação em estado sólido na produção de enzimas invertases utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* IOC 4003 como agente transformador utilizando dois substratos (Farelo de algaroba e Farelo de arroz). A fermentação ocorreu em frascos de 250 mL contendo o meio inoculado juntamente com os substratos escolhidos, onde todo

o processo foi mantido sob incubação a temperatura ambiente. No que se refere ao período deste processo, a fermentação ocorreu em sete dias, e a cada 24 horas eram coletados frascos de cada resíduo. Do fermentado extraído de cada frasco por filtração à vácuo foi analisado o pH, consumo de substrato e atividade enzimática. Foi observado que em ambas as fermentações, utilizando farelo de arroz e farelo de algaroba, apresentaram níveis de atividade invertásica significativamente no processo e mostraram-se diretamente proporcionais ao consumo de carbono e nitrogênio presente no meio pelo microrganismo ao longo da fermentação. Neste viés, a produção de invertase por fermentação em estado sólido agrega valor aos resíduos que seriam descartados, fortalecendo todo o conceito de sustentabilidade em processos fermentativos e viabilidade econômica da indústria de produção enzimática.

**Palavras-chave:** Invertase, fermentação em estado sólido, *Aspergillus niger* IOC 4003, farelo de algaroba, farelo de arroz e sustentabilidade.

#### **ANALYSIS OF ENZYME INVERTASE PRODUCTION FROM SOLID STATE FERMENTATION USING NON-CONVENTIONAL SUBSTRATES**

**ABSTRACT:** Invertase can be known also as  $\beta$ -fructofuranosidase D, and hydrolase, that can be detected in a wide variety of eukaryote and prokaryote organism. In the industry, it is the main enzyme used in the hydrolysis of sucrose, and also in obtaining the invert sugar syrup. For this enzyme production, the most widely way of fermentation in scientific production is the solid state fermentation. In this context, this study aimed to analyze the performance of the solid state fermentation in the invertase enzyme production, using the filamentous fungus *Aspergillus niger* IOC 4003 as an agent, using two waste (bran and rice bran mesquite). The fermentation took place in 250 ml Erlenmeyer flasks containing the inoculated medium with the chosen substrate, where the whole process is kept under incubation at room temperature. Regarding the period of this process, the fermentation occurred in seven days, and every 24 hours were collected flasks of each residue. From the fermented product extracted from each flask by vacuum filtration the pH, substrate consumption and enzymatic activity were analyzed. It was observed that in both fermentations, using rice bran and algaroba meal, they presented levels of invertase activity significantly in the process and were directly proportional to the carbon and nitrogen consumption present in the medium by the microorganism throughout the fermentation. In this bias, the invertase production by solid state

fermentation adds value to the waste that would be discarded, strengthening the whole concept of sustainability in fermentative processes and economic viability of the enzymatic production industry.

**Keywords:** Invertase, solid state fermentation, *Aspergillus niger* IOC 4003, mesquite meal, rice bran and sustainability.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das mais importantes economias do mundo baseadas na agricultura sendo referência na produção de café, açúcar de cana, soja, mandioca, frutas, dentre outros. Entretanto, a sintetização destes produtos agrícolas tem causado grande geração de resíduos. Somando-se a problemática da geração dos resíduos oriundo desta dinâmica, insere-se também a problemática da destinação final, uma vez que quando ocorre de maneira ambientalmente inadequada, possui grande potencial de degradação dos sistemas ambientais e, por conseguinte, depreciando à qualidade de vida das pessoas. Atualmente em razão desta série de problemas, as pesquisas estão direcionadas a atuar no sentido de mitigação dos impactos negativos gerados por esta atividade, por meio de ações integradas de minimização dos resíduos, redução dos desperdícios e, sobretudo, aproveitamento pleno dos seus elementos constituintes (30-15).

Como aplicação em potencial destes resíduos destaca-se a sua utilização como principal fonte de carbono em bioprocessos para a obtenção de bioprodutos com valor agregado, entre eles: enzimas, álcoois, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólicos secundários biologicamente ativos e compostos de aroma (3). Nos processos biotecnológicos, a fermentação em estado sólido vem sendo a técnica mais utilizada e contribuindo fortemente para esta utilização (30).

A fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação semi-sólida ou fermentação em meio semi-sólido emprega-se em processos onde há o desenvolvimento de micro-organismos sobre ou dentro de partículas sólidas, onde a presença de água é um fator determinante no andamento do processo fermentativo para garantir o crescimento e um melhor metabolismo (24).

A fermentação em estado sólido apresenta diversas vantagens quando comparada a submersa, principalmente quando os agentes de transformação são os fungos filamentosos. Para estes micro-organismos, é de extrema importância a semelhança do meio de cultivo e seu meio natural para que possam crescer e excretar

maior quantidade de enzimas (21-22). A concentração de produtos originados deste processo é maior que os obtidos na fermentação submersa e gera menos resíduos líquidos. O processo estimula o setor econômico em regiões com abundância em biomassa e resíduos agroindustriais por ser acessível e farto (4-5).

A algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) é uma leguminosa arbórea, não oleaginosa, da família Fabaceae, originária das Américas (encontrada desde a América do Norte a Central e Sul) e África Tropical. Chegou no Brasil há mais de 50 anos, estando difundida na região Nordeste, em populações cultivadas e subespontâneas (29). A utilização do farelo é recomendada, pois no processamento térmico e físico das vagens, além da incorporação de todos os componentes, torna-se mais susceptível ao ataque de enzimas e micro-organismos, reduz o ataque de insetos no armazenamento e agrega-se valor ao produto que iria ser descartado definitivamente, entre outros fatores (29).

Para muitos países em desenvolvimento o arroz é considerado o cultivo alimentar de maior importância e é o alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas no mundo, atingindo na Ásia, uma produção e consumo da ordem de 90% (3). No Brasil, o arroz se destaca como maior produtor fora do continente asiático e está entre os dez principais produtores mundiais, segundo os estudos realizados pela FIESP com o apoio do Ministério da Agricultura (11). Há bastante interesse em pesquisas biotecnológicas, uma vez que o farelo de arroz possui uma alta carga nutritiva e apresenta uma relativa disponibilidade e baixo custo. Este subproduto tem sido evidenciado em diversos trabalhos nos quais são reaproveitados como suplemento na composição de meios de cultivo para diferentes microrganismos, como relata os trabalhos que enfocam a produção de xilitol em açúcar e álcool de várias aplicações terapêuticas (27).

A invertase (EC 3.2.1.26), também pode ser conhecida como  $\beta$ -D frutofuranosidase. É uma hidrolase que pode ser descoberta em uma ampla variedade de organismos procariotos e eucariotos, estando entre estes os fungos e leveduras como os dos gêneros *Aspergillus* e *Saccharomyces*, respectivamente (23). As invertases são enzimas com alto poder industrial devido a sua utilidade na produção de xaropes com alto teor de frutose e glicose a partir da sacarose como a matéria-prima (27).

O que limita a produção em massa da enzima invertase tem sido basicamente o elevado custo em sua produção e o baixo rendimento obtido nos processos de extração e purificação da enzima. Mas, há técnicas naturais de imobilização de enzimas e

oferecem uma alternativa para melhoria do processo, oferecendo grande estabilidade operacional à enzima e possibilitando inúmeras reutilizações sem perda significativa de atividade enzimática (12).

Os fungos do gênero *Aspergillus* se destacam não apenas na produção de enzimas, mas também na produção de metabólitos secundários. Em destaque, na produção de metabólitos secundários, os fungos *Aspergillus flavus* e o *A. parasiticus* são responsáveis por intoxicação cancerígena em várias espécies de animais (31).

Os fungos do gênero *Aspergillus niger*, é bastante empregado na produção da enzima invertase, como também das enzimas pectinolíticas (30), com destaque para a poligalacturonase (PG) (6). O *A. niger* também possui participação especial na biossíntese de ácido cítrico para uso em indústrias de alimentos, refrigerantes e biofármacos (17).

Devido a estes fatores, este trabalho teve como principal intuito, a produção da enzima invertase por meio da fermentação em estado sólido impondo valor a resíduos agroindustriais como farelo de algaroba e farelo de arroz, tendo como principal agente transformador o fungo filamentosso *Aspergillus niger* IOC 4003.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os ensaios pertencentes a este trabalho foram realizados no laboratório de Bioengenharia (LABIO), do Departamento de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa.

### **Preparo Do Resíduo**

Como meio de cultivo no processo de fermentação em estado sólido para a produção da enzima invertase, foram utilizados dois resíduos agroindustriais: O farelo de algaroba triturada e o Farelo de arroz triturado. Ambos os resíduos foram gentilmente cedidos pelo laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal da Paraíba.

### **Caracterização Dos Resíduos**

A caracterização físico-química dos resíduos quanto à densidade aparente, pH, umidade e sólidos solúveis foi realizado conforme procedimentos descritos a seguir:

### Densidade aparente

Para a determinação da densidade aparente pesou-se 50g de cada resíduo em uma proveta de 50 mL e verificou-se o volume ocupado da massa do resíduo sem haver a compactação (9). A densidade aparente, pode ser expressa pela fórmula:

$$\text{Densidade aparente} = \frac{\text{massa ocupada (g)}}{\text{Volume total da proveta (mL)}} \quad (1)$$

### pH

Preparou-se uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1 g do resíduo. Após a homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 min, depois o pH foi mensurado por um peagâmetro digital previamente calibrado com as soluções padrões (16).

### Umidade

Verificou-se a umidade medindo 5g do resíduo em cadinho de alumínio previamente seco e tarado. Os cadinhos permaneceram em estufa por 24h a 105 °C (9). A umidade pode ser expressa de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final da amostra}}{\text{Peso inicial da amostra}} \times 100 \quad (2)$$

### Teor de sólidos solúveis (°Brix)

A concentração de sólidos solúveis medidas em °Brix é uma medida relacionada a quantidade de açúcares presentes na amostra. Para esta análise, mediu-se 9 mL de água destilada e 1 g do resíduo, após a homogeneização, deixou-se a suspensão em repouso por 30 minutos, com uma agitação intermitente. Após esse repouso, a solução foi filtrada usando algodão e a leitura do teor dos sólidos solúveis foi medida em um refratômetro e multiplicada por dez, devida a sua diluição (16).

### Micro-Organismo

O micro-organismo empregado foi o *Aspergillus niger* IOC 4003, selecionado por ser uma linhagem produtora da enzima de interesse adquirido da coleção de culturas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os esporos foram conservados em tubos de ensaio e placas de petri devidamente esterilizados e lacrados.

### Obtenção da Solução De Esporos (Meio De Cultura)

Na solução do meio de cultivo para a realização do inóculo foi utilizado o meio BDA (sem ágar). Colocou-se 100g de batata em 500 mL de água destilada em um

erlenmeyer de 1 L e foi aquecido a 50 °C por uma hora. Posteriormente, as batatas foram descartadas e na água resultante deste processo, adicionou-se 8g de glicose. Esta solução foi devidamente autoclavada por 20 minutos a 1 atm. Retirou-se uma alíquota de 30 mL do meio de cultivo para os cálculos do consumo de substrato. O meio foi levado para a Câmara de fluxo laminar para a ativação do inoculo (pré-inóculo), após a ativação o meio foi deixado em repouso por 24 h em temperatura ambiente.

### **Processo de Fermentação em estado sólido**

Para o processo fermentativo foram utilizados sete erlenmeyers de 250 mL contendo 3g de cada substrato. Os resíduos foram devidamente autoclavados antes do inóculo realizado em câmara de fluxo laminar.

Os resíduos foram hidratados com 3 mL da suspensão de esporos que estava em repouso em temperatura ambiente. A fermentação ocorreu por 168h ao total, de modo que a cada 24h um frasco, contendo cada substrato, era coletado para a obtenção do extrato enzimático.

### **Extração enzimática**

Para a aquisição do extrato enzimático, a cada 24h um frasco de cada substrato era recolhido, como foi mencionado anteriormente. Em câmara de fluxo laminar, adicionou-se 100 mL de água destilada e 2 mL de tween 80 nos erlenmeyers coletados referentes a cada ponto dos substratos. Em seguida foram homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro devidamente esterilizado por 5 minutos. A extração das células e enzimas foi realizada por filtração com papel de filtro qualitativo em um kitassato e uma bomba à vácuo. De cada frasco, separou-se 50 mL de caldo extraído para posterior análise da quantificação de proteína e atividade enzimática.

### **Determinação do pH das amostras**

A análise do pH das amostras foi determinada pela coleta do sobrenadante resultante da centrifugação correspondente a cada substrato e período. O pH foi mensurado em peagâmetro digital devidamente calibrado no início dos experimentos. Os dados obtidos foram anotados para a construção dos gráficos posteriormente.

### **Consumo do substrato**

Para a avaliação do consumo de substrato, este trabalho teve como subsídio o modelo adotado por outros autores [32-18]. Sinteticamente, este processo de

monitoramento e determinação de consumo de substrato pelo fungo filamentos *Aspergillus niger* baseou-se em determinar a absorvância do caldo fermentado a cada período de 24 horas. Para isso, foi produzida uma curva de calibração do meio de cultivo sem o inóculo para a determinação do consumo de substrato do microrganismo.

A solução preparada para esta análise foi à mesma utilizada no processo de fermentação, mas sem o acréscimo do inóculo. Para esta solução, foi dado o nome de solução-mãe, e foi preparada para a construção da curva de calibração para a determinação do consumo de substrato. A partir da solução-mãe, foram preparadas 7 alíquotas com ordem de diluição de 0,2 g/mL, ou seja, em um intervalo entre 0 g/mL a 0,14 g/mL.

A densidade ótica (DO), foi medida para cada solução referente às alíquotas diluídas (0 a 0,14 g/mL) e que correspondem a cada ponto (7 pontos ao total para cada substrato). A DO foi medida em espectrofotômetro ajustado para 480nm.

Após 24 horas do processo de fermentação em estado sólido (FES), antes de dar início a filtração à vácuo, foram retirados 5 mL desse mesmo caldo e em seguida foi levado para o espectrofotômetro (480 nm), para posteriormente ser analisado o consumo de substrato em comparação com a solução-mãe já mencionada anteriormente.

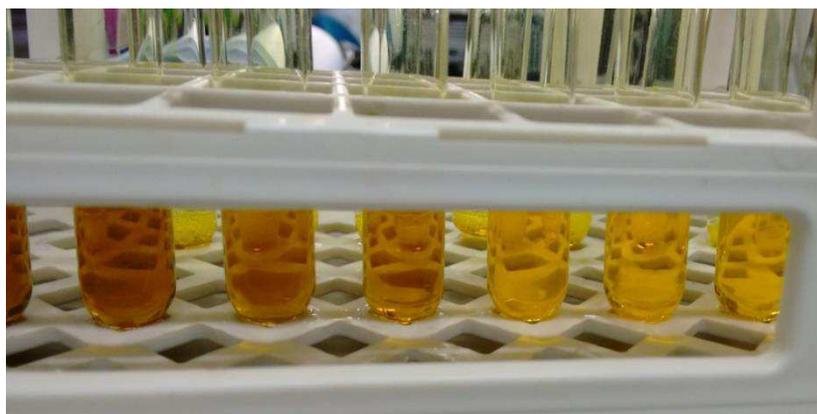
### Determinação da atividade invertásica

O método DNS basicamente remete um método colorimétrico para a quantificação de açúcares redutores que inclui a reação da amostra com a participação do reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) quando está submetido a uma temperatura de 100 °C aproximadamente por cinco minutos (13). Este método tende a promover a redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e, simultaneamente na oxidação do grupo aldeído ou cetônico a grupos carboxílicos, com o desenvolvimento da cor laranja/marrom intensos (26).

Para a determinação das concentrações de açúcares, foi construída uma curva padrão a partir de uma solução de glicose que posteriormente foi diluída em alíquotas com concentrações conhecidas (100 a 700 mg/L). A curva padrão é fundamentada na observação dos valores da absorvância das soluções de mistura entre solução de glicose e DNS, previamente preparadas. Com a determinação da curva padrão, pôde-se determinar o fator de concentração (Eq. 4) a partir do coeficiente angular da reta ajustada.

$$\text{Fator de concentração} = \frac{1}{\text{Coeficiente Angular da reta ajustada}} \quad (4)$$

A análise da atividade enzimática foi preparada a partir do aquecimento em banho-maria das amostras enzimáticas (100 µL do extrato enzimático; 500 µL da solução de sacarose 0,1 M e 400 µL de tampão acetato 100mM, pH 5,0 ) a 30 ° C por 30 minutos, e em seguida foi adicionado 1mL do reagente DNS para que ocorra o término da reação. Uma solução “branco” ( 1mL de DNS e 8 mL de água destilada) foi produzida visando evitar uma superestimativa da atividade da enzima. A atividade foi determinada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro (540 nm) dos extratos enzimáticos juntamente com a solução em branco (16).



**Figura 1**– Tubos de ensaios prontos para a leitura da absorbância. **Fonte:** Autores.

Pode-se calcular uma unidade (U) de atividade de invertase pela quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de grupos redutores, medidos como glicose, por minuto, nas condições de reação utilizadas. Portanto, os valores da atividade invertásica (U) podem ser definidos pela Eq. 5:

$$\text{Invertase (U)} = \frac{(\text{Abs da amostra} - \text{Abs branco}) \times \text{Fator de conc} \times \text{Diluição}}{540} \quad (5)$$

Onde:

Abs. da amostra = Absorbância da amostra;

Abs. do branco = Absorbância do branco correspondente;

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

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

540 = fator de conversão para atividade (u.m.ab-1 x min-1).

Os dados foram devidamente anotados referentes à atividade invertásica e uma curva da atividade foi construída graficamente analisando os níveis de atividade

enzimática correspondentes a cada amostra coletada em função do tempo de fermentação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Caracterizações dos resíduos secos

A produção de enzimas como invertase, amilase, celulase, pectinase e protease é induzida pela presença de nutrientes no substrato. Assim, torna-se indispensável a caracterização dos resíduos secos do farelo de algaroba e farelo de arroz. Esta caracterização expõe um conhecimento geral da composição e desempenho do resíduo que são importantes na síntese das proteínas de interesse, que neste caso trata-se das enzimas invertases (23). A Tabela 1 apresenta os resultados da caracterização dos substratos utilizados no processo fermentativo por FES.

**Tabela 1**– Caracterização dos resíduos sólidos na fermentação por FES.

<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Unidade</b>	<b>Substrato 1 – Algaroba</b>	<b>Substrato 2 - Arroz</b>
<b>Umidade</b>	%	2,12	2,58
<b>Sólidos solúveis</b>	°Brix	---	---
<b>pH</b>	---	5,04	5,35
<b>Densidade aparente</b>	g/mL	0,5491	0,4093

**Fonte:** Autores.

Na fermentação em estado sólido (FES), o pH do meio é um parâmetro importante e bastante difícil de controlar. A padronização do pH do substrato pode se dar durante o seu pré-tratamento. Existem elementos com a capacidade tamponante, os quais podem ser adicionados ao meio de modo a evitar a oscilação do pH. Esta adição pode ser efetuada desde que a substância não exerça nenhum papel nocivo sobre a atividade biológica (21-22).

A densidade apresentada nos resíduos de 0,5 g/mL e 0,4 g/mL para o farelo de algaroba e farelo de arroz, respectivamente, revela que os resíduos tendem a não se compactarem completamente, fator este, bastante propício ao desenvolvimento dos micro-organismos. Os espaços vazios criados pelos resíduos geram uma proveitosa circulação de ar, que facilita o crescimento fúngico do *Aspergillus Níger* (28).

### **Análise da variação do pH no extrato enzimático da FES**

O pH das amostras nas duas fermentações é expresso na Tabela 2 abaixo, onde pode-se observar que em ambos processos enzimáticos, inicialmente, possuem os valores mais ácidos durante o período de fermentação.

**Tabela 2** – pH das amostras enzimáticas em função do tempo de fermentação.

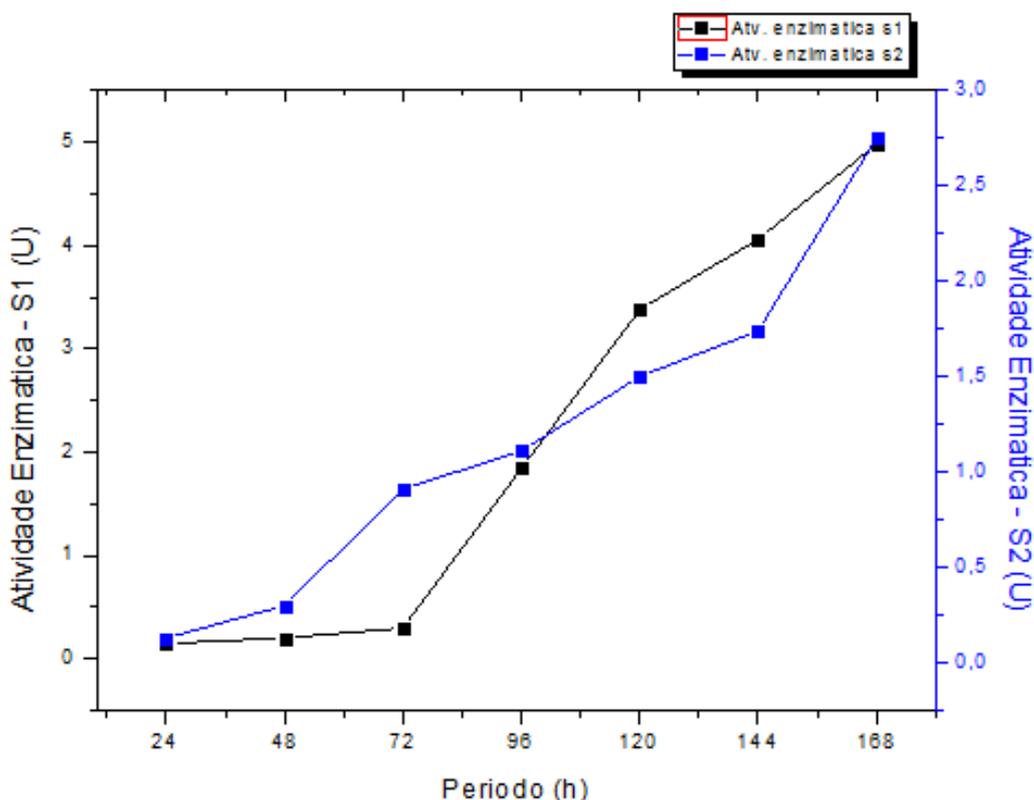
Período (h)	pH - S1 - Algaroba	pH - S2 - Arroz
24	5,13	4,95
48	5,05	6,23
72	5,91	6,36
96	6,1	6,05
120	6,34	6,00
144	6,42	6,05
168	6,31	6,02

**Fonte:** Autores.

Por interferir diretamente com o estado de ionização das cadeias laterais de aminoácidos, o pH é um parâmetro muito importante para a manutenção da estrutura protéica e da atividade das enzimas (8). A mudança deste parâmetro atinge a ionização dos resíduos de aminoácidos essenciais do sítio ativo, que estão envolvidos na ligação do substrato e sua transformação em produto (7).

Os fungos filamentosos preferem o pH baixo para a manutenção do seu metabolismo nos padrões ideais em um processo de fermentação em estado sólido e pode variar entre 4,0 a 6,5 (4-5). Outros pHs ótimos foram descritos com 3,85 para a invertase de *Pycnoporus sanguineus* (7), 5,5 para a invertase produzida a partir da levedura *Candida utilis* (8) e 6,0 e 5,5 para invertases da bactéria *Zymomonas mobilis* intracelular e extracelular, respectivamente.

### **Determinação da Atividade Invertásica do processo fermentativo.**



**Figura 2** – Atividade da enzima invertase obtida da FES por *Aspergillus niger* IOC 4003 utilizando farelo de algaroba (S1) e farelo de arroz (S2) como substrato. **Fonte:** Autores.

Na presença dos resultados obtidos experimentalmente em cada período de fermentação, obteve-se uma taxa média de atividade enzimática de 2,13 (U/dia) e 1,20 (U/dia) utilizando como substrato o farelo de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) e o farelo de arroz (*Oryza Sativa* L.), respectivamente.

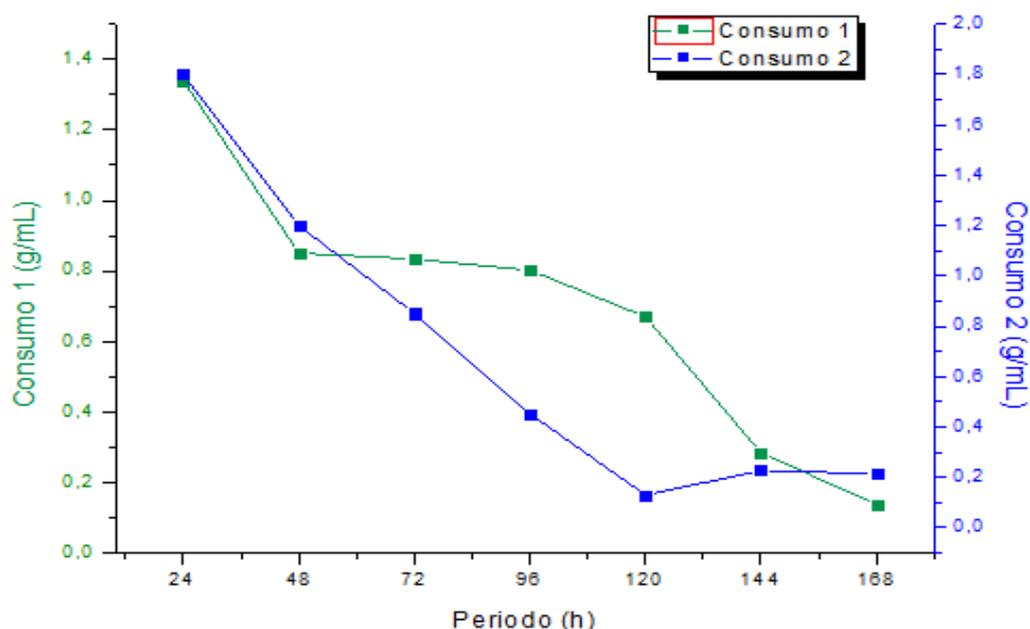
Diante da Figura 2, pode-se observar que a cepa de *Aspergillus niger* IOC 4003 produziu a enzima de interesse, invertase, com a utilização tanto do substrato 1 (farelo de algaroba) quanto do substrato 2 (farelo de arroz). Observa-se também, o crescimento exponencial de ambas as atividades invertásicas ao longo do processo fermentativo de 168 horas (sete dias). Observa-se também, que o substrato com os níveis mais altos de atividade enzimática foi o farelo de algaroba, chegando a 4,98 U em 168 horas de cultivo.

Na produção de invertase por *Aspergillus caespitosus* utilizando farelo de trigo e suplementando o meio com um acréscimo de nutrientes (nitrogênio, peptona e fosfato) à temperatura de 30°C, e obteve-se após 72 horas de processo a atividade de 3,034 U/g

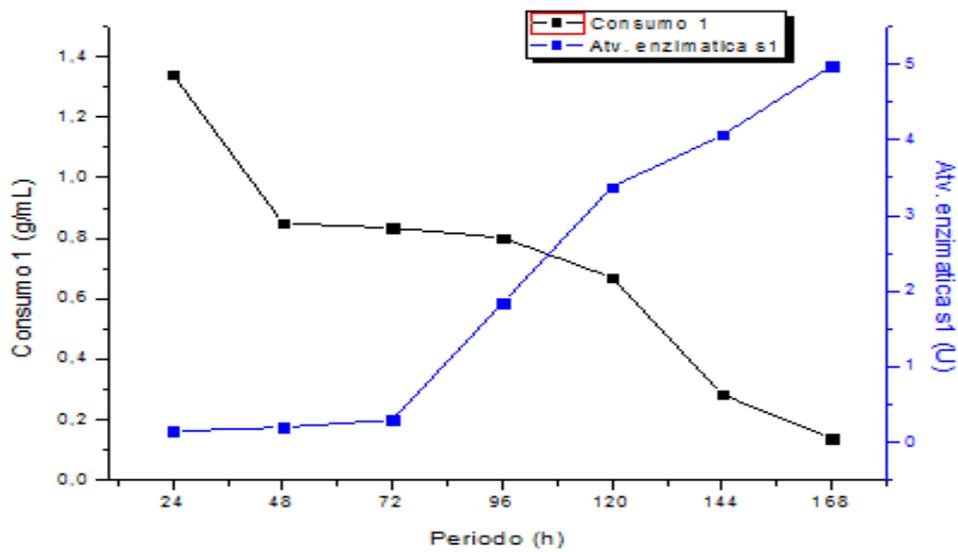
(1). O substrato foi enriquecido com nutrientes de alto valor nutricional para o desenvolvimento do fungo e foi realizado também o controle de temperatura durante todo o processo fermentativo.

Em uma revisão de literatura abordando diversas pesquisas na produção de invertase por fermentação em estado sólido com a utilização de resíduos não convencionais, os índices de atividade invertásica está entre 3 a 14 U/g. Logo, corrobora com os valores encontrados no presente trabalho (2).

### Consumo de substrato pelo *Aspergillus niger*

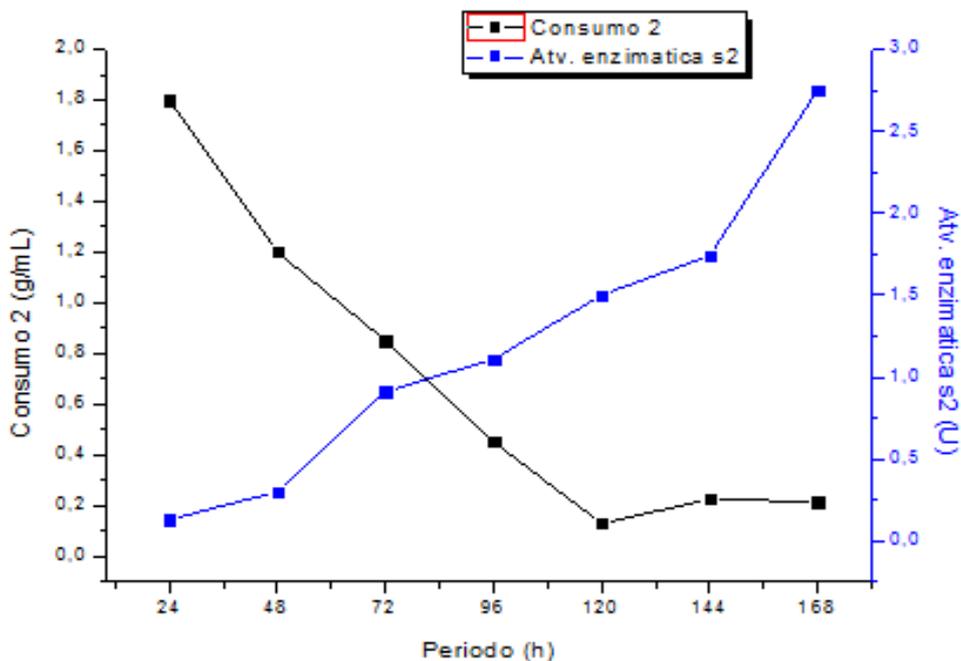


**Figura 3** – Análise comparativa do consumo de substrato do fungo filamentososo na fermentação em estado sólido em função do tempo. Fonte: Autores.



**Figura 4** – Relação entre Consumo 1 e Atividade enzimática 1 (Farelo de algaroba).

**Fonte:** Autores.



**Figura 5** – Relação entre Consumo 2 e Atividade enzimática 2 (Farelo de Arroz).

**Fonte:** Autores.

A Figura 3 faz uma análise comparativa do consumo de substrato, do fungo filamentoso na fermentação em estado sólido em função do tempo utilizando os dois substratos em questão. É indiscutível que este consumo de substratos foi bastante satisfatório, uma vez que em ambos os casos, houve o decréscimo de nutrientes no

meio de cultivo, ou seja, o microrganismo utilizado aproveitou abundantemente as fontes de carbono e nitrogênio presentes na matriz sólida utilizada.

Pode-se perceber diante das Figuras 4 e 5, que o consumo de substrato foi eficaz comparando com os níveis de atividade enzimática para os dois casos. Vale enfatizar também, que há uma relação inversamente proporcional entre este decréscimo nutricional e o aumento da atividade enzimática, logo, a medida que os níveis do consumo de nutrientes foram reduzindo, ocorreu um aumento significativo das taxas da atividade enzimática nos dois processos fermentativos.

Os dados condizem com os resultados encontrados por (26), que estudou a otimização da produção de diversas enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido, onde empregou o resíduo do arroz e maracujá. Rocha revela o grande consumo de substrato do fungo filamentosos, chegando a um consumo de aproximadamente 80%, e também, uma relação direta com a atividade enzimática invertásica (Fig 4 e Fig 5). Vale salientar que nos resultados obtidos por este trabalho, o consumo de substrato chegou a quase 100%, ratificando assim, um emprego mais sustentável destes resíduos na produção de enzimas, uma vez que boa parte deles são desprezados e causam desequilíbrio ao meio ambiente.

#### 4. CONCLUSÕES

O rendimento da fermentação na produção de enzimas invertases utilizando o fungo filamentosos *Aspergillus niger* IOC 4003 como agente transformador sob fermentação em estado sólido (FES) utilizando dois resíduos (Farelo de algaroba e Farelo de arroz) como substrato foi bastante eficaz. Pode-se perceber diante dos resultados obtidos que o consumo de substrato foi bastante satisfatório e houve relação direta com a atividade invertásica, ou seja, o microrganismo utilizado respondeu de forma expressiva e significativa os resíduos selecionados para a produção da enzima de alto valor industrial.

#### REFERÊNCIAS

1. Alegre ACP, Polizeli MLTM, Terenzi HF, Jorge JA, Guimarães LHS. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerge or solid state fermentation using agro-industrial residue as carbon source. Braz. J. Microbiol, 2009, 40(3).

2. Almeida ÉS, Dias EC, Vaz MRF, Ribeiro VT, Silva AC, Padilha CEA, JÚNIOR, F. C. S, Nóbrega FFF. Uma breve revisão sistemática da literatura sobre a produção de invertase por fermentação em estado sólido. *Revista Saúde e Ciência*, 2014; 3(3): 94-106.
3. ARROZ BRASILEIRO. Cultura do arroz é destaque em estudo produzido pela Fiesp. 2008. Disponível em : <http://www.arroz.agr.br/site/arrozemfoco/080519.php>. Acesso em jun. 2015.
4. Castilho LR, Medronho RA, Alves TLM. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 2000, 71(1): 45-50.
5. Castilho LR. Recuperação e pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1997.
6. Castro RJS, Torres MBO, Freitas AC, Pinto GAS. Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando torta de girassol como substrato. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal, 2009.
7. Chávez FP, et al. Purification and characterization of invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases. *Journal of Biotechnology*, 1997, 53(1): 67-74.
8. Collins CH, Braga GL, Bonato PS. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: EdUnicamp; 1990. 279 p.
9. Correia RTP. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. Tese (Doutorado em Engenharia química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2004.
10. Coutinho PM, Henrissat B. Carbohydrate-Active Enzymes server an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J.
11. EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Utilização do farelo de arroz. 2004. Disponível em: [http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/folhetos/arroz\\_farelo.pdf](http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/folhetos/arroz_farelo.pdf) . Acesso em maio 2015.
12. FELIPE, M.G.A. Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. In: SAHA, B.C.; HAYASHI, K. (eds.) *Lignocellulose Biodegradation*; American Chemical Society, cap. 18, 2004.
13. Fontes CPML. Produção de manitol a partir da fermentação do suco de caju utilizando bactérias lácticas heterofermentativas. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos), Universidade Federal do Ceará; 2009.
14. Gilbert G, Davies B, Henrissat B and Svensson EDS. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1999.
15. Gouveia N. Resíduos sólidos urbanos: impactos socioambientais e perspectiva de manejo sustentável com inclusão social. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2012, 17 (6): 1503-

1510.

16. Instituto Adolf Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3 ed. São Paulo: editora; 1985.

17. Leonel M, Cereda MP. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Sci. Agric.; Piracicaba, 1995, 2(4): 299-304.

18. Melo GG, Braz LCC, Amador VC, Dias EC, Almeida ÉS, Silva DP, Bezerra RM, Coelho GD. Estudos preliminares sobre a atividade adsortiva do corante vermelho coelho pelo fungo *Lentinus crinitus*. In: I SENGEBBIO 2014. Sumé-PB, 2014.

19. Moura CL, Pinto GA, Rodrigues S. Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos. Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos 108, Fortaleza, 2007.

20. Oliveira AC. Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga. Dissertação (Área de concentração: Engenharia de processos de alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia; 2013.

21. Pandey A, Soccol CR, Leon JAR. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech; 2001.

22. Pandey A. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. 2003, 13(2), p. 81-84.

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

24. Pinto GAS, Brito ES, Silva FLH, Santos SFM, Macedo GR. Fermentação em estado sólido uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. Rev. Química. Ind., 2006, 74(724):17-20.

25. Quiroga EN, Vattuone MA, Sampietro AR. Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*. Biochimica et Biophysica Acta. Protein structure and molecular Enzymology, 1995, 251(2): 75-80.

26. Rocha CP. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia; 2010.

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

28. Santos SFM. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.

29. SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análises de alimentos (Métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 2002. 235p.

30. Soccol CR, Vandenbergher LPS. Overview of applied solid- state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 2003,13(2): 205-218.
31. Taniwaki MII, Fonseca II, Pizzirani-Kleiner AA. Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção. *Sc. Agric. Piracicaba.*, 1993, 1 (3): 140-150.
32. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2003. 827p.
33. Uenojo M, Pastore GM. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, 2007, 30(2): 388-394.