

"CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE PRODUÇÃO
DE INVERTASE EXTRACELULAR
POR LEVEDURAS"

13/86

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE PRODUÇÃO DE
INVERTASE EXTRACELULAR POR LEVEDURAS"

FATIMA APARECIDA DE ALMEIDA COSTA

Orientador: Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO

Parar
Este exemplar corresponde
à relação final da tese
apresentada por Fátima Apa-
recida de Almeida Costa
aprovada pela Comissão
Julgadora em 04.12.86,
Campinas, 04 de dezembro/86.


Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Uni-
versidade Estadual de Campinas
para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia de Alimentos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais,
A meu marido, Antonio Carlos,
A minha filha, Carolina

Com carinho e gratidão

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO, por sua orientação, estímulo e amizade.
- A FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS e particularmente ao Departamento de ENGENHARIA, por possibilitar o desenvolvimento desta pesquisa.
- A Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos (ABIA) pelo custeio da confecção desta tese.
- Aos professores da Área de Bioengenharia por permitirem minha atuação como funcionária e aluna.
- Ao laboratório de Bioquímica, e especialmente à Prof. HÉLIA e INGRID, pelo auxílio na cromatografia em papel e por discussões técnicas.
- Ao Prof. VALDOMIRO SGARBIERI pelos conselhos e ensinamentos, bem como pelo empréstimo da centrífuga refrigerada e aparelho de ultra-som.
- A todo pessoal do laboratório de Bioengenharia pelo companheirismo e amizade. Ao QUIRINO pela colaboração e à MARIA ISABEL pelo carinho e afeição.

- Aos funcionários da Biblioteca da FEA pela simpatia e trabalhos prestados.
- A RENATA RODRIGUES, SANDRA ALMEIDA e ROGÉRIO KARPISCHEK pelo auxílio no manuseio de microcomputadores e elaboração de programa para gráficos.
- A meu marido, ANTONIO CARLOS, pelo amor, paciência e incentivo em todos os momentos.
- A minha filha, CAROLINA, pela ternura e inspiração.
- A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1. Aspectos gerais.....	2
2. Especificidade.....	2
3. Ocorrência.....	3
4. Obtenção.....	6
5. Purificação da enzima.....	14
6. Propriedades.....	16
7. Inibidores.....	18
8. Aplicações da invertase.....	20
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1. Microrganismos.....	24
2. Meios de cultura.....	25
3. Condições de cultura.....	32
4. Influência de tenso-ativos.....	34
5. Métodos analíticos.....	35
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
1. Seleção do microorganismo.....	42
2. Otimização das condições de cultura.....	50

3. Características da enzima.....	71
4. Extração.....	80
V. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Produção de invertase extracelular por leveduras.	10
TABELA 2 - Atividade da enzima invertase extracelular (AIE) durante a fermentação de diferentes linhagens de leveduras em frascos agitados, após 18 horas de incubação	43
TABELA 3 - Atividade da invertase extra (AIE) e intracelular (AII) de culturas em mini-fermentadores, após 18 horas de incubação em aerobiose e anaerobiose.....	44
TABELA 4 - Evolução de açúcar redutor (AR), atividade de invertase extracelular (AIE) e intracelular (AII) durante fermentação de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em frascos agitados com diferentes meios de cultura.	51
TABELA 5 - Evolução de açúcar redutor (AR) e atividade de invertase extracelular (AIE) e intracelular (AII) durante fermentação de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em frascos agitados, com adição de Tween 80 (TW) e Silicone (SI) em diferentes concentrações (C).....	55

TABELA 6 - Evolução da massa seca (MS), açúcar redutor (AR) e atividade de invertase extracelular (AIE) durante fermentação de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em frascos agitados com o meio 13 em diferentes pHs iniciais.....	57
TABELA 7 - Evolução da massa seca (MS), açúcar redutor (AR) e atividade de invertase extracelular (AIE) durante fermentação de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em mini-fermentadores com o meio 13 a diferentes temperaturas (T).....	59
TABELA 8 - Evolução da massa seca (MS), açúcar redutor (AR) e atividade de invertase extracelular (AIE) durante fermentação de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em frascos agitados com os meios 13, 19, 20, 21, 22 e 23.....	62
TABELA 9 - Evolução da massa seca (MS), açúcar redutor (AR), pH e atividade de invertase extracelular (AIE) durante fermentação de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em frascos agitados, empregando diferentes concentrações de inóculo de cultura mãe em diferentes estágios de idade.....	72
TABELA 10 - Atividade relativa da enzima invertase submetida a diferentes pHs. pH de estabilidade.....	76

TABELA 11 - Rendimento de extração (%) da enzima invertase com etanol e sulfaato de amônio a 70% de saturação..... 80

TABELA 12 - Rendimento de extração (%) da enzima invertase com etanol a 70% de saturação e com adição de íons.. 81

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Esquema do mini-fermentador..... 33
- FIGURA 2 - Curva padrão de Densidade ótica (DO) em unidades de absorbância em função de massa seca (MS)..... 35
- FIGURA 3 - Evolução do pH, crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e intracelular (AII), durante fermentação de *Kluyveromyces lactis* ATCC 10689 em aerobiose.... 46
- FIGURA 4 - Evolução do pH, crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e intracelular (AII), durante fermentação de *Kluyveromyces lactis* ATCC 10689 em anaerobiose....47
- FIGURA 5 - Evolução do pH, crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e intracelular (AII), durante fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em aerobiose 48
- FIGURA 6 - Evolução do pH, crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redu-

tores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e intracelular (AII), durante fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em anaerobiose..... 49

FIGURA 7 - Evolução da atividade invertase extracelular (AIE) durante fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 no meio 13 a diferentes pHs iniciais..... 58

FIGURA 8 - Evolução da atividade invertase extracelular (AIE) durante fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 no meio 13 a diferentes temperaturas..... 60

FIGURA 9 - Evolução da atividade invertase extracelular (AIE) durante fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em diferentes meios 63

FIGURA 10 - Evolução do crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e atividade total (AIT) durante fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 sem controle de pH. 65

FIGURA 11 - Evolução do crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e atividade total (AIT) durante fermentação de *Kluyve-*

romyces bulgaricus ATCC 16045 com controle de pH a 3,5..... 66

FIGURA 12 - Evolução do crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e atividade total (AIT) durante fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 com adição de solução de sacarose 240,0 g/l na razão de 13,60 g/h..... 67

FIGURA 13 - Evolução da atividade invertase total (AIT) no fermentador durante crescimento de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em mini-fermentador sem controle de pH, com controle de pH a 3,5 e com adição de solução de sacarose..... 68

FIGURA 14 - Evolução do crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e atividade total (AIT) durante fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em mini-fermentador com: adição de solução de sacarose e soluções de melão..... 70

FIGURA 15 - Efeito do pH na atividade da enzima invertase extracelular..... 74

FIGURA 16 - Efeito da temperatura na atividade da enzima invertase extracelular.....	74
FIGURA 17 - Efeito da temperatura na estabilidade da enzima invertase extracelular.....	75
FIGURA 18 - Cromatografia em papel. Hidrólise da sacarose pela enzima produzida por <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045.....	77
FIGURA 19 - Cromatografia em papel. Hidrólise da rafinose pela enzima produzida por <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045.....	78
FIGURA 20 - Cromatografia em papel. Hidrólise da melezitose pela enzima produzida por <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045.....	79

RESUMO

Neste trabalho procurou-se obter a enzima invertase extracelularmente. De 13 linhagens de leveduras testadas, *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 foi a mais produtiva. As condições em que se obteve maior produção foi em fermentador aerado, sem controle de pH, a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com adição de sacarose durante o processo fermentativo.

A enzima mostrou ter características muito semelhantes a enzimas produzidas intracelularmente por outras leveduras: boa estabilidade a pH 5,0 e baixa para temperaturas acima de 60°C , pH e temperatura ótimos de atuação respectivamente 4,0 e 50°C e específica para grupos β -frutosil.

SUMMARY

The object of this research was to select a yeast which produced extracellular invertase. *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 was found to be the most productive. The optimum conditions for invertase production were in an aerated fermenter at 30°C with no pH control and with the addition of sucrose during fermentation.

The enzyme showed characteristics very similar to those of the intracellular enzymes produced by others yeasts: good stability at pH 5.0 but low at temperatures above 60°C. The best conditions for activity were pH 4.0 and 50°C, with specificity for β -fructosyl groups.

1. INTRODUÇÃO

A invertase tem sido utilizada quase que exclusivamente na indústria de doces. Esse uso restrito, de um lado se deve ao tipo de substrato no qual ela atua, sacarose, e por outro lado pelo alto custo da enzima. Este último fator é o motivo principal pelo qual a enzima ainda não atingiu uma maior aplicação em atividades industriais, sendo frequentemente substituída pela inversão ácida.

Recentemente tem crescido o interesse no Brasil de se produzir xarope com alto teor de frutose tanto para exportação como para consumo interno. A inversão ácida tem se mostrado inconveniente pelos subprodutos que são formados durante o processo, o que faz certos consumidores preferirem o xarope invertido enzimaticamente. Porém, o preço elevado da enzima importada torna o processo inviável. Portanto o barateamento da produção de invertase seria o primeiro passo a ser dado para reverter esta situação. Este trabalho traz uma colaboração neste sentido ao mostrar que é possível se obter a enzima na forma extracelular, podendo provocar uma redução significativa nos custos de produção, principalmente no que tange a etapas de extração e purificação.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ASPECTOS GERAIS

A invertase (β -D-frutofuranosidase, E.C.3.2.1.26) também conhecida como invertina, sucrase ou sacarase, é uma enzima que hidrolisa a sacarose, fornecendo uma mistura equimolar de glicose e frutose. O xarope resultante desta inversão é mais doce devido ao poder adoçante da frutose, tem ponto de ebulição mais alto e ponto de congelamento mais baixo. Os monossacarídeos formados são mais solúveis e conseqüentemente não se cristalizam tão facilmente, mesmo quando em soluções altamente concentradas.

O nome invertase é derivado da mudança de rotação que ocorre quando a sacarose ($\alpha_D = 66,7^\circ$) é hidrolisada a glicose e frutose ($\alpha_D = -20^\circ$).

2. ESPECIFICIDADE

A invertase atua sobre radicais β -D-frutofuranosil insubstituído. O substrato típico da ação da invertase, a sacarose, sendo ao mesmo tempo um β -frutofuranosídeo e um α -glicosídeo, pode ser hidrolisado por dois tipos diferentes de enzima: a β -D-frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) e a α -D-glicosidase (E.C.3.2.1.20) que atacam a sacarose nos terminais da frutose e glicose, respectivamente (50, 37).

A caracterização das duas enzimas foi baseada original-

mente na habilidade da enzima hidrolisar além da sacarose (glicose-frutose), a rafinose (galactose-glicose-frutose) e melezitose (glicose-frutose-glicose) (50, 41). A rafinose possuindo um resíduo β -D-frutofuranosídeo não substituído é hidrolisado pela invertase mas não pela α -D-glicosidase, enquanto que a melezitose não é hidrolisada pela invertase, mas sim pela α -D-glicosidase.

3. OCORRÊNCIA

A invertase ocorre largamente na natureza, tendo sido observada em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*) (50); fungos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spinulosum* e *Penicillium chrysogenum*); e outros microrganismos (*Actinomicetos*, *Puricularia oryzae*, *Mycorri-za fungi*, *Polystictus sanguineus* e certos líquens); animais (insetos, abelhas, ratos, coelhos, porco) assim como em plantas (trigo, beterraba doce, banana, mamão, cevada germinada, alfafa) (37,65).

REED (50) considera que dentre as diversas fontes de invertase, somente a enzima obtida de levedura é importante para a produção industrial de invertase.

A invertase em células de levedura é encontrada em duas formas: uma glicoproteína contendo 50% de manana e 3% de glicosamina localizada entre a membrana plasmática e a parede celular, também conhecida como enzima externa de alto peso molecular, e uma enzima intracelular desprovida de carboidrato, loca-

lizada exclusivamente no protoplasma e de peso molecular inferior (21, 43, 23). Em geral a invertase produzida pela levedura não é liberada para o meio, contudo WICKERHAM (61), DWORSCHACK e WICKERHAM (15) e IZUKA e YAMAMOTO (29) verificaram que algumas espécies são capazes de produzir enzima extracelularmente.

A invertase externa tem peso molecular de aproximadamente 270.000 e corresponde a maior parte da enzima produzida pela célula, enquanto que a enzima interna tem peso molecular de 135.000 (1, 53).

DWORSCHACK e WICKERHAM (16) trabalhando com *Saccharomyces kluyveri* para a produção de invertase, depararam com uma certa instabilidade do microrganismo. Curiosamente observaram que colônias com 17 dias de idade apresentavam colônias secundárias na superfície das colônias primárias e com 20 a 30 dias de idade essas colônias secundárias eram de duas cores, branca e marron. A colônia branca era geralmente unissexual diplóide ou tetraplóide e a colônia marron era principalmente unissexual triplóide. As colônias marrons são geralmente instáveis, podendo ser estabilizadas por um processo de isolamento sucessivo em placas de Petri, até aparência homogênea da cultura.

O teor de invertase em leveduras é dependente das condições de crescimento e especialmente da concentração de glicose do meio (9). Em células que crescem a baixas concentrações de glicose, a maior parte da invertase produzida é de alto peso molecular e está localizada fora da membrana citoplasmática (57).

MORENO e col. (39) estudando a linhagem de *Saccharomyces* 303-67 e um mutante FH4C em condições de células em altas e bai-

xas concentrações de substrato, constatarem a existência de uma terceira enzima de peso molecular intermediário. Empregando a técnica de eletro-focalização foi possível separar as 3 formas de invertase através de seus pontos isoelétricos. A enzima mais leve com $pI=3,4$, a enzima mais pesada com $pI=4,2$ e a forma intermediária com $pI=5,0$.

A invertase leve e pesada estão em concentrações similares em células reprimidas, mas em células não reprimidas a concentração da invertase pesada aumenta atingindo 80% da enzima total, confirmando os resultados de DAVIES (9). A forma intermediária está presente em células não reprimidas tanto de *Saccharomyces* 303-67 como em *Saccharomyces* FH4C.

A existência de diferentes formas de enzima pesada tem sido sugerida por alguns autores (23), mas MORENO e col. (39) acreditam que a forma existente fora da membrana citoplasmática é homogênea.

Há muitas controvérsias quanto à secreção de enzima exocelular em leveduras (21). Alguns autores (28, 5, 1) acreditam que a enzima interna possa ser um precursor ou um produto de degradação durante a síntese da enzima pesada (31). BETETA e GASCÓN (6) acreditam que primeiro ocorra a síntese da proteína (enzima leve) e depois uma adição sequencial de manose, formando um espectro contínuo de invertase com pesos moleculares crescentes de acordo com o teor de manana, sendo então a enzima pesada, contendo 50% de carboidrato, excretada no espaço periplasmático. A transformação da enzima leve para pesada parece ser compatível com os dados obtidos por MORENO e col. (39), que verificaram

que na presença de 2-Deoxy-D-glicose, sob condições de inibição da síntese de invertase, houve um acúmulo das formas moleculares leve e intermediária, como consequência da interferência no processo de glicosilação.

RODRÍGUEZ e col. (53) também mostraram a existência de três diferentes invertases. Duas estão no citoplasma, uma livre de carboidrato e solúvel no citoplasma e a outra parcialmente glicosilada, ligada à membrana. A terceira forma é também glicosilada e secretada para o exterior celular. Uma relação entre produto e precursor parece estar associada à enzima ligada à membrana e à periplasmática, mas a relação entre a enzima presente no citoplasma e outras formas é desconhecida.

THACZ e LAMPEN (60) verificaram a maneira como a enzima é transportada através da barreira permeável da célula usando técnicas de imunofluorescência e determinaram a distribuição superficial de moléculas de invertase sintetizadas em células. Diversos mecanismos foram propostos para explicar este transporte, sendo que LAMPEN (30) propôs que exoenzimas são formadas ao longo de invaginações características da membrana plasmática de levedura e são lançadas para o periplasma da célula.

4. OBTENÇÃO

A invertase de levedura foi descoberta por PERSOZ em 1833 e purificada pela primeira vez em 1860 por BERTHELOT através de precipitação alcoólica. Embora muitos dos estudos fundamentais da cinética enzimática tenham sido realizados, a enzima de leve-

dura ainda não foi obtida na forma cristalina. Isto se deve, provavelmente, à presença de polímananas que se aderem à enzima durante o processo de purificação (43, 37).

Uma variedade de técnicas tem sido empregadas para romper as células e obter a enzima, dentre elas temos: sonificação (62), autólise (45)), lise enzimática (49), ruptura mecânica de células (19, 17). Os métodos mais amplamente empregados são lise enzimática e disruptores mecânicos com esferas de vidro (63).

WILLIAM e WISEMAN (62) submeteram células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fase exponencial a uma agitação violenta com esferas de vidro em Vibro-Mill a 2°C. Após agitação violenta fizeram diversas lavagens com tampão acetato de sódio pH 4,7 e centrifugaram para remoção das paredes celulares e células inteiras. Simultaneamente os autores investigaram a lise enzimática da parede celular. Células de levedura foram pré-tratadas com tampão fosfato citrato de potássio 0,1M pH 5,8 contendo como aditivo mercaptoetanol e EDTA a 30°C por 30 minutos. As células foram então ressuspensas em solução tampão, a enzima adicionada e a mistura foi então incubada a 30°C por vários períodos. Dos dados obtidos, verificaram que a solubilização da invertase foi observada após 10 minutos de tratamento no Vibro-Mill e correspondeu a 80% da atividade total, com 20% de destruição. Neste mesmo intervalo de tempo o tratamento enzimático solubilizou somente 7,5% da enzima, mas após 60 minutos, 90% da enzima foi encontrada no sobrenadante e 10% remanescente na parede celular. Observações ao microscópio de células tratadas com

a enzima revelaram uma completa remoção da parede.

WISEMAN e JONES (64) reportaram que somente técnicas enzimáticas, autólise com tolueno-papaina ou tratamento prolongado com enzima solubilizavam invertase em quantidades realmente significantes. FOLLOWS e col. (19), entretanto, usando homogenizador de alta pressão Manton-Gaulin, encontrou 100% de solubilização de invertase após 90 minutos de tratamento.

HESTRIN e col. (27) relatou a extração da invertase através de degradação da membrana de levedura por plasmólise seguida por uma solubilização de componentes ligados à membrana por meio de autólise. A célula de levedura foi plasmolizada a pH 6,0 pela mistura de acetato de sódio. Após a massa ter sido liquefeita, tolueno foi adicionado e a mistura foi emulsificada com um vibrador e deixada em repouso a 37°C por 60 minutos. Após este período, adicionou-se ácido acético até pH 4,5 e centrifugou-se. Foram formadas três camadas, sendo que na camada mais leve se encontra a invertase.

BABCZINSKI (5) obteve a invertase de levedura incubando células de *Saccharomyces cerevisiae* X 2180 com deoxycholate 1% durante uma noite à temperatura ambiente. Posteriormente foi centrifugado e o extrato dialisado contra solução tampão acetato 50 μ M pH 5,0 e fluoreto de fenilmetilsulfonil 7 μ M. Centrifugou-se novamente sendo o extrato passado em coluna de DEAE-Sephadex para purificação.

IGLESIAS e col. (28) fermentaram *Saccharomyces* 303-67 e obtiveram a enzima por ruptura da célula com homogenizador Braun MSP com esferas de vidro e centrifugação.

Em contraste a todas as técnicas de extração da invertase de levedura localizada na periferia da célula, WICKERHAN (61) mostrou que a enzima pode ser liberada para o meio de cultura por diversos microrganismos, eliminando assim a etapa de extração. Para provar que a enzima era excretada por células vivas, o autor realizou testes com *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y-898 com e sem adição de tolueno. Verificou que a cultura sem adição de tolueno teve uma alta produção de células vivas e invertase, com poucas células mortas. O mesmo não aconteceu com a adição de tolueno, evidenciando que a invertase é produzida por células vivas.

Em outro experimento, a fim de verificar se a invertase era produzida por células propagadas aerobicamente, o autor cultivou o microrganismo com agitação intensa. Verificou que a produção de enzima é aproximadamente paralela ao crescimento celular. A taxa de multiplicação celular e secreção de invertase diminui após 48 horas, mas a contagem de células mortas aumentou com o tempo. Isto prova que a invertase solúvel é proveniente de células vivas. Os dados da tabela 1, obtidas por WICKERHAN (61), mostram que a produção da enzima é característica de cada linhagem, com quantidades variáveis.

DWORSCHACK e WICKERHAM (15) trabalhando com *Saccharomyces uvarum* NRRL-Y-972, testaram condições aeróbicas e anaeróbicas, bem como a produção de invertase extra e intracelular. O preparo e manuseio da cultura foi similar ao empregado por WICKERHAM (61).

Tabela 1

Produção de invertase extracelular por leveduras

Name of Culture	Number	Invertase Activity, units/ml.	
		Aerobic	Anaerobic
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (unisexual haploid)	Y-4288-7H1	298.4	
Do	Y-4288-18H2	253.6	
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (unisexual diploid)	Y-4288-7D2	337.2	
Do	Y-4288-18D2	300.8	
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (unisexual polyploid)	Y-4288-Code 3	791.6	162.8
Do	Y-4288-Code 4	491.0	267.2
Do	Y-4288-Code 15	380.5	223.6
Do	Y-4288-Code 18	278.5	434.4
Do	Y-4288-Code 20	580.0	201.2
Do	Y-4288-Code 25	385.0	465.2
Do	Y-4288-Code 27	385.0	
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (bisexual diploid)	Y-4288-7H1X13H2	13.1	
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (bisexual triploid)	Y-4288-7D2X13H2	24.3	
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (bisexual tetraploid)	Y-4288-7D2X13D2	25.1	
<i>Candida</i> (<i>Torulopsis</i>) <i>utilis</i>	Y-900	243.6	10.0
<i>Candida</i> (<i>Torulopsis</i>) <i>utilis</i> v. <i>thermophila</i>	Y-1082	209.0	15.4
<i>Candida</i> (<i>Torulopsis</i>) <i>utilis</i> v. <i>major</i>	Y-1084	134.0	18.7
<i>Torulopsis colliculosa</i>	Y-172	210.8	7.1
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Y-972	138.0	51.0
<i>Saccharomyces validus</i>	Y-1374	53.9	26.0
<i>Saccharomyces fragilis</i>	Y-1109	38.3	8.3
<i>Saccharomyces oviformis</i>	Y-1356	36.0	20.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y-898	31.6	45.4
<i>Saccharomyces locis</i>	Y-1205	27.7	30.7
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Y-379	5.7	4.0
<i>Zyposaccharomyces ashbyi</i>	Y-1598	84.0	63.4
<i>Kluyveromyces polysporus</i>	Y-2399	54.6	54.2
<i>Torulaspora rosei</i>	Y-1567	50.6	7.1
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	Y-1361	41.3	38.6
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Y-974	14.0	16.7
<i>Endomycopsis chodatii</i>	Y-1933	13.1	3.5
<i>Endomycopsis fibuliger</i>	Y-25	2.9	26.8
<i>Candida fiareri</i>	Y-1476	5.4	15.4
<i>Debaryomyces hioeckeri</i>	Y-833	0	20.5

Incubation temperature: 28° C. Incubation time: 144 hours.

Fonte: DWORSCHACK e WICKERHAM (16)

Amostras foram retiradas de tempos em tempos para teste de atividade enzimática e contagem de células vivas e mortas. O sobrenadante, após centrifugação, foi usado diretamente para o teste de atividade e as células lavadas foram agitadas com tolueno e ficaram a 28°C por 7 dias, sendo agitadas diariamente.

Ao final de 7 dias foi novamente centrifugado e o sobrenadante testado quanto à atividade. As células foram suspensas em tolueno e armazenada a 28°C por mais 7 dias. Este procedimento foi repetido 3 vezes, sendo que a atividade do terceiro sobrenadante foi quase nula. Simultaneamente foi testada a estabilidade da enzima e verificou ser ela estável.

A atividade enzimática extracelular de *Saccharomyces uvarum* NRRL-Y-972 em condições aeróbicas foi 3 vezes superior à obtida em condições anaeróbicas, contrastando com os resultados obtidos por WICKERHAN (61) que encontrou quantidades iguais ou levemente superior para culturas anaeróbicas de *Saccharomyces cerevisiae* Y-898.

A liberação dos constituintes da célula por autólise pode ser variável. A fim de consubstanciar os dados obtidos, DWORSCHECK e WICKERHAN (16) fizeram também uma desintegração mecânica de microrganismos, partindo de células correspondentes a 500 ml de cultura em condições aeróbicas, e verificaram que a desintegração de células liberam aproximadamente 70-80% mais atividade do que o método de autólise com tolueno. Embora tendo sido melhor a extração, o método mecânico foi abandonado porque a solução tornou-se cinza e pequenas partículas de metal foram observadas.

A fim de constatar a proveniência da invertase extracelular, os autores cultivaram *Saccharomyces uvarum* NRRL-Y-972 em condições aeróbicas. Após 14 horas de fermentação o crescimento foi abundante. Dois frascos contendo o meio fermentado foram re-colocados no shaker, um com adição de tolueno e outro sem adi-

ção. Verificou-se que a produção de invertase extracelular parou rapidamente após a adição de tolueno e a liberação da enzima a partir de células mortas foi desprezível no decorrer de 186 horas de experimento, confirmando que a produção de invertase é proveniente de células vivas. Em outro experimento foi verificado que concentrações de sacarose variando de 3 a 10% são propícias à produção da enzima durante as primeiras 48 horas de fermentação. Foi verificado igualmente que taxas de aeração de 0,2 a 1,6 mmoles de O_2 /ml/min favorecem a produção de invertase, enquanto que taxas de 3,0 mmol O_2 /ml/min, são inibitórias.

IIZUKA e YAMAMOTO (30) estudando *Candida utilis* 6020 verificaram que o máximo crescimento celular foi obtido em condições aeróbicas após 70 horas de incubação, enquanto que a maior atividade enzimática foi observada depois de 140 horas de cultura, evidenciando que a atividade aumenta quando o substrato é totalmente consumido e o crescimento celular é máximo.

Para verificar como a enzima foi liberada pelas células, os autores ressuspenderam células em tampão fosfato M/50 pH 5,0 com e sem adição de 1% de açúcar. Foi possível verificar após incubação que a maior liberação da enzima ocorreu sem adição de qualquer fonte de carbono, em condições aeróbicas. Concluíram então que células de levedura liberam invertase em condições aeróbicas e na ausência de açúcar (29).

O fator que controla o aparecimento da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* parece ser a concentração de glicose no meio. O aparecimento da atividade não tem relação com a fase de crescimento, mas é retardado com o aumento da concentração ini-

cial de glicose. Assim, DODYK e ROTHSTEIN (11) verificaram que com 0,025 M de glicose, a atividade apareceu na metade da fase logarítmica, com 0,1 M de glicose ela apareceu no final da fase logarítmica e com 0,3 M de glicose ela apareceu na fase estacionária. Com o aumento da concentração de glicose, a quantidade de glicose em excesso e a taxa de formação de piruvato são aumentadas. Para a utilização do piruvato existem 2 caminhos: um caminho oxidativo com a formação de acetil Co-A e um caminho descarboxilativo, com a formação de acetaldeído, etanol e acetato. A concentrações inferiores a 0,01M, os produtos do caminho descarboxilativo são mínimos, mas com o aumento do teor de glicose estes produtos se acumulam rapidamente, inibindo o aparecimento de invertase.

A adição de intermediários do metabolismo de glicose também reprime o aparecimento da invertase. Estes intermediários incluem compostos de 2 carbonos (acetaldeído, etanol e acetato) assim como ácidos dicarboxílicos (malato, fumarato e succinato).

Testando diferentes fontes de carbono para obtenção de invertase em *Candida utilis*, IIZUKA e YAMAMOTO (29) verificaram que não houve diferença marcante no crescimento celular e atividade enzimática liberada ao meio com o emprego de sacarose, glicose e maltose. Isto levou-os a concluir que a invertase é uma enzima constituinte, concordando com o afirmado por WICKERHAN (61) para as diversas linhagens de levedura capazes de produzir invertase extracelularmente.

Segundo alguns autores (51, 52) o uso de agente tenso-ativo não iônico, tween 80, estimulou a produção de enzima inver-

tase. Substratos e produtos modificados frequentemente fornecem maior produção que compostos sem modificações, atuando em alguns casos como agente ativo de superfície .

5. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

Desde que se obtenha a enzima na forma solúvel é necessário separá-la dos demais compostos indesejáveis na solução (proteínas e enzimas).

Sabendo-se que as proteínas diferem entre si quanto a solubilidade, densidade de carga, tamanho, forma, densidade, grupos reativos específicos e estabilidade relativa, sendo possível isolar uma determinada proteína baseando-se nestas propriedades características.

Não existe um critério rigoroso para a purificação da enzima, mas um procedimento aconselhável inicia-se com precipitação fracionada por solvente orgânico ou sulfato de amônio. Esta etapa não apresenta grande capacidade de resolução e geralmente são seguidos por métodos cromatográficos. Frequentemente a cromatografia de exclusão molecular e a cromatografia de troca iônica são empregadas, em qualquer uma das sequências, para se obterem frações enriquecidas da enzima desejada, e tendo como base seu tamanho molecular e carga elétrica, respectivamente. Para uma purificação final a enzima é submetida a eletroforese de disco ou eletrofocalização a fim de se detectar o grau de pureza da mesma (67, 32).

Baseando-se nestes princípios, LESKOVAC e col. (33) puri-

ficaram invertase por cromatografia em DEAE-Sephadex, obtendo uma atividade específica de 1400-2000 unidades/mg, onde uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima catalisando a formação de 1 mmol de produto por minuto.

NEWMAN e LAMPEN (43) estudando invertase de *Saccharomyces* FH4C, precipitaram-na inicialmente com etanol e sulfato de amônio e depois utilizaram cromatografias consecutivas com Sephadex G-25, SE-Sephadex C-50 e DEAE-Sephadex A-50. A enzima obtida teve uma atividade específica de 2700-3000 umoles de sacarose/min/mg de proteína a 30°C.

Outros autores (28) utilizaram colunas com Sephadex G-200 e conseguiram separar a invertase de *Saccharomyces* 303-67 em isoenzimas de pesos moleculares distintos, obtendo as formas extracelular ($\text{Volume eluído (Ve) / Volume morto (Vo)} = 1,07$), a intracelular ($\text{Ve/Vo} = 1,65$) e a intermediária (Ve/Vo variando de 1,07 a 1,65, dependendo da concentração de glicose do meio).

GASCÓN e LAMPEN (21) obtiveram invertase interna de mutante *Saccharomyces* FH4C por precipitação com sulfato de amônio e posterior cromatografia em DEAE-Sephadex A-50. As frações ativas foram reunidas e passadas em coluna de sulfoetil Sephadex, atingindo uma purificação da ordem de 2500 vezes em termos de proteína.

IIZUKA e YAMAMOTO (29) obtiveram a invertase de *Candida utilis* através de precipitação com acetona, seguida por cromatografia com DEAE-celulose e Sephadex G-200.

MORENO e col. (39) investigando formas intermediárias de invertase em células não reprimidas de *Saccharomyces* 303-67, ve-

rificaram que a invertase pesada é extremamente abundante e parece mascarar a presença das outras formas. Sua remoção se faz necessário e pode ser efetuada por precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação, onde a maioria da enzima pesada é solúvel. O precipitado contém 20 a 30% do total da enzima pesada. Através de filtração em gel Sephadex G-200 os autores conseguiram separar além da forma leve predominante ($V_e/V_o = 1,75$), duas formas de invertase intermediária com $V_e/V_o = 1,20$ e $1,34$, respectivamente.

6. PROPRIEDADES

A invertase de levedura compõe-se de uma forma externa à membrana citoplasmática e uma forma intracelular. A enzima externa tem peso molecular de aproximadamente 270.000 e é constituída de aproximadamente 30 cadeias de manana ligadas à proteína por ligações glicosamílicas-asparagina (43, 44). COLONNA e col. (8) constatarem que essa enzima contém ligações covalentes de fosfato, sugerindo que a acidez da enzima externa varia de acordo com o grau de fosforilação. Isto foi verificado por eletrofocalização de invertase proveniente de levedura FH4C, a qual forneceu uma heterogeneidade de pontos isoelétricos, variando de 3,67 a 2,7.

A enzima intracelular com peso molecular de 135.000 além de diferir da invertase externa quanto à localização, difere na estrutura primária, possuindo quantidades distintas de glicina, tirosina, cisteína e histidina (21).

A condição de máxima atividade para invertase é encontrada a pH entre 4 e 5, e temperatura entre 50 a 60°C. A reação é máxima para soluções com 5-10% de sacarose (14, 24, 65), caindo 25% para soluções concentradas a 70% (24).

WISEMAN e WOODWARD (66) estudando a estabilidade térmica da enzima verificaram que na ausência de substrato a invertase de *Saccharomyces cerevisiae* perde quase toda sua atividade quando aquecida a 65°C por 15 minutos. A invertase de *Candida utilis* tratada similarmente, perde 25% da atividade quando previamente purificada, ao passo que, na forma bruta ela é termooestável a esta temperatura.

Alguns autores verificaram que a estabilidade enzimática está diretamente relacionada com o teor de carboidrato da molécula. ARNOLD (2) verificou que o teor de carboidrato da enzima e inativação térmica são inversamente correlacionados, sendo que a manana estabiliza a proteína.

Em contraste, SMITH e BALOU (55) verificaram que a completa remoção da manana não afetou a atividade nem a estabilidade térmica da enzima a 37°C.

Pelo fracionamento de invertase, WOODWARD e WISEMAN (68) verificaram 4 picos de atividade onde a razão de carboidrato/proteína diferiu significativamente. A taxa de inativação térmica para cada uma dessas isoenzimas foram correlacionadas inversamente com seu teor de carboidrato. A invertase interna, desprovida de manana, teve toda sua atividade perdida depois de 2 minutos a 65°C. A fim de estudar a influência da manana, removeram-na completamente da invertase extracelular por precipitação

com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100% e verificaram que a estabilidade térmica a 65°C foi similar à enzima nativa, confirmando os resultados obtidos por SMITH e BALOU (55). A remoção artificial da manana fornece produtos estáveis diferentes das isoenzimas com baixo teor de carboidrato. Isto evidencia que a enzima interna é conformacionalmente instável, enquanto que a externa é estável.

Quanto ao pH, LESKOVAC e TRIVICK (33) notaram que a enzima é estável em pH entre 3,5 a 8,5. Em meio ácido ocorre rápida inativação abaixo de pH 3,5, e em pH alcalino acima de pH 10.

7. INIBIDORES

Entre os diversos pesquisadores que se dedicaram ao estudo da invertase, MYRBACK se destacou por haver se dedicado à ação de inibidores e sua cinética. A enzima é fortemente inibida por íons metálicos, particularmente a prata. O íon metálico se combina com a histidina da molécula da enzima (36). A inibição por zinco é reversível e não competitiva e é fortemente dependente do pH, aparentemente devido à formação de um dímero (38). Quanto ao íon mercúrio, DRAETTA (13) verificou que em concentrações de HgCl_2 de $5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, ele atua como um ativador da enzima externa e inibe não competitivamente a forma interna. A concentrações entre $3,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ este reagente inibe competitivamente a forma solúvel.

A inibição pelo iodo é um fato incomum. Se uma pequena quantidade de iodo é adicionada a uma solução de invertase, a atividade da enzima diminui até atingir cerca de 55% do valor

original. Se o iodo é adicionado em excesso, inativação acontece após um decréscimo mais lento da atividade. Assim, a inativação da invertase pelo iodo é provocada por duas reações distintas: uma, muito rápida, forma um derivado I-invertase com atividade cerca de 45% menor que a enzima natural, e outra, mais lenta, transformando o complexo I-invertase num derivado completamente inativo (36).

Conforme REED (50), uréia a baixas concentrações produz inativação imediata sem alterar as propriedades físicas da enzima. A altas concentrações (8 M a pH 5,0), ou a valores de pH acima de 6,0, ocorre inativação irreversível, juntamente com mudanças da estrutura secundária e terciária (50).

Quanto às substâncias orgânicas que atuam como inibidores da enzima temos: anilina, o,m,p-toluidina, tricloro e tribromo anilinas (27), ácidos aminobenzóicos, ácidos sulfanílicos (42) e ácido iodoacético (12). A anilina apresenta uma inibição reversível não competitiva (59). O efeito inibidor do ácido iodoacético foi constatado por DRAETTA (14), sem contudo identificar o tipo de inibição.

NEWMAN e LAMPEN (43) verificaram que p-mercuribenzoato inibe a enzima somente a altas concentrações. Outros reagentes tais como iodoacetamida, ácido iodoacético e N-etil--maleimida não inibiram a enzima.

LIRAS e GASCÓN (34) trabalhando com o protoplasma de *Saccharomyces* 303-67 e *Saccharomyces* FH4C verificaram que tanto o ciclo heximide quanto 2 deoxy-D-glicose inibem a formação de glicoproteínas, bloqueando a síntese e secreção do complexo ma-

nana-proteína.

Ácido nitroso causa inativação irreversível, presumivelmente pelo ataque de grupos aminos livres (27).

Testando os efeitos tóxicos de taninos condensáveis e hidrolizáveis, STRUMEYER e MALIN (56) verificaram que ambos reagem com enzimas para formar complexos, diminuindo a atividade, mas somente os taninos condensados produzem complexos enzimáticos estáveis, que não reagem mesmo parcialmente. A invertase extracelular de levedura é uma enzima diferente das proteínas típicas por ser capaz de tolerar a ação do tanino condensado, tendo sido reconhecida como a primeira enzima a resistir a este tipo de inibidor. Esta resistência é uma consequência de sua natureza glicoprotéica, onde provavelmente ocorre a ligação do tanino com o carboidrato, sem precipitar ou alterar a atividade enzimática.

Quanto ao efeito do substrato, RODRÍGUEZ e col. (53) verificaram que a síntese de invertase de levedura ocorre em presença de baixas concentrações de glicose. Concentrações superiores a 1% provocam uma inibição catabólica, não tendo efeito na secreção ou atividade catalítica (40).

DAVIES (10) constatou que concentrações de glicose superiores a 0,001% eram prejudiciais à síntese de invertase por *Saccharomyces fragilis*, enquanto que para *Saccharomyces cerevisiae*, DODYK e ROTHSTEIN (11) encontraram esse limite a 0,18% e RODRÍGUEZ e col. (53) a 1%.

8. APLICAÇÕES DA INVERTASE

A invertase é de grande aplicação na indústria de alimentos por hidrolizar soluções concentradas de sacarose, fornecendo soluções com maior poder adoçante, com temperatura de ebulição mais elevada e ponto de congelamento mais baixo.

A inversão da sacarose pode ser feita tanto por hidrólise ácida como enzimática. A hidrólise ácida usando HCl 2N é o processo comercial preferido nos EUA, enquanto que a conversão enzimática é praticada em alguns países da Europa e Japão (25). Cada um desses métodos tem suas vantagens e desvantagens. Na hidrólise enzimática temos baixo custo do catalisador, alta porcentagem de conversão (90%), tempo de residência no reator menor que o método químico, solução de açúcar invertido incolor e temperatura do processo mais baixa. O inconveniente deste método é que a operação precisa ser realizada em batelada e a enzima não pode ser reutilizada.

Na hidrólise ácida temos baixo custo do catalisador e facilidade em se usar reator tubular em processo contínuo. Como desvantagem depara-se com a baixa porcentagem de conversão (65-70%), tempo de residência elevado no reator, solução de açúcar invertido colorida e temperatura do processo elevada. A hidrólise ácida pode produzir furfural e outros agentes aromáticos indesejáveis, assim como oligossacarídeos por reações de polimerização (63).

A tendência atual é o emprego da hidrólise enzimática. O desenvolvimento de enzimas imobilizadas oferece uma maneira alternativa de tornar o processo contínuo possível e economicamente viável. Neste sentido já existem muitos trabalhos publicados,

embora muitos deles não tipifiquem as condições de processo comercial e utilizem baixas concentrações de substrato e temperaturas brandas (25).

O maior emprego da enzima se encontra na manufatura de confeitos com recheios liquefeitos. Tais formulações consistem principalmente de sacarose, xarope de glicose, açúcar invertido e outros componentes. A invertase é agregada a uma baixa dosagem e hidrolisa a sacarose lentamente. A adição da enzima resulta em:

a) o centro do confeito torna-se mais mole ou mesmo liquefeito,

b) a frutose resultante da sacarose é higroscópica e previne a perda de umidade do produto,

c) a frutose inibe cristalização de outros componentes e assegura uma consistência adequada,

d) a inversão da sacarose aumenta a pressão osmótica o suficiente para inibir a fermentação (48).

A invertase tem ainda as seguintes aplicações:

- em produtos para higiene oral a fim de evitar a formação de placas dentais ou remoção das mesmas (7),

- na indústria de refrigerantes,

- na indústria de papel para produzir levulose usada como agente plastificante (16),

- no preparo de D-frutose a partir de inulina, melibiose a partir de rafinose, gentiose a partir de gentianose e hexose fosforilada a partir de sacarose monofosfatada (16),

- na hidrólise de sacarose em fermentação contendo meio d

e cultura com melão para melhorar crescimento de microrganismos,

- uso terapêutico, na análise clínica de urina

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. MICRORGANISMOS

Foram testadas as seguintes linhagens de levedura quanto à capacidade de produção de invertase extracelular:

- a) *Saccharomyces cerevisiae* UD-224
- b) *Saccharomyces cerevisiae* Y-978
- c) *Saccharomyces ellipsoideus* IZ-608
- d) *Saccharomyces uvarum* NRRL-1348
- e) *Saccharomyces uvarum* IZ-785
- f) *Kluyveromyces fragilis* ATCC-8635
- g) *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC-16045
- h) *Kluyveromyces fragilis* NRRL-Y-2415
- i) *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1193
- j) *Kluyveromyces lactis* ATCC-10689
- k) *Saccharomyces cerevisiae* IZ-888
- l) *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1908
- m) *Saccharomyces cerevisiae* Y-2034

As culturas de *Kluyveromyces* (f,g,h,i,j) são estocadas em caldo lactosado e as demais são mantidas em meio potato dextrose agar (PDA) inclinado em tubo de ensaio.

2. MEIOS DE CULTURA

- MEIO DE MANUTENÇÃO - CALDO LACTOSADO

Extrato de levedura..... 3,0 g/l
Extrato de malte..... 3,0 g/l
Peptona..... 5,0 g/l
Lactose.....225,0 g/l
pH 6,8

- MEIO 1 (15)

Sacarose..... 30,0 g/l
Peptona..... 5,0 g/l
Extrato de levedura..... 3,0 g/l
pH 6,0

- MEIO 2 (21)

Glicose..... 40,0 g/l.
(NH₄)₂SO₄..... 2,0 g/l
Extrato de levedura..... 10,0 g/l
pH 5,5

- MEIO 3 (46)

Glicose..... 20,0 g/l
Peptona..... 20,0 g/l
Extrato de levedura..... 10,0 g/l
ph 6,8

- MEIO 4 (28)

Glicose..... 10,0 g/l

Extrato de levedura..... 10,0 g/l

pH 6,8

- MEIO 5 (*)

Melaço..... 21,0 g/l

Peptona..... 20,0 g/l

Extrato de levedura..... 10,0 g/l

pH 6,8

- MEIO 6 (*)

Melaço..... 21,0 g/l

Uréia..... 15,0 g/l

Extrato de levedura..... 10,0 g/l

pH 6,8

- MEIO 7 (*)

Melaço..... 21,0 g/l

Uréia..... 20,0 g/l

Extrato de levedura..... 10,0 g/l

pH 6,8

- MEIO 8 (*)

Melaço..... 21,0 g/l .

Uréia..... 25,0 g/l

Extrato de levedura..... 10,0 g/l

pH 6,8

- MEIO 9 (*)

Melaço..... 21,0 g/l

Água maceração milho (AMM)...150,0 g/l

Extrato de levedura..... 10,0 g/l

pH 6,8

- MEIO 10 (*)

Melaço..... 21,0 g/l

Água maceração milho (AMM)...200,0 g/l

Extrato de levedura..... 10,0 g/l

pH 6,8

- MEIO 11 (*)

Melaço..... 21,0 g/l

Água maceração milho (AMM)...250,0 g/l

Extrato de levedura..... 10,0 g/l

pH 6,8

- MEIO 12 (*)

Melaço..... 30,2 g/l

Peptona..... 20,0 g/l

Extrato de levedura..... 10,0 g/l

pH 6,8

- MEIO 13 (*)

Melaço..... 30,2 g/l
Água maceração milho (AMM)... 40,0 g/l
 KH_2PO_4 5,0 g/l
pH 6,8

- MEIO 14 (*)

Melaço..... 30,2 g/l
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,0 g/l
 KH PO 5,0 g/l
pH 6,8

- MEIO 15 (*)

Melaço..... 30,2 g/l
Água maceração milho (AMM)... 40,0 g/l
 KH_2PO_4 5,0 g/l
Extrato de levedura..... 1,0 g/l
pH 6,8

- MEIO 16 (*)

Melaço..... 30,2 g/l
Água maceração milho (AMM)... 40,0 g/l
 KH_2PO_4 5,0 g/l
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,65 g/l
pH 6,8

- MEIO 17 (*)

Melaço..... 30,2 g/l
Água maceração milho (AMM)... 40,0 g/l
pH 6,8

- MEIO 18 (*)

Melaço..... 30,2 g/l
Água maceração milho (AMM)... 40,0 g/l
 KH_2PO_4 5,0 g/l
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,0 g/l
pH 6,8

- MEIO 19 (*)

Melaço..... 10,0 g/l
Água maceração milho (AMM)... 40,0 g/l
 KH_2PO_4 5,0 g/l
pH 3,5

- MEIO 20 (*)

Melaço..... 25,0 g/l
Água maceraçãomilho (AMM).... 40,0 g/l
 KH_2PO_4 5,0 g/l
pH 3,5

- MEIO 21 (*)

Melaço..... 50,0 g/l
Água maceração milho (AMM)... 40,0 g/l
 KH_2PO_4 5,0 g/l
pH 3,5

- MEIO 22 (*)

Melaço..... 75,0 g/l
Água maceração milho (AMM)... 40,0 g/l
 KH_2PO_4 5,0 g/l
pH 3,5

- MEIO 23 (*)

Melaço.....100,0 g/l
Água maceração milho (AMM)... 40,0 g/l
 KH_2PO_4 5,0 g/l
pH 3,5

(*) Meio formulado tomando como base a variação de determinados nutrientes e respectivas fontes.

Para efeito de comparação, os meios de cultura empregados foram reunidos no quadro a seguir:

COMPOSICAO DOS MEIOS DE CULTURA											
MEIOS	pH	SACAROSE (g/l)	GLICOSE (g/l)	MELAÇO (g/l)	EXT. LEVEDURA (g/l)	PEPTONA (g/l)	UREIA (g/l)	A.M.N. (g/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	KH ₂ PO ₄ (g/l)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/l)
1	6,0	30,0			3,0	5,0					
2	5,5		40,0		10,0				2,0		
3	6,8		20,0		10,0	20,0					
4	6,8		10,0		10,0						
5	6,8			21,0	10,0	20,0					
6	6,8			21,0	10,0		15,0				
7	6,8			21,0	10,0		20,0				
8	6,8			21,0	10,0		25,0				
9	6,8			21,0	10,0			150,0			
10	6,8			21,0	10,0			200,0			
11	6,8			21,0	10,0			250,0			
12	6,8			30,2	10,0	20,0					
13	6,8			30,2				40,0		5,0	
14	6,8			30,2					5,0	5,0	
15	6,8			30,2	1,0			40,0		5,0	
16	6,8			30,2				40,0		5,0	0,65
17	6,8			30,2				40,0			
18	6,8			30,2				40,0	5,0	5,0	
19	3,5			10,0				40,0		5,0	
20	3,5			25,0				40,0		5,0	
21	3,5			50,0				40,0		5,0	
22	3,5			75,0				40,0		5,0	
23	3,5			100,0				40,0		5,0	

3. CONDIÇÕES DE CULTURA

a) Preparo do inóculo

Tubos de ensaio contendo 5 ml de meio de cultura foram esterilizados a 121°C por 15 minutos, resfriados a 30°C e inoculados com uma alçada da cultura em estoque. Estes frascos foram mantidos em repouso a 30°C por 24 horas.

A seguir, erlenmeyers de 500 ml contendo 100 ml de meio de cultura foram esterilizados de maneira similar e receberam 5% da cultura anterior. Foram incubados em shaker a 200 rpm, 30°C por 24 horas.

b) Fermentação em frascos agitados

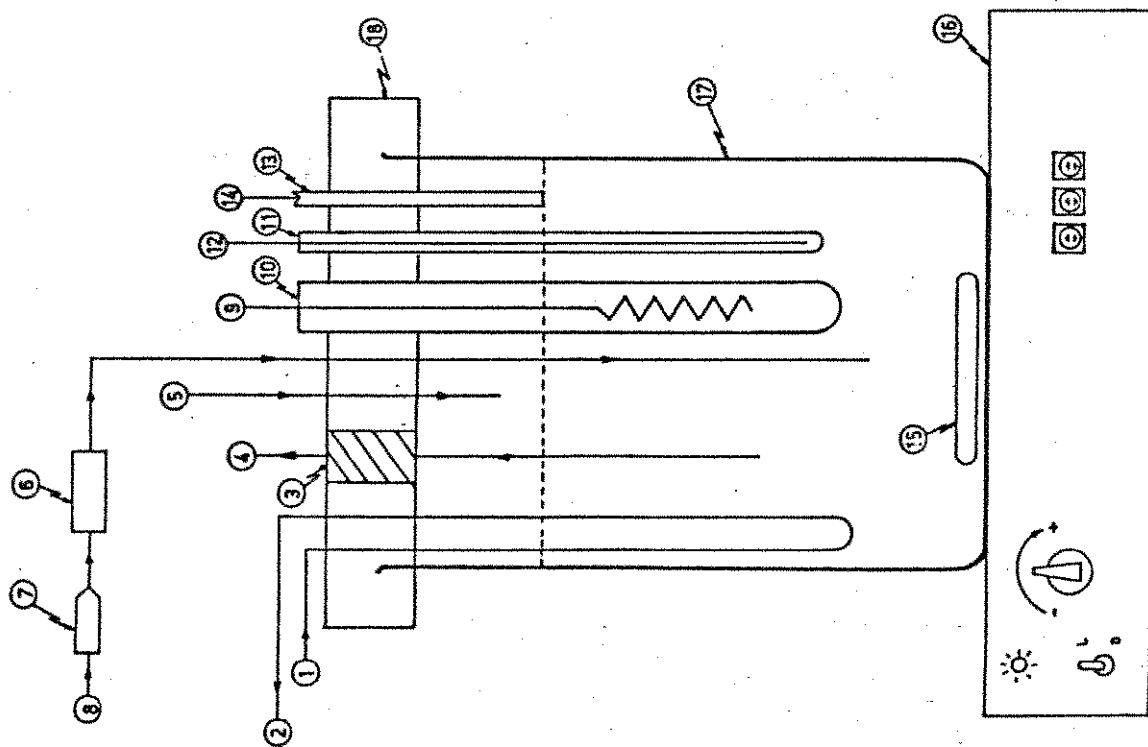
Erlenmeyers de 500 ml contendo 100 ml de meio de cultura foram esterilizados, resfriados e inoculados com 5% de inóculo. Essa cultura foi incubada a 30°C em shaker a 200 rpm.

c) Culturas em mini-fermentador

c.1) Culturas aeróbicas

Mini-fermentadores Modelo M-1000 da Fermentation Design Inc. (Fig. 1) com capacidade de 1000 ml contendo 600 ml de meio de cultura foram esterilizados, resfriados e inoculados com 5% de inóculo. A fermentação foi mantida a 30°C sob agitação e com aeração de 1 VVM.

ESQUEMA DO MINIFERMENTADOR



1. Entrada de água para resfriamento
2. Saída de água do resfriamento
3. Diafragma de borracha para introdução de seringas: ino
lação, controle de pH, espuma, retirada de amostra
4. Retirada de amostra através de seringa
5. Entrada de meio (alimentação)
6. Filtro de ar com leito de lã de vidro
7. Rotâmetro
8. Linha de entrada de ar
9. Termostato
10. Tubo pirex para termostato
11. Falso pirex para termômetro
12. Termômetro
13. Falso pirex para saída de meio fermentado
14. Linha de saída de meio fermentado
15. Agitador magnético
16. Base do fermentador
17. Vaso pirex 1000 ml
18. Tampa

Figura 1 - Esquema do mini-fermentador

c.2) Culturas anaeróbicas

Mini-fermentadores com capacidade de 1000 ml contendo 800 ml de meio de cultura foram esterilizados, resfriados e inoculados com 5% de inóculo. A fermentação foi mantida a 30°C sob agitação branda.

c.3) Culturas com controle de pH

Mini-fermentadores com capacidade de 1000 ml contendo 600 ml de meio de cultura foram esterilizados, resfriados e inoculados com 5% de inóculo. O pH da fermentação foi mantido constante a 3,5 através de controlador de pH Methrohn Herisau e com adição de NaOH 1N e H_3PO_4 1N.

c.4) Culturas com adição de substrato durante a fermentação

Mini-fermentadores com capacidade de 1000 ml contendo 600 ml de meio de cultura foram esterilizados, resfriados e inoculados com 5% de inóculo. A adição do substrato durante a fermentação foi feita assepticamente com o uso de bombas peristálticas.

4. INFLUÊNCIA DE AGENTES TENSO-ATIVOS (51,52)

A fim de verificar a influência de tensio-ativos na produção enzimática, foram adicionados às culturas em frascos agitados, Tween 80 e silicone, respectivamente nas seguintes proporções: 0%, 0,1%, 0,2% e 0,5%.

5. MÉTODOS ANALÍTICOS

a) Crescimento celular

O crescimento do microrganismo foi determinado espectofotometricamente através da leitura da absorbância a 600 nm (Espectrofotômetro Spectronic 20 da Bausch & Lomb), utilizando água destilada para calibração do aparelho.

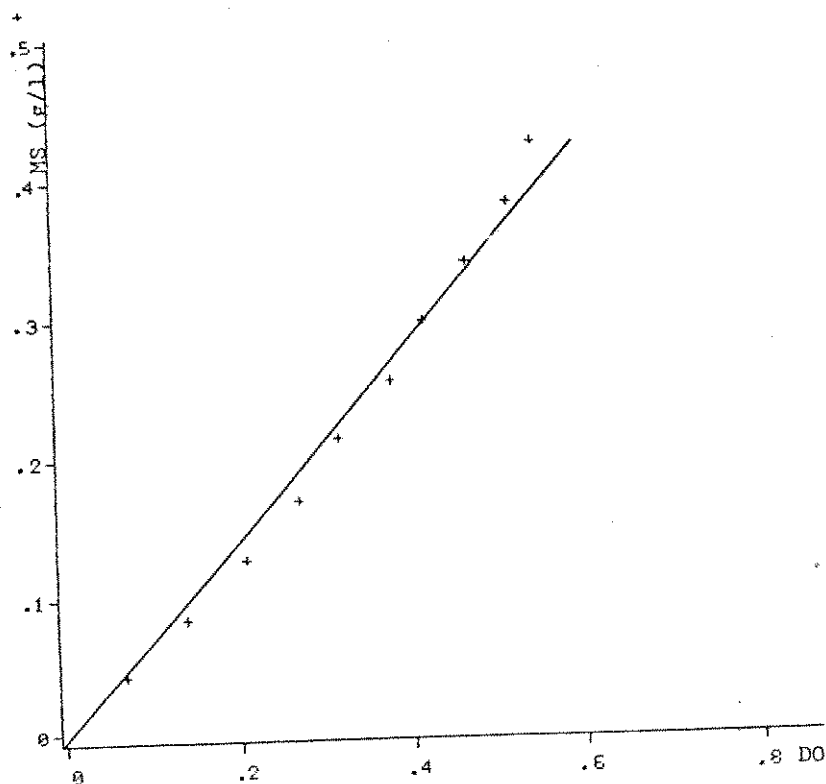


Figura 2 - Curva padrão de Densidade Ótica (DO) em unidades de absorbância em função de massa seca (MS).

Para avaliação da massa celular foi necessário construir uma curva padrão de Densidade Ótica x Massa Seca (Fig. 2) a qual foi feita da seguinte maneira: filtrou-se 500 ml de caldo fer-

mentado em papel de filtro Millipore, secou-se e determinou-se a massa seca (g/l). Paralelamente fez-se diluições sucessivas do caldo de cultura e mediu-se a Densidade ótica e a partir da concentração de massa seca determinou-se indiretamente a massa seca para cada diluição.

b) Determinação de Açúcares Redutores pelo método de DNS

b.1) Reagente DNS (35)

Misturar:

1416 ml de água destilada

10,6 g de 3,5 ácido dinitrosalicílico

19,8 g de NaOH

Dissolver tudo. Depois adicionar:

7,6 ml de fenol (fundido a 50°C)

b.2) Reação

Este método consiste em misturar 1 ml da amostra convenientemente diluída com 1 ml de reagente DNS e levar em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Resfria-se imediatamente em banho de gelo e adiciona-se 16 ml de tartarato duplo de sódio e potássio 11,25 g/l. O branco é feito substituindo-se a amostra por 1 ml de água destilada. A leitura da absorbância é feita em espectrofotômetro Spectronic 20 da Bausch & Lomb a 540 nm. É necessário construir uma curva padrão de açúcares redutores x densidade ótica.

b.3) Determinação de açúcares residuais

A análise dos açúcares residuais foi feita pelo método de DNS após hidrólise ácida da amostra. Para a conversão do substrato em açúcares redutores adiciona-se 1 ml de HCl 2N a 1 ml do sobrenadante do caldo fermentado e submete-se esta mistura a banho-maria a 100°C por 5 minutos . Depois de resfriada, adiciona-se 1 ml de NaOH 2N para neutralizar a amostra.

c) DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

c.1) Obtenção da enzima

A invertase produzida pelo microrganismo foi obtida por centrifugação do caldo fermentado, sendo que no sobrenadante encontra-se a enzima extracelular e no "pellet" a forma intracelular. A forma extracelular é diretamente testada quanto à atividade enzimática, enquanto que para a extração da enzima intracelular precisa-se suspender o "pellet" em água destilada e submetê-lo a um tratamento com ultra-som para rompimento da parede celular e liberação da enzima. Após centrifugação coleta-se a invertase intracelular no sobrenadante, a qual pode ser testada quanto à atividade enzimática.

A centrífuga utilizada foi a MLW VAC 25 com as seguintes condições de trabalho: 10.000 rpm, 10 minutos a 10°C.

c.2) Atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática procedeu-se como SUZUKI e col. (58), fazendo a seguinte reação:

5,0 ml de solução de sacarose 0,06M

2,5 ml de tampão fosfato 0,05M pH 5,2

1,5 ml de água destilada

1,0 ml de solução enzimática

Homogeniza-se a solução e determina-se imediatamente os açúcares redutores pelo método de DNS. Incuba-se a mistura a 40°C por 30 minutos. Posteriormente faz-se a inativação enzimática a 100°C por 5 minutos e determinação de açúcares redutores pelo método de DNS.

A diferença de açúcares redutores após incubação e antes da incubação fornece a atividade enzimática expressa em mol de glicose liberada/minuto, ou seja, Atividade de Invertase (AI).

d) Especificidade da enzima

Inicialmente foi feita uma purificação da enzima extracelular com acetona a 70% de saturação. A solução foi mantida no freezer por 20 horas, sendo depois centrifugada e o precipitado suspenso em tampão fosfato 0,05M pH 5,2.

A especificidade da enzima foi testada incubando-a com sacarose, rafinose e melezitose. Foi utilizado papel Whatman nº 1 e neste papel foram aplicadas amostras das misturas citadas acima.

O sistema de solvente utilizado para a cromatografia descendente foi n-butanol:piridina:água, na proporção de 6:4:3 (v/v, respectivamente). O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 17 horas à temperatura ambiente, e para a revelação do

mesmo foi utilizado a mistura de difenilamina-anilina-fosfato.

e) Caracterização da enzima

e.1) pH ótimo

A reação para determinação da atividade enzimática foi feita a pHs variando de 3 a 10.

e.2. Temperatura ótima

A reação para determinação da atividade enzimática foi incubada a temperaturas variando de 20 a 70°C.

e.3) Temperatura de estabilidade

A solução enzimática foi mantida a diferentes temperaturas e determinou-se a atividade enzimática de tempos em tempos.

e.4) pH de estabilidade

A solução enzimática foi mantida a diferentes pHs e determinou-se a atividade enzimática de tempos em tempos.

f) Purificação preliminar da enzima

A enzima foi produzida de acordo com 3.c.1 de Material e Métodos e o sobrenadante do caldo fermentado foi usado para a purificação.

f.1) Fracionamento com sulfato de amônio

A alíquotas de 20 ml de sobrenadante da cultura adicionou-se sob fraca e constante agitação $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até a obtenção de 70% de saturação. As soluções foram mantidas em repouso a 5°C por diferentes intervalos de tempo. Posteriormente foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e o material sedimentado foi suspenso em tampão fosfato 0,05M pH 5,0 e dialisado contra o mesmo tampão por 20 horas a baixa temperatura. Em seguida determinou-se a atividade enzimática a fim de verificar o grau de extração desta etapa.

f.2) Fracionamento com etanol

Neste teste empregou-se 10 ml de sobrenadante da cultura e adicionou-se lentamente sob fraca e constante agitação o solvente a -15°C até atingir 70% de saturação. Manteve-se as soluções em repouso a -15°C por diferentes intervalos de tempo, sendo posteriormente centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O material sedimentado foi suspenso em tampão fosfato 0,05M pH 5,0 e a atividade foi determinada para verificação do grau de extração.

f.3) Influência de íons no processo de purificação

O fracionamento da enzima foi feito com etanol a 70% de saturação, sendo que após a adição do solvente, as soluções foram centrifugadas e os precipitados contendo a invertase foram suspensos em tampão fosfato 0,05M pH 5,0 contendo os diferentes íons Mn, Mg, Ca, K e Zn numa concentração final de 0, 0,001M,

0,002M, 0,005M, 0,008M, 0,01M e 0,05M, respectivamente. Foi determinada a atividade enzimáticas de cada condição para avaliar o efeito de cada elemento.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. SELEÇÃO DO MICRORGANISMO

Na realização deste trabalho tomou-se como etapa preliminar a seleção de microrganismos produtores de invertase extracelular. Esse estudo foi feito em frascos agitados de 500 ml, conforme item III.3.b de Material e Métodos, com diversas leveduras incubadas a 30°C no meio 1 (item 3 de Material e Métodos). As atividades enzimáticas foram determinadas após 18 horas de fermentação e os resultados obtidos foram reunidos na Tabela 2.

As maiores atividades encontradas correspondem às linhagens *Saccharomyces cerevisiae* Y 978 (0,87 AI/ml), *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 (3,27 AI/ml) e *Kluyveromyces lactis* ATCC 10689 (1,03 AI/ml), que foram utilizadas na sequência do trabalho.

Para verificar a influência do oxigênio na produção de invertase pelos 3 microrganismos selecionados, passou-se a trabalhar com estas cepas em mini-fermentadores, onde é possível um controle mais rigoroso do processo. Foram feitas fermentações em condições aeróbicas e anaeróbicas, e a atividade enzimática intra e extracelular foram determinadas após 18 horas de incubação. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3.

De uma forma geral, verifica-se que as atividades são maiores em aerobiose, em concordância com o descrito por DWORSHACK e WICKERHAM (15). Observa-se também que a atividade extracelular é superior à atividade intracelular e que as linhagens *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 (3,54 AI/ml) e *Kluyve-*

Saccharomyces lactis ATCC 10689 (3,27 AI/ml) são bem mais eficientes que *Saccharomyces cerevisiae* Y-978.

Tabela 2

Atividade da enzima invertase extracelular (AIE) durante fermentação de diferentes linhagens de levedura em frascos agitados, após 18 horas de incubação.

MICROORGANISMOS	AIE (AI/ml)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UO-224	0,11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-978	0,87
<i>Saccharomyces elipsoideus</i> IZ-608	0,08
<i>Saccharomyces uvarum</i> NRRL-1348	0,27
<i>Saccharomyces uvarum</i> IZ-785	0,05
<i>Kluyveromyces fragilis</i> ATCC-8635	0,44
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC-16045	3,27
<i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL-Y-2415	0,63
<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL-Y-1193	-
<i>Kluyveromyces lactis</i> ATCC-10689	1,03
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IZ-888	0,25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IZ-7908	0,35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-2034	0,22

Tabela 3

Atividade de invertase extra (AIE) e intracelular (AII) de culturas em mini-fermentadores, após 18 horas de incubação em aerobiose e anaerobiose.

MICRORGANISMOS	AEROBIOSE		ANAEROBIOSE	
	AII	AIE	AII	AIE
	(AI/ml)	(AI/ml)	(AI/ml)	(AI/ml)
<i>S.cerevisae</i> Y 978	0,52	0,71	0,22	0,27
<i>K.bulgaricus</i> ATCC 16045	1,36	3,54	0,41	1,08
<i>K.lactis</i> ATCC 10689	0,24	3,27	1,50	2,72

Em vista da grande diferença de produção entre as duas cepas mais produtivas e *Saccharomyces cerevisae* Y-978, descartou-se esta última linhagem nos ensaios subsequentes.

Com o intuito de se ter uma melhor idéia da produção de enzima faz-se necessário realizar medidas ao longo do processo fermentativo. Neste sentido, foram testadas as culturas de *Kluyveromyces bulgaricus* e *Kluyveromyces lactis* em aerobiose e anaerobiose com amostras retiradas em espaços regulares de tempo e determinadas a atividade enzimática, massa seca, pH e concentração do substrato. As figuras 3, 4, 5 e 6 ilustram os resultados

obtidos.

A análise dessas figuras mostra que a atividade intracelular é baixa em todos os casos, chegando a um valor máximo de 3,3 AI/ml após 24 horas de fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* em aerobiose (Fig. 5).

A atividade extracelular de *Kluyveromyces lactis*, figuras 3 e 4, mostra um máximo após aproximadamente 10 horas de cultura, decrescendo lentamente em seguida. O valor máximo atingido foi de 2,5 AI/ml em aerobiose (Fig. 3) e 1,90 AI/ml em anaerobiose (Fig. 4). O crescimento celular foi lento em ambas as condições e houve um ligeiro decréscimo no pH durante o processo. O consumo de substrato também foi baixo, sendo o açúcar residual no final da fermentação de aproximadamente 35% do inicial. É interessante salientar o comportamento deste microrganismo em relação a excreção da enzima. Nota-se que o máximo de produção se dá antes mesmo de um crescimento significativo, fato este bastante incomum, não encontrando-se nada semelhante na literatura consultada.

No caso de *Kluyveromyces cerevisiae* (Figs. 5 e 6) nota-se um comportamento bastante diferente em relação ao observado com *Kluyveromyces lactis*. O crescimento celular é mais rápido, porém a produção de enzima é feita gradualmente, aumentando a atividade durante a fermentação. O máximo valor obtido foi de 8,0 AI/ml em aerobiose após 24 horas de cultura. O pH apresentou um leve declínio até 10 horas, elevando-se ligeiramente em seguida até o final. O substrato foi rapidamente consumido chegando a níveis mínimos após 10 horas de cultura.

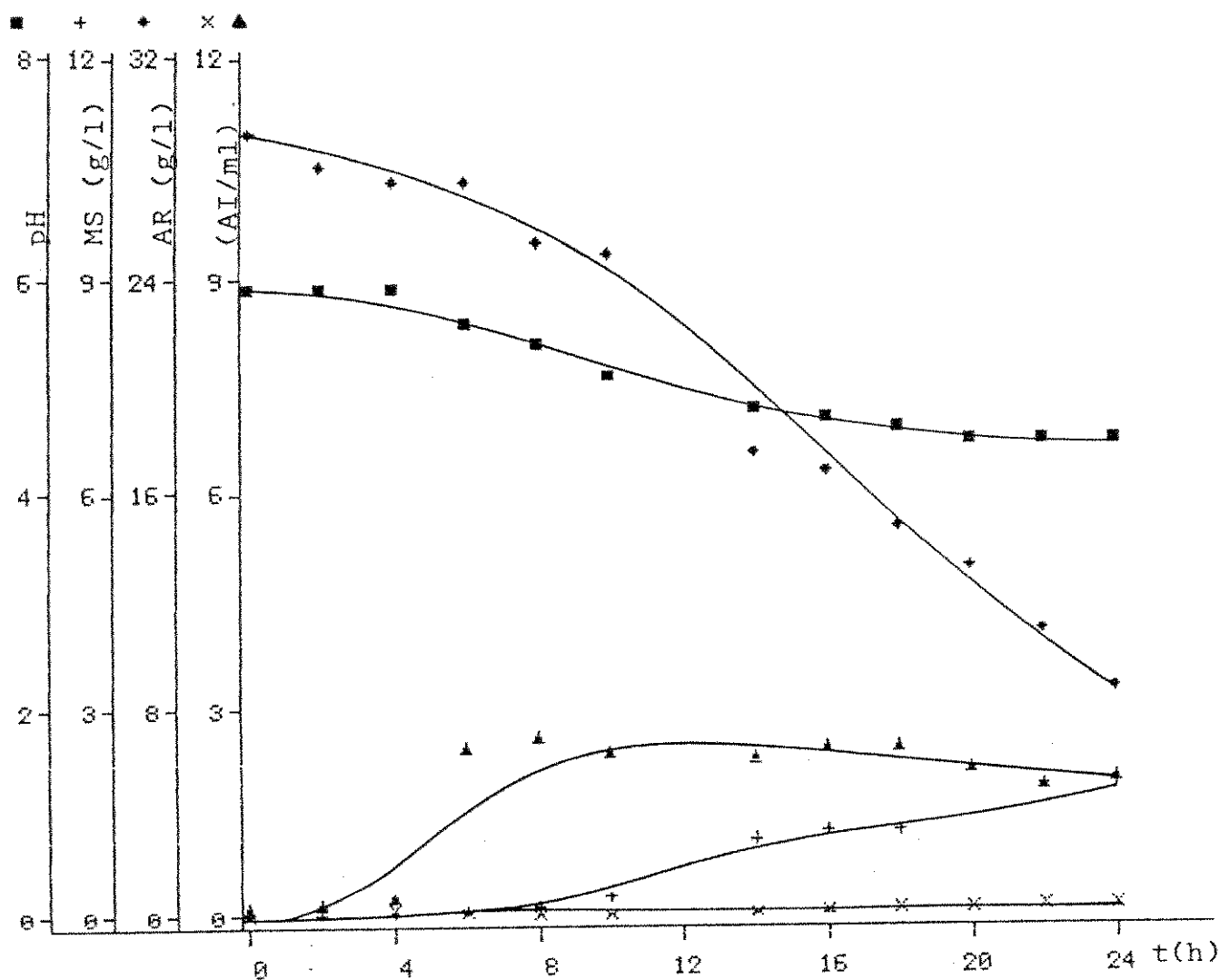


Figura 3 - Evolução do pH, crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE) - ▲ - e intracelular (AII) - x - durante a fermentação de *Kluyveromyces lactis* ATCC 10689 em aerobiose.

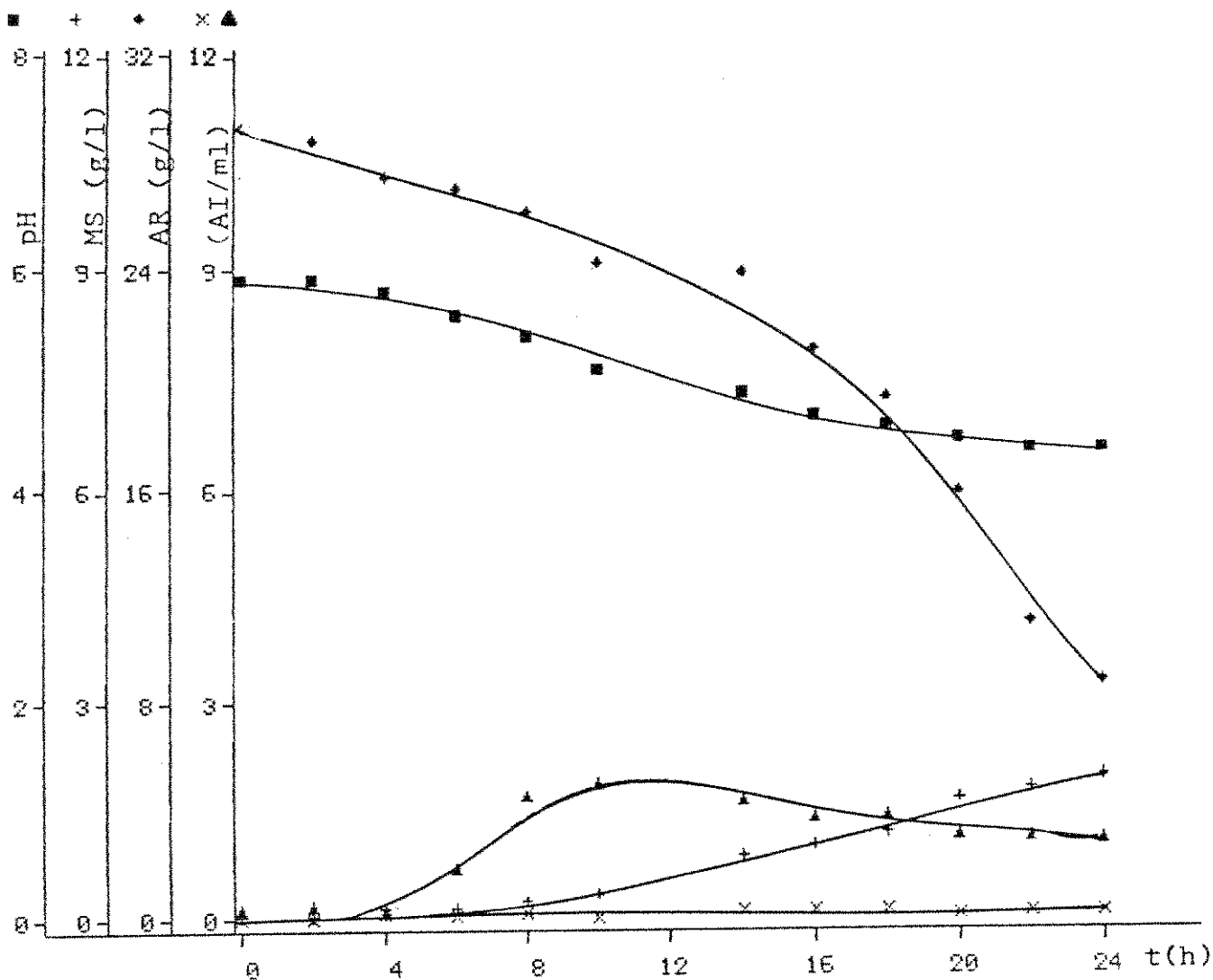


Figura 4 - Evolução do pH, crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE) -▲- e intracelular (AII) -x- durante a fermentação de Kluyveromyces lactis ATCC 10689 em anaerobiose.

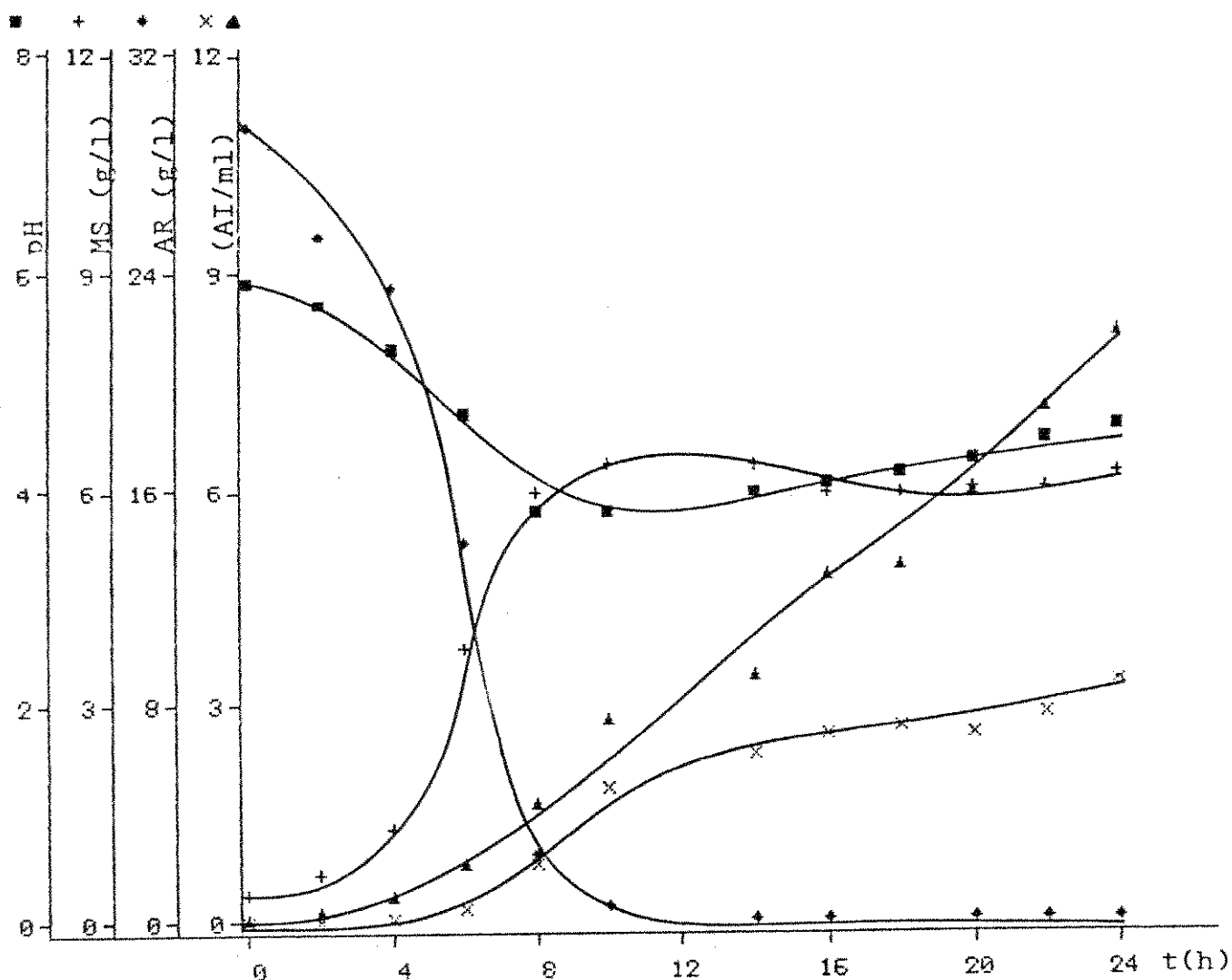


Figura 5 - Evolução do pH, crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE) -▲- e intracelular (AII) -x- durante a fermentação de Kluyveromyces fragilis ATCC 16045 em aerobiose

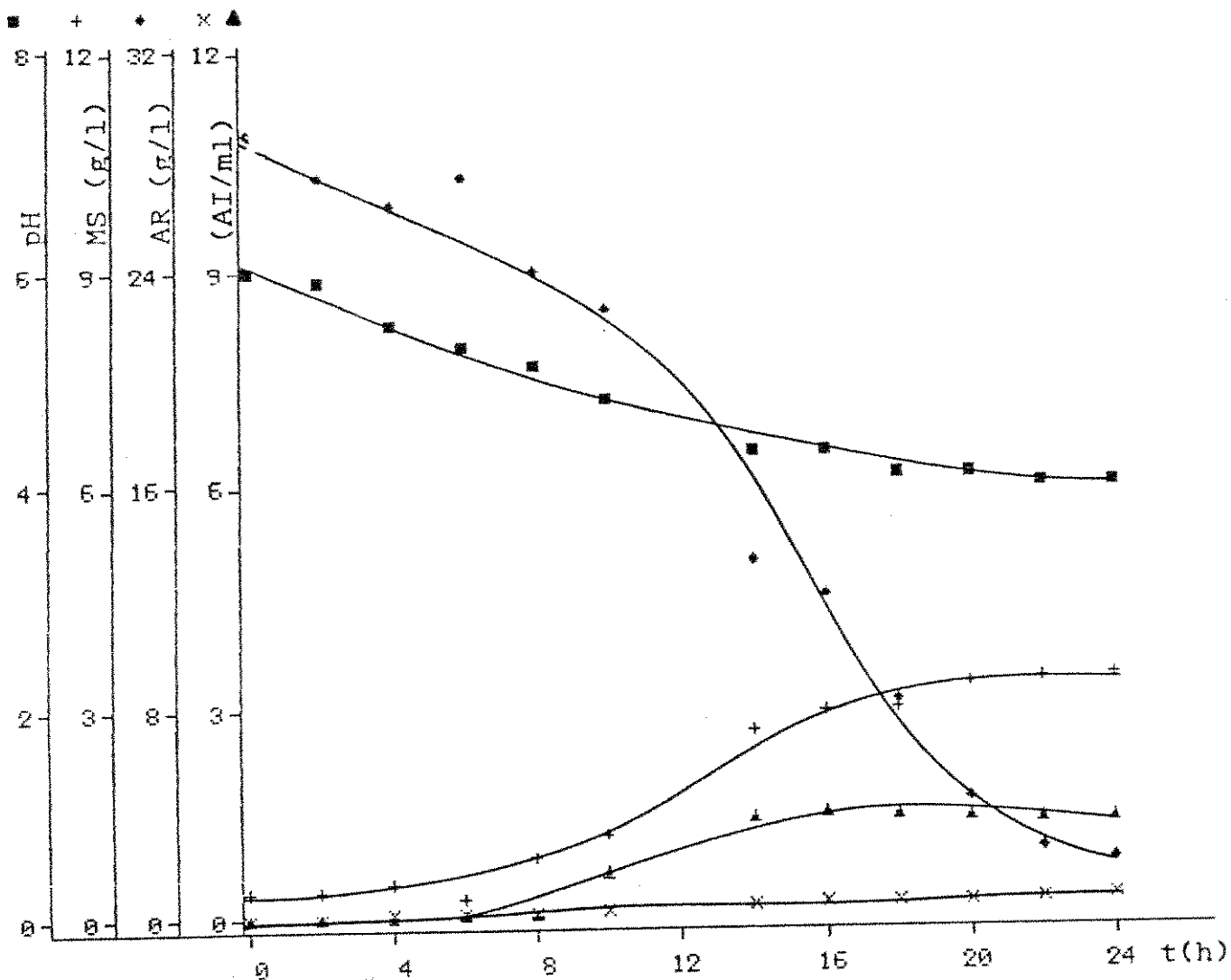


Figura 6 - Evolução do pH, crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE)-▲- e intracelular (AII) -x- durante a fermentação de Kluyveromyces fragilis ATCC 16045 em anaerobiose.

Verificamos que a eficiência do processo é maior em aerobiose e que a linhagem de *Kluyveromyces bulgaricus* foi a mais produtiva nas condições empregadas. Assim sendo, na continuidade do trabalho foi utilizado somente a linhagem de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045.

2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA

a) Meio de cultura

Nos ensaios executados durante a etapa de seleção foi utilizado somente o meio de cultura nº 1 (item III.2 de Material e Métodos) e tomado neste trabalho como meio de referência para os testes de otimização do meio. O parâmetro básico para estes testes foi o aumento da produção de enzima e eventualmente a diminuição dos custos, o que possibilitaria pensar, em termos futuros, numa ampliação de escala do processo desenvolvido. Executamos este trabalho em frascos agitados de 500 ml, sendo possível o emprego de uma variedade de meios simultaneamente (item III.3.b de Material e Métodos).

Os resultados dos 18 meios testados estão reunidos na tabela 4. Os meios 1, 2, 3 e 4 são formulações encontradas na literatura. Os demais foram formulados obedecendo os critérios de disponibilidade ao microrganismo de nutrientes essenciais para o seu metabolismo. Assim sendo, tomou-se o melaço como fonte de carboidrato, vitaminas e aminoácidos e a água de maceração de milho (AMM), uréia e peptona como fontes essencialmente de ni-

Tabela 4

Evolução de açúcar redutor (AR), atividade de invertase extracelular (AIE) e intracelular (AII) durante fermentação de *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045 em frascos agitados com diferentes meios de cultura.

MEIO	TEMPO (h)	A.R. (g/l)	AIE (AI/ml)	AII (AI/ml)	COMPOSIÇÃO DO MEIO
MEIO 1	0	27,80	-	-	Sacarose.....30,0 g/l
	16	21,42	0,21	-	Peptona..... 5,0 g/l
	24	10,71	0,38	-	Ext.levedura.. 3,0 g/l
	48	0,76	2,97	0,10	pH 6,0
	72	0,12	3,25	0,18	
MEIO 2	0	38,00	-	-	Glicose.....40,0 g/l
	16	5,72	0,98	0,16	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2,0 g/l
	24	3,40	1,20	0,38	Ext.levedura..10,0 g/l
	48	1,53	2,68	0,94	pH 5,5
	72	1,80	11,97	1,31	
MEIO 3	0	18,00	-	-	Glicose..... 20,0 g/l
	16	2,70	4,68	2,46	Peptona..... 20,0 g/l
	24	1,36	6,74	3,06	Ext.levedura.. 10,0 g/l
	48	1,78	15,65	3,95	pH 6,8
	72	1,43	18,49	4,09	
MEIO-4	0	9,20	-	-	Glicose..... 10,0 g/l
	16	2,32	1,26	0,56	Ext.levedura.. 10,0 g/l
	24	1,98	1,66	0,79	pH 6,8
	48	1,35	2,58	0,81	
	72	1,10	2,93	0,94	
MEIO 5	0	15,00	-	-	Melaco..... 21,0 g/l
	16	2,15	9,36	3,28	Ext.levedura.. 10,0 g/l
	24	1,53	15,43	4,91	Peptona..... 20,0 g/l
	48	1,40	16,69	6,46	pH 6,8
	72	1,35	13,61	2,68	
MEIO 6	0	14,80	-	-	Melaco 21,0 g/l
	16	12,65	0,55	-	Ext.levedura.. 10,0 g/l
	24	11,22	0,68	0,09	Uréia..... 15,0 g/l
	48	10,20	0,76	0,28	pH 6,8
	72	9,44	0,86	0,32	
MEIO 7	0	14,80	-	-	Melaco..... 21,0 g/l
	16	13,10	0,22	-	Ext.levedura.. 10,0 g/l
	24	11,32	0,28	-	Uréia 20,0 g/l
	48	10,22	0,38	0,10	pH 6,8
	72	7,84	1,13	0,69	
MEIO 8	0	14,80	-	-	Melaco..... 21,0 g/l
	16	12,97	-	-	Ext.levedura.. 10,0 g/l
	24	10,71	0,06	-	Uréia..... 25,0 g/l
	48	10,20	0,09	-	pH 6,8
	72	9,07	1,42	0,52	
MEIO 9	0	14,94	-	-	Melaco..... 21,0 g/l
	16	6,48	5,44	1,87	Ext.levedura.. 10,0 g/l
	24	2,70	8,79	3,32	AMM.....150,0 g/l
	48	2,70	12,03	3,15	pH 6,8
	72	1,89	10,09	2,33	

tabela 4 - continuação

MEIO	TEMPO (h)	A.R. (g/l)	AIE (AI/ml)	AII (AI/ml)	COMPOSIÇÃO DO MEIO
MEIO 10	0	14,90	-	-	Melaco..... 21,0 g/l
	16	7,87	5,12	1,08	Ext.levedura.. 10,0 g/l
	24	1,07	9,51	3,76	AMM.....200,0 g/l
	48	1,94	11,31	3,06	pH 6,8
	72	1,99	10,80	1,11	
MEIO 11	0	14,94	-	-	Melaco..... 21,0 g/l
	16	7,26	5,32	1,36	Ext.levedura.. 10,0 g/l
	24	1,56	9,76	3,07	AMM.....250,0 g/l
	48	2,35	10,14	3,13	pH 6,8
	72	1,99	10,14	1,11	
MEIO 12	0	22,98	-	-	Melaco..... 30,2 g/l
	16	2,40	13,51	7,43	Ext.levedura.. 10,0 g/l
	24	1,87	15,59	3,46	Peptona..... 20,0 g/l
	48	1,55	13,26	5,78	pH 6,8
	72	1,65	14,56	6,19	
MEIO 13	0	22,78	-	-	Melaco..... 30,2 g/l
	16	1,55	5,37	4,83	AMM..... 40,0 g/l
	24	1,55	11,40	3,15	KH ₂ PO ₄ 5,0 g/l
	48	1,65	13,51	4,66	pH 6,8
	72	1,55	14,27	4,41	
MEIO 14	0	22,38	-	-	Melaco..... 30,2 g/l
	16	0,91	1,64	0,76	(NH ₄) ₂ SO ₄ 5,0 g/l
	24	0,91	4,91	0,47	KH ₂ PO ₄ 5,0 g/l
	48	0,85	12,19	1,89	pH 6,8
	72	0,75	13,29	0,94	
MEIO 15	0	22,91	-	-	Melaco..... 30,2 g/l
	16	1,39	4,90	3,31	AMM..... 40,0 g/l
	24	1,49	10,46	3,52	Ext.levedura.. 1,0 g/l
	48	1,60	12,88	4,24	KH ₂ PO ₄ 5,0 g/l
	72	1,49	13,61	5,73	pH 6,8
MEIO 16	0	22,45	-	-	Melaco..... 30,2 g/l
	16	1,49	4,91	3,27	AMM..... 40,0 g/l
	24	1,49	11,09	3,62	KH PO..... 5,0 g/l
	48	1,23	13,04	6,24	MgSO ₄ .7H ₂ O..... 0,65g/l
	72	1,39	13,89	5,20	pH 6,8
MEIO 17	0	22,45	-	-	Melaco..... 30,2 g/l
	16	1,49	3,26	4,24	AMM..... 40,0 g/l
	24	1,44	6,74	3,73	pH 6,8
	48	1,60	12,35	4,16	
	72	1,55	13,611	4,25	
MEIO 18	0	22,38	-	-	Melaco..... 30,2 g/l
	16	1,76	1,25	2,80	AMM..... 40,0 g/l
	24	1,12	3,09	3,78	KH ₂ PO ₄ 5,0 g/l
	48	1,33	9,61	3,95	(NH ₄) ₂ SO ₄ 5,0 g/l
	72	1,44	12,14	1,81	pH 6,8

trogênio e aminoácidos. Para cada meio formulado variou-se a disponibilidade de cada elemento, variando sua fonte e a concentração. Os meios 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 e 18, foram elaborados para se testar a fonte de nitrogênio. Os meios 5 e 12 para testar a concentração de açúcar, os meios 13 e 17 para o fosfato, os meios 13 e 15 para a fonte de vitamina e aminoácidos e os meios 13 e 16 para o magnésio.

Comparando-se o meio 1, 2, 3 e 4 notamos que o meio 3 favorece mais a produção enzimática, apesar de possuir glicose como fonte de carbono. Isto nos leva a crer que a enzima é constituinte e não necessita de sacarose para ser produzida, concordando com o observado por WICKERHAM (61, 29).

Os meios 5 e 12, que diferem do meio 3 quanto à fonte de carbono, mostraram ser os melhores, atingindo uma produção máxima de 16,69 AI/ml após 48 horas de cultura no meio 5. Entre os dois meios variou-se a concentração de melaço, porém os resultados foram semelhantes.

Os meios 6, 7 e 8 não forneceram bons resultados, evidenciando que a uréia não é uma boa fonte de nitrogênio para o microrganismo. REED (50) demonstrou ser a uréia um inibidor da enzima.

Entre os meios 9, 10 e 11 variou-se a concentração de água de maceração de milho (AMM), porém os resultados não foram significativamente diferentes.

Comparando-se os meios 12 e 13 notamos que o meio 12 é mais favorável onde a produção é mais rápida, atingindo 13,5 AI/ml após 16 horas. No entanto, após 72 horas as concentrações de

enzima são essencialmente iguais. Convém salientar, no entanto, que os componentes usados na formulação do meio 13 são de custos bem inferiores e economicamente mais viáveis. Assim sendo, passamos a testar novas formulações tendo como referência o meio 13.

Entre os meios 13 e 14 variou-se a fonte de nitrogênio (AMM em 13 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 14), sendo a água de maceração de milho a mais favorável.

Entre os meios 13 e 15 comparou-se a influência da adição do extrato de levedura. O meio 15, no qual foi adicionado este composto, mostrou um resultado levemente inferior ao meio 13.

No meio 16 testamos a influência da adição de sulfato de magnésio, mas os resultados não foram muito diferentes. No meio 17 retiramos a fonte de fosfato e os resultados foram inferiores. Finalmente, no meio 18 adicionamos sulfato de amônio, porém os resultados foram desfavoráveis.

Da análise da Tabela 4 podemos concluir que a produção máxima da enzima foi conseguida com o meio 3. Na sequência do trabalho será usado o meio 13 devido ao seu baixo custo e boa produção. A atividade intracelular em todos os testes foi em geral bem inferior à extracelular.

b) Efeito de tensio-ativos

Certos autores (51, 52) verificaram que na presença de tensio-ativos ocorre um aumento na produção da enzima. Foi então testada a influência de dois tensio-ativos citados na literatura

(Tween 80 e silicone) na cultura de *Kluyveromyces bulgaricus*. A Tabela 5 reúne os resultados obtidos para esta série de ensaios.

Tabela 5

Evolução do açúcar redutor (AR) e atividade de invertase extracelular (AIE) e intracelular (AII) durante fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em frascos agitados, com adição de Tween 80 (TW) e Silicone (SI) em diferentes concentrações (C).

TEMPO (h)	AR (g/l)		AIE (AI/ml)		AII (AI/ml)		C (%)
	TW	SI	TW	SI	TW	SI	
0	22,78	22,78	-	-	-	-	0
24	1,11	1,11	4,45	4,45	2,40	2,40	0,1
	1,11	1,19	7,02	5,98	2,20	2,91	0,2
	1,02	1,19	6,60	6,27	1,97	1,57	0,5
	1,15	1,19	6,13	6,27	1,89	1,81	
48	1,11	1,11	12,16	12,16	2,13	2,13	0
	1,11	1,02	14,58	14,28	1,93	1,54	0,1
	1,19	0,94	13,94	12,47	1,89	1,61	0,2
	1,06	1,06	13,98	12,42	1,38	1,97	0,5
72	1,12	1,12	15,37	15,37	2,56	2,56	0
	1,12	1,19	14,16	14,72	2,20	2,36	0,1
	1,16	1,02	14,77	14,56	2,09	2,25	0,2
	1,16	1,09	12,91	13,83	2,13	2,44	0,5

As culturas foram realizadas em frascos agitados com o meio 13 e a adição do tensio-ativo foi feita em diferentes concentrações (0,1%, 0,2% e 0,5%).

Verifica-se que durante as primeiras 48 horas existe um efeito benéfico com a adição de tensio-ativo, seja Tween 80 ou silicone, principalmente a 0,1%. Este efeito porém se anula após 72 horas quando a atividade é menor em presença do aditivo. Os efeitos da adição tanto de Tween 80 quanto de silicone na produção de invertase são mínimos.

c) Efeito do pH do meio

O efeito do pH na produção da enzima foi estudado variando os pHs iniciais do meio (3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0). As culturas foram feitas em frascos agitados como descrito em Material e Métodos (item III.3.b) e a Tabela 6 mostra os resultados obtidos. Nota-se que a produção não difere significativamente após 48 horas de fermentação, embora para pHs mais baixos a produção seja mais acelerada nas primeiras horas de fermentação, como ilustra a figura 7. Pelo motivo de se ter uma maior produtividade a pH 3,5 nas primeiras 24 horas, tomou-se este pH no prosseguimento do trabalho.

d) Efeito da temperatura

Outro parâmetro testado foi a influência da temperatura para a produção enzimática. Esse experimento foi feito em mini-fermentadores por ser possível um melhor controle da temperatura, bem como possibilitar a realização de todas as variações (25, 28, 30, 32, 35 e 38°C), simultaneamente. Os resultados obtidos estão na Tabela 7.

Na tabela 7 observa-se que o pH se eleva mais notoriamente a 25, 28 e 30°C. Acima de 30°C a produção enzimática é reduzida (Fig. 8). Verifica-se que a temperatura ótima de produção enzimática pelo microrganismo deve estar entre 28 e 30°C, sendo adotadas nos experimentos subsequentes.

Tabela 6

Evolução da massa seca (MS), açúcar redutor (AR) e atividade de invertase extracelular (AIE) durante fermentação de *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045 em frascos agitados com o meio 13 em diferentes pHs iniciais.

TEMPO (h)	pH	MS (g/l)	AR (g/l)	AIE (AI/ml)	pH INICIAL
0	3,15	-	20,88	-	3,0
2	3,10	2,48	18,34	2,45	
4	3,10	4,26	15,79	1,85	
6	3,05	7,09	2,86	3,05	
8	3,05	7,80	1,78	7,20	
13	3,10	8,16	2,04	7,36	
24	3,25	8,87	1,58	8,68	
32	3,70	9,22	1,58	12,34	
48	3,85	10,99	1,58	16,26	
0	3,5	-	20,88	-	3,5
2	3,60	2,48	17,83	2,04	
4	3,55	5,85	11,71	1,19	
6	3,55	7,80	2,44	4,75	
8	3,65	8,51	1,99	6,89	
13	4,05	9,40	1,68	9,26	
24	4,95	9,57	1,27	11,19	
32	5,20	10,28	1,48	15,25	
48	5,35	10,28	1,38	15,41	
0	4,15	-	20,88	-	4,0
2	4,30	2,84	17,32	1,62	
4	4,25	5,67	9,17	0,80	
6	4,25	7,80	2,24	2,55	
8	4,45	8,51	2,14	3,64	
13	5,20	8,80	1,53	3,19	
24	6,00	8,51	2,09	5,75	
32	6,05	9,22	1,53	12,12	
48	5,85	11,35	1,53	17,61	
0	4,50	-	20,88	-	4,5
2	4,50	2,84	17,83	0,63	
4	4,50	5,67	10,19	0,50	
6	4,50	8,16	1,94	2,94	
8	4,75	8,16	1,78	3,73	
13	5,60	8,16	1,53	3,46	
24	6,25	8,51	1,68	11,89	
32	6,10	8,51	1,68	12,62	
48	6,00	11,35	2,04	14,59	
0	5,00	-	20,88	-	5,0
2	4,95	2,48	17,32	1,01	
4	4,95	5,32	11,71	0,66	
6	5,00	8,51	2,29	2,41	
8	5,35	8,80	2,04	4,78	
13	5,90	8,16	1,53	4,93	
24	6,50	9,57	1,38	8,94	
32	6,50	8,87	1,27	16,98	
48	6,35	10,64	1,48	16,57	

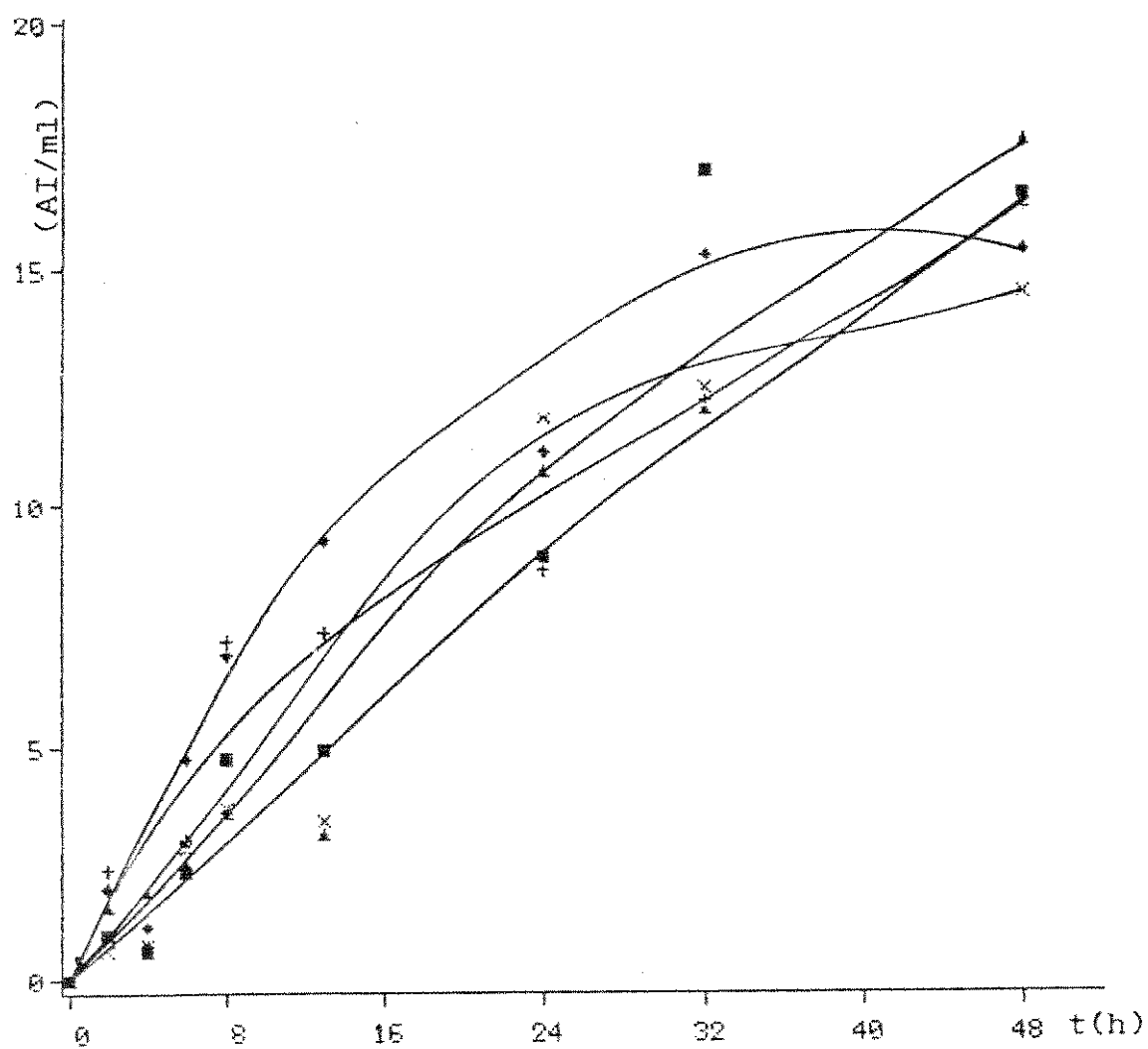


Figura 7 - Evolução da atividade invertase extracelular (AIE) durante fermentação de *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045 no meio 13 a diferentes pHs iniciais: 3,0 (+), 3,5 (◆), 4,0 (▲), 4,5 (x) e 5,0 (■).

Tabela 7

Evolução da massa seca (MS), açúcar redutor (AR) e atividade de invertase extracelular (AIE) durante fermentação de *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045 em mini-fermentadores com o meio 13 a diferentes temperaturas (T).

TEMPO (h)	PH	MS (g/l)	AR (g/l)	AIE (UI/ml)	T (°C)
0	3,50	-	19,60	-	25
2	3,50	3,01	13,47	2,00	
4	3,40	5,50	11,92	1,92	
6	3,40	8,33	1,81	5,96	
8	3,45	8,87	1,50	6,76	
13	4,10	9,22	1,40	7,44	
24	4,75	9,93	1,45	10,04	
32	5,10	10,28	1,40	12,49	
48	5,20	11,35	1,55	14,36	
0	3,50	-	19,60	-	28
2	3,45	3,55	18,65	1,92	
4	3,35	7,80	7,25	1,92	
6	3,35	9,75	1,55	5,31	
8	3,45	9,57	1,61	6,17	
13	3,50	9,57	1,55	6,99	
24	4,80	10,64	1,61	8,60	
32	5,00	11,35	1,45	10,12	
48	5,20	11,35	1,71	15,99	
0	3,50	-	10,60	-	30
2	3,40	3,01	14,51	1,76	
4	3,30	7,62	2,80	2,59	
6	3,35	8,16	1,55	5,23	
8	3,60	8,69	1,50	7,05	
13	4,15	9,04	1,40	7,34	
24	4,90	10,11	1,50	9,35	
32	5,10	11,35	1,55	12,89	
48	5,40	11,35	1,61	15,40	
0	3,50	-	19,60	-	32
2	3,40	3,72	15,54	3,04	
4	3,30	7,98	1,92	3,85	
6	3,35	8,51	1,50	5,15	
8	3,50	8,51	1,55	5,94	
13	3,60	8,87	1,45	6,30	
24	3,60	8,87	1,55	7,57	
32	3,70	9,22	1,55	8,53	
48	3,70	9,57	1,50	9,12	
0	3,50	-	19,60	-	35
2	3,50	2,66	11,92	0,96	
4	3,55	3,90	1,14	3,60	
6	3,55	7,80	1,30	6,02	
8	3,65	8,16	1,50	6,78	
13	4,00	8,51	1,55	7,60	
24	4,00	8,65	1,40	7,72	
32	4,00	8,87	1,50	8,41	
48	4,20	8,16	1,76	8,96	
0	3,50	-	19,60	-	38
2	3,55	3,01	14,50	1,34	
4	3,50	5,85	1,92	2,78	
6	3,50	6,03	1,66	3,00	
8	3,55	6,03	1,19	3,18	
13	3,65	6,38	1,19	3,23	
24	3,75	6,38	1,68	3,86	
32	3,90	6,56	1,24	4,54	
48	4,00	6,74	2,44	5,69	

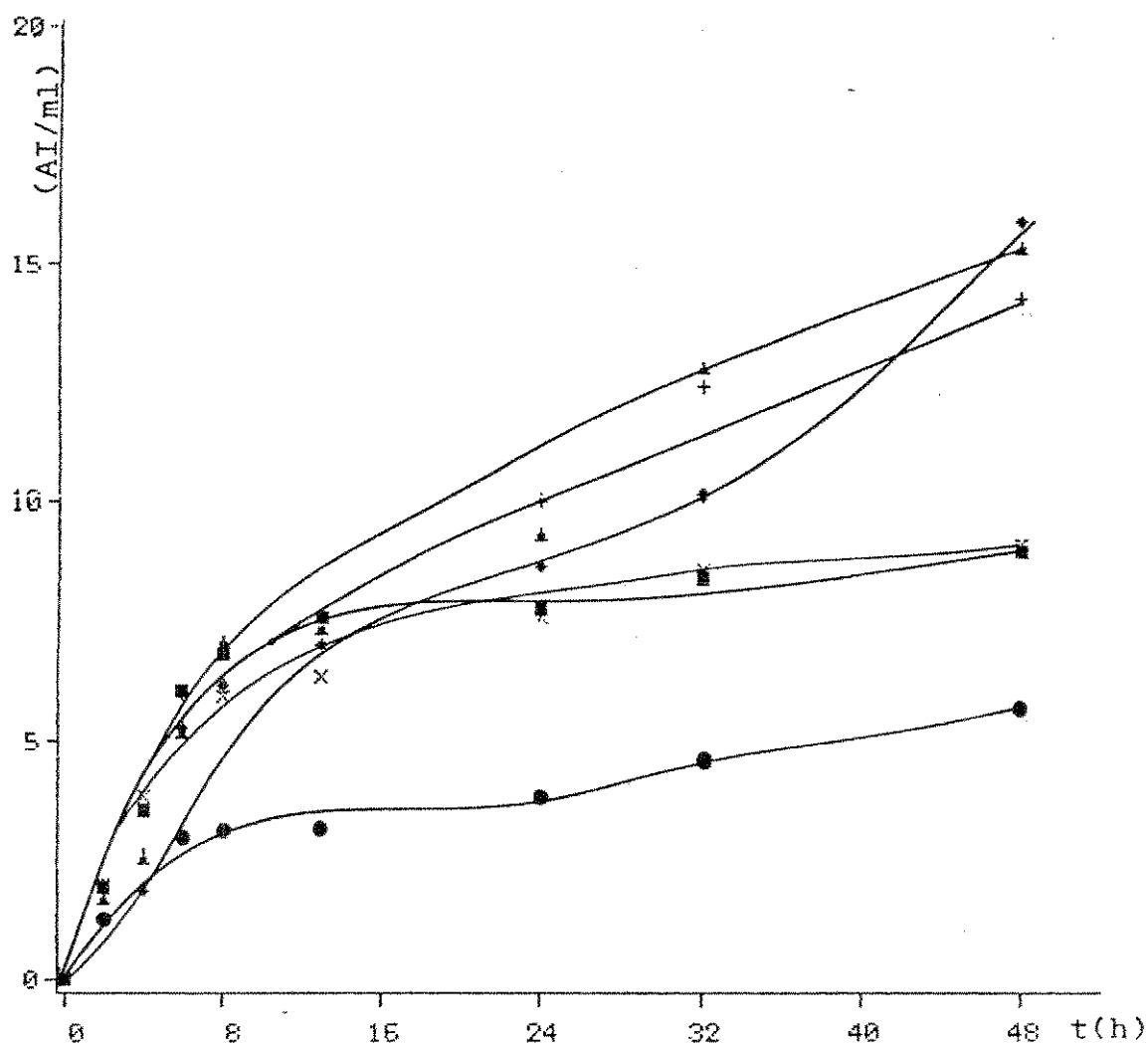


Figura 8 - Evolução da atividade invertase extracelular (AIE) durante fermentação de *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045 no meio 13 a diferentes temperaturas: 25°C (+), 28°C (♦), 30°C (▲), 32°C (x), 35°C (■) e 38°C (●).

e) Efeito da concentração de melaço

Considerando-se pH 3,5 e temperatura de 30°C como as condições mais adequadas de produção enzimática, passou-se a variar a concentração de melaço (meios 19, 20, 21, 22 e 23) de 10 a 100 g/l. As culturas foram feitas em frascos agitados e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 8.

A massa celular aumentou sensivelmente nos meios 13, 19 e 20. O meio 19 atingiu sua máxima atividade por volta de 24 horas de fermentação, mas a maior produção foi verificada nos meios 13 e 20 após 48 horas de cultura, como mostra a figura 9. Para as concentrações maiores de melaço (acima de 50,0 g/l) houve aparentemente uma inibição da produção de enzima.

Em termos de produtividade, o meio 13 apresentou uma ligeira supremacia em relação aos outros, apesar da atividade final ser semelhante ao meio 20.

f) Tecnologia de fermentação

Com a finalidade de complementar o estudo das melhores condições de cultura para *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, testamos simultaneamente em mini-fermentadores, culturas sem controle de pH, com controle de pH a 3,5 e com adição de sacarose.

Na figura 10 é mostrado o crescimento de *Kluyveromyces bulgaricus* sem controle de pH. Verifica-se um rápido crescimento celular e consumo de substrato, com uma produção enzimática que

Tabela 8

Evolução da massa seca (MS), açúcar redutor (AR) e atividade de invertase extracelular (AIE) durante fermentação de *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045 em frascos agitados com os meios 13, 19, 20, 21, 22 e 23.

TEMPO (h)	pH	MS (g/l)	AR (g/l)	AIE (AI/ml)	COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA
0	3,40	-	7,25	-	MEIO 19
2	3,40	2,48	6,22	2,17	
4	3,35	4,61	0,83	1,65	Melaco...10,0 g/l
6	3,40	6,03	0,78	6,30	AMM.....40,0 g/l
8	3,60	6,03	0,67	7,89	KH ₂ PO ₄ ... 5,0 g/l
13	4,50	7,45	0,88	9,72	pH 3,5
24	5,50	9,22	0,73	11,07	
32	5,60	9,22	0,83	10,03	
48	5,90	9,22	0,83	10,16	
0	3,50	-	17,61	-	MEIO 20
2	3,45	2,48	16,06	1,66	
4	3,35	4,61	4,15	1,52	Melaco...25,0 g/l
6	3,30	7,80	1,92	4,96	AMM.....40,0 g/l
8	3,45	7,98	1,40	5,82	KH ₂ PO ₄ ... 5,0 g/l
13	4,00	8,51	1,35	8,08	pH 3,5
24	5,00	9,04	0,98	9,69	
32	5,10	9,93	1,19	12,14	
48	4,90	10,64	0,93	15,51	
0	3,50	-	20,88	-	MEIO 13
2	3,60	2,48	17,83	2,04	
4	3,55	5,85	11,71	1,19	Melaco...30,2 g/l
6	3,55	7,80	2,44	4,75	AMM.....40,0 g/l
8	3,65	8,51	1,99	6,89	KH ₂ PO ₄ ... 5,0 g/l
13	4,05	9,40	1,68	9,26	pH 3,5
24	4,95	9,57	1,27	11,19	
32	5,20	10,28	1,48	15,25	
48	5,35	10,28	1,38	15,41	
0	3,35	-	37,30	-	MEIO 21
2	3,40	1,77	32,12	2,88	
4	3,30	4,61	25,38	2,94	Melaco...50,0 g/l
6	3,25	9,22	9,33	2,69	AMM.....40,0 g/l
8	3,25	10,99	3,32	5,63	KH ₂ PO ₄ ... 5,0 g/l
13	3,60	12,06	2,18	7,70	pH 3,5
24	3,60	11,88	1,37	9,11	
32	3,65	12,41	1,50	10,62	
48	3,35	10,99	1,35	10,82	
0	3,50	-	51,81	-	MEIO 22
2	3,45	2,48	44,04	4,64	
4	3,50	5,14	36,27	3,04	Melaco...75,0 g/l
6	3,45	9,93	20,73	2,40	AMM.....40,0 g/l
8	3,35	13,48	2,85	5,82	KH ₂ PO ₄ ... 5,0 g/l
13	3,45	14,18	2,33	8,17	pH 3,5
24	3,60	14,54	2,23	8,84	
32	3,60	13,12	2,12	10,76	
48	3,65	12,06	2,18	10,43	
0	3,50	-	67,37	-	MEIO 23
2	3,50	2,66	59,59	3,20	
4	3,50	4,79	56,99	2,88	Melaco 100,0 g/l
6	3,40	9,57	36,27	2,88	AMM..... 40,0 g/l
8	3,30	14,89	6,01	5,16	KH ₂ PO ₄ ... 5,0 g/l
13	3,45	15,25	3,32	7,52	pH 3,5
24	3,45	15,25	3,21	8,27	
32	3,40	13,12	3,83	8,68	
48	3,45	13,12	3,73	10,53	

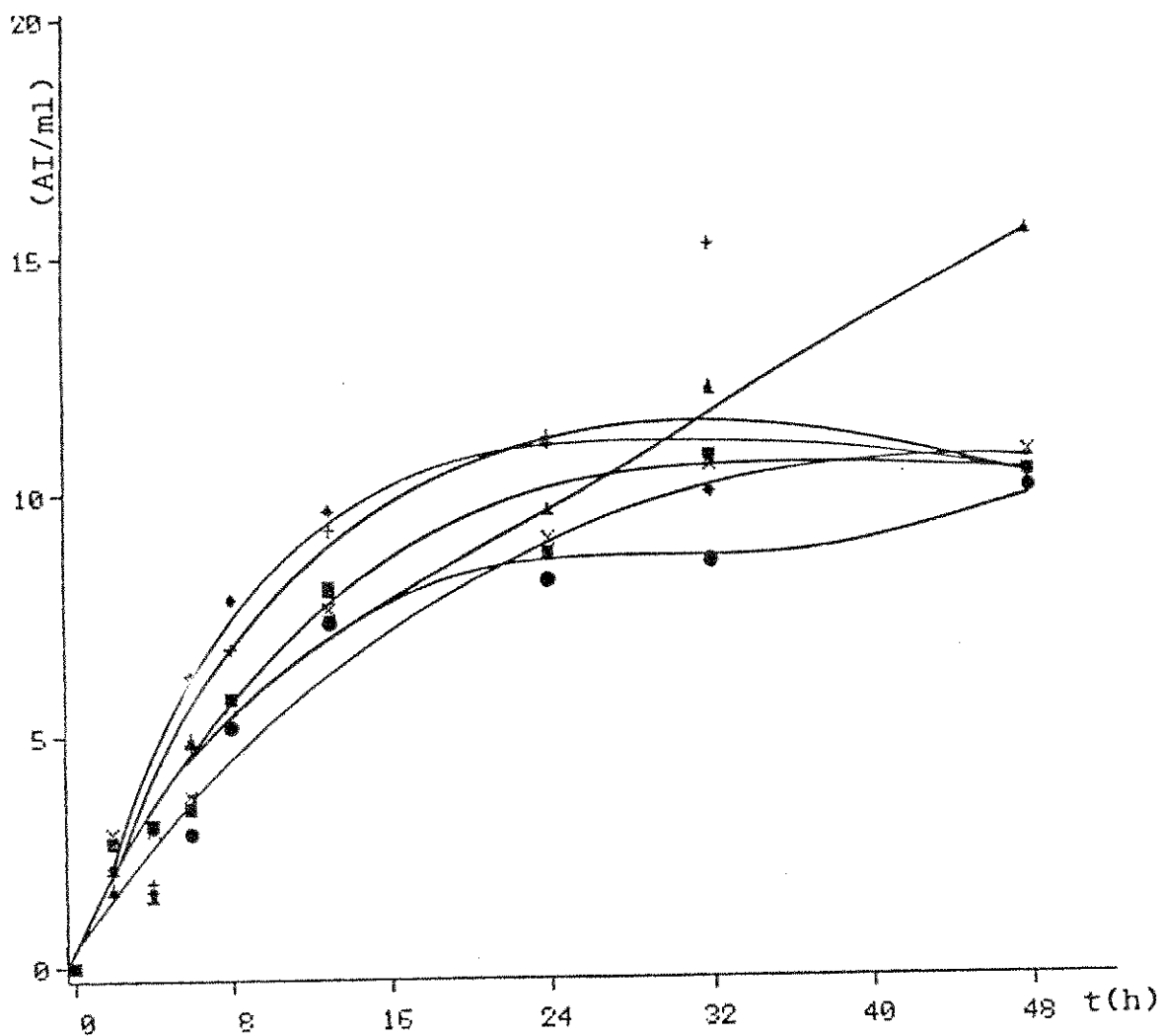


Figura 9 - Evolução da atividade invertase extracelular (AIE) durante a fermentação de Kluyveromyces bulgaricus ATCC 16045 nos meios: 13 (+), 19 (◆), 20 (▲), 21 (x), 22 (■) e 23 (●).

atinge 14,7 AI/ml após 48 horas de incubação, representando uma atividade total de $8,9 \times 10^3$ AI.

O controle de pH a 3,5 mostrou-se prejudicial à produção de enzima, como constata-se na Figura 11. A atividade máxima atingida foi de 5,5 AI/ml, ou seja, uma atividade total de $3,4 \times 10(3)$ AI.

A Figura 12 mostra o efeito da adição de sacarose na razão de 13,6 g/h em forma de solução 240 g/l. O pH não foi controlado e promoveu-se uma agitação constante. Optou-se por começar a alimentação após 5 horas de fermentação e cortá-la às 24 horas (representado pelas setas). A massa celular atingiu seu valor máximo mais rapidamente que nas experiências anteriores e a concentração de substrato mantém-se a níveis baixos apesar da adição constante de sacarose, denotando um consumo eficiente do microrganismo. Em relação à atividade enzimática, nota-se que a produção máxima atinge 14,8 AI/ml após 48 horas. No entanto, como o volume varia com o tempo devido à adição da solução de sacarose, torna-se mais adequada expressar os resultados em termos da atividade total da enzima no reator. Assim sendo a Figura 13 expressa a evolução da atividade total de invertase no reator para os diferentes ensaios: sem controle, com controle de pH e com adição de sacarose. Fica evidente que a adição de sacarose favorece a produção de invertase aumentando em 44% a atividade final.

Testou-se igualmente a adição de melaço durante a fermentação, em substituição a sacarose. A concentração de melaço foi de 400 g/l e a vazão de alimentação foi de 12,84 g/h numa pri-

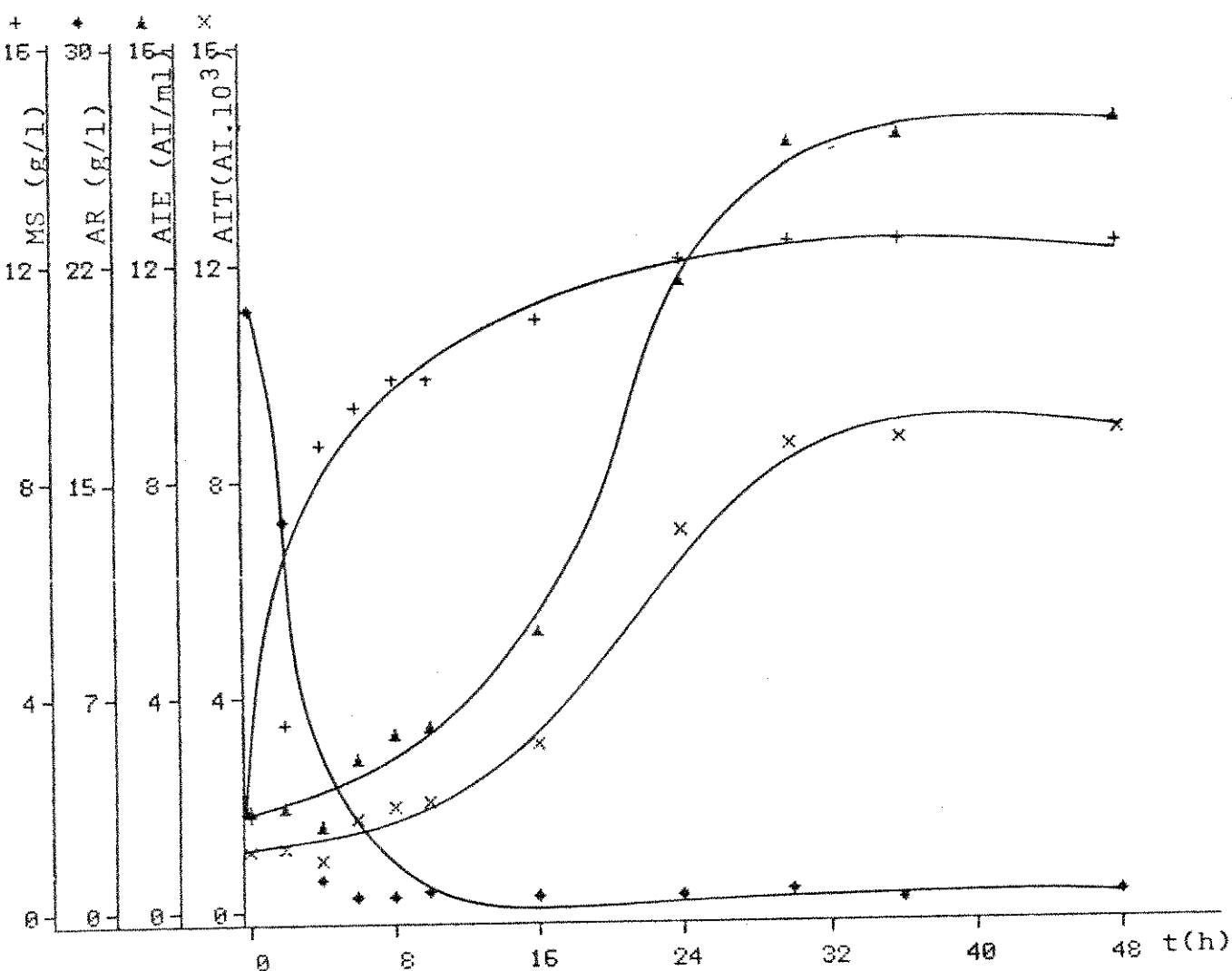


Figura 10 - Evolução do crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores (AR) atividade invertase extracelular (AIE) e atividade invertase total (AIT) durante fermentação de Kluyveromyces bulgaricus ATCC 16045 sem controle de pH.

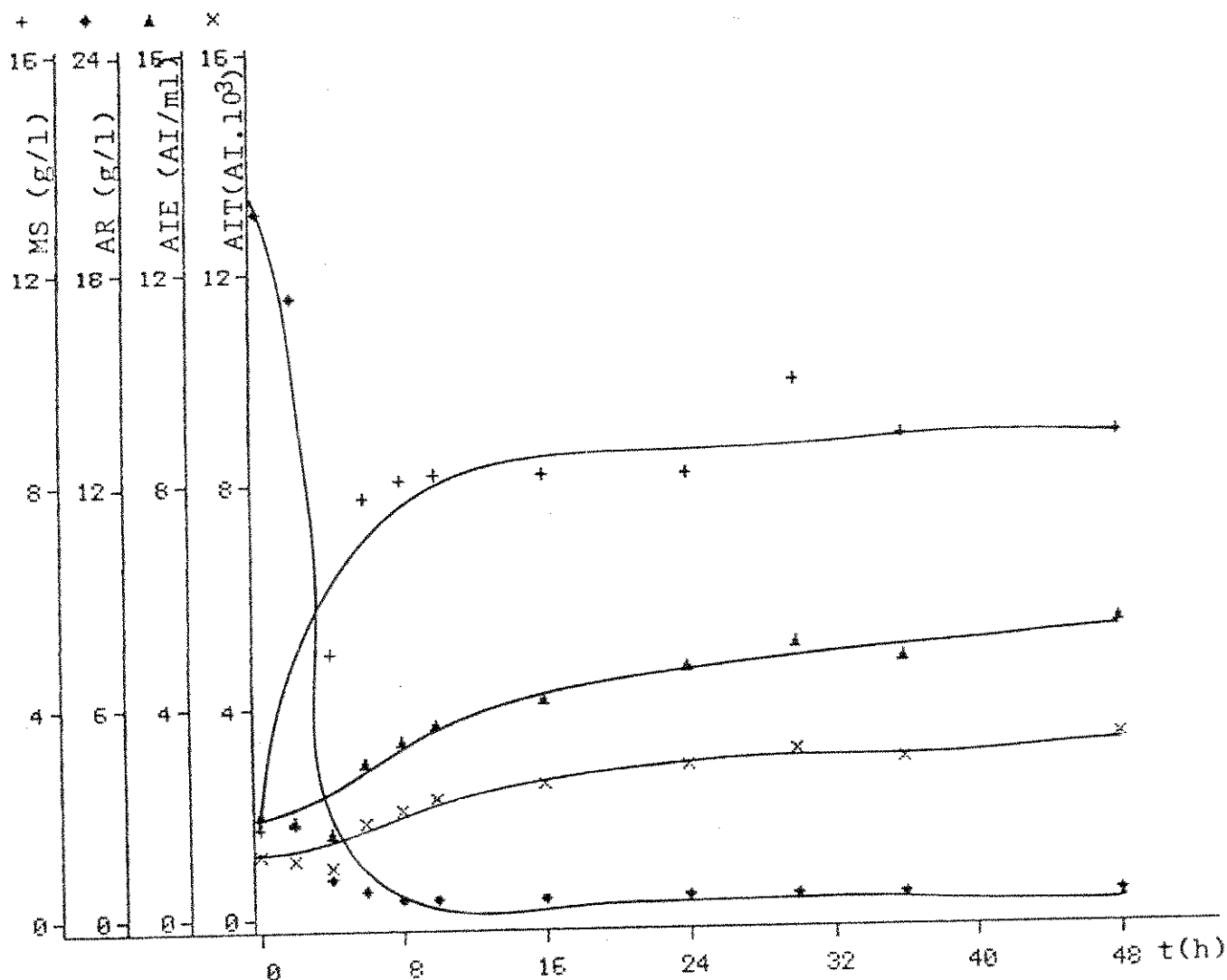


Figura 11 - Evolução do crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e a atividade invertase total (AIT) durante fermentação de Kluyveromyces bulgaricus ATCC 16045 com controle de pH a 3,5.

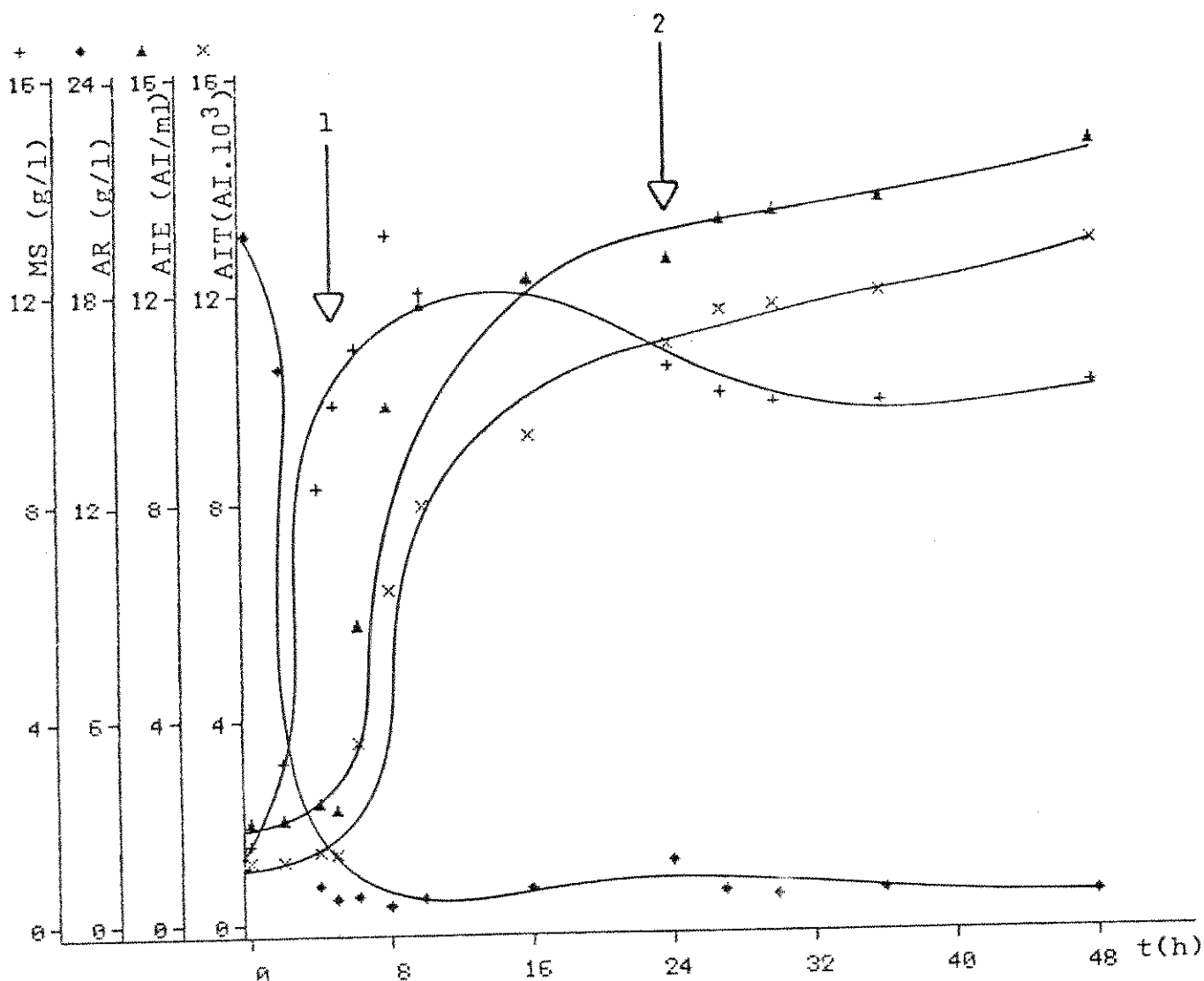


Figura 12 - Evolução do crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e atividade invertase total (AIT) durante fermentação de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 com adição de solução de sacarose 240 g/l na razão de 13,60 g/h.
 (1) início da adição de sacarose
 (2) fim da adição de sacarose

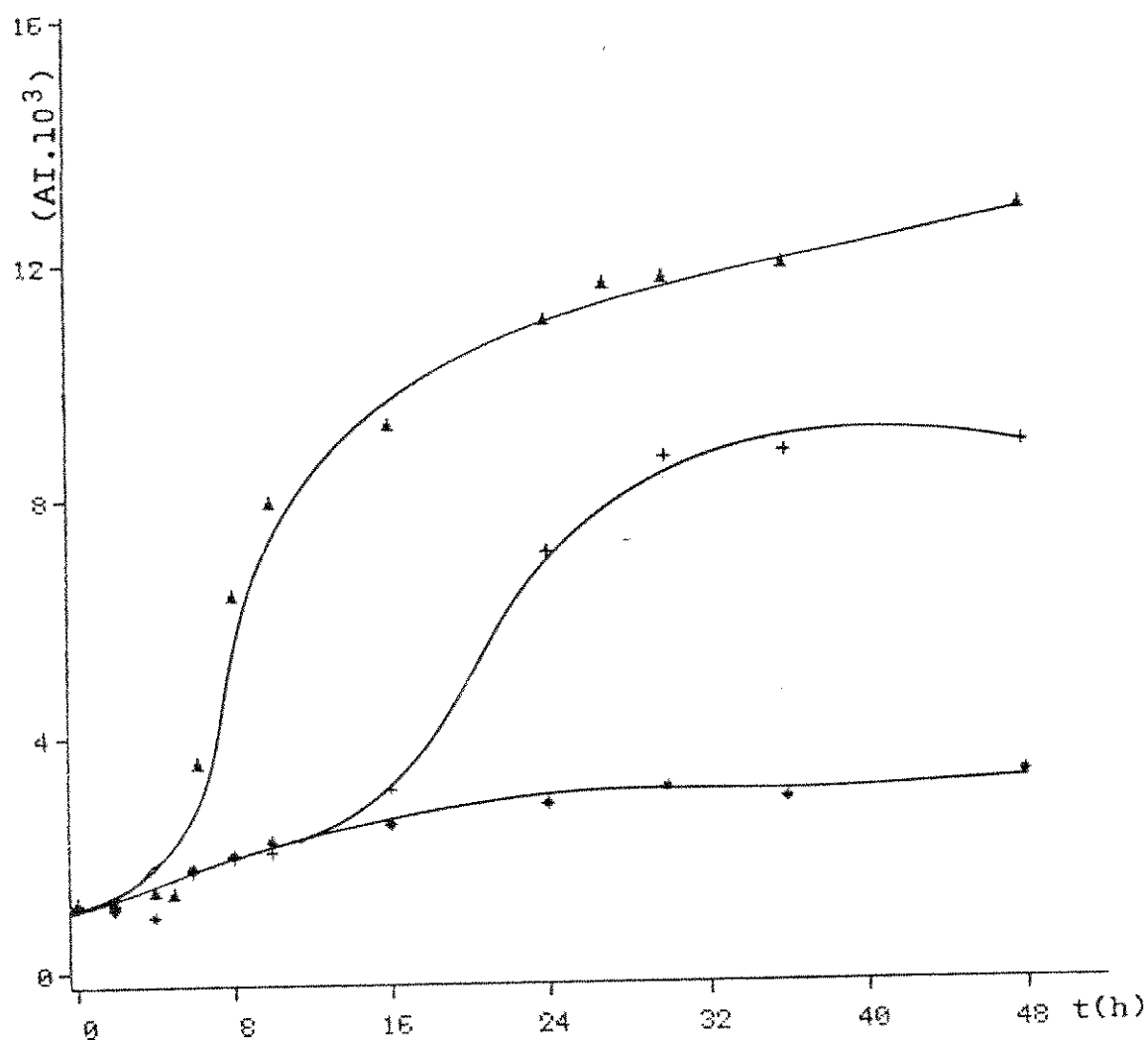


Figura 13 - Evolução da atividade invertase total (AIT) no fermentador durante crescimento de Kluyveromyces bulgaricus ATCC 16045 em mini-fermentador sem controle de pH (+), com controle de pH a 3,5 (◆) e com adição de solução de sacarose 240 g/l na razão de 13,60 g/h (▲).

meira experiência e 23,80 g/h numa experiência posterior. As Figuras 14b e 14c mostram respectivamente estas experiências. Verifica-se que a vazão de 23,80 g/h foi prejudicial à cultura provocando uma inibição da produção de invertase, enquanto que a vazão de 12,84 g/h aparentemente não provocou inibição embora a atividade total atingida no final da fermentação seja semelhante à atividade obtida sem adição de substrato e sem controle de pH. A Figura 14d reúne todos os resultados obtidos para as diversas experiências, onde constata-se que o procedimento que resultou numa maior atividade foi a de adição de sacarose, com uma atividade total de $13,0 \times 10(3)$ Al.

f) Efeito da porcentagem de inóculo e idade da cultura mãe

Em diversas oportunidades, durante a realização deste trabalho, deparou-se com um fenômeno de instabilidade do microrganismo em termos de produção da enzima. Verificou-se que, apesar dos cuidados de se repetir as mesmas condições de cultura, o microorganismo se comportava de forma diferente, resultando numa produção menor de enzima, assim como uma variação menor no pH do meio durante a fermentação. Sem que fosse encontrado uma explicação plausível para esse fato, pensou-se em testar a idade da cultura mãe, parâmetro este que até então não tinha sido estudado. Idealizou-se ao mesmo tempo o teste com a porcentagem de inóculo, variando de 5 a 30%. A idade da cultura mãe variou de 0 a 41 dias após ser replicada em caldo lactosado, como descrito em Material e Métodos (Ítem III.2).

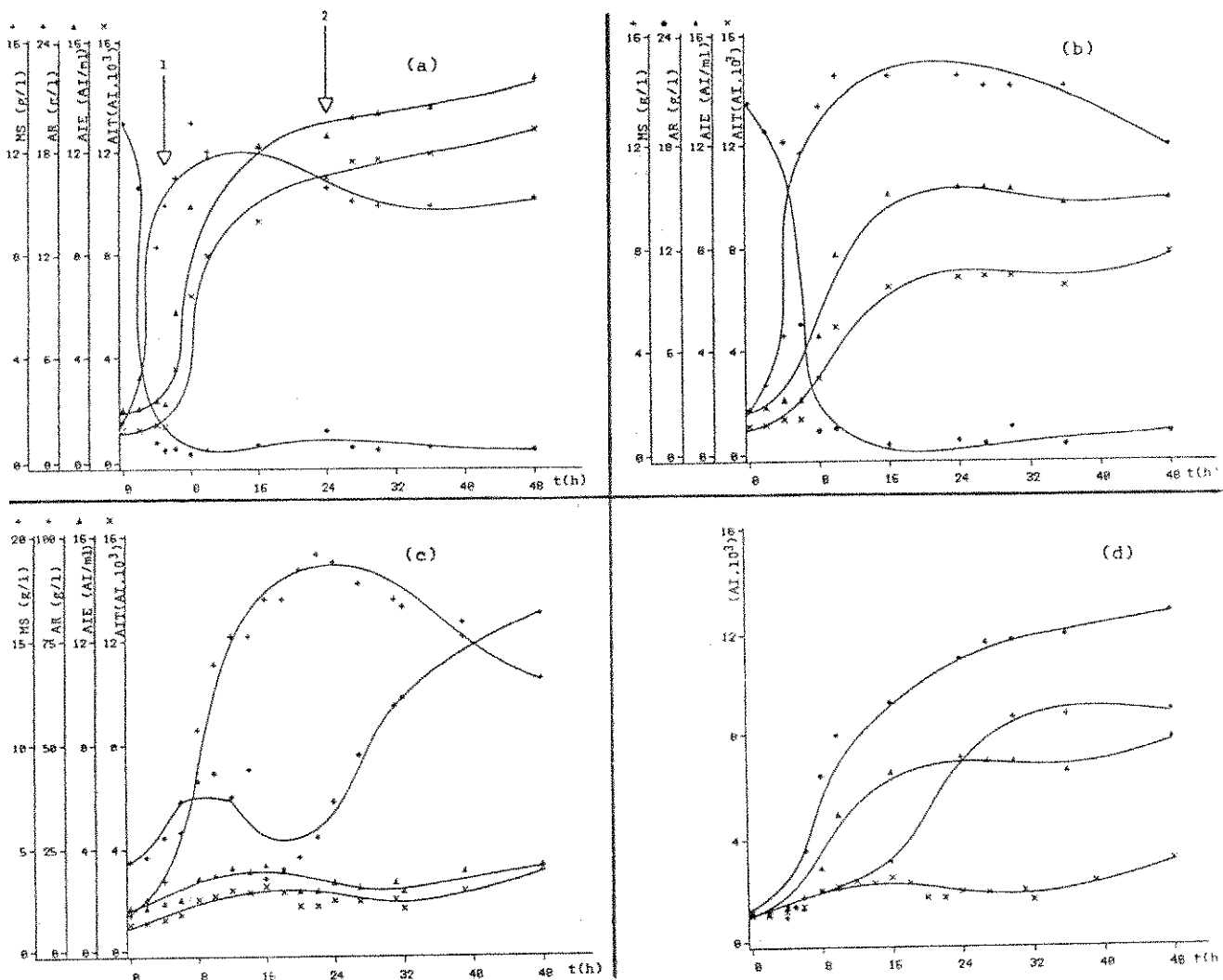


Figura 14 - Evolução do crescimento celular em massa seca (MS), concentração de substrato como açúcares redutores totais (AR), atividade invertase extracelular (AIE) e atividade invertase total (AIT) durante a fermentação de *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045 em mini-fermentador:

- a) Com adição de solução de sacarose 240 g/l na razão de 13,60 g/h
- b) Com adição de solução de melaço 400 g/l na razão de 12,84 g/h
- c) Com adição de solução de melaço 400 g/l na razão de 23,80 g/h
- d) Reunião comparativa dos valores de atividade invertase total (AIT) para fermentação de *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045 nas condições descritas em a (♦), b (▲), c (x) e sem controle de pH (+).

Os resultados, reunidos na Tabela 9, mostram que a instabilidade verificada não é devida à idade da cultura mãe, pois após 0 e 12 dias de idade, houve baixa produção de enzima se comparadas com as outras experiências, com 5, 21 e 41 dias de idade. É possível portanto, que esta instabilidade se deva a fatores intrínsecos ao microrganismo e não a fatores de cultivo. O mesmo fenômeno foi estudado por DWORSCHACK e WICKERHAM (16) onde os autores constataram que culturas de células poliplóides produziam mais invertase que cultura de células diplóides de uma mesma linhagem, *Saccharomyces kluyveri* Y-4288.

A variação da porcentagem de inóculo mostrou pouco efeito sobre a atividade final da cultura como se pode observar ainda na Tabela 9.

3. CARACTERÍSTICAS DA ENZIMA

a) pH ótimo

Para a determinação do pH ótimo da enzima fez-se a reação de atividade enzimática a pHs variando de 3 a 10. Na Figura 15 podemos verificar que a pHs mais baixo a atividade enzimática é superior, sendo o pH ótimo aproximadamente 4,0.

Tabela 9

Evolução da massa seca (MS), açúcar redutor (AR), pH e atividade de invertase extracelular (AIE) durante fermentação de Kluyveromyces fragilis ATCC 16045 em frascos agitados, empregando diferentes concentrações de inóculo de cultura mãe em diferentes estações de idade.

IDADE CULTURA MÃE (DIAS)	TEMPO DE FERM. (h)	5% DE INÓCULO				10% DE INÓCULO				20% DE INÓCULO				30% DE INÓCULO			
		PH	MS (g/l)	AR (g/l)	AIE (AI/ml)	PH	MS (g/l)	AR (g/l)	AIE (AI/ml)	PH	MS (g/l)	AR (g/l)	AIE (AI/ml)	PH	MS (g/l)	AR (g/l)	AIE (AI/ml)
0	0	3,5	1,77	15,30	1,26	3,5	2,84	15,30	1,64	3,5	4,61	15,99	3,40	3,5	7,09	15,74	4,83
	8	3,6	8,16	0,70	4,52	3,6	8,51	0,78	4,48	3,7	9,93	0,96	5,97	3,8	10,64	0,66	6,27
	24	4,3	9,22	0,66	5,64	4,1	9,57	0,66	5,34	4,4	10,28	0,57	6,84	4,1	11,35	0,83	6,87
	32	5,1	10,64	0,66	8,11	4,9	10,46	0,66	6,72	5,0	11,70	0,70	8,51	4,9	12,06	0,83	9,10
	48	5,1	10,28	0,57	7,86	4,8	10,99	0,87	7,18	5,2	12,77	0,52	9,68	5,1	12,41	0,74	9,80
5	0	3,5	1,42	17,49	3,93	3,4	2,84	16,18	2,73	3,4	4,61	16,18	5,48	3,5	6,74	15,31	7,03
	8	3,6	8,51	1,00	7,98	3,6	9,22	0,87	5,56	3,6	9,57	0,92	8,40	3,7	10,64	0,52	9,30
	24	4,7	9,22	1,00	8,71	3,7	10,28	0,61	7,33	4,0	9,93	0,83	8,89	4,6	11,85	0,96	10,47
	32	5,1	10,99	0,74	11,17	5,0	10,99	0,83	14,81	4,3	10,64	1,00	10,03	5,0	12,06	0,57	12,11
	48	5,1	10,64	0,66	15,09	5,0	11,35	0,92	16,24	4,9	12,41	0,52	16,07	5,0	11,90	1,36	15,31
12	0	3,5	1,77	16,70	1,08	3,5	2,84	15,80	2,43	3,5	5,32	16,10	3,51	3,6	7,80	15,90	5,94
	8	3,6	7,45	1,05	5,32	3,6	10,99	0,90	5,67	3,7	9,57	0,82	7,26	3,8	9,93	0,78	8,37
	24	3,8	10,28	0,98	6,48	3,8	11,35	0,78	6,48	4,0	9,93	0,80	8,91	4,1	10,28	0,75	8,59
	32	3,8	10,99	0,80	7,59	3,8	10,64	0,72	6,78	4,0	10,64	0,91	9,66	4,1	11,55	0,78	9,66
	48	3,9	11,70	0,76	8,15	3,8	10,64	0,82	8,10	4,0	10,99	0,76	10,26	5,0	12,06	0,55	11,04
21	0	3,5	1,06	16,30	3,29	3,5	2,48	16,20	5,72	3,5	4,96	16,80	8,15	3,6	5,74	16,00	9,90
	8	3,6	8,51	1,22	8,72	3,7	9,22	1,22	10,60	3,8	7,45	0,97	11,42	3,8	10,64	0,83	11,90
	24	4,7	9,92	0,85	11,36	3,8	11,35	0,82	12,99	4,5	10,64	0,76	12,47	4,4	11,55	0,86	13,23
	32	5,0	10,99	0,78	14,33	5,0	11,35	0,77	15,55	5,1	13,48	0,68	15,25	4,8	12,77	0,65	13,44
	48	5,1	11,70	0,53	16,63	5,1	12,06	0,65	16,47	5,2	13,48	0,58	15,66	5,2	13,48	0,60	16,06
41	0	3,5	1,06	15,80	2,15	3,6	1,42	16,50	4,13	3,6	2,48	16,20	5,80	3,7	4,26	16,10	7,64
	8	3,7	6,38	1,10	6,37	3,8	6,38	0,86	8,53	3,8	6,38	0,78	9,25	3,8	7,69	0,82	8,72
	24	4,2	7,09	0,67	8,53	4,2	7,45	0,75	10,00	4,2	7,09	0,72	10,45	4,5	7,80	0,69	9,58
	32	4,2	7,09	0,70	9,20	5,0	8,87	0,66	10,08	5,1	8,16	0,54	10,91	5,2	8,87	0,50	11,74
	48	5,2	8,51	0,62	13,78	5,2	8,87	0,68	12,10	5,3	8,87	0,60	14,20	5,4	9,57	0,58	13,52

b) Temperatura ótima

Quanto à temperatura ótima da enzima, procedeu-se de maneira similar ao método descrito para a determinação da atividade enzimática, mas mantendo-se a reação a temperaturas entre 20 e 70°C. Constatamos pela Figura 16 que a maior atividade está entre 50 e 60°C, sendo a temperatura ótima ao redor de 50°C.

c) Estabilidade da enzima

c.1) Em relação à temperatura

A estabilidade térmica da enzima foi determinada mantendo-a a diferentes temperaturas e medindo sua atividade em diversos intervalos de tempo. Na Figura 17 observa-se que acima de 60°C a enzima perde rapidamente a atividade e a 40°C por 1 hora ela perde 8%.

c.2) Em relação ao pH

A enzima mostrou boa estabilidade numa ampla faixa de pH, como comprova a tabela 10. O pH 5,0 foi o mais favorável, mantendo a enzima 100% da atividade após 6 horas de incubação. Entre pH 4,0 e 8,0 a enzima conservou mais de 95% da atividade após 6 horas de incubação.

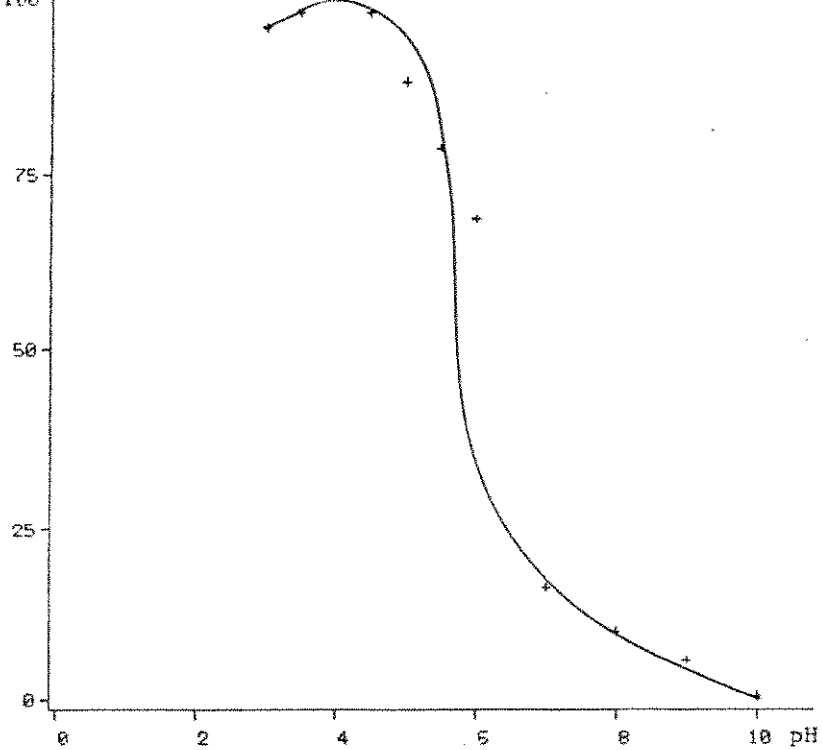


Figura 15 - Efeito do pH na atividade da enzima invertase extracelular.

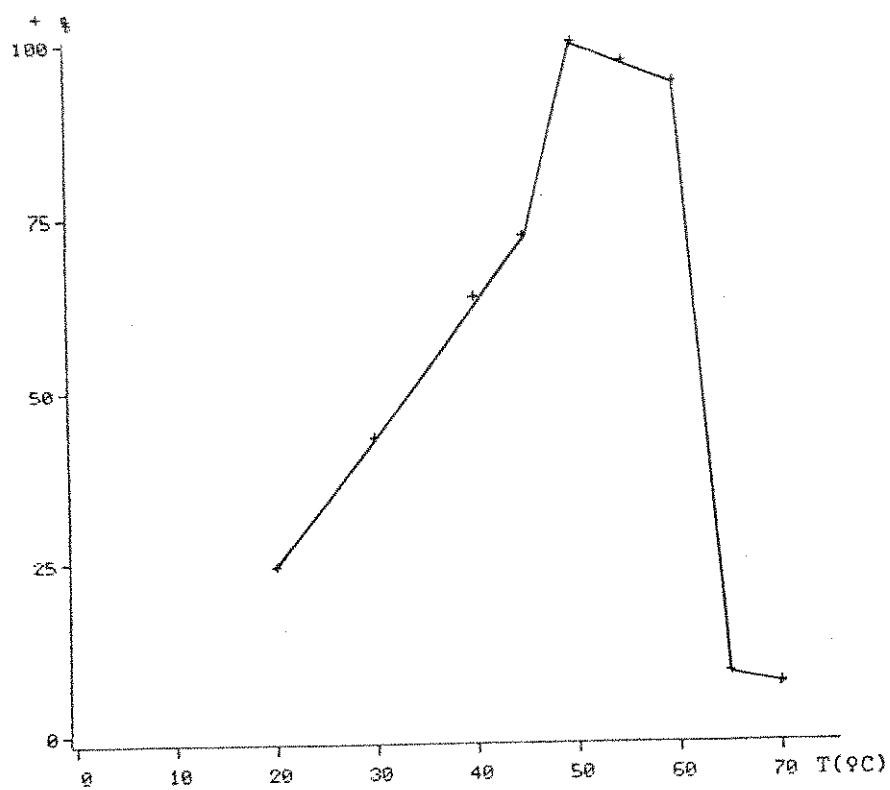


Figura 16 - Efeito da temperatura na atividade da enzima invertase extracelular.

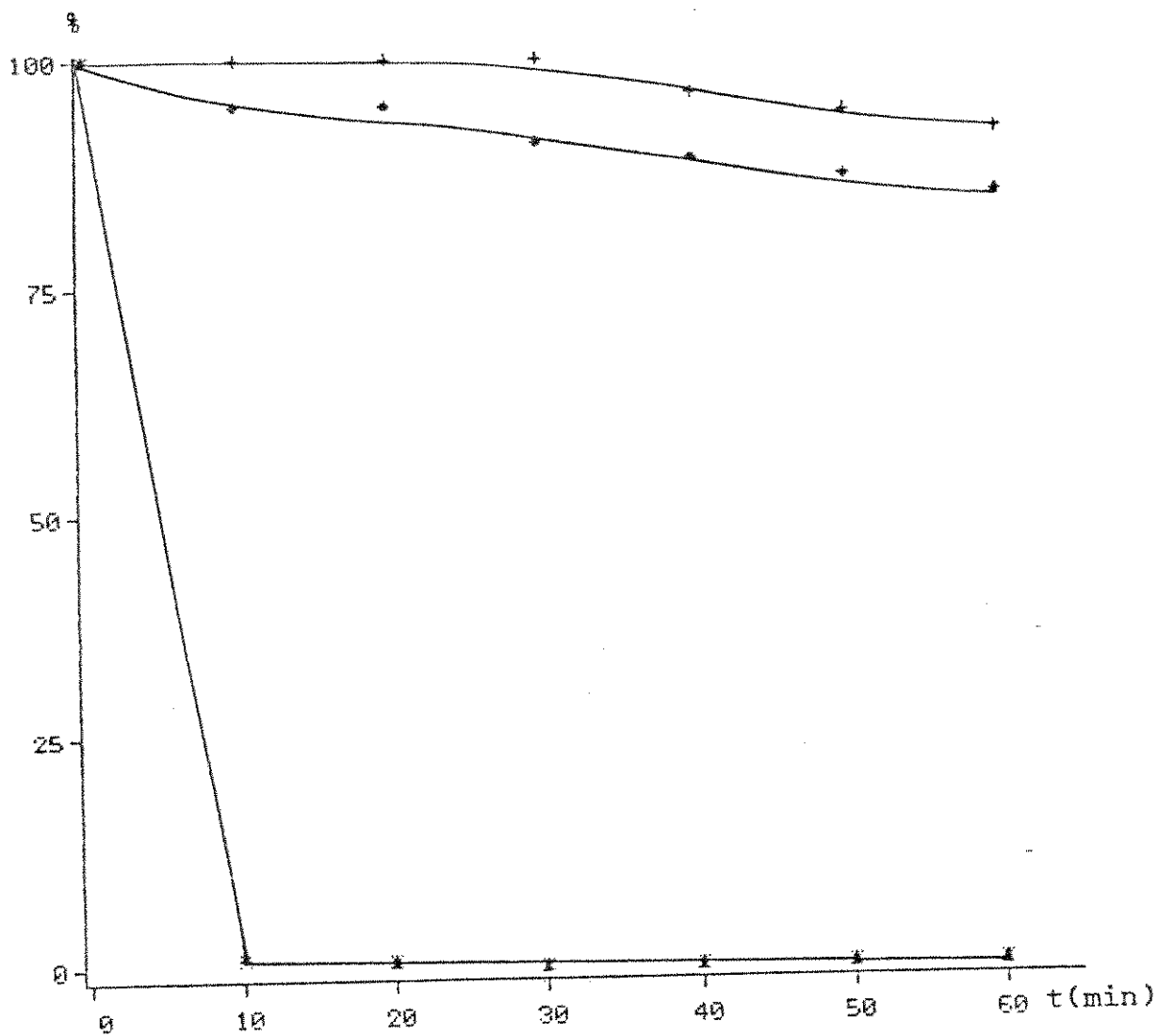


Figura 17 - Efeito da temperatura na estabilidade da enzima invertase extracelular: 40°C (+), 50°C (♦), 60°C (▲) e 70°C (x).

Tabela 10

Atividade relativa da enzima invertase submetida a diferentes pHs. pH de estabilidade.

TEMPO (h)	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0	pH 10,0
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	95,3	76,1	80,1
1,0	95,1	94,8	100,0	98,7	97,0	92,1	74,6	77,0
4,0	87,8	95,2	100,0	96,3	97,0	95,6	74,6	47,8
6,0	84,1	95,2	100,0	96,3	95,4	95,3	69,9	13,3

d) Especificidade

A especificidade da enzima foi verificada incubando-a com os trissacarídeos rafinose (o- α -D-galactopiranosil-(1-->6)-o- α -D-glicopiranosil (1-->2)-o- β -D-frutofuranosídeo) e melezitose (o- α -D-glicopiranosil (1-->3)-o- β -D-frutofuranosil (2-->1)-o- α -D-glicopiranosídeo). Os produtos da hidrólise enzimática foram analisados através de cromatografia descendente, de acordo com o procedimento descrito em Material e Métodos (item III.5.d).

As figuras 18, 19 e 20 ilustram , respectivamente, que a enzima hidrolisa a sacarose, hidrolisa a rafinose em melibiose e frutose, mas não hidrolisa a melezitose. Esses resultados mostram que a enzima hidrolisante da sacarose é específica para os grupos β -frutosil e assemelha-se a uma β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase (E.C.3.2.1.26).



Figura 18 - Cromatografia em papel -
Hidrólise da sacarose pe
la enzima produzida por
Kluyveromyces bulgaricus
ATCC 16045

1 - tempo - 0h

2 - tempo - 5h



Figura 19 - Cromatografia em papel -
Hidrólise da rafinose pe
la enzima produzida por
Kluyveromyces bulgaricus
ATCC 16045

1 - tempo - 0h

2 - tempo - 5h



Figura 20 - Cromatografia em papel -
Hidrólise da melezitose -
pela enzima produzida por
Kluyveromyces bulgaricus
ATCC 16045
1 - tempo - 0h
2 - tempo - 5h

4. EXTRAÇÃO

a) Efeito da adição de sulfato de amônio e etanol

A extração de invertase do meio de cultura foi estudada utilizando sulfato de amônio e etanol. O grau de saturação de cada composto foi de 70%. Adicionou-se lentamente o sulfato de amônio e o solvente orgânico (a -15°C) à alíquotas de solução enzimática e deixou-se em repouso por um tempo variado de 0 a 24 horas a baixa temperatura. Posteriormente as soluções foram centrifugadas e o precipitado contendo a enzima foi suspenso em tampão fosfato 0,05M pH 5,0 (o precipitado do sulfato de amônio foi previamente dialisado em tampão fosfato 0,05M pH 5,2 por 20 horas). Os resultados estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11

Rendimento de extração (%) da enzima invertase com etanol e sulfato de amônio a 70% de saturação

TEMPO DE REPOUSO (h)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	ETANOL
0	1,98	85,10
1	1,81	80,23
2	1,77	68,37
5	1,81	70,59
24	1,77	72,73

Nesta tabela pode-se notar que o sulfato de amônio não é adequado para a purificação da enzima, fornecendo uma taxa de extração muito baixa. Segundo MORENO e col. (1975) este comportamento se deve à solubilidade da enzima pesada em soluções com sulfato de amônio a 70% de saturação. Quanto ao etanol, obteve-se

um rendimento da ordem de 85% no tempo zero. Com relação ao tempo de repouso observa-se que centrifugando logo após a adição do solvente obteve-se a maior porcentagem de extração. Tempos maiores de repouso não implicam num maior rendimento.

b) Efeito da adição de íons

Para investigar a existência de íons ativadores ou estabilizantes, a enzima foi precipitada com etanol a 70% de saturação e centrifugada imediatamente após. O precipitado foi suspenso em tampão fosfato 0,05M pH 5,0 na presença de íons cálcio, potássio, zinco e magnésio em concentrações de 0 a 0,05M.

Na tabela 12 estão reunidos os dados obtidos neste ensaio. De uma forma geral a adição de íons foi benéfica em todos os casos, aumentando o rendimento de extração de 3 a 5% até uma determinada concentração. O melhor efeito foi obtido com zinco num concentração de 0,001M.

Tabela 12

Rendimento de extração (%) da enzima invertase com etanol a 70% de saturação e com adição de íons.

CONCENTRAÇÃO DO ÍON	++ Ca	+ K	++ Zn	++ Mg
0	83,33	83,33	83,33	83,33
0,001 M	85,65	87,62	88,41	86,09
0,002 M	86,75	83,33	83,33	86,09
0,005 M	81,55	81,01	83,33	86,09
0,008 M	79,54	81,01	80,66	83,33
0,010 M	75,32	78,90	78,09	80,67
0,050 M	73,31	78,90	78,09	80,67

V. CONCLUSÕES

O trabalho realizado levou-nos a tirar as seguintes conclusões:

- Nos testes realizados com diferentes microrganismos para produção de invertase, a linhagem de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 foi a mais eficiente.

- A produção de invertase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 é favorecida em aerobiose.

- A enzima produzida por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 é uma enzima constituinte.

- A atividade enzimática extracelular é bem superior à atividade intracelular.

- Os meios 5, 12 e 13 foram os que melhor se prestaram à produção da enzima, com uma atividade máxima de 16,67 AI/ml após 48 horas de cultura no meio 5, porém o meio 13 tem como ponto positivo o baixo custo dos componentes.

- A adição de tensio-ativos favorecem a produção de invertase (57%) na concentração de 0,1% de Tween 80.

- Concentrações de melaço acima de 50,0 g/l não favorecem a produção enzimática. A melhor concentração entre as diversas testadas foi de 30,2 g/l.

- Temperaturas acima de 30°C são prejudiciais à produção de enzima. A temperatura ótima para o processo deve estar ao redor de 30°C.

- As melhores condições de cultura para *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045 foram: meio 13 com pH inicial a 3,5 e temperatura de 30°C.

- O controle de pH durante a fermentação não foi favorável à produção de invertase.

- A adição de solução de sacarose 240 g/l na razão de 13,6 g/h incrementou consideravelmente o crescimento celular, bem como a produção enzimática, atingindo uma atividade total de $12,93 \times 10^3$ AI, 44% superior ao processo sem adição.

- A temperatura ótima de atuação da enzima é ao redor de 50°C. Acima de 60°C ela é rapidamente inativada.

- O pH ótimo da enzima é ao redor de 4,0. A enzima mostrou boa estabilidade numa ampla faixa de pH, porém pH 5,0 foi o mais favorável.

- A enzima hidrolisante da sacarose é específica para os grupos β -frutossil e assemelha-se a uma β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase (E.C.3.2.1.26).

- Com relação à purificação, verificou-se que sulfato de amônio a 70% de saturação não é favorável à extração da enzima. O etanol a 70% de saturação forneceu um rendimento de extração da ordem de 85%, imediatamente após a adição do solvente.

- A adição de íons na purificação mostrou-se ligeiramente benéfica até uma dada concentração, sendo que o rendimento de extração aumentou até 5% quando foi usado 0,001M do íon zinco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMS, B.B.; HACKEL, R.; MIZUNAGA, T. e LAMPEN, J.O. - "Relationship of large and small invertases in *Saccharomyces*: mutant selectively deficient in small invertase". J. Bacteriol, 135, 809-817, 1978.
2. ARNOLD,, W.N. - "Heat inactivation kinetics of yeast β -fructofuranosidase a polydisperse system". Biochim. Biophys. Acta 178,347-353, 1969.
3. ARNOLD, W.N.- "The structure of the yeast cell wall: solubilization of a marker enzyme, β -fructofuranosidase, by the autolytic enzyme system". J. Biol. Chem., 247, 1161-1169, 1972.
4. ARNOLD, W.N.- "Localization of acid phosphatase and β -fructofuranosidase within yeast cell envelopes". J. Bacteriol., 112, 1346-1352, 1972.
5. BABCZINSKI, P.- "Partial purification, characterization and localization of the membrane-associated invertase of yeast". Biochim. Bbiophys. Acta, 614, 121-133, 1980.
6. BETETA, P. e GASCÓN, S.- "Localization of invertase in yeast vacuolos". FEBS Lett. 13, 297-300, 1971.

7. BECKER, J.C.; MITCHELL, R.L. e PIERSON, W.G. - "Invertase containing mouth care agente. Ger. Offen 2, 044, 534 (Cl. A 61 K)) Apr. 15, 1971, US appl. oct. 06, 1969. Apud Chem. Abstr., Columbus, 75:52834t, 1971.
8. COLONNA, W.J.; CANO, F.R. e LAMPEN, J.O.- "Microheterogeneity in yeast invertase". J. Chromatography, 386, 293-300, 1975.
9. DAVIES, A. "Enzyme formation in *Saccharomyces fragilis*. 1. Invertase and raffinase". Biochem. J. 55, 484-497, 1953.
10. DAVIES, A.- "Invertase formation in *Saccharomyces fragilis*". J. Gen. Microbiol., 14, 109-121, 1956.
11. DODYK, F. e ROTHSTEIN, A.- "Factors influencing the appearance of invertase in *Saccharomyces cerevisiae*". Arch. Biochem. Biophys., 104, 478-486, 1964.
12. DRAETTA, I.S. - "Isolamento, purificação e cinética da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*". Coletânea do ITAL, 4, 23-37, 1971-1972.
13. DRAETTA, I.S. e PARK, Y.K.- "Estudo das propriedades e cinética de invertases solúvel e insolúvel". Revista Brasileira de Tecnologia, 4, 199-206, 1973.

14. DRAETTA, I.S.- "Invertases solúvel e insolúvel: suas propriedades e cinética". Tese de Mestrado nº 71, FEA, UNICAMP, 1973.
15. DWORSCHACK, R.G. e WICKERHAM, L.J.- "Production of extracellular invertase by the yeast, *Saccharomyces uvarum* Y-972". Arch. Biochem. Biophys. 76, 449-456, 1958.
16. DWORSCHACK, R.G. e WICKERHAM, L.J.- "Yeast Enzymes". In: Microbial Enzyme Production. GUTCHO, S.J., ed. Noyes Data Corporation, New Jersey, London, England, 1974.
17. EDWARDS, D.G. e WISEMAN, A.- "Novel shock-tube cell-disruptor". Proc. Biochem., 6, 32-34. 1971.
18. FARKAS, V.; KOVARÍK, J.; KOSINOVÁ, A. e BAUER, S.- "Autoradiographic study of Mannan incorporation into the growing cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol., 117, 265-269, 1974.
19. FOLLOWS, M.; HETHERINGTON, P.J.; DUNNILL, P. e LILLY, M.D.- "Release of enzymes from baker's yeast by disruption in an Industrial Homogenizer". Biotechnol. Bioeng. 13, 549-560, 1971.
20. GALLILI, G. e LAMPEN, J.O.- "Large and small invertase and

the yeast cell cycle pattern of synthesis and sensitivity to tunicamycin". *Biochim. Biophys. Acta*, 475, 113-122, 1977.

21. GASCÓN, S. e LAMPEN, J.O.- "Purification of the internal invertase of yeast". *J. Biol. Chem.*, 243, 1567-1572, 1968.

22. GASCÓN, S.; NEUMANN, N.P. e LAMPEN, J.O.- "Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast". *J. Biol. Chem.*, 243, 1573-1577, 1968.

23. GASCÓN, S. e OTTOLENGHI, P. - "Invertase isozymes and their localizaation in yeast". *C.R. Trav. Lab. Carlsberg*, 36, 85-93, 1967.

24. GODFREY, T.- "Comparison of key characteristics of industrial enzymes by type and source". In: *Industrial Enzymology - The Aplication of Enzymes in Industry*. GODFREY, T. e REICHEL, J., eds. The nature Press, N.Y., 1983.

25. GOLDSTEIN, H.; BARRY, P.W.; RIZZUTO, A.B.; VENKATASUBRAMANIAN, K. e VIETH, W.R.- "Continuous enzymatic production of invert sugar". *J. Ferment. Technol.*, 55, 516-524, 1977.

26. GOUD, B.J.- "Enzyme data". In: *Handbook of Enzyme Biotechno-*

logy. WISEMAN, A., ed., Ellis Harwood Ltd., Chichester, England, 1975.

27. HESTRIN, S.; FEINGOLD, D.S. e SCHRAMM, M.- "Hexoside hydrolases". In: Methods in Enzymology I. COLOWICK, S.P. e KAPLAN, N.O., eds., Academic Press, N.Y., 1955.
28. IGLESIAS, C.F.; MORENO, F. e GASCÓN, S.- "Light and intermediate molecular forms of yeast invertase as precursors of the heavy enzyme". FEBS Letters, 114, 57-60, 1980.
29. IIZUKA, M. e YAMAMOTO, T.- "Studies on invertase of *Candida utilis*. Part I: A comparative study on isolation methods of the enzyme". Agr. Biol. Chem., 36, 349-355, 1972.
30. LAMPEN, J.O. - "External enzymes of yeast: their nature e formation". Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Ser. 34, 1-18, 1968.
31. LAMPEN, J.O.; KUO, S.C. e LIRAS, P. - "Synthesis of external glycoprotein enzymes by yeast". In: Metabolism and regulation of cellular processes. SUOMALAINEN, H.; WALLES, C., eds. Proceedings of the third International Specialized Symposium on yeasts, part 2. Helsinki: Otaniemi, 1973.
32. LEHNINGER, A.L. - "Proteínas: purificação e caracterização".

In: Bioquímica. LEHNINGER, A.L., ed. Editora Edgard Blucher Ltda, 1976.

33. LESKOVAC, V.; TRIVIĆ, S.; PAVKOV-PERICIN, D. e PRODANOV, V.-
"External yeast β -fructosidase. The role of tryptophyl
residues in catalysis". Biochim. Biophys. Acta, 405,
482-491, 1975.
34. LIRAS, P. e GASCÓN, S.- "Biosynthesis and secretion of yeast
invertase: effect of cycloheximide and 2-deoxy-D-glucose". Eur. J. Biochem., 23, 160-165, 1971.
35. MILLER, G.L. - "Use of Dinitrosalicylic acid reagent for de-
termination of reducing sugar". Analytical Chem. 31,
426-428, 1959.
36. MYRBACK, K. - "Studies on yeast invertase". Arch. Biochem.
Biophys. 69, 138-148, 1957.
37. MYRBACK, K.- "Invertases". In: The Enzymes. BOYER, P.D.;
LARDY, H.; MYRBACK, K., eds. Academic Press, N.Y., 1960.
38. MYRBACK, K. - "Studies on yeast β -fructofuranosidase XXII.
The reaction with the zinc ion. Ark. Kemi, Stockholm,
27, 507-514, 1967.
39. MORENO, F.; OCHOA, A.G.; GASCÓN, S. e VILLANUEVA, J.R.- "Mo-

lecular forms of yeast invertase". Eur. J. Biochem., 50, 571-579, 1975.

40. MORMENEO, S. e SENTANDREU, R.- "Regulation of invertase synthesis by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol., 152, 14-18, 1982.
41. MORTATTE, M.P.L.; SATO, H.H. e PARK, Y.K.- "Induction and some characteristics of sucrose hydrolyzing enzyme from *Zymomonas mobilis*". Biotechnol. Letters, 5, 229-232, 1983.
42. NEUBERG, C. e MANDL, I. - "Invertase". In: The Enzymes. BOYER, LARD e MYRBACK, eds. Academic Press, N.Y., 1950.
43. NEUMANN, N.P. e LAMPEN, J.O.- "Purification and properties of yeast invertase". Biochemistry, 6, 468-475, 1967.
44. NEUMANN, N.P. e LAMPEN, J.O.- "The glycoprotein structure of yeast invertase". Biochemistry, 8, 3552-3556, 1969.
45. NIXON, P.F. e BLAKLEY, R.L. - "Invertase secretion and sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts". J. Biol. Chem. 243, 4722-4731, 1968.
46. NOVICK, P. e SCHEKMAN, R. - "Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of

Saccharomyces cerevisiae". Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 1858-1862, 1979.

47. PARK, Y.K.- "Produção de Enzimas". In: Tecnologia das Fermentações. ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E. e BORZANI, W., eds. Editora Edgard Blucher Ltda, 1975.
48. PARKER, K.J.- "Invertase". In: Enzymess and Food Processing. BIRCH, G.G. e BLAKLBROUGH, N., eds. Applied Science Publishers Ltda, London, 1981.
49. PERUTZ, M.F. - "Subcellular distribution of yeast invertase isoenzymes". Proc. Roy. Soc. Ser. B 167, 349-355, 1967.
50. REED, G. "Invertases". In: Enzymes in Food Processing. REED, G., ed. Academic Press, N.Y., 1975.
51. REESE, E.T. e MAGUIRRE, A.- "Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms". Appl. Microbiol., 17, 242-245, 1969.
52. REESE, E.T.; LOLA, J.E. e PARRISH, F.W. - "Modified substrates and modified products as inducers or carbohydrases". J. Bacteriol., 100, 1151-1154, 1969.
53. RODRÍGUEZ, L.; RUIZ, T.; VILLANUEVA, J.R. e SENTANDREU, R.- "Yeast invertase: subcellular distribution and possible

relationship between the isoenzymes". Current Microbiol.,
1, 41-44, 1978..

54. SICARD, P.- "Applications Industrielles des enzymes". In:
Les Enzymes - Production et utilisations industrielles.
DURANT, G. e MONSAN, P., eds. Gauthier Villars, Paris,
1982.
55. SMITH, W.L. e BALLOU, C.E.- "Immunochemical characterization
of the mannan component of the external invertase (β -fructofuranosidase) of *Saccharomyces cerevisiae*". Bioche-
mistry, 13, 355-361, 1974.
56. STRUMEYER, D.H.. e MALIN, M.J.- "Resistance of extracellular
yeast invertase and other glycoproteins to denaturation
by tannins". Biochem. J., 118, 899-900, 1970.
57. SUTTON, D.D. e LAMPEN, J.O. - "Localization of sucrose and
maltose fermenting systems em *Saccharomyces cerevisiae*".
Biochim. Biophys. Acta 56, 303-312, 1962.
58. SUZUKI, H.; OZAWA, Y. e MAEDA, H.- "Studies on the water-in-
soluble enzyme hydrolysis of sucrose by insoluble yeast
invertase". Agr. Biol. Chem., 30, 807-812, 1966.
59. TRACEY, M.V. - "Substrate constant for yeast invertase".
Biochim. Biophys. Acta, 77, 147-149, 1963.

60. TKACZ, J.S. e LAMPEN, J.O.- "Surface distribution of invertase on growing *Saccharomyces* cells". *J. Bacteriol.*, 113, 1073-1075, 1973.
61. WICKERHAM, L.J.- "Evidence of the production of extracellular invertase by certain strains of yeasts". *Arch. Biochem. Biophys.*, 76, 439-448, 1958.
62. WILLIAMS, N.J. e WISEMAN, A. - "Ease of invertase (β -fructofuranosidase) solubilization in disruption of brewer's yeast by Vibro-Mill". *Biochem. Soc. Trans.*, 4, 1299-1301, 1976.
63. WISEMAN, A. - "Enzymes for breakage of micro-organisms". *Process Biochem.* 4, 63-65, 1969.
64. WISEMAN, A. e JONES, P.R. - "Assay-increment and solubilization of α -glucosidase and invertase in disruption of brewer's yeast". *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 2, 26-28, 1971.
65. WISEMAN, A.- "New and modified invertases and their applications". In: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. WISEMAN, A., ed. Ellis Harwood House, England, 1979.

66. WISEMAN, A. e WOODWARD, J.- "Industrial yeast invertase stabilization". Proc. Biochem., July/August, 24-26, 1975.
67. WHITAKER, J.R. - "The glycoside hydrolases". In: Principles of Enzymology for the Food Science. WHITAKER, J.R., ed. Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1972.
68. WOODWARD, J. e WISEMAN, A.- "Folding-Pathway selection or cross-linking as the cause of thermal stabilization of yeast invertase conformation by its mannan". Bioch. Soc. Trans., 1, 80-82, 1973.