



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**CATARINA FRANCISCA MORAIS LIMA CARVALHINHO**

**PRODUÇÃO DE INVERTASE DE *Bacillus tequilensis* ISOLADA DO FRUTO**  
**PUPUNHA: PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E SÍNTESE DE FRUTO-**  
**OLIGOSSACARÍDEOS**

**Palmas – TO**

**2024**

**Catarina Francisca Morais Lima Carvalhinho**

**Produção de invertase de *Bacillus tequilensis* isolada do fruto pupunha: propriedades bioquímicas e produção de fruto-oligossacarídeos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em ciência e tecnologia de alimentos da Universidade Federal do Tocantins (UFT), como requisito à obtenção do grau de Mestra em ciência e tecnologia de alimentos.

Orientador (a): Prof. Doutor Alex Fernando de Almeida

**Palmas - TO  
2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

C331p    Carvalhinho, Catarina Francisca Morais Lima.  
Produção de invertase de *Bacillus tequilensis* isolada do fruto da pupunha: propriedades bioquímicas e síntese de fruto-oligossacarídeos. / Catarina Francisca Morais Lima Carvalhinho. – Palmas, TO, 2024.

117 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2024.

Orientador: Alex Fernando De Almeida

1. invertase bacteriana. 2. *Bacillus tequilensis*. 3. açúcar demerara. 4. fruto-oligossacarídeos. I. Título

**CDD 664**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**Catarina Francisca Morais Lima Carvalhinho**

**Produção de invertase de *Bacillus tequilensis* isolada do fruto da pupunha: propriedades bioquímicas e produção de fruto-oligossacarídeos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos avaliada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 02/ 02 / 2024

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida, UFT

---

Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, UNIFAL

---

Prof. Dr. Nelson Rosa, UFPA

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por renovar suas misericórdias sobre mim todos os dias e por me fortalecer em todos os momentos em que quis parar.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio e compreensão quando estive ausente, em especial ao meu esposo Jefte, que me acompanhou ao laboratório em muitos finais de semana e feriados. Agradeço por ser o ombro em que pude descansar.

Agradeço imensamente a Roze Anne e Larissa que dividiram comigo as tristezas e alegrias durante todo esse tempo, por tanto me ajudarem e por não me deixarem desistir e, também, por tornarem o ambiente de trabalho mais leve e divertido.

Agradeço aos professores Dra. Solange Carreiro, Dra. Caroline Pires e Dr. Guilherme Nobre por terem, tantas vezes, cedido espaço de trabalho.

Agradeço a toda equipe do LABIC, em especial aos professores Dr. Sergio A. V. Morales e Dra. Michelle C. A. Xavier por terem me acolhido e me ensinado tanto. Agradeço a Gabriela e a todos os alunos de ICs pela parceria, apoio, carinho e tantos cafés e momentos de descontração.

Agradeço ao professor Dr. Alex Fernando de Almeida, por ceder a mim sua orientação, por todos os ensinamentos, paciência e prontidão em sanar as minhas dúvidas.

À CAPES pela concessão de recursos de custeio para o desenvolvimento do Projeto PROCAD-AM 17/07/2018 (Processo nº 88881.200497/2018-01).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal do Tocantins pela infraestrutura disponibilizada durante todo o período de experimentos.

## RESUMO

Invertases (E.C. 3.2.1.26) são enzimas que possuem a capacidade de produzir açúcar invertido clivando a ligação  $\alpha$ -1,4-glicosídica entre D -glucose e D -frutose. Podem ser encontradas em diversos seres vivos, como plantas, animais e microrganismos, sendo que a produção microbiana é a mais rápida e vantajosa. Bactérias apresentam grande potencial tecnológico para a produção de invertases mediante o cultivo em estado líquido (Smf), técnica em que são obtidas 90% das enzimas microbianas para uso industrial. A Amazônia é o maior bioma do planeta e seus frutos apresentam uma extensa variedade de microrganismos autóctones com potencial biotecnológico, como o fruto da pupunha. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi produzir invertase bacteriana a partir de uma cepa de *Bacillus tequilensis* PP6 isolada do fruto da pupunha e obter a melhor composição de meio de cultura para essa produção, sendo testados seis meios distintos, cujo meio composto por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1  $\text{MgSO}_4$ ; 0,1  $\text{CaCl}_2$ ; 0,01 e  $\text{NaCl}$ ; 10 proporcionou a maior atividade enzimática (3,60 U/mL). Também, buscou-se analisar a melhor fonte de carbono, variando os cultivos com sacarose P.A, açúcar mascavo e açúcar demerara nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 % (m/v). O açúcar demerara, na concentração de 3% (m/v) apresentou o maior valor de atividade enzimática (5,53 U/mL). A caracterização bioquímica da enzima mostrou que os melhores valores de pH e temperatura do meio reacional foram iguais a 5,0 e 50 °C, respectivamente. Com relação a estabilidade frente ao pH, a enzima foi estável em todos os pHs testados durante 24 horas de incubação e estável termicamente em 30,40, 45 e 50°C.

Analisando a influência dos íons sob a atividade enzimática, verificou-se que a presença do ferro aumentou em 157,55% a atividade da enzima, ao passo que a presença do sódio aumentou a atividade da enzima em 22,85% em relação a sua atividade inicial. Também foi possível avaliar a atividade de transfrutoseilação da enzima, sendo as concentrações de sacarose de 20 e 30% (m/v) as melhores para produção de frutose transfrutoseilada, com os valores de 14,72 g/L e 14,60 g/L, respectivamente, durante 90 minutos de reação.

**Palavras-chave:** invertase, açúcar mascavo, açúcar invertido, fruto-oligossacarídeos.

## ABSTRACT

Invertases (E.C. 3.2.1.26) are enzymes that have the ability to produce inverted sugar by cleaving the  $\alpha$ -1, 4-glycosidic bond between D-glucose and D-fructose. They can be found in various living beings, such as plants, animals and microorganisms, with microbial production being the fastest and most advantageous. Bacteria have great technological potential for the production of invertases through liquid state cultivation (Smf), a technique in which 90% of microbial enzymes for industrial use are obtained. The Amazon is the largest biome on the planet and its fruits contain an extensive variety of autochthonous microorganisms with biotechnological potential, such as peach palm fruit. Therefore, the objective of this work was to produce bacterial invertase from a strain of *Bacillus tequilensis* PP6 isolated from peach palm fruit and obtain the best composition of culture medium for this production, testing six different media, the medium consisting of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.1  $\text{MgSO}_4$ ; 0.1  $\text{CaCl}_2$ ; 0.01 and  $\text{NaCl}$ ; 10 provided the highest enzymatic activity (3.60 U/mL). Also, we sought to analyze the best carbon source, varying crops with P.A sucrose, brown sugar and demerara sugar at concentrations of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 % (m/v). Demerara sugar, at a concentration of 3% (m/v) showed the highest value of enzymatic activity (5.53 U/mL). The biochemical characterization of the enzyme showed that the best pH and temperature values of the reaction medium were equal to 5.0 and 50 °C, respectively. Regarding stability in relation to pH, the enzyme was stable at all pHs, analyzing the influence of ions on the enzymatic activity, it was found that the presence of iron increased the activity of the enzyme by 157.55%, while the presence of sodium increased the activity of the enzyme by 22.85% in relation to its initial activity. It was also possible to evaluate the transfructosylation activity of the enzyme, with sucrose concentrations of 20 and 30% (m/v) being the best for the production of transfructosylated fructose, with values of 14.72 g/L and 14.60 g/L, respectively, for 90 minutes in fact.

**Key words:** invertase; brown sugar; invert sugar and fructooligosaccharides.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1- Mapa geral de dobramento e densidade eletrônica experimental da invertase...**Erro!**

**Indicador não definido.17**

Figura 2- Reação de redução do ácido dinitrosalicílico ..... 40

Figura 3- Hidrolise da sacarose. .... 47

Figura 4- Reação de redução do ácido dinitrosalicílico ..... 59

Figura 5- Influência da temperatura do meio reacional na atividade de invertase produzida por *B. tequilensis* PP6..... 70

Figura 6- Influência do pH do meio reacional na atividade de invertase produzida por *B. tequilensis* PP6..... 73

Figura 7- Estabilidade termica da invertase ..... 74

Figura 8- Estabilidade frente ao pH de incubação da invertase produzida por *B. tequilensis* PP.. ..... 78

Figura 9- Efeito de diferentes íons sobre a atividade da invertase produzida por *B. tequilensis* PP6... ..... 79

Figura 10- Produção de açúcar invertido pelo *B. tequilensis* PP6.....82

Figura 11- Produção de frutose trasfrutosilada a partir de *B.tequilensis* PP6.....83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fonte de invertases Bacterianas .....	19
Tabela 2-Métodos de alta e baixa resolução para a purificação de enzimas .....	29
Tabela 3-Técnicas de purificação aplicadas para invertases bacterianas. ....	37
Tabela 4-Propriedades bioquímicas de invertases bacterianas. ....	45
Tabela 5-Influência de diferentes meios de cultivo utilizados na produção de invertase por <i>B. tequilensis</i> PP6. ....	64
Tabela 6-Produção de invertase de <i>B. tequilensis</i> PP6 em cultivos contendo sacarose como fonte carbono.. ....	69
Tabela 7-Produção de invertase de <i>B. tequilensis</i> PP6 em cultivos contendo açúcar mascavo como fonte carbono.... ....	71
Tabela 8-Produção de invertase de <i>B. tequilensis</i> PP6 em cultivos contendo açúcar demerara como fonte de carbono. ....	72

## **LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS**

FOS –fruto-oligossacarídeos

DNS – ácido 3,5-dinitrosalisílico

FFase – Beta-frutofuranosidase,

GRAS -generallyregarded as safe

FES – Fermentação em estado Sólido

DEAE – dietilaminoetil

MMP – Meio mineral padrão

MSC – massa seca celular

NR – Não relatado

DPN–Dímero de polinucleotídeo

CE– Expressão cíclica

RDP–Repetição de DNA polimórfico

SHARP– (Statistical Heavy-Atom Refinement and Phasing)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>2.1 Invertase: definição e mecanismo de ação</b> .....	15
<b>2.2 Produção de invertases bacterianas</b> .....	16
2.2.1 Linhagens de bactérias produtoras de invertases.....	16
2.2.2 Cultivo em Condições Submersas .....	20
2.2.3 Cultivo em Estado Sólido .....	20
2.2.4 Fatores nutricionais .....	22
<b>2.3 Métodos de extração e purificação de invertase bacteriana</b> .....	25
2.3.1 Métodos de Purificação de baixa resolução .....	31
2.3.1.1. Precipitação .....	31
2.3.1.2 Precipitação com sulfato de amônio.....	32
2.3.2 Técnicas de purificação de alta resolução.....	33
2.3.2.1 Purificação por cromatografia de troca iônica .....	33
2.3.2.2 Purificação por cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular .....	34
2.3.2.3 Purificação por cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) .....	34
2.3.2.4 Purificação por cromatografia de afinidade .....	35
2.3.2.5 Cromatografia de interação hidrofóbica.....	35
<b>2.4 Propriedades bioquímicas de invertases bacterianas</b> .....	39
2.4.1 Métodos de determinação da atividade enzimática .....	39
2.4.2 Características bioquímicas de invertases bacterianas .....	40
<b>2.5 Aplicações das invertases</b> .....	44
2.5.1 Açúcar líquido .....	45
2.5.2 Açúcar líquido invertido.....	46
<b>2.6 Avanços recentes</b> .....	48
<b>2.7 Desafios e Futuras pesquisas</b> .....	49
<b>2.8 Conclusão</b> .....	49
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	50
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	50
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	50

<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	51
<b>4.1 Microrganismo: manutenção e inóculo</b> .....	51
<b>4.2 Produção da enzima em cultivos submersos</b> .....	52
4.2.1. Meios de cultivo para produção de invertase.....	52
4.2.2. Efeito de diferentes fontes de carbono para produção de invertase.....	53
<b>4.3 Determinação da concentração de massa celular seca</b> .....	53
<b>4.4 Caracterização das propriedades bioquímicas da invertase</b> .....	54
4.4.1 Efeito da temperatura do meio reacional sobre a atividade enzimática .....	54
4.4.2 Efeito do pH do meio reacional sobre a atividade enzimática .....	54
4.4.3. Ensaio de estabilidade térmica .....	55
4.4.4. Estabilidade frente ao pH de incubação.....	55
4.4.5 Efeito dos íons metálicos na atividade da invertase.....	55
<b>4.5 Hidrólise da sacarose</b> .....	57
<b>4.6 Métodos analíticos</b> .....	57
4.6.1 Determinação da atividade invertase .....	57
4.6. 2 Determinação da atividade frutossiltransferase.....	58
<b>4.7 Análise estatística dos dados</b> .....	60
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>5.1 Efeito de diferentes sais inorgânicos sobre a produção de invertase</b> .....	60
<b>5.2 Efeito de diferentes açúcares sobre a produção de invertase</b> .....	65
<b>5.3. Propriedades bioquímicas da invertase de <i>B. tequilensis</i> PP6</b> .....	70
5.3.1 Influência da temperatura do meio reacional na atividade enzimática .....	70
5.3.2 Influência do pH do meio reacional na atividade enzimática .....	72
5.3.3. Estabilidade térmica da invertase.....	74
5.3.4. Estabilidade da invertase frente ao pH de incubação .....	77
5.3.5. Efeito de íons metálicos sob a atividade de invertase.....	78
<b>5.4. Produção de açúcar invertido</b> .....	81
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	84
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente utilização de biocatalisadores na indústria é vista de forma clara, quando se analisa o mercado global de enzimas, avaliado em US\$ 11,47 bilhões em 2021 e com estimativas de aumento anual de 6,5% até 2030 (MAGHRABY *et al.*, 2023). Dentre as enzimas mais utilizadas na indústria encontra-se a invertase (1, 2-  $\beta$ -D-frutofuranosidase, EC 3.2.1.26), biocatalisadores, segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), pertence à classe das GH32 glicosil hidrolases, capazes de catalisar reações de hidrólise em moléculas de sacarose (HAKKOYMAZ; MAZI, 2020). O processo de hidrólise ocorre por meio da quebra da ligação glicosídica  $\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$  da sacarose, resultando na formação de uma mistura equimolar conhecida como açúcar invertido (OLIVEIRA *et al.*, 2020). As invertases desempenham papéis relevantes em diversas indústrias, incluindo têxtil, cosmética, médica, farmacêutica e alimentar, entre outras. Seu emprego abrange a produção de mel artificial, formulações de alimentos infantis, fabricação de cerveja, formulação de rações animais, síntese de biocombustíveis e contribuições para o desenvolvimento de eletrodos enzimáticos utilizados na detecção de sacarose em alimentos e bebidas (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020; ALMEIDA *et al.*, 2018). Essas enzimas também podem atuar na síntese de fruto-oligossacarídeos (FOS) de cadeia curta quando em contato com soluções concentradas em sacarose (BARROS *et al.*, 2020).

As invertases podem ser obtidas de diversas fontes, incluindo animais, vegetais e microbianas (bactérias, fungos filamentosos e leveduras), sendo prevalentes em plantas, uma vez que a enzima é essencial para o seu desenvolvimento (BEGARECHE *et al.*, 2018). Apesar da grande diversidade, as fontes microbianas são as mais usuais, visto que linhagens bacterianas podem apresentar grande potencial biotecnológico, produzindo invertases intracelular, endocelular e extracelular. Algumas linhagens em destaque são *Actinomycetales*, *Brevibacterium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Streptomyces sp.*, *Zymomonas mobilis* e *Bacillus cereus TA-11* (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020).

A utilização de microrganismos, como fonte enzimática, oferece inúmeras vantagens, pois esses organismos têm crescimento rápido, ao contrário das plantas. Além disso, apresentam grande diversidade bioquímica, possibilitando a extração de enzimas com diversas atividades catalíticas, não possuem flutuações sazonais, apresentam facilidade de manipulação genética e pequena liberação de materiais nocivos (GU *et al.*, 2018; MIAO *et al.*, 2018; MEHTA;

SATYANARAYANA, 2016; BINOD *et al.*, 2019). As enzimas podem ser sintetizadas por meio de processos fermentativos conduzidos por microrganismos em diferentes estados incluindo o estado sólido (SSF), estado semissólido, submerso e líquido (SmF). Contudo, a modalidade preponderante para a produção de enzimas microbianas é o SmF. Essa preferência se justifica pela capacidade de mitigar gradientes de temperatura e concentrar nutrientes na presença de água. A utilização do SmF possibilita um controle mais preciso das reações enzimáticas, ampliando as oportunidades de aplicações em contextos industriais (LINCONL *et al.*, 2018).

O processo de extração das enzimas frequentemente resulta em uma mistura complexa contendo não apenas a enzima de interesse, mas também uma variedade de contaminantes, tais como proteínas indesejadas, lipídios, nucleotídeos e outros componentes celulares. Diante do exposto, faz-se necessário realizar a purificação da enzima para garantir sua utilização adequada (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020). A etapa de purificação visa eliminá-las de possíveis contaminantes, ampliar sua durabilidade e estabilidade, além de viabilizar a investigação de suas propriedades bioquímicas. Tais análises, fundamentais para compreender a funcionalidade das enzimas, somente podem ser conduzidas quando as mesmas se encontram em estado puro (LINCONL; MORE, 2017). Diversos métodos são empregados na purificação de enzimas, destacando-se a cromatografia de troca iônica, conforme utilizado por Almeida *et al.* (2018) na purificação de duas invertases de *Aspergillus terreus*. Em uma abordagem distinta, Ávila *et al.* (2018) empregou a técnica de precipitação com cetona para obter uma invertase purificada a partir da atividade de *Candida guilliermondii* isolada de resíduos de pêssego. No âmbito da purificação de invertases bacterianas, Lincoln *et al.* (2018) obteve uma recuperação de 15,58% ao purificar uma invertase extracelular de *Bacillus subtilis* LYN 12, empregando precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel. Esses exemplos evidenciam a importância de escolher métodos de purificação adequados para alcançar a pureza desejada nas preparações enzimáticas.

Considerando que o gênero *Bacillus* é reconhecido como um potencial produtor de invertases (KAUR; TEOTIA, 2017; ZHOU *et al.*, 2016; IVANOVA *et al.*, 2018; LINCONL; MORE, 2017; BASTOS, 2020), esta pesquisa objetiva explorar a habilidade do *Bacillus tequilensis* PP6, isolado do fruto da pupunha, em relação à sua capacidade de produção de invertase. Além disso, visa realizar a caracterização das propriedades bioquímicas dessa

invertase, uma vez que há escassez de informações na literatura acerca do modo de atuação de invertases bacterianas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Invertase: definição e mecanismo de ação

A  $\beta$ -frutofuranosidase (FFase, E.C 3.2.1.26), comumente referida como invertase, recebe tal denominação devido à inversão na rotação óptica observada durante a hidrólise da sacarose. Pertencente à família GH32 de glicosil hidrolases, essa enzima catalisa a quebra da ligação glicosídica  $\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$  da sacarose, resultando na produção equimolar de D-glicose e D-frutose, formando uma mistura conhecida como açúcar invertido (AFTAB *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

No Reino vegetal, as invertases são encontradas no vacúolo ou apoplasto/parede celular e contribuem para a degradação da sacarose compondo uma parte vital do metabolismo vegetal (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020). Contudo, as invertases de vegetais apresentam algumas limitações para aplicações biotecnológicas, como sazonalidade, alto custo de produção e liberação de subprodutos químicos. Dessa forma, os microrganismos são as fontes mais utilizadas para produção de invertase devido a facilidade de produção, de extração e purificação (BENATTOUCHE *et al.*, 2016). Dentre os microrganismos mais utilizados se destacam a *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida spp.*, *Aspergillus niger*, *Arthrobacter globiformis*, *B.cereus*, *Bifidobacterium breves* e *Lactobacillus reuteri* (LINCONL; MORE, 2017).

As invertases podem ser classificadas como ácidas, neutras e alcalinas sendo as invertases ácidas e neutras mais comuns em bactérias (WARCHOL *et al.*, 2002; WIN *et al.*, 2004). Invertases ácidas demonstram uma faixa ótima de pH entre 4,5-5,0, enquanto invertases neutras/alcalinas apresentam sua faixa ótima entre pH 6,5-8. No entanto, a grande maioria das invertases apresentam pH ótimo em torno de 4,5 e temperatura ideal em torno de 55 °C (AFTAB *et al.*, 2021; KUMARI; SETHY, 2020). Quanto a constante de Michaelis-Menten (Km), na literatura, é comum encontrar valores variando de 18,0 Mm a 40 Mm (VITOLLO, 2020). Devido a

essas características, as invertases têm ganhado destaque na hidrólise da sacarose em condições industriais, facilitando o aumento da produção de xaropes à base de glicose e frutose (CHOUKADE *et al.*, 2021).

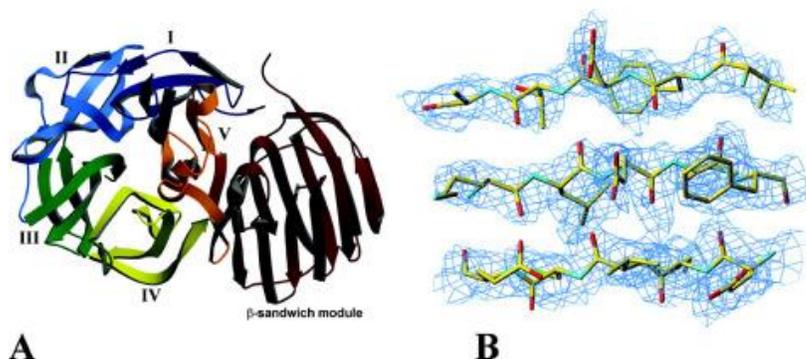
Em relação a estrutura primária, a enzima contém sequências de aminoácidos com três regiões cada uma consistindo em DPN (Dímero de polinucleotídeo), CE (Expressão cíclica) e RDP (Repetição de DNA polimórfico), que podem fazer parte do domínio catalítico e são responsáveis pela ação catalítica da enzima (PANG *et al.*, 2019). A estrutura secundária parece ser formada principalmente por folha- $\beta$  pregueada e na estrutura 3D de invertases bacterianas, observou-se que a região N terminal é composta por cinco folhas- $\beta$ , enquanto o terminal C é formado por duas folhas- $\beta$  (PANG *et al.*, 2019).

## **2.2 Produção de invertases bacterianas**

### **2.2.1 Linhagens de bactérias produtoras de invertases**

Invertases bacterianas podem ser classificadas como intracelulares (YOON, 2007) ou extracelulares (AWAD *et al.*, 2013) conforme apresentado na Tabela 1. As invertases extracelulares são caracterizadas como glicoproteínas, contendo aproximadamente 50% de carboidratos, distribuídos entre manose e glucosamina, e exibem um elevado grau de microheterogeneidade. Em contrapartida, as invertases intracelulares carecem desses carboidratos em sua composição (BARBOSA *et al.*, 2018). Com relação a estrutura da invertase bacteriana foi encontrada em uma invertase de *Thermotoga maritima*, cinco cadeias de  $\alpha$ -hélice conectadas a um domínio sanduíche  $\beta$  por regiões ligantes de 10 resíduos como demonstrado na Figura 1 (ALBERTO *et al.*, 2004).

**Figura 1:** Mapa geral de dobramento e densidade eletrônica experimental da invertase



Legenda: (A) representação em fita da unidade monomérica da invertase de *T. maritima*, destacando o módulo  $\beta$ -hélice N-terminal, as cinco pás (numeradas I–V), e o módulo  $\beta$ -sanduíche C-terminal (vermelho escuro) (B), seção do mapa experimental após faseamento com SHARP, achatamento de solvente com DMMULTI e média de simetria não cristalográfica .

**Fonte:** Alberto et al. (2004)

Outra característica interessante das invertases bacterianas é que se apresentam como enzimas monoméricas, diferente das invertases de fungos e leveduras que são descritas como multiméricas (MURAMATSU *et al.*, 1993; ÁLVARO-BENITO *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2018).

As principais espécies produtoras de invertases são pertencentes ao gênero *Bacillus*, uma vez que esses microrganismos possuem a capacidade de produzir quantidades expressivas de exoenzimas, além de possuírem alta taxa de crescimento em processos de fermentação, sendo assim uma excelente fonte de produção industrial de invertase (SIDDIQA; AMIN, 2023). Um exemplo é o *Bacillus subtilis*, bactéria Gram positiva, amplamente utilizada em processos industriais por apresentar ciclos curtos de crescimento, boa estabilidade e *status* GRAS (*Generally Regarded As Safe*), visto que essa espécie é considerada segura e não patogênica para os humanos (SCHALLMEY *et al.*, 2004). As proteínas produzidas por estas linhagens, incluindo as enzimas, apresentam potenciais aplicações nas indústrias alimentícias. Outras linhagens de bactérias Gram-positivas, como *Actinomycetales*, *Brevibacterium* sp. (YAMAMOTO *et al.*,

1986), *Arthrobacter* sp. (WIN et al., 2004; XU et al., 2009), *Streptomyces* sp (KAUR; SHARMA, 2005), e Gram-negativas como *Z. mobilis* (OMULLAN et al., 1992; YANASE et al., 1991) também podem ser produtoras de invertase. Na Tabela 1 é possível visualizar algumas fontes de invertase bacteriana.

**Tabela 1:** Fontes de invertase bacterianas

<b>Linhagem bacteriana</b>	<b>Tipo de enzima</b>	<b>Fonte de cultura</b>	<b>Referências</b>
<i>B. subtilis</i>	NR Extracelular	Solo	(KAUR; TEORIA, 2021; LINCOLN <i>et al.</i> , 2018).
<i>Bacillus</i> sp.	NR	Água marinha	(JAYA <i>et al.</i> , 2020)
<i>Staphylococcus</i> sp	Extracelular	Solo	(LASE <i>et al.</i> , 2021)
<i>Klebsiella variicolaisolate</i>			
<i>Enterobacter asburiaestrain</i>			
<i>Escherichia coli</i>	NR	Solo	(AL-RAWI <i>et al.</i> , 2020)
<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> Dz13.	NR	Solo sedimentar antártico	(LIU <i>et al.</i> , 2021)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NR	Bebida fermentada	(OKAFOR <i>et al.</i> , 2023)
<i>Lactobacillus fermentum</i>			
<i>Lactobacillus brevis</i>	Intracelular	Centro Nacional de Pesquisa (NRC) Cairo, Egito	(AHMED, 2008)
<i>Bacillus Macerans</i>			
<i>B. cereus</i> TA	Intracelular	Solo	(YOON <i>et al.</i> , 2007)
<i>Enterobcter kobei</i>	NR	Cascas de maçã e banana	(RANA <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bacillus subtilis</i>			
<i>Streptomyces</i> sp. ALKC8	Extracelular	Solo	(KAUR; SHARMA, 2005)

Legenda: (NR): não relatado

### 2.2.2 Cultivo em Condições Submersas

Os microrganismos são preferíveis para a produção de invertase em comparação com plantas e animais, pois liberam materiais menos nocivos durante o processo de produção (ZHOU *et al.*, 2016). De um modo geral, o cultivo em condições submersas (CCS) é a técnica mais antiga utilizada para a produção de invertase bacteriana devido ao fácil controle do processo o que possibilita a produção de enzimas em escala industrial (SILVA *et al.*, 2019).

No CCS, o substrato líquido é utilizado para o fornecimento de nutrientes necessários para o crescimento microbiano e para a produção de diversos metabólitos (SINGH; SINGH, 2014). As bactérias são microrganismos que requerem alto teor de umidade para o crescimento e, por isso, esse tipo de cultivo se torna favorável para produção de enzimas (SINGH; SINGH, 2014). As vantagens do CCS são bem conhecidas e incluem a minimização dos gradientes de temperatura e concentração de nutrientes devido a grande quantidade de água disponível no processo (SILVA *et al.*, 2019), além da facilidade do controle de aeração, agitação e pH (RAMAMOORTHY *et al.*, 2019). Essa tecnologia é econômica, possibilitando alta produtividade por volume do reator (NADEEM *et al.*, 2015). Outra vantagem do CCS é a facilidade na recuperação das enzimas e a determinação da biomassa. Nesse processo, o sobrenadante da cultura é utilizado para estudos cinéticos quanto à produção de enzimas e crescimento microbiano (LIMA *et al.*, 2003).

### 2.2.3 Cultivo em Estado Sólido

O cultivo em estado sólido (CES) é caracterizado pelo crescimento microbiano em um substrato sólido ou com reduzida quantidade de água livre. Esse método tem demonstrado potencial para aumentar a produtividade de extratos enzimáticos, conferindo maior estabilidade às enzimas diante de variações de pH e temperatura. O CES oferece vantagens como baixo custo de matéria-prima, consumo reduzido de energia com mínima produção de água residual, baixo risco de contaminação e eficiência destacada na recuperação do produto (SOCCOL *et al.*, 2017; SADH *et al.*, 2018). Apesar de todas essas

vantagens esse processo é mais utilizado para a produção enzimática por fungos e leveduras por simular o habitat natural desses microrganismos (SANTOS *et al.*, 2018). No entanto é importante destacar que o CES pode ocasionar heterogeneidade na produção, tanto no tempo quanto no espaço, demandando etapas subsequentes de padronização do produto (ZANELATO, 2011).

No CES, os substratos de origem vegetal poderão servir não apenas para a fixação do microrganismo, mas também para o fornecimento de nutrientes. Os resíduos agroindustriais são bastante utilizados com várias finalidades nesse processo, como a produção de proteínas, enzimas, lipídios, vitaminas, promotores de crescimento vegetal, entre outros produtos (FISCHER, 2014). Para a criação eficaz de um sistema CES, é crucial analisar diversos parâmetros, tais como a escolha apropriada da linhagem microbiana e do substrato, bem como a seleção criteriosa dos parâmetros de processo, abrangendo aspectos físicos, químicos, bioquímicos e de engenharia (PANDEY *et al.*, 2000).

Em um estudo realizado por Lincoln *et al.* (2018), a produção de invertase foi investigada em meio sólido composto por 20 g de farelo de trigo, extrato de levedura (0,2%, p/v) e uma solução salina de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%, KCl 0,05%, e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0001% oligoelemento (p/v). Após a inoculação do microrganismo em estudo, *B. subtilis* LYN12, no meio de cultura, o cultivo foi realizado a 37°C por 48 horas, resultando em uma produção de extrato enzimático de 2070,97 U/ml. Em estudo comparativo entre a produção de invertase em CCS e CES, conduzido por Lincoln e More (2018), observou-se que no CES o crescimento bacteriano ocorreu entre 30 a 48 horas, enquanto no CCS, o crescimento foi mais rápido, entre 12 a 36 horas. A invertase produzida em CCS apresentou pH ótimo de 6,0, enquanto a produzida no CES teve pH ótimo de 6,5. Quanto à temperatura ótima, os melhores resultados foram alcançados a 37°C no CES e a 45°C no CCS. Os resultados do estudo indicaram que o maior rendimento ocorreu no cultivo em estado sólido (2,84 vezes), em comparação com o cultivo em estado líquido, que teve um rendimento de 1,64. Essa descoberta ressalta a importância de investigações futuras sobre a produção de invertase bacteriana em CES.

#### 2.2.4 Fatores nutricionais

Os fatores críticos que podem influenciar a produção de invertase bacteriana incluem a fonte de nitrogênio e carbono, bem como as condições ideais de temperatura e pH (HORAK *et al.*, 2019). A sacarose emerge como a fonte de carbono mais frequente para a produção de invertase bacteriana, enquanto o extrato de levedura é amplamente empregado como fonte de aminoácidos (YOON *et al.*, 2007; WIN *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2005; LINCOLN *et al.*, 2018). A complexidade dos meios de cultivos e as condições de cultura afetam diretamente a morfogênese e a via metabólica da linhagem em estudo, o que influencia a indução enzimática e a conversão biocatalítica adicional do substrato em produtos bioquímicos desejáveis (SINGH *et al.*, 2017). Estudos recentes buscaram analisar as condições de cultivo para a produção da enzima. Doan *et al.* (2021) conduziram testes utilizando sacarose como fonte de carbono e diversos resíduos industriais, como casca de banana, farelo de trigo e pó de pomelo albedo. Para a fonte de nitrogênio, avaliaram  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  caseína, peptona, pó de extrato de carne bovina, pó de lulas, pó de casca de camarão e pó de cabeça de camarão. Os resultados indicaram que o pó de pomelo albedo foi a melhor fonte de carbono, enquanto a adição de extrato de levedura ao meio reduziu a produção enzimática. Al-Rawi (2020) realizou testes visando a produção de invertase por uma cepa de *Bacillus*, utilizando maltose, lactose, sacarose e manitol como fontes de carbono, e peptona, extrato de levedura, extrato de carne e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio. Os resultados revelaram que o extrato de carne e sacarose proporcionaram os melhores desempenhos. Rana *et al.* (2023) constataram que sacarose e peptona são as fontes promissoras de carbono e nitrogênio, respectivamente, para *Enterobacter kobei*, alcançando uma produção de invertase de 36,24 U. No mesmo estudo, para a produção da enzima por *B. subtilis*, sacarose e extrato de levedura demonstraram ser as fontes de carbono e nitrogênio mais vantajosas, atingindo uma produção de invertase de 45,27 U.

O pH e a estabilidade térmica das enzimas representam fatores economicamente cruciais, uma vez que enzimas ativas em pH neutro e temperaturas moderadas podem reduzir os custos associados a energia e equipamentos (SINGH *et al.*, 2017). Dado que as bactérias são altamente sensíveis a variações na concentração de íons hidrogênio, mesmo

pequenas alterações no pH podem modificar a conformação das enzimas responsáveis por seu metabolismo e outras atividades funcionais (SINGH *et al.*, 2017). Assim sendo, a regulação cuidadosa do pH emerge como um fator essencial para a síntese de compostos celulares, incluindo as enzimas (SINGH *et al.*, 2017).

As invertases bacterianas demonstram versatilidade ao serem produzidas em amplas faixas de pH e temperatura. Um estudo conduzido por Jaya *et al.* (2020) relatou a produção de invertase em meio neutro (pH 7,0). Nessa pesquisa, a produção de invertase foi investigada em três linhagens bacterianas: *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., e *Staphylococcus* sp. isolados da água marinha. Os cultivos foram desenvolvidos em diferentes níveis de pH (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0) e temperaturas (0 °C, 4 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C e 42 °C). Além disso, os pesquisadores exploraram diferentes fontes de carbono, adicionando individualmente 1% (m/v) de glicose, xilose, lactose, galactose, frutose, sacarose, manitol e arabinose ao meio de fermentação base (caldo nutriente). Os resultados indicaram que o pH neutro (7,0) foi o mais adequado para todas as linhagens testadas, enquanto a temperatura de 37 °C foi a mais adequada para a produção de invertase pelo *Bacillus* sp. Para as espécies de *Staphylococcus* sp., a temperatura ideal foi de 20 °C. Quanto às fontes de carbono, houve variação entre os três microrganismos, destacando-se a galactose para a espécie de *Bacillus*, e glicose e manitol para as espécies de *Staphylococcus* sp. Vásquez-Bahena *et al.* (2006) estudaram a expressão de um gene de invertase de *Z. mobilis* em *E. coli*. Para isso, conduziram o cultivo do microrganismo a 30 °C em pH 4,9, em meio contendo glicose, extrato de levedura (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Por outro lado, o cultivo de *E. coli* foi realizado em meio LB com pH ajustado para 7,5, demonstrando a versatilidade possível para a produção da enzima.

Na literatura, comumente encontram-se relatos de produção de invertase em torno de 30 °C (NADEEM *et al.*, 2015). Entretanto, existem estudos que apontam temperaturas ideais distintas, como 50 °C e 80 °C (Yoon *et al.*, 2007). Dipasquale *et al.* (2009) conduziram a produção de invertase a partir de *Thermotoga napolitana* DSM 4359T, utilizando um meio de fermentação com extrato de levedura e triptona como fontes de nitrogênio, e sacarose como fonte de carbono. Neste estudo, a temperatura que indicou maior para a produção da invertase foi de 80 °C, ressaltando que a produção ocorreu sem agitação. Outro estudo realizado por Yoon *et al.* (2007) indicou ser 50 °C a temperatura em

que houve maior produção de invertase de *B. cereus* TA-11. Nesse caso, o meio de fermentação inclui extrato de levedura como fonte de nitrogênio e sacarose como fonte de carbono.

Kaur e Teotia (2021) estudaram a produção de invertase de *B. subtilis* isolado do solo, envolvendo quatro variações de pH (5, 7, 9 e 11) e quatro variações de temperatura (22 °C, 28 °C, 37 °C e 50 °C). Como fontes de nitrogênio, foram testadas peptona, extrato de carne bovina, extrato de levedura, cloreto de amônio e ureia, enquanto maltose, lactose, sacarose e manitol foram avaliados como fontes de carbono. A temperatura de fermentação foi mantida a 25 °C ao longo de 48 horas. As melhores fontes de nitrogênio e carbono encontradas foram extrato de carne e sacarose. O pH neutro e a temperatura de 37 °C foram as melhores condições obtidas para a produção enzimática.

Em um estudo conduzido por Awad *et al* (2013) foi utilizado o planejamento experimental randomizado de *Plackett-Burman* para otimizar a produção de invertase de uma espécie de *L. brevis* Mm-6, isolada do leite materno. Os componentes selecionados para variação no estudo foram pH, fontes de carbono (glicose e sacarose), fontes de nitrogênio (extrato de malte, peptona e extrato de levedura) e alguns sais (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> e FeSO<sub>4</sub>). No estudo, observou-se que o extrato de malte, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, sacarose, peptona, pH do meio de cultura e CaCl<sub>2</sub> apresentaram efeito positivo na atividade da invertase. Porém, a glicose, extrato de levedura, NaCl e MgSO<sub>4</sub> contribuíram negativamente para produção da enzima. Os cultivos foram produzidos durante três dias a 37 °C. Algumas espécies de *Lactobacillus* também podem ser potenciais produtores de invertase. Ginés *et al.* (2000) cultivaram *Lactobacillus reutri* CRL 1100 para produção da enzima a 37 °C por 16 horas, em meio MRS (meio específico para contagem de *Lactobacillus*) com sacarose como fonte de carbono.

O tempo de fermentação também é outro ponto que pode afetar positivamente a produção de invertase bacteriana (KUMARI; SETH, 2020). A rápida multiplicação celular e a capacidade adaptativa das bactérias as tornam excelentes candidatas para a produção enzimática em processos industriais (SHARMA; SATYANARAYANA, 2015). O tempo de fermentação empregado nos estudos referente a produção de invertase pode ser bem amplo e diversificado, a depender do tipo de microrganismo em questão e outros parâmetros de

controle, como pH e temperatura, além do meio de crescimento utilizado. O tempo de fermentação mais curto, reportado na literatura para a produção da invertase de *Brevibacterium divaricatum* NRRL B-2312, foi de 12 h a 32 °C em meio de cultura com pH 7,2 constituído por sacarose, ureia e biotina (YAMAMOTO *et al.*, 1986). O tempo de cultivo de 16 h também já foi bastante explorado, como no estudo de Warchol *et al.* (2002) que aplicaram este parâmetro ao produzir invertase de *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 em pH 6,8 a 37 °C. O mesmo intervalo de tempo (16 h) foi aplicado para produção de invertase por *L. reuteri* (CRL 1100) na mesma temperatura de 37 °C (GINES *et al.*, 2000). A faixa de tempo comumente empregada para produção de invertase bacteriana parece variar entre 20 e 48 horas.

Utilizando o tempo de 20 horas, tem-se o exemplo mencionado por Xu *et al.* (2009) tendo como estudo a invertase produzida por *Arthrobacter* sp. a 37 °C.

Dipasquale *et al* (2009) ao utilizar a bactéria *T. napolitana* DSM 4359T em meio de cultivo com pH 8,0 a 80°C optaram por conduzir o processo fermentativo por 24h. Assim como Kaur e Sharma (2005), ao analisar a produção de invertase por *Streptomyces* sp. ALKC8, controlando o pH em 5,0 e a temperatura em 37 °C. Em 48 h de cultivos, tem-se o relato de Ahmed *et al* (2008), estudando a produção de invertase por *B. macerans*, em pH 6,0 e temperatura de 30°C e o relato mais recente de Linconl *et al.* (2018) analisando a produção de invertase por uma espécie de *Bacillus* a 37 °C. Por fim, o tempo mais elevado de cultivo (70 h) foi testado por Awad *et al* (2013) para a bactéria *L. brevis* Mm-6 em meio com pH 8,0 e temperatura de 30°C.

### **2.3 Métodos de extração e purificação de invertase bacteriana**

Enzimas são moléculas solúveis em água e para serem reutilizadas, precisam ser separadas do meio de cultivo, pois são produzidas em conjunto com outras proteínas que podem apresentar atividade catalítica não desejada, resultando em um acúmulo de contaminantes e sendo prejudicial a economia do processo (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020).

Após a produção de uma enzima microbiana, aplica-se o processo de lise celular, uma operação unitária importante nos processos de *downstream*. O rompimento celular

pode ser realizado por meio de métodos mecânicos e não mecânicos. Nos métodos mecânicos a força de cisalhamento é empregada para romper a membrana da célula, enquanto os métodos não mecânicos podem ser classificados em químicos, físicos e biológicos (SHEHADUL *et al.*, 2017). Esse processo é empregado somente para enzimas que são produzidas dentro das células microbianas (SRIVASTAVA, 2019). Realizada a análise celular, caso o produto de interesse esteja dentro da célula, faz-se necessário a clarificação da enzima produzida e, então, pode-se utilizar a técnica de centrifugação (KILIAN; PESSOA, 2021). A centrifugação é um processo simples, rápido, eficiente e possibilita a obtenção de pequenas organelas e frações subcelulares. O princípio da técnica consiste em aplicar uma força centrífuga ao extrato fazendo com que as partículas se sedimentem. As partículas maiores se sedimentam primeiro e, no sobrenadante, ficam as partículas menores e menos densas (ANTUNES *et al.*, 2017). Esta é uma técnica comum na purificação de invertases bacterianas (PEK *et al.*, 2017; JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA *et al.*, 2011; HOFFMANN *et al.*, 2020).

A extração de invertases pode ser realizada por diferentes métodos que visam obter preparações enzimáticas purificadas. Um dos métodos mais comuns é a extração a partir de microrganismos, como bactérias e leveduras que, naturalmente, produzem invertases (KULSHRESTHA *et al.*, 2013). O processo envolve o cultivo desses microrganismos em meios apropriados, seguido pela ruptura celular para liberar as enzimas (KLOBITZ, 2010).

Um método tradicional aplicado a invertase bacteriana é a extração intracelular. Isso pode ser alcançado por métodos mecânicos (homogeneização ou ultrassonicação) ou por métodos químicos, como a utilização de detergentes ou solventes orgânicos. Em seguida, a mistura é centrifugada para separar os componentes celulares e a fração contendo as invertases é recuperada. Outro método é a extração extracelular, em que as invertases são secretadas pelos microrganismos no meio de cultura. Após o cultivo, o meio é separado das células por centrifugação ou filtração e as invertases, presentes na fração líquida, são recuperadas. Posteriormente, as invertases podem ser purificadas por diferentes técnicas (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020; KULSHRESTHA *et al.*, 2013).

O principal propósito da purificação de enzimas consiste em eliminar contaminantes, melhorar a estabilidade e prolongar a vida útil (NADEEM *et al.*, 2015). Além disso, a purificação enzimática desempenha um papel crucial na investigação da

conformação estrutural, permitindo o estudo de propriedades bioquímicas, tais como parâmetros cinéticos e termodinâmicos (NADEEM *et al.*, 2015) Possibilita também estudos da relação estrutura- função da enzima, tornando assim, possível a aplicação dos biocatalisadores nos mais diversos campos industriais, pois é a pureza de uma enzima que dita sua atividade, valor comercial e aplicação (FASIM *et al.*, 2021). A purificação é capaz de eliminar alguns inibidores das proteases e outros fatores destrutivos para a estrutura/atividade da enzima (ZHOU *et al.*, 2020).

Os processos de purificação de enzimas podem envolver uma ou muitas etapas, em que são combinadas diversas técnicas de alta e baixa resolução, como a adição progressiva de sulfato de amônio, precipitação utilizando etanol ou acetona, ultrafiltração, ultracentrifugação, diálise e cromatografias realizados de forma combinada ou individual.

Na Tabela 2 estão dispostos métodos de purificação e suas respectivas vantagens e desvantagens.

**Tabela 2.** Métodos de alta e baixa resolução para a purificação de enzimas

<b>Método de Purificação</b>	<b>Resolução</b>	<b>Princípio de Separação</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>	<b>Referências</b>
Precipitação com Sais	Baixa	Precipitação com base na solubilidade em diferentes concentrações de sais (como sulfato de amônio).	Concentração inicial e remoção de impurezas grosseiras.	Elevada solubilidade em água, baixa densidade de suas soluções, posição favorável de seus íons na série de <i>Hofmeister</i> em relação à efetividade de precipitação, a ausência de efeitos desnaturantes e sua capacidade de prevenir o crescimento bacteriano na solução, aliadas ao fato de ser economicamente viável mesmo em níveis elevados de pureza.	A presença de sal em ambas as fases formadas requer operações adicionais de purificação para remover o sal da fase precipitada e tratar a fase líquida para possibilitar sua reutilização ou descarte. Estes procedimentos limitam, em certa medida, as aplicações do processo de precipitação por 'salting-out' devido aos custos associados a tais tratamentos.	(POPOVA <i>et al.</i> , 2008)
Cromatografia por Troca Iônica	Alta	Separação baseada em cargas elétricas das proteínas.	Separação de proteínas com diferentes cargas.	Possuem as vantagens de baixo preço, boa resistência mecânica e propriedades físicas e químicas estáveis, e também possuem amplas perspectivas de aplicação como transportadores imobilizados	Apresenta limitações como seletividade restrita, sensibilidade a impurezas, necessidade de manutenção regular das colunas, restrições de faixa de pH, capacidade limitada de retenção de íons e complexidade operacional.	(BEDZO <i>et al.</i> , 2019)
		Separação por	Remoção de	Destaca-se por separar	Resolução limitada e a falta	

Cromatografia por Filtração em Gel	Alta	tamanho molecular.	impurezas de menor tamanho.	moléculas com base em seus tamanhos moleculares, removendo eficientemente impurezas menores. Sua natureza suave e não denaturante a torna adequada para moléculas sensíveis. A resolução é mantida altamente específica para as moléculas desejadas e o sistema é mantido para obter estabilidade. A cromatografia de filtração em gel é adequada mesmo para moléculas frágeis	de separação baseada em interações específicas são desafios. Restrições de faixa de tamanho, possíveis adsorções e custos associados também devem ser considerados.	(BEZERRA <i>et al.</i> , 2005)
Cromatografia de Afinidade	Alta	Uso de ligantes específicos para a enzima alvo.	Alta especificidade, purificação com afinidade.	É notável pela sua alta especificidade, proporcionando purificação altamente seletiva para a molécula desejada.	Custo elevado devido ao uso de ligantes específicos, e a regeneração da coluna pode ser complexa. Além disso, é mais eficaz quando o alvo é conhecido	(MIRANDA <i>et al.</i> , 2002)
Eletroforese Capilar	Alta	Separação por carga e	Alta resolução para moléculas	É caracterizada por sua alta resolução e baixo	É sensível às condições experimentais e pode	(CHIANG; WHANG,

---

		mobilidade em campo elétrico.	de tamanho semelhante.	consumo de amostra.	apresentar limitações quanto ao tamanho e massa molecular das amostras.	2001)
Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC)	Alta	Separação baseada na hidrofobicidade e relativa.	Útil para enzimas com diferenças sutis em hidrofobicidade.	É útil para moléculas com diferenças sutis em hidrofobicidade, mantendo a estrutura tridimensional de biomoléculas.	Pode ter custos associados à compra de resinas e colunas além de que variações na composição do solvente podem impactar a eluição.	(CAO <i>et al.</i> , 2005)

---

## 2.3.1 Métodos de Purificação de baixa resolução

### 2.3.1.1. Precipitação

A precipitação é um processo que consiste na separação de substâncias mediante a diminuição da solubilidade de um meio (KILIKIA; PESSOA, 2020). O objetivo da técnica é obter um precipitado que mantenha suas características biomoleculares e que, se necessário, seja possível realizar a ressolubilização desta amostra sem grandes perdas. A possibilidade de uso de equipamentos simples e o baixo custo do processo são as principais vantagens da técnica, assim como a possível não desnaturação da proteína precipitada (KILIKIA; PESSOA, 2020).

Para as etapas iniciais de purificação de proteínas, a precipitação com uso de sais é amplamente utilizada (ROBINSON, 2015). O princípio da técnica se baseia na diminuição da solubilidade ocasionada pela dissolução do sal (*salting-out*), ocasionando a competição dos íons com a proteína pelas moléculas de água e, quando removida a camada de hidratação, as interações proteína-proteína se tornam relevantes, a força iônica é aumentada e, então, as moléculas de interesse se agrupam e precipitam (DEUTSCHER, 1990; SCHMIDELL *et al.*, 2001). Para invertases bacterianas, as técnicas de precipitação com sulfato de amônio ou sulfato de sódio são as mais comuns, pois são sais anticaotrópicos, que possuem a capacidade de aumentarem o efeito hidrofóbico das moléculas de proteínas em solução aquosa, desorganizando as estruturas das macromoléculas (GHOSH, 2006).

A precipitação com sulfato de amônio tem sido frequentemente empregada na maioria dos estudos para obter a forma bruta da enzima, seguida por múltiplos estágios de separação cromatográfica. Dentre as técnicas cromatográficas aplicadas, destacam-se também a troca aniônica, troca catiônica, filtração em gel, cromatografia em coluna de afinidade, cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC), cromatografia de interação hidrofóbica e cromatofocagem. Entretanto, o processo complexo de purificação subsequente apresenta diversas desvantagens, incluindo a perda da estrutura nativa da proteína devido à agregação, resultando em baixa qualidade do produto e atividade enzimática reduzida, além de ser insustentável (ALI; BAVISETTY, 2020).

Nesse contexto, sistemas bifásicos aquosos (ATPS) como polietilenoglicol 4000/8000 e sulfato de sódio, AOT (di [2-etilhexil] sulfosuccinato de sódio) /sistema de micelas reversas de isooctano, e particionamento trifásico (combinando sulfato de amônio e *t*-butanol para precipitação de proteínas a partir de extratos brutos) têm demonstrado vantagens sobre as técnicas convencionais (TIMERMAN, 2012).

Esta técnica também costuma ser utilizada em combinação com técnicas cromatográficas para alcançar um alto grau de pureza. Park *et al.* (2001), ao purificar uma invertase de *B. macerans*, optaram por unir as técnicas de precipitação de sulfato de amônio (20-60% de saturação) com cromatografias de troca catiônica e, posteriormente, a proteína foi submetida a uma técnica de interação hidrofóbica. Em cada uma das etapas citadas foi possível recuperar 76,5%, 36,7 e 0,8% da atividade da enzima, respectivamente.

Como as enzimas podem ser hidrofílicas ou hidrofóbicas com solubilidade limitada, sensíveis a grandes oscilações de temperatura e pH, técnicas adequadas devem ser empregadas para evitar o desdobramento ou desnaturação da proteína, indicando que um estudo prévio deve ser realizado ao planejar uma estratégia de purificação enzimática. Caso contrário, esta etapa pode ser lenta, com alto custo e dispendiosa em uma produção de larga escala, além de aumentar o gasto de energia do processo. Por isso, a origem, a complexidade da enzima, a distribuição das cargas e as propriedades físico-químicas são fatores determinantes em um processo de purificação (ARBIGE *et al.*, 2019; NADAR *et al.*, 2017; CHO; YUN, 2002).

### 2.3.1.2 Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação com sulfato de amônio é a técnica mais comumente usada para purificação de proteínas tanto em laboratório quanto em larga escala. Baseia-se na alteração da solubilidade das proteínas na presença de sulfato de amônio (DEUTSCHER, 1990; SCHMIDELL *et al.*, 2009). A solubilidade da proteína aumenta, efeito denominado *salting in*. Em maiores concentrações desse sal, a solubilidade da proteína geralmente diminui, resultando na precipitação da proteína, efeito esse denominado *salting out*. O mecanismo de salga é baseado na solvatação preferencial devido à exclusão do co-solvente (sal) da camada de hidratação. A precipitação com sulfato de amônio permite a precipitação rápida

de proteínas celulares. Portanto, é geralmente útil para as etapas iniciais de purificação (LIU *et al.*, 2023). Também é aplicado nas etapas finais de purificação, por exemplo, após filtração em gel (GF) para concentrar ainda mais a proteína a partir de soluções diluídas. A desvantagem deste método é que, às vezes, as proteínas indesejadas também co-precipitam com as proteínas alvo (PARK *et al.*, 2001).

Doan *et al.* (2021) aplicaram a técnica de precipitação com sulfato de amônio a 60% (m/v) para purificar uma invertase de *Bacillus licheniformis* TKU004. Quatro etapas de purificação foram aplicadas neste estudo, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular, sendo possível recuperar em cada uma delas, respectivamente 51%, 34%, 34,26% e 1,31% da enzima purificada, sendo que o rendimento final foi de 1,31%. Já Liu *et al.* (2023) utilizaram a precipitação gradual com sulfato de amônio (10-90%, m/v) para purificar uma invertase produzida por *Bacillus metanolicus* LB-1, uma técnica de filtração em gel, também foi adicionada ao processo. Na etapa inicial de precipitação a enzima apresentou 40,01 U/mg de atividade específica e na etapa de filtração em gel, 343,00 U/mg, resultando em um fator de purificação de 59,93.

### 2.3.2 Técnicas de purificação de alta resolução

#### 2.3.2.1 Purificação por cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é um método muito utilizado para purificação e caracterização de proteínas, que consiste na separação de partículas por meio da carga superficial possibilitando diferentes interações iônicas dessas partículas com sua matriz. A matriz liga variantes com cargas opostas, por meio da hidrofobicidade. Geralmente, é uma técnica utilizada apenas como uma etapa intermediária do processo de purificação necessitando ser aliada a outra etapa, como a filtração em gel (AMARTELY *et al.*, 2018).

A cromatografia de troca iônica é uma técnica vantajosa, pois é de fácil aplicação em comparação com outras técnicas. Pode ser replicada em larga escala, apresenta elevada resolução e grande capacidade de adsorção, além de apresentar uma ampla variedade de matrizes (KILIKIAN; PESSOA, 2020). No entanto, a triagem das condições para se utilizar

a cromatografia de troca iônica é de alto custo e trabalhosa (AASIM *et al.*, 2022; FARSANGE *et al.*, 2020).

#### 2.3.2.2 Purificação por cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular

A cromatografia de filtração em gel, também denominada de cromatografia de exclusão molecular ou por tamanho, é uma técnica utilizada na separação de proteínas/enzimas e para estimar o peso molecular. O princípio da cromatografia de filtração em gel é separar a proteína alvo de outros constituintes que são menores ou maiores que ela. Essa separação é conduzida por meio de uma matriz porosa, as moléculas que são maiores são excluídas da matriz com mais rapidez e as menores permanecem por mais tempo presas a matriz (BURGESS, 2018; DONG *et al.*, 2020; WINZOR, 2003). Apesar de ser uma técnica que apresenta altos custos, é comumente utilizada na purificação de invertase bacteriana

#### 2.3.2.3 Purificação por cromatografia de interação hidrofílica (HILIC)

A cromatografia de interação hidrofílica baseia-se na associação entre proteínas e ligantes hidrofóbicos. Nela acontece a interação entre uma amostra com alta concentração de sal e uma fase estacionária hidrofóbica, essa alta concentração de sais neutraliza as cargas da proteína, expondo suas cargas hidrofóbicas e permitindo que se liguem a grupos hidrofóbicos da matriz (ALMEIDA, 2019). Esta técnica une os princípios da cromatografia líquida de fase reversa, fase normal e troca iônica e é muito utilizada como uma técnica complementar a outros métodos cromatográficos (FEKETE *et al.*, 2014).

O grande diferencial da HILIC é não envolver uma interação direta entre o ligante e a proteína em estudo, pois a interação entre as moléculas de água é que são responsáveis pela força motriz da ligação (ERIKSSON, 2018). A técnica apresenta algumas vantagens quando comparadas a outros tipos de cromatografia, como diminuição da pressão do sistema, maior preservação da fase estacionária e maior retenção de analitos polares sem a utilização de reagentes de pareamento iônico. No entanto, as principais desvantagens do

método são o alto custo do equipamento e a necessidade de operadores experientes (SILVA *et al.*, 2016; KOZIOROWSKI, 2010).

#### 2.3.2.4 Purificação por cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade pode ser considerada a forma mais seletiva de cromatografia líquida e utiliza como princípio a interação específica entre uma molécula alvo e um agente que seja biologicamente compatível com ela, geralmente por meio de ligações covalentes (ARORA *et al.*, 2017). Nos processos de purificação, ligante e metabolito a ser purificado devem formar um complexo reversível que seja resistente a passagem da amostra e as etapas subsequentes de lavagens e que seja desfeito sem desnaturação (ALMEIDA, 2018).

Este é um dos métodos mais eficientes para purificação de proteínas, pois possui alta seletividade e resolução, além de apresentar altas taxas de recuperação do material ativo, e por ser um processo em que a proteína é recuperada em uma única etapa, torna-se um método mais rápido, diminuindo o custo global do processo (RODRIGUÉZ *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2017).

#### 2.3.2.5 Cromatografia de interação hidrofóbica

Nesta técnica de purificação, as proteínas passam por uma coluna cromatográfica recheada com uma resina suporte à qual os grupos hidrofóbicos estão ligados covalentemente. Fenil-Sepharose, que contém um grupo fenil, é comumente usado na coluna. Normalmente, a amostra de proteína é preparada em tampão com alto teor de sal. Quando a amostra de proteína passa pela coluna, as proteínas ligam-se ao grupo fenil em virtude de interações hidrofóbicas. As proteínas em uma mistura podem ser eluídas diferencialmente do grupo fenil usando tampão de baixa concentração de sal ou adicionando solventes como polietilenoglicol ao fluido de eluição (CAO *et al.*, 2005). Na tabela 3 estão expostos alguns métodos de purificação aplicados a invertases bacterianas.

**Tabela 3.** Técnicas de purificação aplicadas para invertases bacterianas.

<b>Microrganismo</b>	<b>Técnica de purificação</b>	<b>Fator de purificação</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Referências</b>
<i>L. reuteri</i> CRL 1100	Precipitação com sulfato de amônio (80%); Filtração em gel (Sephadex G-150); Cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel)	31,2	16,9	(GINES <i>et al.</i> , 2000)
<i>B. licheniformis</i> TKU00	Precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de exclusão de tamanho	11h 40	1,31	(DOAN <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bacillus</i> sp. HJ14 expresso em <i>E coli</i>	Cromatografia de afinidade quelante de metal Ni <sup>2+</sup> -NTA.	NR	NR	(ZHOU <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. Macerans</i>	Precipitação com sulfato de amônio e cromatografia líquidas de proteína rápida	NR	0,8	(PARQUE <i>et al.</i> , 2001)

<i>B. cereus</i>	Precipitação de sulfato de amônio (40–80%); Cromatografia DEAE (A-50); Filtração em gel (Sephadex G-75)	15h 37	26,6	(YOON <i>et al.</i> , 2007)
<i>Lactococcus lactis</i>	Saturação com sulfato de amônio a 60% e por cromatografia de afinidade	NR	14,1	(PEK <i>et al.</i> , 2017)
<i>Bifidobacterium longum KN29.1</i>	Precipitação com sulfato de amônio (60%) e cromatografia líquida de filtração em gel	16h 40	11h 35	(JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus methanolicus LB-1</i>	Precipitação fracionada com sulfato de amônio, Sephadex G-75 cromatografia de filtração em gel e LC-MS e SDS-PAGE	52,93	NR	(LIU <i>et al.</i> , 2023)
<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 435911	Q-Sepharose FF; Sephacryl S-100; HPLC	469,5	25,8	(DIPASQUALE <i>et al.</i> , 2009)

---

<i>B. subtilis</i> LYN12	Cromatografia de filtração em gel	6,94	15,58%	(LINCOLN <i>et al.</i> , 2018)
<i>Bacillus sp.</i> SG7	Cromatografia de exclusão por tamanho e cromatografia de troca iônica	10,44	24,7	(IVANOVA <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. globiformis</i>	Precipitação com sulfato de amônio e Cromatografia de troca iônica	37	30	(WIN <i>et al.</i> , 2004)

---

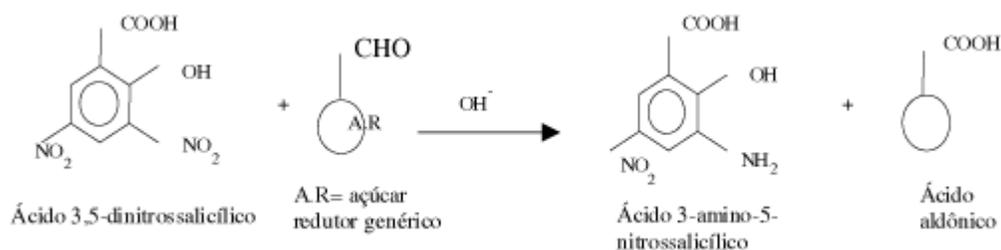
## 2.4 Propriedades bioquímicas de invertases bacterianas

### 2.4.1 Métodos de determinação da atividade enzimática

Uma maneira de caracterizar invertases é por meio da avaliação da atividade enzimática, realizada por dois métodos principais: o espectrofotométrico (AHMED, 2008; DISPASQUALE, 2009) e o colorimétrico. O método espectrofotométrico analisa compostos orgânicos e inorgânicos, baseando-se na incidência de um feixe de luz na amostra, medindo, posteriormente, a quantidade de luz absorvida. Esta técnica é reconhecida por sua simplicidade, confiabilidade, baixo custo, e pela capacidade de analisar pequenas quantidades de amostra. Além disso, os equipamentos são de fácil operação e portabilidade, tornando-a uma excelente opção para acompanhar reações de catálise enzimática. Durante a reação enzimática, a técnica é empregada para monitorar a mudança na absorvância ao longo do tempo (PASSOS; SARAIVA, 2018)

Uma outra forma de analisar a atividade enzimática da invertase é por meio do método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), utilizado para determinar açúcares redutores. Neste método, ocorre uma reação redox entre os açúcares redutores da amostra e o DNS. O grupo carbonila livre da amostra reage com o DNS sob condições alcalinas e, quando submetido a uma temperatura de 100°C por aproximadamente cinco minutos, obtém-se um composto aromático de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. A quantidade de açúcares redutores é identificada pela mudança de coloração amarela (DNS) para avermelhado (3-amino-5-nitrosalicílico) e pode ser analisada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 540 nm. Este é um método de fácil execução e permite avaliar um número maior de amostras em curto período. No entanto, o método DNS apresenta como principal limitação a toxicidade do ácido (BOSHAGH, 2021; MILLER, 1959). Na figura 2 pode ser observada a reação entre açúcar redutor e DNS.

Figura 2. Reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico



Fonte: Silva et al (2003).

#### 2.4.2 Características bioquímicas de invertases bacterianas

A caracterização bioquímica das invertases bacterianas, comparadas com as invertases de fungos e leveduras, ainda são pouco relatadas. No entanto, o estudo dessas características é essencial para a aplicação industrial das enzimas. As propriedades bioquímicas das invertases bacterianas, como temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e frente ao pH de incubação, massa molecular, ponto isoelétrico e estabilidade estão resumidas na Tabela 4.

Alguns dados da literatura podem ser citados em relação ao estudo das invertases de fontes bacterianas, como o de Yoon *et al.* (2007) que ao purificarem uma invertase bacteriana de *B. cereus*, obtiveram massa molecular de 23 kDa por SDS-PAGE e 26 kDa por filtração em gel. A enzima foi estável na faixa de pH 5,0 a 8,0 e os valores de  $K_M$  (constante de Michaelis-Menten) e  $V_{max}$  (velocidade máxima de reação) da enzima para sacarose foram 370 mM e 3,0 por micromol/min, respectivamente. Lincoln *et al.* (2018) obtiveram uma massa molecular de 66 kDa para uma invertase de *B. subtilis* LYN12 e estabilidade em pH 7,0, a 40 °C. Os parâmetros cinéticos encontrados foram:  $K_M$  e  $V_{max}$  de 41,98 mM e 1,184  $\mu$ mol/min, respectivamente. Outra invertase de *B. liicheniformis* também foi analisada por Doan *et al.* (2021). Neste estudo foi possível identificar uma enzima com massa molecular de 53 kDa,  $K_M$  de 1,16 mM e  $V_{max}$  de 5,99  $\mu$ mol/min. Para esta invertase, os maiores valores de atividade foram determinados em pH 60 a 50 °C, indicando que invertases bacterianas apresentam características diversificadas. Apesar de os relatos de caracterização química de invertases bacterianas produzidas por espécies de *Bacillus* serem os mais comuns, invertases produzidas a partir de outras espécies de bactérias também podem ser exemplificadas, como no estudo conduzido por Dipasquali *et al.* (2009). Esses

autores, ao estudarem as propriedades da invertase produzida por *T. neapolitana* (DSM4359) encontraram uma enzima com massa molecular de 47 kDa, e maiores atividades em pH 6,0 e 85 °C, apresentando ainda, valores de  $K_M$  14 mM. Características diferentes foram encontradas por Ginés *et al.* (2000), ao analisarem as propriedades de invertase produzida por *L. reutri*, cuja enzima apresentou massa molecular de 58 kDa, e maior atividade a 37 °C e pH 6,0 sendo estável (60–50% de sua atividade) em pH 7,0 a 8,0.

Tabela 4. Propriedades bioquímicas de invertases bacterianas

Massa molecular (kDa)	pH Ótimo	Temperatura ótima	Estabilidade	Km e V <sub>MAX</sub>	Referências
60	6,8	37 °C	pH 5,5 e 9,5 a 4 °C	Km 2,4 mM.,	(WIN <i>et al.</i> , 2004)
23	7	50 °C	pH 5,0 a 8,0	Km 3,0mM., Vmax 370(μmol/min)	(YOON <i>et al.</i> , 2007)
60	6	37 °C	NR	25 mM ., Vmax 24 μmol/min/mg	(RYAN <i>et al.</i> , 2005)
70	6	37 °C	NR	Km 0,65., Vmax e 0,025 × 10 <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	(WARCHOL <i>et al.</i> , 2002)
92	6,8	40 °C	30°C	0,19 Mm	(YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1986)
58	6	37 °C	45°C em uma ampla faixa de pH (4,5-7,0)	Km 6,66 mM.; Vmax 0,028 μmol min <sup>-1</sup>	(GINES <i>et al.</i> , 2000)
66	7,0	40°C e 50°C	40 °C em pH 7,0	Km 41,98mM., Vmax1,184 μmol/min	(LINCONL <i>et al.</i> , 2018)
NR	4,0-4,5	40°C a 45°C	pH 6 a 7 por 24 horas em 40 a	NR	(BENATTOUCHE

---

			50 °C		<i>et al.</i> , 2016)
<b>47</b>	6	NR	NR	14 mM., /Km = $5,2 \times 10^8$ M s <sup>-1</sup>	(DIPASQUALE <i>et al.</i> , 2009)

---

Legenda: (NR): não relatado.

## 2.5 Aplicações das invertases

As invertases desempenham um papel fundamental em diversas aplicações industriais, especialmente na indústria de alimentos (VEANA *et al.*, 2018). Sua principal utilidade reside na produção de açúcar invertido, essencial na fabricação de mel artificial, biscoitos, cremes, doces, geleias, chocolates, formulações infantis, produtos de panificação e cerveja. Além disso, as invertases são empregadas na produção de formulações destinadas à alimentação animal, como rações para gado e alimentos para abelhas (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020; KULSHRESTHA *et al.*, 2013). Na indústria vinícola, a invertase desempenha um papel crucial ao promover o aumento da clarificação e do rendimento. Além disso, ela contribui para uma maior liberação de compostos bioativos, intensificando a recuperação de fenóis e antocianinas. Ao mesmo tempo, a invertase reduz a acidez e aprimora as propriedades organolépticas, como textura, sabor e aroma (CAMARGO *et al.*, 2021).

Estudos recentes têm revelado que as invertases apresentam atividades antioxidantes, bactericidas e anticancerígenas. Diante dessas descobertas, seu emprego tem crescido significativamente na indústria farmacêutica, especialmente na produção de xaropes, formulação de medicamentos e fabricação de fruto-oligossacarídeos (FOS). Estes últimos, sendo carboidratos não digeríveis, demonstram a capacidade de estimular as bifidobactérias intestinais, desempenhando um papel crucial na modulação do sistema imunológico. (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020). A enzima pode ainda ser aplicada ao tratamento de diversas doenças, pois as invertases possuem a capacidade de reduzir o colesterol e a amônia do sangue humano. Dentro da indústria farmacêutica, a invertase é utilizada também na formulação de agentes plastificantes aplicados na produção de cosméticos (BHALLA *et al.*, 2017; CHANG *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

A utilização industrial da invertase não se limita apenas às indústrias alimentícias e farmacêuticas, pois, como sendo uma enzima promissora, ela pode aumentar a quantidade de glicose no caldo de cana, quando utilizado em processos fermentativos, sendo uma boa opção para produção de biocombustíveis. Por meio dos processos de fermentação, a invertase também é capaz de produzir ácido lático, bebidas alcoólicas e glicerol (MANOOCHEHRI *et al.* 2020; MALHOTRA; BASIR, 2020). Por fim, eletrodos

enzimáticos podem ser desenvolvidos por meio da invertase para detectar a presença de sacarose nas mais diversas soluções (KULSHRESTHA *et al.*, 2013). Até o momento, o único relato de aplicação de invertase bacteriana em alimentos foi delineado por Rana *et al.* (2023). Nesse estudo, suco de manga e *muffins*, prontos para comercialização e consumo, foram desenvolvidos com a incorporação de invertases bacterianas produzidas por bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Enterobacter*, isoladas especificamente da maçã e banana.

### 2.5.1 Açúcar líquido

O açúcar líquido representa uma solução que incorpora açúcar dissolvido em água, podendo manifestar-se tanto como uma única variedade de açúcar quanto como uma composição de dois ou mais tipos de açúcares. Essa solução pode incluir sacarose, glicose, frutose, ou uma combinação desses três açúcares (CABRAL, 2012). Como alternativa, pode-se formar uma solução utilizando glicose enriquecida com frutose. O açúcar líquido de sacarose, por sua vez, é obtido por meio da dissolução de açúcar refinado granulado em água, resultando em uma solução de 67,5 °Brix. Caso o açúcar utilizado não apresente coloração branca, a solução pode adquirir uma tonalidade amarelada, tornando necessária a passagem do produto por carvão vegetal como medida de purificação (RODRIGUES *et al.*, 2000).

Os açúcares líquidos têm aplicações abrangentes, sendo empregados como matéria-prima em biscoitos, produtos assados, confeitaria, enlatados, e diversas bebidas, como aguardente, refrigerantes, cervejas e sucos de frutas. Além disso, são utilizados na produção de laticínios, sorvetes, manteiga e na indústria de frutas congeladas. A baixa viscosidade, juntamente com as propriedades umectantes, possibilita a aplicação dessa matéria-prima em geleias, bolos, produtos contendo gelatina e doces aerados (GRATÃO; BERTO; SILVEIRA, 2004).

Os açúcares na forma líquida apresentam diversas vantagens em comparação ao açúcar a granel, tais como facilidade no manuseio e dosagem, requisitos reduzidos de espaço para armazenagem, minimização de perdas, custos e mão de obra, aprimoramento na sanitização, além das propriedades microbiológicas conhecidas e da considerável

flexibilidade nas proporções de diferentes misturas de açúcares. Contudo, este produto também possui desvantagens, incluindo a baixa solubilidade da sacarose, a susceptibilidade ao ataque microbiano e a necessidade de equipamentos especializados para armazenamento e manuseio (HUSSAIN *et al.*, 2009).

### 2.5.2 Açúcar líquido invertido

O açúcar líquido invertido é a mistura de glicose e frutose. Apresenta-se em uma solução límpida e amarelada muito utilizado na indústria alimentícia como xarope, ingrediente de preparações doces como geleias, e balas devido às suas propriedades adoçantes superiores às da sacarose, pelo alto teor de frutose (KULSHRESTHA *et al.*, 2013). Além de ter maior solubilidade e resistência a cristalização, devido a natureza higroscópica da glicose. Sendo assim o açúcar invertido é mais vantajoso para a indústria alimentícia, pois possui maior vida útil (CHEN *et al.*, 2023; MENÉNDEZ, 2013). O nome açúcar invertido é decorrência da rotação óptica da solução, pois uma solução contendo sacarose pura, polariza a luz para a direita e uma solução de açúcar invertido, polariza para esquerda (KLOBITZ, 2010).

O açúcar invertido pode ser produzido por hidrólise ácida, troca iônica ou enzimática. A hidrólise ácida é um método rápido, fácil e não possui a interferência de contaminantes microbianos. No entanto, não é um processo econômico e apresenta baixa eficiência por conferir coloração marrom aos produtos, causar alteração de textura e sabor e promover a formação de hidroximetilfurfural (HMF) (OLIVEIRA *et al.*, 2020; KLASSON *et al.*, 2022; OBODOVYCH *et al.*, 2021). A troca iônica utiliza-se resinas catiônicas para a inversão da sacarose. Os sais na calda de açúcar reagem com as resinas em uma coluna, gerando acidez e promovendo uma inversão parcial da sacarose (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020). O processo é completado ao passar por uma segunda coluna de resina catiônica. Já a hidrólise enzimática é catalisada pela enzima invertase resultando em um xarope de alta qualidade, caracterizado por baixas concentrações de hidroximetilfurfural e um desenvolvimento de cor minimizado (RODRIGUES *et al.*, 2000). Os métodos enzimáticos podem envolver tanto enzimas solúveis quanto enzimas imobilizadas. Na hidrólise da



2022). Além disso, a taxa de cristalização na frutose é prolongada. Esses dois fatores não apenas contribuem para a redução do número de adoçantes necessários na indústria alimentícia, mas também estendem a vida útil dos produtos (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020).

## 2.6 Avanços recentes

Por mais que a produção da invertase seja possível por meios naturais, a demanda industrial requer uma grande quantidade da enzima e, portanto, o mais acessível é a produção da enzima pelo processo recombinante (PISCITELLI *et al.*, 2010). Atualmente, há uma variedade de sistemas de expressão, incluindo fungos e bactérias, que podem ser usados para a produção de invertase (BROCARD-MASSON *et al.*, 2019). Recentemente, a produção de invertase bacteriana por tecnologia recombinante tem despertado grande interesse industrial, pois é uma estratégia eficiente para atender aos requisitos de comercialização do mercado, possuindo alta eficiência de produção e baixo custo dos produtos finais (PALOMARES *et al.*, 2004). Um microrganismo comumente explorado na tecnologia recombinante é a *E. coli* (PEK *et al.*, 2015), como demonstrado por Vásquez-Bahena *et al.*, (2006) ao clonaram um gene de invertase de *Z. mobilis* em *E. coli*. Outro exemplo da utilização do microrganismo nesta tecnologia se refere ao trabalho de Tripathi *et al.* (2015), que expressaram um gene de *Bacillus megaterium* em *E. coli* não produtora de invertase.

Uma área de intensa pesquisa tem sido a utilização de recursos renováveis, como os resíduos agroindustriais, como substratos de baixo custo e prontamente disponíveis para a produção de enzimas, possibilitando uma forma de gerenciamento de resíduos com boa relação custo-benefício (OYEDJI *et al.*, 2017). Resíduos agroindustriais apresentam uma grande quantidade de nutrientes facilmente disponíveis, tornando-os fontes alternativas de carbono e nitrogênio, sendo assim, um ambiente promissor para o crescimento e metabolismo de bactérias (KESKIN *et al.*, 2016). Os microrganismos possuem a capacidade de fermentar os açúcares disponíveis nesses resíduos e convertê-los em produtos de grande interesse industrial, como as enzimas. Além disso, os resíduos podem ser utilizados como matéria-prima de baixo custo para a produção de metabólitos primários

e secundários com baixo valor comercial (GIRALDO *et al.*, 2012; PANDA *et al.*, 2016; RAFATULLA *et al.*, 2010).

Alguns resíduos utilizados até o momento para produção da invertase bacteriana foram bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, farelo de soja, farelo de arroz, farelo de aveia, farelo de trigo, casca de laranja, casca de romã, casca de banana, casca de maçã e albedo em pó (LINCONL *et al.*, 2018; DOAN *et al.*, 2021).

## **2.7 Desafios e Futuras pesquisas**

A produção de invertase bacteriana tem sido relatada somente em escala de laboratório, sendo que industrialmente, as invertases são preferencialmente isoladas de leveduras (SUNMONU *et al.*, 2022). A aplicação das enzimas em escala industrial é restrita pelo seu alto custo de produção e estabilidade de armazenamento. Durante o uso da enzima podem ocorrer alterações de pH e temperatura, necessitando do emprego de técnicas de imobilização para amenizar os custos de utilização da enzima em processos industriais. Embora o uso de invertases solúveis seja mais vantajoso em relação a hidrólise com ácidos, a sua aplicação nesses processos em larga escala permite apenas o emprego de reatores descontínuos, o que torna a operação onerosa (PANG *et al.*, 2019; VITOLO *et al.*, 2021). Atualmente, o uso de invertases é permitido na produção de alimentos em diversos países, incluindo Austrália, Nova Zelândia, Canadá, China, França e Coreia do Sul. Embora não haja ainda especificações para o uso de invertases bacterianas, o uso de invertase de *S. cerevisiae* foi considerado seguro pelo comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA), por possuir a enzima, baixa toxicidade, não colocando em risco a segurança do consumidor final (VO *et al.*, 2021). No entanto, por ser o mercado de enzimas bastante competitivo, invertases bacterianas ainda não estão no grupo das hidrolases mais produzidas e comercializadas (UZUNER; CEKMECELIOGLU, 2019).

## **2.8 Conclusão**

As invertases bacterianas apresentam eficiência comparável às invertases de leveduras, sugerindo que ambas as fontes microbianas são promissoras para diversas aplicações industriais. A similaridade no desempenho sugere que as invertases bacterianas podem ser viáveis em escala industrial, proporcionando uma alternativa valiosa. No que diz respeito aos custos operacionais, embora seja necessário um exame mais aprofundado, a produção de invertases bacterianas pode se revelar vantajosa no mercado de enzimas. A eficiência, a adaptabilidade em diferentes meios e a rápida multiplicação celular das bactérias sugerem que o processo pode ser otimizado, contribuindo para uma produção mais eficiente e econômica.

Quanto a utilização da invertase na produção de açúcar invertido e na indústria de suplementos, observamos um potencial significativo. O uso dessas enzimas em processos de produção de açúcares invertidos pode ser otimizado, proporcionando uma alternativa viável e eficiente. Além disso, a aplicação em suplementos destaca a versatilidade das invertases, abrindo novas possibilidades para o desenvolvimento de produtos nutricionais inovadores. Invertases bacterianas são, portanto, enzimas promissoras para área de alimentos, mas é necessário que novos estudos sejam conduzidos com foco na aplicação industrial da enzima.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Produzir invertase de *B. tequilensis* PP6 em diferentes meios e fontes de carbono e avaliar as propriedades bioquímicas da enzima e seu potencial na síntese de açúcar invertido e fruto-oligossacarídeo.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o potencial de síntese de invertase pelo *B. tequilensis* PP6 mediante estudos de diferentes meios de produção;

- Analisar a influência dos açúcares mascavo, demerara e sacarose P.A em diferentes concentrações, como fonte de carbono na produção da invertase;
- Avaliar a influência da temperatura e do pH do meio reacional nas atividades da invertase;
- Examinar a estabilidade térmica e frente ao pH da invertase produzida;
- Avaliar a influência dos íons metálicos de cálcio, ferro, magnésio, cobre e sódio sob a atividade da invertase;
- Mensurar o potencial de produção de fruto-oligossacarídeos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo: manutenção e inóculo

A linhagem bacteriana *B. tequilensis* PP6 foi isolada do fruto da pupunha, obtido por meio do projeto PROCAD-AM 1707/2018 (Processo n 88881.200497/2018-01) e foi mantida no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas, TO. A linhagem foi preservada em criotubos contendo 50% de uma solução de glicerol 40%, e 50% do meio de cultura (5 g/L de peptona de carne e 3 g/L de extrato de carne). A linhagem foi mantida a -80 °C até o momento da reativação. A reativação foi realizada retirando a amostra do criotubo com o auxílio de uma alça descartável estéril, inoculando-a em placa de Petri contendo 3 g/L de extrato de carne, 5 g/L de peptona de carne e 20g/L de ágar bacteriológico. Os isolados permaneceram incubados a 30 °C por 24 horas.

O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 20 mL do meio basal composto por 3 g/L de extrato de carne e 5 g/L de peptona de carne. O meio de cultivo foi esterilizado a 121 °C, 2 atm, por 15 min e mantido a 150 rpm, 30 °C por 24 horas. Dois mililitros do pré-inóculo foram utilizados para inocular os meios de cultivos para a produção da enzima.

## 4.2 Produção da enzima em cultivos submersos

### 4.2.1. Meios de cultivo para produção de invertase

Sete meios de cultivo foram testados buscando encontrar a melhor fonte de nutrientes para produção da invertase. A composição dos meios foi a seguinte:

**Meio Mineral Padrão (MMP):** 20 g/L de sacarose, 3 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,5 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4$  e 1,0 g/L de extrato de levedura (adaptado de REDDY *et al.*, 2010);

**Meio 1 (M1):** 12 g/L de extrato de levedura, 10 g/L  $\text{NaCl}$ , 7,21 g/L  $\text{NaNO}_3$ , 2,4 g/L e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 12,5 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (adaptado de YINGHUA *et al.*, 2007).

**Meio 2 (M2):** (g/L) ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1,  $\text{MgSO}_4$ ; 0,1  $\text{CaCl}_2$ ; 0,01,  $\text{NaCl}$ ; 10 (adaptado de Bandal *et al.*, 2021).

**Meio 3 (M3):** 5g/L  $\text{NaCl}$  e  $\text{KCl}$ , 1g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ ; 0,3 g/L,  $\text{MnSO}_4$  e  $\text{MgSO}_4$  e 3g  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (LI *et al.*, 2022).

**Meio 4 (M4):** 14g/L de extrato de levedura, 4 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,001g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,004g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (COCA., 2019).

**Meio 5 (M5)** Peptona de carne 10,0 g/L; extrato de levedura 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  ,1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,01;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,01 (SILVA *et al.*, 2021).

**Meio 6 (M6):** 2g/L de Extrato de levedura, 1,0 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,5g/L,  $\text{KCl}$  0,5g/L e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (LINCOLN; MORE., 2018).

Os cultivos submersos foram preparados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 18 mL de cada meio, acima especificado, e 2mL de pré-inóculo. Cada meio foi ainda acrescido de 1% de sacarose e mantidos por 48 horas a 150 rpm a 30 °C. O pH dos

meios foi ajustado para 7,2 com adição de HCl ou NaOH 1 mol/L. Os extratos proteicos foram centrifugados a 10 °C, a 3000 rpm por 30 minutos e congelados para avaliação da atividade enzimática. Todos os cultivos e ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.2. Efeito de diferentes fontes de carbono para produção de invertase

O meio 2 foi submetido a novos testes variando as fontes de carbono, com três diferentes açúcares: Sacarose P.A., açúcar mascavo e açúcar demerara, variando nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0% (m/v).

Os cultivos submersos foram preparados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 18 mL do meio 2 e 2 mL de pré-inóculo. Cada meio foi acrescido de sacarose P.A, açúcar mascavo e açúcar demerara a 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0% e mantidos por 48 horas a 150 rpm a 30 °C. Os extratos proteicos foram centrifugados e congelados para avaliação da atividade enzimática. Todos os cultivos e ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.3 Determinação da concentração de massa celular seca

Para quantificação da concentração de massa celular seca (MCS), uma alíquota de 20 mL do caldo do cultivo submerso foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos (3.800 x g). O sobrenadante foi separado para determinação da atividade enzimática e a massa celular precipitada (“*pellet*”) diluída em água destilada, sendo transferidos para recipientes pré-tarados e acondicionados em estufa de secagem a 100-105 °C, até atingir massa constante. Os valores de massa celular (biomassa centrifugada) foram determinados gravimetricamente a partir da pesagem dos precipitados, sendo expressos em gramas por litro de MCS. O cálculo da concentração da massa celular seca (em g/L) foi realizado por meio da Equação (1).

$$\frac{MCS (g/L) = (MRB - MRV) \times 1000}{V} \quad (1)$$

Em que MRB é igual a massa do recipiente com biomassa (g/L); MRV é igual a massa do recipiente vazio (g/L); V é igual ao volume de amostra de cultivo centrifugado (mL).

#### 4.4 Caracterização das propriedades bioquímicas da invertase

##### 4.4.1 Efeito da temperatura do meio reacional sobre a atividade enzimática

Para a análise de temperatura do meio reacional foi realizada a avaliação em uma faixa compreendida entre 25 e 80 °C, com intervalos de 5 °C, em tampão McIlvaine pH 5,0. A determinação da atividade se realizou conforme descrito nos itens 4.6.1.

Para determinar a média entre as atividades enzimática foi aplicado o cálculo que determina a atividade relativa (Equação 2). A atividade relativa é a maior atividade enzimática obtida, que mostra o percentual que a menor atividade obtida tem em relação a maior atividade, portanto, é representada como porcentagem.

$$\text{Atividade Relativa (\%)} = \frac{ATV1}{ATV2} \times 100 \quad (2)$$

em que  $ATV_f$  e  $ATV_i$  se referem às atividades final e inicial, respectivamente.

##### 4.4.2 Efeito do pH do meio reacional sobre a atividade enzimática

Para avaliar o efeito do pH sobre a atividade enzimática da invertase, o pH do extrato enzimático foi ajustado para 3,0 a 8,0, com intervalos de 0,5, com diferentes soluções tampão McIlvaine. A determinação da atividade foi realizada de acordo com o item 4.6.1 e a atividade relativa foi calculada pela Equação (2).

#### 4.4.3. Ensaio de estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada pela incubação do extrato enzimático, em banho-maria, a diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C) na ausência de substrato. Alíquotas de 1mL do extrato enzimático foram retiradas em intervalos de tempo pré-definidos (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200, 240 minutos) e então foram utilizadas para a determinação da atividade enzimática conforme descrito no item 4.6.1 Os resultados foram expressos em termos de atividade residual. A atividade relativa foi calculada pela Equação (2).

#### 4.4.4. Estabilidade frente ao pH de incubação

A estabilidade frente ao pH foi determinada com o ajuste do pH do extrato enzimático ( $3,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$ , com  $\Delta = 0,5$ ), utilizando 2 mL de tampão McIlvaine, com a ausência de sacarose e 1 mL de enzima. A atividade enzimática, como descrita no item 4.6.1, foi determinada de imediato obtendo o tempo inicial. Após isto, as amostras foram refrigeradas a 4°C por 24, 48, 72 e 96 horas para conservá-las e, posteriormente, obter a atividade enzimática. A estabilidade frente ao pH foi expressa em termos de atividade residual da atividade enzimática. A atividade relativa foi calculada pela Equação (2).

#### 4.4.5 Efeito dos íons metálicos na atividade da invertase

O efeito de vários íons metálicos na atividade da enzima foi determinado na presença de 5 mM para os íons magnésio, ferro, cobre, cálcio e sódio adicionados na mistura de reação.

Para determinar a quantidade de sais adicionados ao meio reacional foi realizado o cálculo de acordo com a equação 3.

$$C \times V = C \times V \quad (3)$$

Onde:

C: concentração de molaridade;

V: volume.

Os sais foram determinados 1 molar de acordo com o cálculo para o preparo das soluções conforme exposto na equação 4.

$$M = \frac{m1}{M1} \times V \quad (4)$$

Onde:

M: molaridade (em mol/L)

m1: massa de soluto (em g)

M1: massa molar (em g/mol)

V: volume (em L)

Neste ensaio, 10 µl de cada um dos íons metálicos foram adicionados a 790 µl de meio reacional a 50 °C e pH 5,0,(tampão McIlvane). O meio foi composto por sacarose a 2%. Posteriormente, a atividade da enzima foi determinada usando um espectrofotômetro a 540 nm conforme descrito no item 4.6.1 É importante ressaltar que para a amostra controle foi substituído os 10 µl dos sais por 10 µl de água destilada.

#### **4.5 Hidrólise da sacarose**

Soluções de sacarose de 5, 10, 20 e 30% (m/v) em tampão citrato-fosfato 0,1 mol/L (pH=5,0) foram submetidas à hidrólise enzimática. Um volume de 10 mL de solução de sacarose foi mantido por 5 min a 50 °C com subsequente adição de 1,0 mL de extrato enzimático aos tubos de reação e então a hidrólise da sacarose foi realizada por 180 min. Amostras de 0,4 mL foram retiradas em intervalos de tempo distintos (0, 5, 10, 20, 30, 50, 70, 90, 120, 150 e 180 min) e submetidas à inativação enzimática fervendo a 100 ° C por 5 min, depois 0,2 mL foram adicionados ao ácido 3,5-dinitrossalicílico para determinar a quantidade de açúcares redutores produzidos após a reação de hidrólise. A determinação de glicose também foi realizada conforme a metodologia utilizada para realização da atividade da frutossiltransferase com o kit enzimático GOD-POD (glicose oxidase peroxidase) (Labtest Diagnóstica S/A, Lagoa Santa, MG, Brasil). Os resultados foram expressos em µmol de açúcar redutor. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

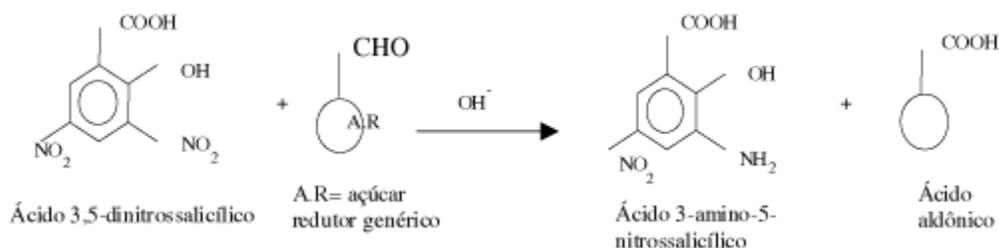
#### **4.6 Métodos analíticos**

##### **4.6.1 Determinação da atividade invertase**

A atividade enzimática de invertase ocorreu adicionando 800 µL de uma solução de sacarose P.A a 2% (m/v) em tampão McIlvane pH 5,0 em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos a 50 °C por 5 minutos. O início da reação ocorreu com a adição de 200 µL do

extrato enzimático. Foram retirados em diferentes intervalos de tempo (0 e 5 minutos) 200  $\mu\text{L}$  da reação, adicionando-os em tubos contendo 200  $\mu\text{L}$  de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm. Esta análise utilizando o DNS testa a presença do grupo carbonila livre ( $\text{C} = \text{O}$ ), os chamados açúcares redutores. Segundo Deshavath *et al.* (2020) e Silva *et al.* (2003) esse ensaio envolve a oxidação do grupo funcional aldeído presente no ácido correspondente, enquanto o DNS é simultaneamente reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico em condições alcalinas, essa reação pode ser melhor visualizada na Figura 4. Uma unidade (1U) de atividade invertase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de frutose, por mililitro, por minuto, (MILLER, 1959).

Figura 4: O ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor, formando o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, dando origem ao ácido aldônico.



Fonte: Silva et al. (2003).

#### 4.6. 2 Determinação da atividade frutossiltransferase

Os ensaios de atividade frutossiltransferase (FTase) foram realizadas pela adição de 1 mL da solução enzimática FTase solúvel em meio reacional constituído por 10 mL de solução de sacarose em diferentes concentrações diluídas em solução tampão tris-acetato  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 5,0 (CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007) adaptado. As reações foram conduzidas por 60 minutos em banho maria na temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$  e, finalizadas em banho com água em ebulição por 10 minutos, visando inativar a enzima. A solução, oriunda do meio reacional, foi utilizada para a quantificação das concentrações de glicose e açúcares redutores (AR) pelos métodos GOD-PAP® (kit enzimático comercial glicose-oxidase) (GANAIE *et al.*, 2014 e CUNHA *et al.*, 2017) e ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), respectivamente. Finalmente, as atividades de transfrutossilção (AT) e hidrolítica (AH) serão obtidas por meio das Equações 5 e 6, respectivamente.

Uma unidade (1U) de atividade de transfrutossilção (At) é definida como a quantidade de enzima que transfere um micromol ( $1\mu\text{mol}$ ) de frutose por minuto, nas condições experimentais estabelecidas (CUNHA, 2017; OTTONI *et al.*, 2012; CUERVO-FERNANDEZ *et al.*, 2007). Assim, a concentração de frutose transfrutossilada é constituída por 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose (OTTONI *et al.*, 2012; CUERVO *et al.*, 2007). A atividade At foi calculada pela Equação (5):

$$At = [Ft].VR/tw \tag{5}$$

em que [Ft] é a concentração molar de frutose transfrutossilada ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ),  $V_R$  é o volume do meio de reação (L),  $t$  é o tempo de reação (min) e,  $W$  é o volume do caldo fermentado utilizado na reação enzimática (mL). Os valores de frutose liberada e frutose transfrutossilada foram calculados pelas Equações (6) e (7), respectivamente (OTTONI *et al.*, 2012; CUERVO *et al.*, 2007).

$$[F] = [AR] - [G] \tag{6}$$

$$[Ft] = [G] - [F] = [2G] - [AR] \quad (7)$$

em que [AR], [F] e [G] são as concentrações ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) de açúcares redutores, frutose e glicose, respectivamente.

#### **4.7 Análise estatística dos dados**

Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados pelo teste de média e submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo *teste de Tukey* ao nível de 5% de significância utilizando o *software* Sisvar®. Os gráficos foram gerados por meio do *software* Origin® Pro 2017.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Efeito de diferentes sais inorgânicos sobre a produção de invertase**

Os microrganismos podem reagir de diferentes formas quando cultivados em diversos meios de cultura, variando-se as fontes de carbono, nitrogênio, pH, temperatura, pressão e oxigênio. O conhecimento da formulação dos meios de cultura otimizados para cada microrganismo possibilitou o isolamento, seleção e caracterização destes, fazendo-se conhecer a sua importância econômica e ecológica (MINELLI-OLIVEIRA *et al.*, 2020), pois é o meio de cultivo que vai determinar o tipo e a quantidade de metabólitos produzidos durante a incubação, devido a variedade de nutrientes ofertados para o crescimento e as vias metabólicas resultantes (HORAK *et al.*, 2019).

Apesar de existirem poucos relatos sobre a produção de invertase por linhagens do gênero *Bacillus*, Lincoln e More (2018) reportaram, como pontos chaves para a produção de invertase, a fonte de carbono, nitrogênio, o tempo, a temperatura e o pH em que os cultivos foram realizados. No entanto, ainda são escassos relatos da produção de invertase bacteriana com meios contendo grandes variações de sais. Desse modo, diferentes cultivos foram realizados com a linhagem *B. tequilensis* PP6.

Sete meios de cultivo diferentes, com pH 7,2, foram testados para a produção de invertase com o objetivo de encontrar a maior produção enzimática. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey (Tabela 5).

**Tabela 5:** Influência de diferentes meios de cultivo utilizados na produção de invertase por *B. tequilensis* PP6.

Meios de cultivo	Atividade enzimática (U/ml)
M4	1,22 <sup>a</sup>
MMP	1,60 <sup>a</sup>
M6	1,67 <sup>a</sup>
M5	2,43 <sup>a</sup>
M1	2,62 <sup>a</sup>
M3	3,40 <sup>a</sup>
M2	3,60 <sup>a</sup>

\*Letras iguais, na linha, não apresentam diferença significativa entre si (Tukey  $p < 0,05$ ).

Condições de cultivo: Cultivos realizados com 20 % das fontes de carbono, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C por 48 horas.

O Meio 2 (BANDAL *et al.*, 2020) foi o meio que apresentou maior média de atividade de invertase (3,60 U/mL), embora seja um meio padrão para a produção de amilase, seguido pelo Meio 3 (3,40 U/mL). O meio 2 é composto por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{NaCl}$ . Bandal *et al.* (2020) utilizaram o mesmo meio de cultivo para a produção de amilase por *Bacillus* sp. H7 isolado de ambiente marinho. Nesse experimento, os autores otimizaram a produção da enzima em biorreator tipo tanque agitado de 5 litros.

O Meio 3 é composto por  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ ;  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  e tri-hidrato de acetato de sódio [ $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ] (LI *et al.*, 2022). Esse meio de cultivo foi utilizado pelos autores para avaliar o crescimento celular de *Clostridium butyricum* e *Bacillus coagulans*, buscando encontrar a melhor combinação de sais para o desenvolvimento da cocultura destas linhagens. No presente estudo, os sais foram utilizados na formulação do meio de cultivo para a produção de invertase.

Kim *et al.* (2000) investigaram as condições de fermentação para a produção de invertase por uma espécie de *B. macerans* EG-6. Os autores notaram que a incorporação de fosfatos aumentou em 8% a produção enzimática e, entre os sais inorgânicos estudados, o  $\text{MgSO}_4$  proporcionou o maior crescimento celular e produção de invertase, pois a presença dos sais pode desempenhar um papel crucial no crescimento celular inicial, indicando que os componentes são nutrientes importantes ao crescimento de *Bacillus*, o que também pode ter ocorrido com a linhagem *B. tequilensis* PP6, por ser uma bactéria do mesmo gênero a produzir a mesma enzima em questão.

Adicionar sais ao meio de cultura pode aumentar a assimilação de substrato pelas bactérias e melhorar a estabilidade catalítica das enzimas, pois a dissociação de sais em íons em uma solução aquosa pode afetar a circulação de moléculas de água através da membrana celular (KAZEEM *et al.*, 2016). O sulfato de amônio é um nutriente de bastante interesse para a produção enzimática, pois, além de ser considerado uma fonte de nitrogênio inorgânica, pode induzir a uma produtividade da molécula em estudo e diminuir os custos de produção em larga escala (NANJUNDASWAMY., OKEKE, 2020; AFOLABI; ADETAYO, 2022). Gavrilov e Ivanova (2014) realizaram um trabalho buscando analisar a produção de inulinase e invertase da cepa de *Bacillus* sp. SG113 e verificaram que a melhor fonte de nitrogênio inorgânico foi o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e, quando combinada, a caseína

estimulou o crescimento microbiano e a produção da invertase, corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

Valores intermediários de atividade de invertase foram observados nos meios de cultivo M1 e M5. O meio de cultivo 1, proposto YINGHUA *et al.* (2007), é composto por extrato de levedura, NaCl, NaNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Os autores utilizaram o meio M1 para a produção de  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase por *E. coli*. O meio apresenta maior proporção de fonte de nitrogênio em relação a fonte de carbono, o que pode ter prejudicado o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a quantidade de enzimas produzidas, pois a adição de fontes de nitrogênio, em excesso, podem reduzir a produção de interesse pelo microrganismo (AITA *et al.*, 2019), devido a relação muito próxima entre o metabolismo de carbono e do nitrogênio, onde sua assimilação é coordenada e controlada de acordo com a disponibilidade de ambos os nutrientes (GINÉSY *et al.*, 2017).

O meio M5 proposto por Silva *et al.* (2020) é composto por peptona de carne, extrato de levedura, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. O meio apresenta a peptona em sua composição. Este nutriente é um dos mais utilizados em preparo de meios para microrganismos que requerem aminoácidos e vitaminas como fonte de nitrogênio orgânico, sendo que as peptonas mais produzidas e utilizadas são as de origem animal, como a de carne, utilizada neste estudo (ORAK *et al.*, 2019; BROLI *et al.*, 2021). A ocorrência da produção de invertases por espécies de *Bacillus*, utilizando peptona bacteriológica como fonte de nitrogênio também foi explorada por Ahmed (2008) e Awad *et al.* (2013), comprovando a influência deste nutriente sobre a produção enzimática, o que pode ser atribuído ao fato de que a peptona possui maior quantidade de proteínas disponíveis do que outras fontes orgânicas de nitrogênio (NORIZAN *et al.*, 2020).

Íons metálicos podem desempenhar um papel relevante no transporte de materiais através da membrana celular primários (OKPALLA *et al.*, 2022). Dentre esses íons, destaca-se o MnSO<sub>4</sub>, responsável pela secreção de metabolitos primários (OKPALLA *et al.*, 2022). Esawy *et al.* (2014) observaram que, ao se utilizar o MnSO<sub>4</sub>, a produção enzimática de invertase de *Aspergillus niger* aumentou, quando comparada a outros sais testados no meio de produção. Comparando, então, os resultados encontrados neste estudo e os de

Esawy *et al.* (2016) é possível observar que o íon manganês apresenta uma certa influência sobre a produção de invertase de fungos ou bactérias e, embora a produção de invertase no meio não tenha sido a maior observada, é notável que a presença do manganês estimulou a produção da enzima.

O meio mineral padrão (MMp) composto por sacarose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  e extrato de levedura (REDDY *et al.*, 2010), foi utilizado para a produção de  $\beta$ -D-Frutofuranosidase ( $\beta$ -FFase) por fungos filamentosos. A partir daí vem sendo utilizado para produção de invertase de fungos e bactérias (BELORKAR *et al.*, 2015; BASTOS, 2022). Bastos (2020) ao utilizar este mesmo meio para produção de invertase por *Bacillus* sp. PP6, alcançou um valor de atividade enzimática (1,8 U/ml), muito próximo ao encontrado neste trabalho (1,60 U/ml).

O M4 proposto por Coca (2019) é composto por extrato de levedura,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  e foi aplicado para a produção  $\alpha$ -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* e o M6, que possui em sua composição extrato de levedura  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$  e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (LINCOLN e MORE., 2018), foi empregado na produção de  $\beta$ -D-frutofuranosidase por *B. subtilis* LYN12. Esses foram os meios que apresentaram as menores médias para a produção de invertase apesar de todos possuírem extrato de levedura considerada uma fonte de nitrogênio orgânica vantajosa para a produção de enzimas (GARRIDO *et al.*, 2018).

A menor atividade foi encontrada no meio M4. Um fator que pode ter causado essa diminuição da atividade foi a presença do  $\text{FeSO}_4$  que pode não ter interagido de forma benéfica com os outros sais do meio e com o *B. tequilensis* PP6. No entanto, Awad *et al.* (2013) ao utilizarem um planejamento experimental de Plackett-Burman para avaliar a importância relativa de vários nutrientes para a produção de invertase por *L. brevis* Mm-6, observaram que a incorporação do sulfato ferroso apresentou efeito significativo sob a produção da invertase o que permite concluir que o  $\text{FeSO}_4$  pode apresentar efeitos distintos a depender do microrganismo em questão, pois os efeitos da incorporação do  $\text{FeSO}_4$  como componente do meio na produção de invertase ainda não está clara na literatura.

É importante ressaltar que não somente a presença ou ausência de um nutriente pode afetar a produção enzimática, mas também a concentração desse nutriente. O  $\text{MgSO}_4$

está presente tanto nos meios de cultivo M2, M3, M4, M5 e M6, mas em concentrações distintas, o que pode ter influenciado o resultado da produção de invertase. Oh *et al.* (2010) ao analisarem a produção de invertase por *Bacillus flexus* concluíram que a incorporação do sal ao meio, aumentou em duas vezes a produção da enzima. O  $MgSO_4$  desempenha diversos papéis no metabolismo celular microbiano podendo favorecer ou inibir rotas metabólicas, pois se a quantidade de magnésio disponível não estiver adequada a produção de adenosina trifosfato (ATP) é diminuída o que pode ser prejudicial em um processo de fermentação. O sulfato de magnésio é ainda um importante cofator enzimático e participa diretamente da biossíntese de proteínas e estabiliza a estrutura e a função dos ribossomos favorecendo o crescimento e a sobrevivência bacteriana (MALIK *et al.*, 2022; CASTIGLIONI *et al.*, 2018; DONG-YEON *et al.*, 2019). Sugere-se que todos esses fatores tenham ocorrido com o *B. tequilensis* PP6 nos meios em questão, estimulando a produção de invertase.

Conforme apresentado nos resultados, o *B. tequilensis* PP6 é capaz de produzir invertase quando recebe do meio os nutrientes adequados ao crescimento. Assim, a seleção do meio de cultivo ideal para a produção de invertase é uma etapa importante para o desenvolvimento de um bioprocesso (DINARVAND *et al.*, 2017).

## 5.2 Efeito de diferentes açúcares sobre a produção de invertase

O meio M2 foi selecionado para os próximos experimentos por ter apresentado uma produção de invertase de 3,60 U/mL, e possuir em sua composição apenas sais inorgânicos, o que facilita o processo de purificação da molécula-alvo. A produção de invertase pelo *B. tequilensis* PP6 foi investigada utilizando diferentes concentrações de sacarose P.A, açúcar mascavo e açúcar demerara (Tabelas 6, 7 e 8).

O açúcar mascavo é a sacarose obtida a partir do caldo de cana-de-açúcar ou beterraba (BRASIL, 2005). O processo de produção se dá por meio do esmagamento dos colmos maduros da cana sem que haja posteriormente o processo de clarificação. Este tipo de açúcar possui em sua composição sacarose, frutose, glicose, potássio, cálcio, magnésio, fósforo, sódio, ferro, manganês, zinco, vitaminas A, B1, B12, B5, C, D6 e E, flavonoides e

ácidos fenólicos, ácidos caféico, clorogênico e cumárico) e aminoácidos (NATALINO *et al.*, 2021).

O valor de pH do açúcar mascavo e outros açúcares não refinados está em torno de 4,55–6,3 e o teor de umidade apresenta variações entre 1,5 a 25,9%. (ZIDAN; AZLAN, 2022). Já o açúcar demerara passa por um refinamento brando, sem a presença de aditivos químicos por este motivo retem mais nutrientes e apresenta um valor nutricional maior que a sacarose (LAROSA *et al.*, 2021). Também é considerado um açúcar intermediário entre a sacarose e o mascavo, possui em sua composição uma vasta gama de minerais Mn, Mg, K, S, P, Zn, Ca, Cu, Fe, apresentando um valor de pH por volta de 6,4 e 6,7 (SILVA *et al.*, 2017; BETANNI *et al.*, 2014). Levando em consideração a maior quantidade de nutrientes disponíveis nos açúcares demerara e mascavo em comparação a sacarose pura, buscou-se otimizar os cultivos utilizando esses açúcares como fonte de carbono. A Tabela 6 mostra os valores de atividade enzimática encontradas em diferentes concentrações de sacarose adicionadas ao cultivo submerso.

**Tabela 6:** Produção de invertase de *B. tequilensis* PP6 em cultivos contendo sacarose como fonte carbono

<b>Sacarose</b>	<b>Atividade enzimática (U/mL)</b>	<b>Concentração celular (g/L)</b>
<b>S 0,5</b>	0,78 <sup>a</sup>	0,10
<b>S 2,5</b>	1,63 <sup>ab</sup>	0,62
<b>S 2,0</b>	2,42 <sup>a</sup>	0,44
<b>S1,5</b>	3,10 <sup>ab</sup>	0,44
<b>S 1,0</b>	3,23 <sup>ab</sup>	0,34
<b>S 3,0</b>	4,82 <sup>b</sup>	0,70

\*Letras iguais, na linha, não apresentam diferença significativa entre si (Tukey  $p < 0,05$ ).

Condições de cultivo: Cultivos realizados em M2 com 0,5, 1,0, 1,5,2,0,2,5 e 3 % de sacarose como fonte de carbono, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C por 48 horas.

Legenda: S - sacarose.

No cultivo contendo sacarose como fonte de carbono, a concentração de 3% apresentou a maior média de atividade enzimática sendo que as concentrações de 0,5% e 2% não apresentaram diferenças significativas entre si, e 2,0, 2,5 e 1,0 também não apresentaram diferenças significativas entre si.

Dentre as fontes de carbono aplicadas nos processos de fermentação, a sacarose é a mais utilizada, sendo capaz de determinar diretamente o metabolismo microbiano (ZHANG *et al.*, 2022). A sacarose vem sendo utilizada como fonte de carbono ideal para a produção de diversas enzimas, por ser uma fonte de baixo custo (BENTO *et al.*, 2019) principalmente para produção de invertase de fungos e bactérias como relatado por Khaskheli *et al.* (2020), que obtiveram maior atividade enzimática de invertase produzida por *S. cerevisiae* quando a sacarose foi acrescentada a 2% no meio de cultura como fonte de carbono e Guerrero *et al.* (2021) que, ao conduzirem um estudo analisando a produção de invertase e inulinase a partir da fermentação *Aspergillus brasiliensis*, encontraram maior atividade enzimática ao aumentar a concentração de sacarose ao meio de fermentação em estado sólido. Benattouche *et al.* (2016) obtiveram maior atividade de invertase produzida por *Streptococcus sp* quando sacarose a 0,4% foi incorporada ao meio de cultivo. Por sua vez, Kim *et al.* (2000) concluíram que, entre as 11 fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, galactose, maltose, lactose, glicerol, ranfinose, xilose, amido solúvel e insulina) testada para produção de invertase por *B. macerans* E-G6, a sacarose a 1,0 % foi a fonte mais benéfica para produção da enzima. Trabalhos mais recentes como o de Bastos (2020) e Lincoln *et al.* (2018) também relataram utilização da sacarose como fonte de carbono, sendo que no trabalho de Bastos (2020) foi a fonte de carbono mais promissora para produção de invertases bacterianas.

No cultivo contendo açúcar mascavo como fonte de carbono, a concentração de 2,0% apresentou a maior média de atividade enzimática. As concentrações de 3,0, 2,5 e 0,5% não apresentaram diferenças significativas entre si, assim como as concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0. Ressalta-se que valores acima de 2,0% provocaram queda na produção enzimática demonstrando que o açúcar mascavo em excesso não provoca efeito positivo sobre o crescimento bacteriano nem sob a produção de enzimas pelo *B. tequilensis* PP6. A

Tabela 7 apresenta os resultados da adição de açúcar mascavo em diferentes concentrações ao meio de cultivo.

O açúcar mascavo requer menos etapas de processamento, não sendo submetida ao refinamento, conservando algumas vitaminas e minerais como potássio (60-400mg/100g), magnésio (35-80mg/100g), cálcio (50-350mg/100g), fósforo (30- 80mg/100g), ferro (4-10mg/100g), manganês (1-5mg/100g), zinco (1-4mg/100g) e sódio (40- 70mg/100g), sendo o açúcar que mais se aproxima da composição da cana de açúcar (NATALINO et al., 2021). O açúcar mascavo já vem sendo utilizado em processos fermentativos para produção de enzimas como demonstrado em um estudo recente para a produção de celulase por *Bacillus pseudomycoides*, concluindo que a produção máxima de celulase ocorreu com a introdução de 1% de bagaço de cana de açúcar ao meio de cultura, indicando que a utilização desta fonte e de seus derivados, já que a composição entre a cana de açúcar e o açúcar mascavo é muito semelhante e benéfica para produção enzimática (DESTRO et al 2019; PRAMANIK et al., 2021).

**Tabela 7:** Produção de invertase de *B. tequilensis* PP6 em cultivos contendo açúcar mascavo como fonte carbono.

<b>Açúcar mascavo</b>	<b>Atividade enzimática (U/ml)</b>	<b>Concentração celular (g/L)</b>
<b>M 3,0</b>	0,56 <sup>a</sup>	1,35
<b>M 2,5</b>	1,12 <sup>a</sup>	0,81
<b>M 0,5</b>	1,33 <sup>a</sup>	0,37
<b>M 2,0</b>	4,13 <sup>ab</sup>	0,72
<b>M 1,0</b>	2,80 <sup>ab</sup>	0,50
<b>M 1,5</b>	2,50 <sup>ab</sup>	1,68

\*Letras iguais, na linha, não apresentam diferença significativa entre si (Tukey p<0,05).

Condições de cultivo: Cultivos realizados em M2 com 0,5, 1,0, 1,5,2,0,2,5 e 3 % de açúcar mascavo como fonte de carbono, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: M - açúcar mascavo.

A produção de invertase utilizando açúcar mascavo já foi testada por Laothanachareon *et al.* (2022), que relataram a produção de enzima por *A. niger* TL19 ao consumir bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono. O açúcar mascavo é uma fonte de carboidrato prontamente disponível para diferentes microrganismos, como as bactérias, que o utilizam esta fonte para produção de kefir. Uma das razões pela qual o açúcar mascavo é benéfico ao crescimento microbiano é devido ao seu alto teor de umidade, diferente do que é encontrado na sacarose (LYNCH *et al.*, 2021; FUHR., 2020). Não há muitos relatos em literatura da utilização de açúcar mascavo para produção de invertase bacteriana. No entanto, um estudo conduzido por Shah *et al.* (2013) indicou que o açúcar mascavo foi capaz de estimular a produção de invertase por uma cepa bacteriana (HIN-1) quando introduzido a 2% no meio de cultura, corroborando com os resultados aqui mencionados, permitindo aos autores a conclusão de que o açúcar mascavo poderia ser um substrato promissor para produção de invertases bacterianas.

Nos meios de cultivo, contendo açúcar demerara, a maior atividade enzimática pode ser encontrada na concentração de 3%, e a produção enzimática foi proporcional a concentração do açúcar adicionado. Os valores são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Produção de invertase de *B. tequilensis* PP6 em cultivos contendo açúcar demerara como fonte de carbono.

<b>Açúcar Demerara</b>	<b>Atividade enzimática (U/ml)</b>	<b>Concentração celular (g/L)</b>
<b>D 0,5</b>	1,65 <sup>a</sup>	0,45
<b>D1,0</b>	1,85 <sup>a</sup>	0,62
<b>D 1,5</b>	2,10 <sup>a</sup>	1,0
<b>D 2,5</b>	2,97 <sup>a</sup>	1,23
<b>D 2,0</b>	3,42 <sup>a</sup>	1,13
<b>D 3,0</b>	5,53 <sup>a</sup>	1,24

\*Letras iguais, na linha, não apresentam diferença significativa entre si (Tukey p<0,05).

Condições de cultivo: Cultivos realizados em M2 com 0,5, 1,0, 1,5,2,0,2,5 e 3 % de açúcar mascavo como fonte de carbono, inoculados com 2 mL de pré-inóculo, agitação a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. Legenda: D - açúcar demerara.

Como mencionado no item 4.2, a produção do açúcar demerara passa por um processo de refinamento mais brando o que permite manter em sua composição muitos sais minerais (RIBEIRO *et al.*, 2020). Essa maior quantidade de sais disponíveis aos microrganismos pode ter influenciado a produção enzimática. Até o momento não há relatos na literatura do uso deste açúcar como fonte de carbono para produção de invertase nem de outras enzimas.

Com relação a concentração de massa seca celular produzida, o açúcar mascavo se comportou como o melhor indutor do crescimento microbiano, apresentando, entre os 3 açúcares testados, o maior valor de massa celular (1,68 g/L), na concentração de 1,5%. O que permite concluir que a atividade enzimática, neste estudo é independente da quantidade de massa seca celular produzida, pois por mais que a maior atividade enzimática tenha sido encontrada com a concentração de 2% de açúcar mascavo, a massa celular produzida foi uma das menores encontradas. Com relação ao açúcar demerara, a concentração de massa celular foi proporcional ao valor de atividade enzimática. Este resultado também foi encontrado quando sacarose foi introduzida ao meio, pois o maior valor de atividade enzimática (4,82 U/ml) e massa celular produzida (0,70 g/L), foram encontradas na concentração de 3% de sacarose, indicando que essa concentração foi benéfica tanto para produção da enzima, quanto para o crescimento microbiano.

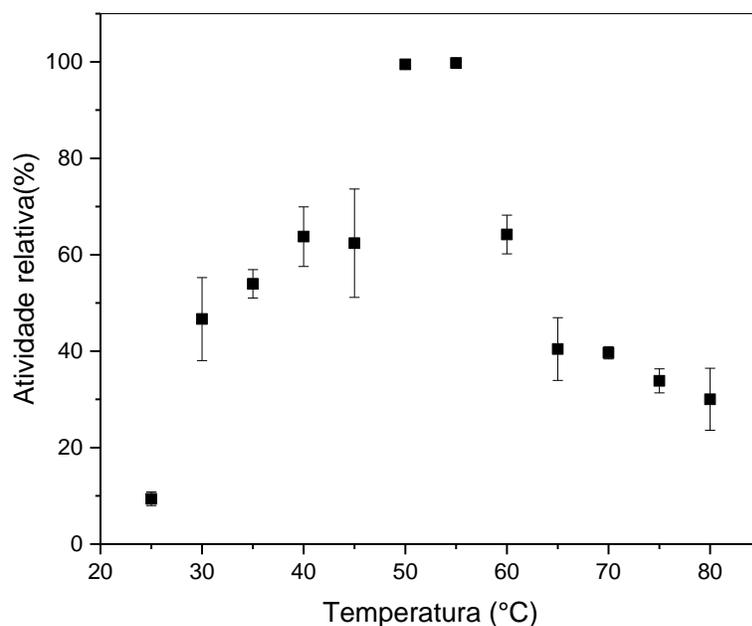
### **5.3. Propriedades bioquímicas da invertase de *B. tequilensis* PP6**

#### **5.3.1 Influência da temperatura do meio reacional na atividade enzimática**

Na Figura 5 são apresentados os resultados para o efeito da temperatura sobre a atividade de invertase de *B. tequilensis* PP6.

A maior atividade de invertase (5,37 U/mL) (100,00 %) foi encontrada na temperatura de 55 °C. A enzima apresentou um aumento gradativo na atividade de 25 °C (9,37%) até 55 °C. A partir de 60 °C houve um declínio na atividade de 30% (1,6 U/mL) a 80 °C. Para as temperaturas de 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C, a enzima apresentou, respectivamente 2,49 U/mL, 2,90 U/mL, 3,42 U/mL, 3,33 U/mL e 5,35 U/mL. Várias invertases bacterianas podem apresentar atividade ótima entre 50 °C e 55 °C (YOON et al., 2007; BENATTOUCHE *et al.*,2016; OMORI *et al.*,2010; CHEN *et al.*,2020; ÁVILA-FERNANDEZ *et al.*,2016; BASTOS *et al.*,2022

**Figura 5:** Influência da temperatura do meio reacional na atividade de invertase produzida por *B. tequilensis* PP6.



Condições do experimento: Atividade de invertase realizada em diferentes temperaturas: 20 °C a 80 °C, em tampão McIlvaine pH 5,0 por 5 minutos.

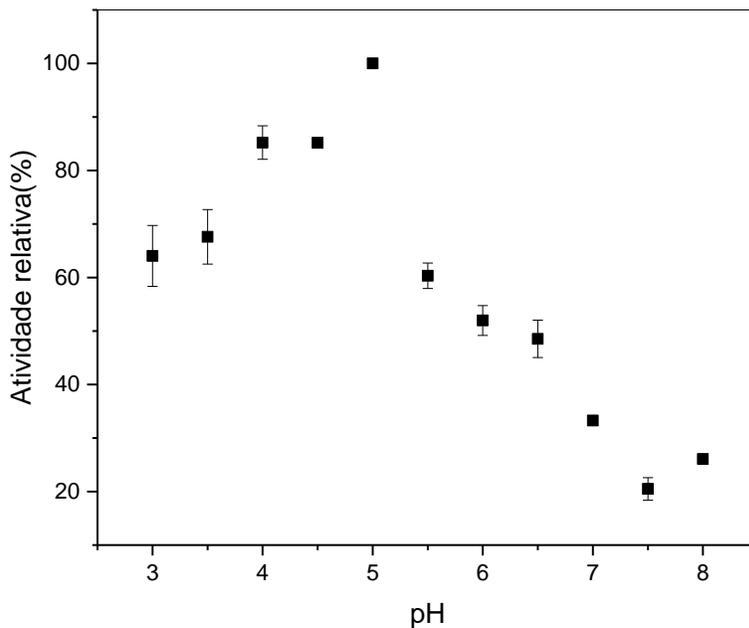
Kaur e Sharna *et al.* (2005) isolaram do solo bactérias produtoras de invertase e encontraram as melhores atividades da enzima em uma faixa de temperatura entre 50 °C e

60 °C, indicando a natureza termotolerante da enzima. Neste estudo, os autores também observaram uma queda gradual da atividade enzimática à medida que a temperatura aumentou a partir de 65 °C. Park *et al.* (2001) também encontraram a maior atividade da invertase em 50 °C para invertase produzida por *B. macerans* EG-6. Encontrar a temperatura ideal para atividade das enzimas é necessário para evitar a desnaturação e consequente queda na atividade enzimática (PAUL *et al.*, 2021).

### 5.3.2 Influência do pH do meio reacional na atividade enzimática

Na Figura 6 são apresentados os resultados para a atividade enzimática da invertase de *B. tequilensis* PP6 para diferentes valores de pH do meio reacional.

**Figura 6:** Influência do pH do meio reacional na atividade de invertase produzida por *B. tequilensis* PP6.



Condições do experimento: Atividade de invertase realizada em diferentes pH ( $3,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$ , com  $\Delta = 0,5$ ) a  $50^\circ\text{C}$  pH 5,0 por 5 minutos.

O pH do meio reacional tem grande influência na manutenção da estrutura proteica e da atividade das enzimas, pois é capaz de interferir diretamente no estado de ionização das cadeias laterais de aminoácidos. Esse processo de ionização é afetado pela mudança no pH e, conseqüentemente, ocorrem alterações no sítio ativo das enzimas o que afeta diretamente a atividade enzimática (SHAHEEN *et al.*, 2008).

A invertase de *B. tequilensis* PP6 apresentou 100% de sua atividade enzimática em pH 5,0 (5,62 U/mL). No pH 6,0 a enzima apresentou 51,96% de sua atividade e no pH 8,0 apresentou apenas 26,08% de atividade. O pH e a temperatura, natureza do meio e presença de ativadores e inibidores são fatores que podem influenciar a catálise enzimática, sugerindo que toda enzima tem um valor de pH no qual sua atividade catalítica é máxima. Nas condições experimentais previamente determinadas, esse valor é definido como o pH ótimo da enzima. Quando a enzima é submetida a um pH extremo, fora da zona do seu pH ótimo, sua atividade pode ser perdida em consequência da desnaturação proteica devido a

alteração entre os grupos catiônicos e aniônicos da superfície da proteína (ARSALAN; YOUNUS, 2018; KURIBAYASHI *et al.*, 2021). Além de que, a maioria das enzimas tem grupos  $-NH_2$  (amino) e  $-COOH$  (carboxila) e cada enzima tem um ponto isoelétrico específico (HAKKOYMAZ; MAZI, 2020).

A invertase pode ser produzida por diferentes microrganismos e em diferentes partes da célula, podendo ser intracelular ou extracelular apresentando diferentes pH ótimos; o que é vantajoso para as aplicações industriais da enzima (ALMEIDA *et al.* 2018; (BARBOSA *et al.*, 2018) e por mais que a invertase bacteriana seja ativa em uma ampla faixa de pH, sua atividade torna-se mais elevada quando se encontra em pH ótimo (YOON *et al.*, 2007). Apresentando resultados semelhantes com o encontrado nesta pesquisa, Kaur e Sharma (2005), caracterizaram uma invertase produzida por *Streptomyces* sp. com atividade máxima em pH 5,0, com queda da atividade a partir do pH 6,0 onde se manteve estável até pH 10. A invertase produzida pela linhagem de *B. macerans* EG-6 foi estudada e apresentou pH ideal em 5,0 (PARK *et al.*, 2001). Omori *et al.* (2010) encontraram valor de pH ótimo em torno de 5,7 para invertase produzida por *Bifidobacterium adolescentis* G expressa em *E. coli*. Diversos estudos mostram que invertases bacterianas apresentam o pH ideal por volta de 6,0 e 6,5, como no estudo de Jędrzejczak-Krzepkow *et al.* (2011) que encontraram para a invertase de *B. longum* KN29.1 um pH ideal de 6,0 e Liu *et al.* (2021) que encontraram atividade máxima de uma invertase extraída de *M. trichothecenolyticum* Dz13 em 6,5, mostrando mais uma vez a capacidade que a invertase bacteriana tem de ser ativa em diferentes pH. Outros autores também encontraram atividade ótima da invertase próximo aos valores de pH 6,0 como no estudo conduzido por Du *et al.* (2013) para invertases de *E. coli* XL1-blue, indicando que o melhor pH da enzima foi encontrado em 6,0 e Chen *et al.* (2014) para invertase de *L. plantarum* que também determinaram ser 6,0 o pH ideal para atividade da enzima

### 5.3.3. Estabilidade térmica da invertase

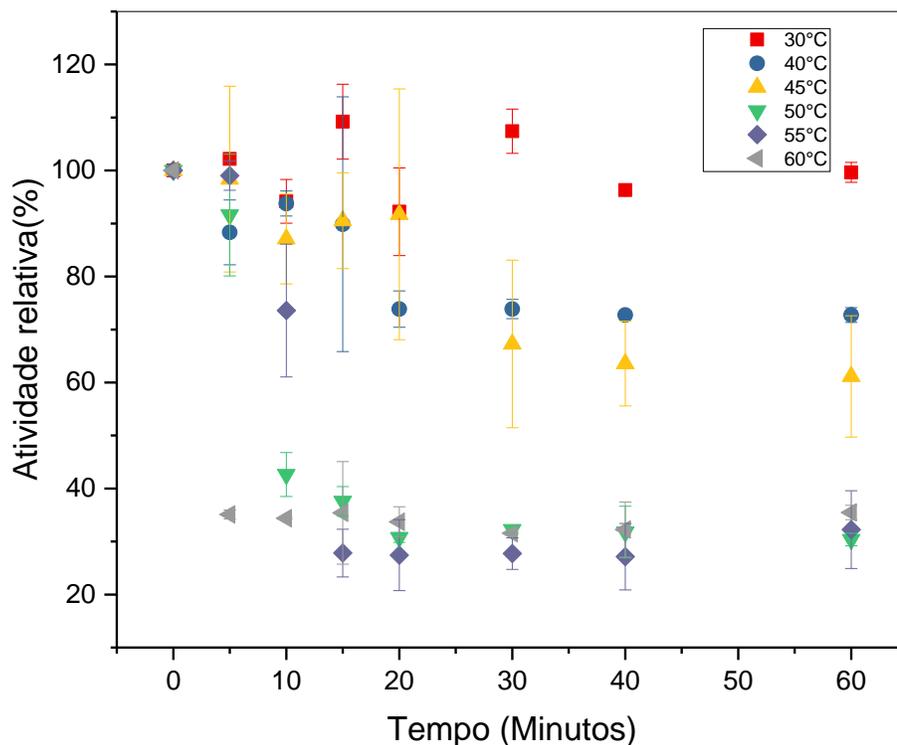
Na Figura 7 são apresentados os resultados para a estabilidade térmica de invertase de *B. tequilensis* PP6 em temperaturas que variaram de 30 °C a 60 °C. A invertase

apresentou estabilidade de 99,64% após 60 minutos de incubação a 30°C e apresentou queda na atividade relativa somente após 24h, em apresentou 39,64 % de sua atividade. A invertase reteve 72,73% da sua atividade em temperatura de 40 °C após 60 minutos de reação e a 24h apresentou, portanto, 18,4% de atividade. Na temperatura de 45 °C a invertase reteve 91% da sua atividade até 20 minutos de incubação sendo que, após 1h de reação apresentou 61,13% de atividade e após 24h a atividade enzimática reduziu para 20,44%. Na temperatura de 50 °C a invertase reteve 30,7 % da sua atividade após 20 minutos e permaneceu nessa faixa até 60 minutos de reação. Já para a temperatura de 55 °C, foi observada uma queda de mais de 50% na atividade inicial logo após 10 minutos de reação. Na temperatura de incubação mais elevada, 60 °C, a enzima apresentou 35% de atividade após 5 minutos de incubação, permanecendo nessa faixa de atividade ainda por 60 minutos. Esses resultados corroboram com os encontrados na literatura, levando em consideração que a temperatura aumenta a velocidade de reação somente enquanto a enzima é capaz de manter sua conformação nativa, o que ocorre para a maioria das enzimas em até 55 °C (MARZOCO; TORRES, 2017).

É perceptível que à medida que a temperatura aumenta a estrutura catalítica da invertase se altera, fator que pode estar diretamente relacionado com as ligações não covalentes responsáveis pela preservação da estrutura da enzima. Essas ligações envolvem forças de Van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e, que quando submetidas a altas temperaturas são interrompidas, desnaturando as proteínas (AVILA *et al.*, 2021).

Mesmo após 100 minutos de incubação a invertase apresentou atividade para todas as temperaturas testadas sendo que nas temperaturas de 30 °C, 40 °C, 45°C, onde as enzimas foram incubadas durante 24h os resultados foram, respectivamente, 39,6%, 18,47% e 20, 44%.

**Figura 7:** Estabilidade térmica da invertase



Condições do experimento: Atividade de invertase avaliada a 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos nas temperaturas de 30°C a 60°C em tampão McIlvaine pH 5,0 por 5 minutos.

Interessante notar que a invertase de *B. tequilensis* PP6 é mais estável que algumas invertases produzidas por bactérias. A invertase de *B. adolescentis* G1 foi estável até a temperatura de 50°C e totalmente inativada a 60°C (OMORI *et al.*, 2010). Lincoln e More (2018) observaram que a invertase de *B. subtilis* apresentou termo estabilidade a 40 °C (81% de atividade após 6 horas de incubação).

Outras espécies de bactérias podem produzir invertases ainda mais estáveis, como a *T. neapolitana* que mesmo em altas temperaturas (80-85°C) a invertase reteve ainda 50% de sua atividade após 6 horas de incubação (DIPASQUALI *et al.*, 2009). No entanto, a invertase estudada por Yamamoto *et al.* (1986), apresentou comportamento similar a invertase de *B. tequilensis* PP6, quando submetida a 55 °C, apresentando 37% de sua atividade após 15 minutos de incubação. A invertase de *B. tequilensis* PP6 foi, no entanto,

mais estável que a invertase de *Z. mobilis* que reduziu em 50% após 20 min, a 40 °C (VALLEJO-BECERRA et al., 2008), sendo que a invertase aqui caracterizada manteve 73% de sua atividade nas mesmas condições.

Por mais que a faixa de estabilidade térmica da invertase varie amplamente na literatura, enzimas termoestáveis são preferidas para aplicações industriais (VAVITSAS et al., 2022). Portanto, a invertase do *B. tequilensis* PP6 é um potencial enzima industrial, considerando sua temperatura ótima e estabilidade térmica.

#### 5.3.4. Estabilidade da invertase frente ao pH de incubação

A invertase da cepa *B. tequilensis* PP6 demonstrou estabilidade em uma ampla faixa de pH (3 a 8), retendo atividade entre 68,2% e 61,75% após 24 horas de incubação. Nota-se uma estabilidade máxima de 100% em pH 5,5 a 6,5, enquanto o pH 5,0 exibiu a menor estabilidade (31,45%), possivelmente influenciada por fatores como íons metálicos, cofatores e a condição bruta da enzima.

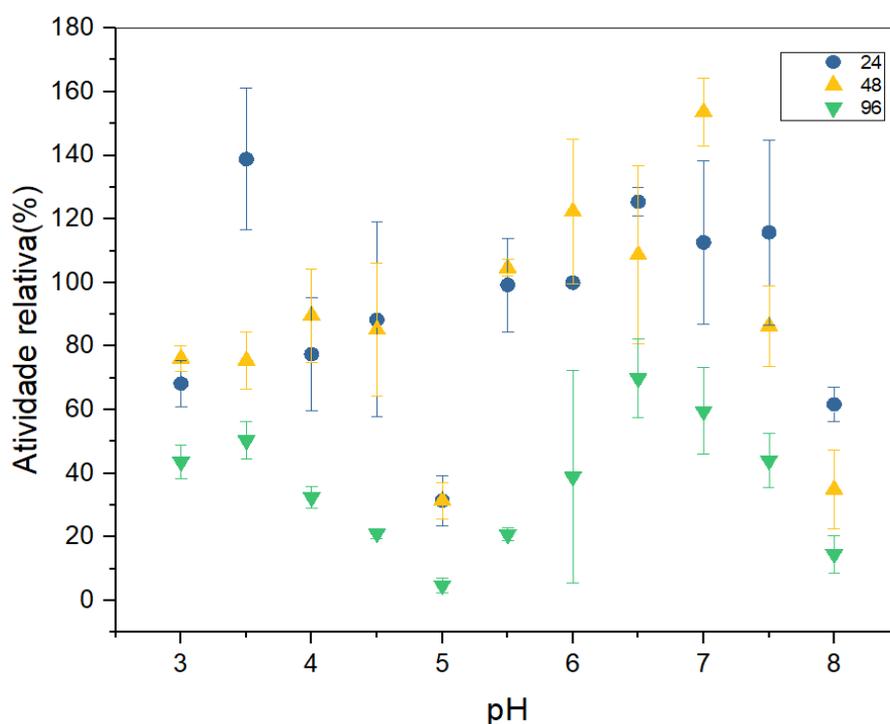
Em pH 3,5 e 7,5, ocorreu um pico de atividade de 138% e 115,08%, respectivamente, após 24 horas, indicando influência do estado de ionização da enzima na estabilização da conformação proteica (NELSON; COX, 2014). Comportamento semelhante foi observado em pH 4,0, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,0 após 48 horas de incubação, com valores de 89,6%, 104%, 122%, 122,3% e 153%, respectivamente.

Em condições alcalinas (pH 8,0), a enzima reteve 61,75% de atividade após 24 horas, diminuindo para 35,03% em 48 horas e atingindo 14,63% em 96 horas. Destaca-se uma maior estabilidade na faixa de pH 6,0 a 7,5, com o pH 6,5 apresentando a máxima estabilidade.

Os resultados assemelham-se aos da invertase de *B. subtilis*, que manteve 80% de atividade entre os pH's 6,0 e 7,0 em 6 horas (LINCOLN et al., 2018). Benattouche *et al.* (2016) observaram que uma invertase bacteriana manteve 100% de atividade em 24 horas em pH 6 a 7, mas perdeu cerca de 56% em pH 8. Essas características da invertase de *B. tequilensis* PP6 são promissoras para aplicações industriais devido à sua atividade também

em pH neutro e estabilidade para armazenamento prolongado (Du *et al.*, 2013). Na Figura 8 são apresentados os resultados para a estabilidade em pH de invertase e por *B. tequilensis* PP6. A enzima foi avaliada de acordo com a atividade enzimática, para uma faixa de pH compreendida entre 3,0 e 8,0 após a incubação de 24, 48 e 96 horas a 10 °C.

**Figura 8:** Estabilidade frente ao pH de incubação da invertase produzida por *B. tequilensis* PP6.



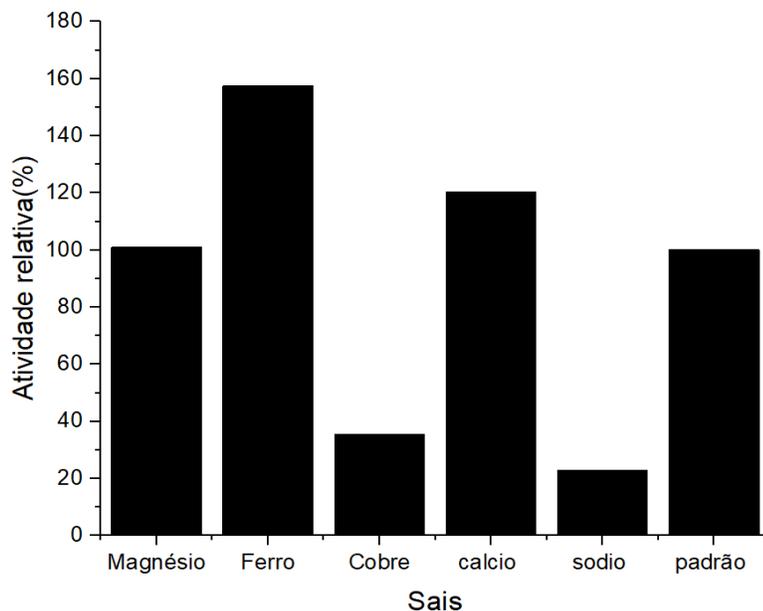
Condições do experimento: Atividade de invertase avaliada a 24, 48 e 96 horas nos pH variando de 3,0 a 8,0 ( $3,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$ , com  $\Delta = 0,5$ ) em 50°C por 5 min.

### 5.3.5. Efeito de íons metálicos sob a atividade de invertase

O efeito de diferentes íons metálicos (magnésio, ferro, cobre, cálcio e sódio) sobre a atividade da invertase de *B. tequilensis* PP6 foi analisado na concentração de 5 mM por pré-

incubação da enzima com os íons (Figura 9). O controle sem a adição de íons metálicos ao meio reacional foi expresso como 100%.

**Figura 9:** Efeito de diferentes íons sobre a atividade da invertase produzida por *B. tequilensis* PP6.



Condições do experimento: Atividade de invertase realizada com a presença de 5 mM dos íons de Mg, Fe, Cu, Ca e NaCl no meio reacional pH 5,0 a 50°C por 5 minutos.

A adição de sal pode afetar o sítio ativo nos resíduos de aminoácidos e na superfície externa da enzima, causando assim distorções estruturais na enzima ou alterações de carga nos aminoácidos catalíticos (EL-GHONEMY *et al.*, 2023). A atividade da invertase sem a presença dos sais foi de 3,71 U/mL, correspondendo a 100% de atividade. Neste estudo, a maior inibição foi observada com a presença do sódio que correspondeu apenas a 22,85% em relação ao controle. A adição de cobre ao meio reacional, correspondeu a uma atividade de 35,37% (1,31 U/mL) comparada ao controle. A adição de ferro ao meio reacional aumentou a atividade em 156,99 (5,83 U/mL). O ferro também já se comportou

anteriormente como um estimulador da atividade enzimática de invertases bacterianas como no estudo de Liu *et al.* (2021), em que a presença de íons de ferro aumentaram a atividade da enzima para 169,5% em relação ao controle. Isto indica que o ferro é capaz de realizar alterações na organização molecular da enzima estimulando a biocatálise (SINGH *et al.*, 2017).

Atividades intermediárias foram encontradas com a presença do magnésio e cálcio. Os dois sais também estimularam a atividade enzimática, e quando comparadas a amostra controle corresponderam a, respectivamente 100,8% e 120,35%, o que indica que o efeito desses íons pode ser importante na utilização de matérias-primas com alto teor de sal (RUBIO; ROSA.,2022). A presença do cálcio pode influenciar a remoção de inibidores enzimáticos e favorecer a manutenção do substrato no sítio ativo da enzima de forma mais eficiente, além de conferir proteção térmica em altas temperaturas. Outro fator que pode explicar o aumento da atividade da invertase na presença do cálcio é força iônica exercida sobre a enzima, uma vez que a esta força é responsável pela estabilidade coloidal das proteínas (EL-GHONEMY *et al.*, 2005; OYEDEJI *et al.*, 2017).

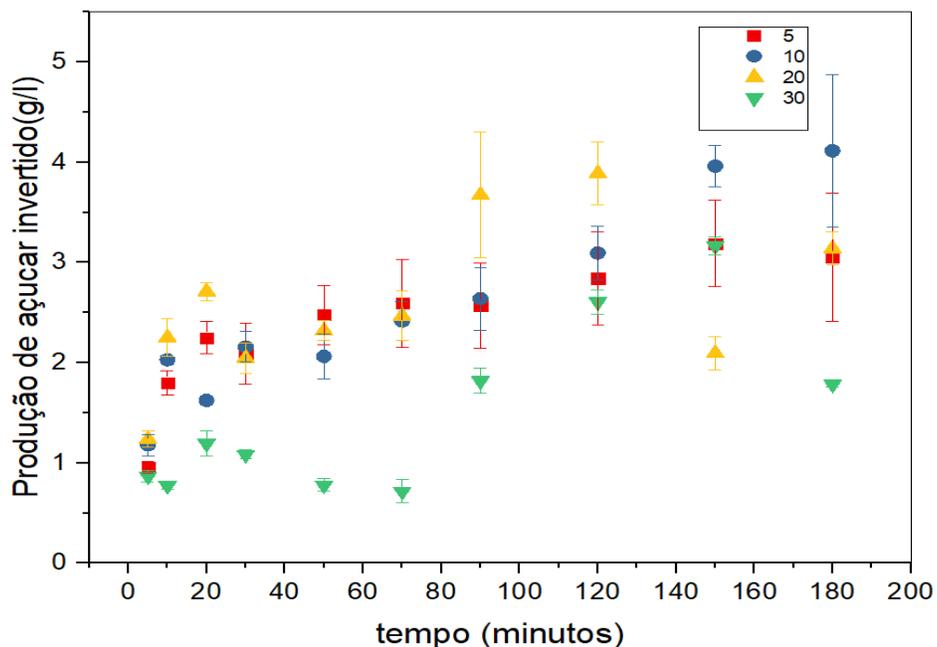
O cobre parece ser um inibidor comum da atividade de invertase bacteriana (LINCOLN *et al.*, 2018; YOON *et al.*, 2007; WARCHOL *et al.*,2002; DISPASQUALI *et al.*,2009). Essa diminuição da atividade pode ser devido às reações de oxidação-redução catalisadas pelos íons de cobre sob os resíduos de cisteína das proteínas para formar pontes dissulfeto intramoleculares ou ácido sulfênico, causando alterações estruturais e funcionais. A redução da atividade pelo íon de cobre também pode indicar a presença de grupos tiol ou resíduos de histidina, onde a ação do cobre pode desestabilizar o dobramento da conformação da enzima ou levar à formação de interação química em posições irregulares dentro da proteína (DE LOS SANTOS *et al.*, 2016). Sais que favoreceram a atividade enzimática podem estar envolvidos na manutenção do substrato em uma posição vantajosa dentro do sítio ativo da enzima, possibilitando a realização de uma reação adequada, além de que também pode favorecer remoção de outros compostos inibidores da atividade enzimática e proporcionarem proteção da enzima contra a desnaturação térmica (OYEDEJI *et al.*, 2017).

#### 5.4. Produção de açúcar invertido

A hidrólise da sacarose foi realizada na concentração inicial de 5–30% (m/v), 50 °C e pH 5,0. Na menor concentração de sacarose analisada (5%) as reações de hidrólise realizadas pela invertase do *B. tequilensis* PP6 atingiram a maior produção de açúcares redutores de 3,18 g/L após 150 minutos de reação. Ao aumentar a sacarose em até 10%, a produção máxima de açúcar redutor foi observada após 180 min de reação (4,11 g/L) (Figura 10). Observando a capacidade da invertase de produzir açúcares redutores em maiores concentrações de sacarose (20% e 30%) obteve-se a maior produção em 120 minutos (3,88 g/L) e 150 minutos (3,16 g/L) para as duas concentrações testadas respectivamente, indicando ser 10% a concentração mais vantajosa de sacarose para produção de açúcares redutores pela invertase em estudo. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que grandes quantidades de sacarose podem bloquear a produção do açúcar invertido, pois ligações de hidrogênio se formam entre as moléculas de sacarose causando um dobramento da molécula e impedindo a ação da invertase, geralmente as ligações começam a ser formar em concentrações acima de 22,3% (ZHOU *et al.*, 2016; KERAMATE *et al.*, 2015).

O principal produto da hidrólise da sacarose é o açúcar invertido ou xarope de alto teor de frutose, utilizado pelas indústrias alimentícias por ser mais doce que a sacarose e por possuir alta solubilidade e evitar a cristalização de produtos de confeitaria e panificação (VITOLLO, 2021). Diante disso, a invertase de *B. tequilensis* PP6 apresenta grande potencial de aplicação industrial.

**Figura 10:** Produção de açúcar invertido pelo *B. tequilensis* PP6.



Fonte: Autor

Invertases quando submetidas a concentrações de sacarose acima de 10% podem apresentar atividade de transfrutossilação e produzir fruto-oligossacarídeos (BARROS *et al.*,2020). Sendo assim, o potencial de produção de frutose transfrutossilada pela invertase de *B. tequilensis* PP6 também foi observado (Figura 11).

A produção máxima de frutose transfrutossilada foi observada na concentração de sacarose a 20% (14,72 g/L) após 90 minutos de reação. Valor semelhante também foi observado na concentração de 30% no mesmo intervalo de tempo (14,60g/L). Na menor concentração testada o maior valor observado foi de 0,77g/L após 10 minutos de reação e após 70 minutos não houve mais produção, o mesmo ocorreu na concentração de 10% após 90 minutos.

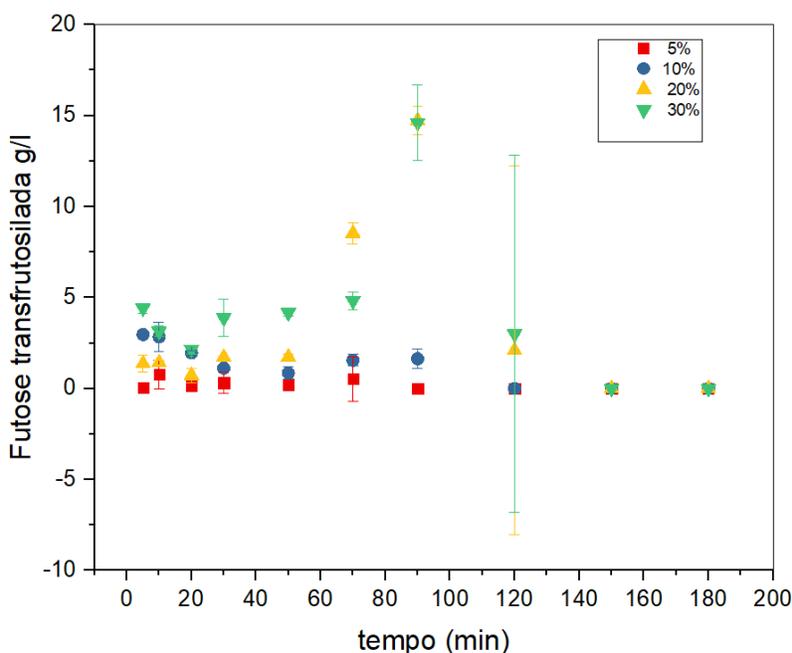
Neste caso, observa-se que o aumento gradual da concentração de açúcar proporcionou maior produção de frutose transfrutossilada. Valores superiores de concentração de açúcar para síntese de FOS pela invertase foram relatados por Khandekar *et al.* (2014). Os autores analisaram a produção de FOS por *S. cerevisiae*, concluindo que a produção ocorreu em concentrações de sacarose acima de 200 g/L e que o pico de produção

aconteceu quando quantidade de sacarose foi de 525 g/L, por volta de 2 a 3 horas de reação, sendo possível produzir 10% de FOS.

Apesar de poucos relatos na literatura da produção de FOS por invertase bacterianas com atividade de transfrutossilação, um estudo de Hernalsteens e Maugeri (2008) identificou uma invertase de *Cryptococcus* sp. (LEB-V2) com atividade de frutossiltransferase capaz de produzir fruto-oligossacarídeos tendo sacarose a 50% como substrato da reação. Nesta pesquisa a produção máxima de FOS foi de 170 g/l após 48 horas de reação.

Fruto-oligossacarídeos é um grupo de carboidratos solúveis e indigeríveis com atividade prebiótica, pois estimulam o crescimento de microrganismos benéficos no trato gastrointestinal humano (BRADHA *et al.*, 2022). O FOS é um produto de grande interesse industrial, pois podem ser potenciais ativadores do sistema imunológico e auxiliam na redução dos níveis de colesterol e triacilgliceróis e melhoram a absorção de cálcio e magnésio pelo intestino, podem ainda ser aplicados na produção de adoçantes não cariogênicos (DE LA ROSA *et al.*, 2019).

**Figura 11.** Produção de Frutose transfrutossilada a partir da invertase de *B.tequilensis* PP6



Fonte: Autor

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma nova linhagem de *Bacillus* (*B. tequilensis* PP6), com poucos relatos em literatura, foi utilizada para produção de invertase onde observou-se que o *B. tequilensis* PP6 foi capaz de produzir a enzima em todos eles, sendo a maior atividade encontrada no meio 2 (3,60 U). Três açúcares diferentes também foram testados como fonte de carbono, sacarose P.A, açúcar mascavo e açúcar demerara, sendo o açúcar demerara foi a fonte de carbono mais favorável (5,53 U/ml) para produção da enzima, na concentração de 3,0%. O estudo das características bioquímicas analisadas sugere que a enzima apresenta atividade aumentada em pH 5,0 e 55°C, valores comumente encontrados para outras invertases bacterianas. A enzima foi estável nas temperaturas 30°C, 40°C e 45°C por 60 minutos e nos pHs de 3,0 a 8,0 por 24 horas.

Ao analisar a influência de íons foi possível observar resposta positiva na presença do ferro e magnésio, já a presença do cobre e cálcio causaram queda na atividade da invertase. O estudo das características químicas da invertase de *B. tequilensis* PP6 indica o alto potencial de aplicação na indústria de alimentos visto que o dois açúcares testados (demerara e mascavo) são mais baratos que a sacarose e os meios de produção testados são simples e de fácil acesso, possibilitando a produção da enzima em larga escala. Outra característica da invertase produzida é sua capacidade de produzir fruto-oligossacarídeos, podendo ser considerada umas das poucas invertases bacterianas com capacidade transfrutossilante avaliada.

## REFERÊNCIAS

AASIM, M.; KHAN, M. H.; BIBI, N. S.; FERNANDEZ-LAHORE, M. Understanding the interaction of proteins to ion exchange chromatographic supports: A surface energetics approach. **Biotechnology Progress**, Malakand, v. 38, n. 2, p. 1-11, jan. 2022.

AFOLABI, F. T.; ADETAYO, O. O. Isolation and characterisation of alpha-amylase producing yeast from different fermented foods and dairy products. **World News of Natural Sciences**, Ibadan, v. 44, p. 89-110, jul. 2022.

AFTAB, A.; KHAN, Z, U.; ALI, Production, kinetics and immobilization of microbial invertases for some commercial applications-a review. **Int. J. Biol. Biotech**, Laore, v. 18, n. 2, p. 377-388, 2021.

AHMED, I.; ZIA, M.A.; HUSSAIN, M.A.; AKRAM, Z.; NAVEED, M.T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peels for induced production of pectinase by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **J. Radiat.** V.2, n. 9, p. 148-154, apr. 2016.

AHMED, S, A. Invertase production by *Bacillus macerans* immobilized on calcium alginate beads. **J Appl Sci Res**, London, v. 4, n. 12, p. 1777-1781, apr.2008.

ALBERTO, F.; BIGNON, C.; SULZENBACHER, G.; HENRISSAT, B.; CZJZEK, M. The three-dimensional structure of invertase ( $\beta$ -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n.18, p.18903-18910, apr.2004.

ALI, A.M; BAVISETTY, S.C. B. Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: a comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1498-1517, nov. 2020.

ALMEIDA, M, N.; GUIMARAES, V, M.; FALKOSKI, D, L.; DE CAMARGO, B, R.; FONTES-SANTANA, G, C.; MAITAN ALFENAS, G, P.; DE REZENDE, S, T. Purification and characterization of an invertase and a transfructosylase from *Aspergillus terreus*. **Journal of Food Biochemistry**, Nova Jersey, v. 42, n. 5, mar. 2018.

AL-RAWI, D, F.; BUNIYA, H, K.; AL-RAWI, A, S. The Optimum Conditions for the Production of Invertase by Local Isolate *Escherichia coli* from the Soil and Grown on Different Carbon Source Substrate. **Iraqi Journal of Science and Technology**, Anbar, v. 11, n. 3, p. 33-38, feb. 2020.

ÁLVARO-BENITO, M.; POLO, A.; GONZÁLEZ, B.; FERNÁNDEZ-LOBATO, M.; SANZ-APARICIO, J. Structural and kinetic analysis of *Schanniomyces occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding. **Journal of Biological Chemistry**, Boston, v. 285, n. 18, p. 13930-13941, apr.2010.

AMARTELY, H.; AVRAHAM, O.; FRIEDLER, A.; LIVNAH, O.; LEBENDIKER, M. Coupling Multi Angle Light Scattering to Ion Exchange chromatography (IEX-MALS) for protein characterization. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, may.2018.

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

ANTUNES, R. S.; LOPES, F. M.; DE OLIVEIRA BRITO, A.; GARCIA, L. F.; DE SOUSA, D. F.; DE SOUZA GIL, E. Enzimas vegetais: Extração e aplicações biotecnológicas. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 3, p. 181-198, abr. 2017.

ARBIGE, M. V.; SHETTY, J. K.; CHOTANI, G. K. Industrial enzymology: the next chapter. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1355-1366, dez.2019.

ARORA,S.;SAXENA, V.; AYYAR, B. V.; VIJAYALAKSHMI. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. **Methods**, Dublin, v.116, p. 84-94, mar. 2017.

ARSALAN, A.; YOUNUS, H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 1833-1847, oct. 2018.

ASLAM, A.; IKRAM-UL-HAQ.; ALI, S. Purification and characterization of two invertases from mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Pak. J. Bot.**, v. 45, n.1, p. 285-291, mar.2013.

ÁVILA, T, L.; TORALLES, R, P.; JANSEN, E, T.; FERREIRA, M, V.; KUHN, C, R.; RUIZ, W, A. Extração, purificação e caracterização de invertase de *Candida guilliermondii* isolada de resíduos sólidos de pêssego. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 44, feb.2022.

AWAD, G. E.; AMER, H.; EL-GAMMAL, E. W.; HELMY, W. A.; ESAWY, M. A., ELNASHAR, M. M. Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 2, p. 740-746, apr. 2013.

AZIZ, S.; JALAL, F.; NAWAZ, M., NIAZ, B.; ALI SHAH, F.; HAFEEZ-UR-RAHMAN MEMON, M.; RAJOKA, M. I. Hyperproduction and thermal characterization of a novel invertase from a double mutant derivative of *Kluyveromyces marxianus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 4, p. 465-473, dec. 2011.

BANDAL, J. N.; TILE, V. A.; SAYYED, R. Z.; JADHAV, H. P.; AZELEE, N. W.; DANISH, S.; DATTA, R. Statistical based bioprocess design for improved production of amylase from Halophilic *Bacillus sp.* H7 isolated from marine water. **Molecules**, v. 26, n. 10, p. 2833, may.2021.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization–

purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 5, p. 435-456, set. 2015.

BARBOSA, P. M.; DE MORAIS, T. P.; ANDRADE-SILVA, C. A.; DA SILVA-SANTOS, F. R.; GARCIA, N. F.; FONSECA, G.; LEITE, R. S.; DA PAZ, F. F. Biochemical characterization and evaluation of invertases produced from *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Rhodotorula mucilaginosa* for the production of fructo-oligosaccharides. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 6, p. 506-513, apr. 2018.

BARROS, R.; PEREIRA, U.; ANDRADE, J.; BARBOSA, P.; VASCONCELOS, S.; NOGUEIRA, J.; MURUGAN.R.; NARAIN, N. Intracellular and extracellular enzyme patterns during biosynthesis of short chain fructooligosaccharides from *Aspergillus spp.* strains: Profile, biological structure correlation and chemometric characterizations. **Bioresource Technology Reports**.v.11, n, p.100546, sep. 2020.

BASTOS, L. Produção de invertases a partir de microrganismos isolados de frutos amazônicos. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) –Universidade Federal do Tocantins. Palmas, p. 101. 2022.

BEDZO, O.K.; TROLLOPE, K.; GOTTUMUKKALA, L. D; COETZEE, G.; GORGENS, J. F. Amberlite IRA 900 versus calcium alginate in immobilization of a novel, engineered  $\beta$ -fructofuranosidase for short-chain fructo-oligosaccharide synthesis from sucrose. **Biotechnology progress**, v. 35, n. 3, feb. 2019.

BELORKAR, S. A.; GUPTA, A. K.; RAI, V. Screening of microbial isolates for extracellular fructosyltransferase production. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 10, p. 730-735, mar. 2015.

BENATTOUCHE, Z.; RAHO, G. B.; SAHNOUNI, F.; BOUHADI, D. PTIMIZATION, purification and characterization of invertase by *Pseudomonas sp*, isolated from the cane molasse. **International Journal of Biosciences**. v. 9, n.1, p. 349-356, jul. 2016.

BENTO, H, B.; CARVALHO, A, K.; REIS, C, E, R.; DE CASTRO, H, F. Microbial biodiesel production: From sucrose-based carbon sources to alkyl esters via enzymatic

transesterification. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 121, p. 349-356, jan. 2019.

BERGARECHE, D.; ROYO, J; MUÑIZ, L. M.; HUEROS, G. Cell wall invertase activity regulates the expression of the transfer cell-specific transcription factor ZmMRP-1. **Planta**, v. 247, p. 429-442, oct. 2018.

BETTANI, S. R.; LAGO, C. E.; FARIA, D. A. M.; BORGES, M. T. M. R.; VERRUMABERNARDI, M. R. Avaliação físico-química e sensorial de açúcares orgânicos e orgânicos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 16, n. 2, p. 155-162, mar. 2014.

BEZERRA, R. S.; LINS, E. J.; ALENCAR, R. B.; PAIVA, P. M.; CHAVES, M. E.; COELHO, L. C.; CARVALHO JR, L. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1829-1834, jun. 2005.

BHADRA, S.; CHETTRI, D.; VERMA, A. K. Microbes in fructooligosaccharides production. **Bioresource Technology Reports**, p. 101159, dez. 2022.

BHALLA, T. C.; THAKUR, N.; THAKUR, N. Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructooligosaccharides. **LWT**, v. 77, p. 178-185, apr. 2017.

BINOD, P.; PAPAMICHAEL, E.; VARHANI, S; SINDHU, Raveendran. Industrial Enzymes for Food Applications. In: **Green Bio-processes**. Singapore: Springer, 2019. p.1-8

BOSHAGH, F. M. Methods of carbohydrates in dark fermentative hydrogen production-A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 47, p. 24028-24050, jul. 2021.

BROCARD-MASSON, C.; BONNIN, I.; DUMAS, B.; DUMAS, B. "Process for preparing genetically transformed yeasts capable of producing a molecule of interest at a high titre". N° 9,994,888, may,09, 2019.

BROLI, G.; NYGAARD, H.; SLETTA, H.; SANDNES, K.; AASEN, I. M. Farmed salmon rest raw materials as a source of peptones for industrial fermentation média. **Process Biochemistry**, v. 102, p. 157-164, mar. 2021.

BURGESS, R. R. A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. **Protein expression and purification**, v. 150, p. 81-85, out. 2018.

CABRAL, B. Hidrólise de sacarose por invertase imobilizada em duolite A-568 por adsorção e ligação cruzada. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 143. 2012.

CAMARGO, S. G.; ALMEIDA, J.; SANCHES, A. C. C.; MALLER, A. Activity of celulase, invertase, pectinase and xylanase enzymes in wine production-a systematic literature review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 19296-19317, set. 2021.

CANLI, O.; ERDAL, S.; TASKIN, M., KURBANOGLU, E. Effects of extremely low magnetic field on the production of invertase by *Rhodotorula glutinis*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, n. 1, p. 35-39, may. 2011.

CAO, X.Z.; JIN, Z.Y.; WANG, X.; CHEN, F. A Novel Cyclodextrin Glycosyltransferase from an Alkalophilic *Bacillus Species*: Purification and Characterization. **Food Res. Int.** v. 38, p. 309-314, apr. 2005.

CASTIGLIONI, G. L.; COSTA, J. A. V.; ALEGRE, R. M. Estudo da produção de lipase por *Burkholderia cepacia*. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v.23, p. 637-644, ago. 2018.

CETIN, K.; PERÇIN, I.; DENIZLI, F.; DENIZLI, A. Tentacle-type immobilized metal affinity cryogel for invertase purification from *Saccharomyces cerevisiae*. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 7, p. 1431-1439, nov. 2017.

CHANG, L. S.; KARIM, R.; MOHAMMED, A. S.; GHAZALI, H. M. Characterization of enzyme-liquefied soursop (*Annona muricata* L.) puree. **LWT - Food Science and Technology**, v. 94, p. 40–49, aug. 2018.

CHEN, C.; DENG, J.; LV, X.; LI, J.; DU, G.; LI, H.; LIU, L. Biocatalytic synthesis of lactosucrose using a recombinant thermostable  $\beta$ -fructofuranosidase from *Arthrobacter sp.* 10138. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 416-427, mar. 2020.

CHEN, Z.; SHEN, Y.; WANG, R., LI, S.; JIA, Y. Expression and characterization of a protease-resistant  $\beta$ -d-fructofuranosidase BbFFase9 gene suitable for preparing invert sugars from soybean meal. **Heliyon**, v. 9, n. 9, set. 2023.

CHIANG, M. T.; CHANG, S. Y.; WHANG, C. W. Capillary electrophoresis and electrochromatography-Chiral analysis of baclofen by  $\alpha$ -cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. **Electrophoresis-An International Journal**, v. 22, n. 1, p. 123-127, jan. 2001.

CHIANG, M.T.; WHANG, C.W. Tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (III)-based electrochemiluminescence detector with indium/tin oxide working electrode for capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 934, n. 1-2, p. 59-66, nov. 2001.

CHO, Y. J.; YUN, J. W. Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1325-1331, jun. 2002.

CHOUKADE, R.; KANGO, N. Production, properties, and applications of fructosyltransferase: a current appraisal. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 41, n. 8, p. 1178-1193, may. 2021.

COCA, B. Otimização da produção e caracterização de  $\alpha$ -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) –Universidade Federal Fluminense. Volta Redonda, P. 103. 2019.

CUERVO-FERNANDEZ, R.; OTTONI, C. A.; DA SILVA, E. S.; MATSUBARA, R. M. S., CARTER, J. M.; MAGOSSO, L. R.; MAIORANO, A. E. Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 75, p. 87-93, mar. 2007.

CUNHA, J.S., OTTONI, C.A.; MORALES, S.A.V.; SILVA, E.S.; MAIORANO, A.E.; PERNA, R.F. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructo-oligosaccharides production. *Braz J Chem Eng.* v. 36, p. 657-658, feb. 2017.

DA SILVA, R.N.; DE ANDRADE, M, L.F.; FINKLER, C, L, L. Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 for cellulase production. **Biotechnology Reports**, v. 29, p. e00599, mar. 2021.

DE ALMEIDA, Alex F.; DO AMARAL, Claudia A. **Frutos amazônicos: biotecnologia e sustentabilidade**. Palmas: EDUFT, 2020.

DE ALMEIDA, Urgel L.; **Biotecnologia Industrial: Processos fermentados e enzimáticos**. 2. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2019.

DE ALMEIDA, M.N.; FALKOSKI, D.L.; GUIMARÃES, V.M.; RAMOS, H.J.D.O., VISSER, E.M.; MAITAN-ALFENAS, G.P.; DE REZENDE, S.T.; Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. **Bioresource technology**, v. 143, p. 413-422, sep. 2013.

DE LA ROSA, O.; FLORES-GALLEGOS, A. C.; MUÑÍZ-MARQUEZ, D.; NOBRE, C.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Fructooligosaccharides production from agro-wastes as alternative low-cost source. **Trends in Food Science & Technology**, 91, 139-146, sep. 2019.

DE LOS SANTOS, A. I. P.; CAYETANO-CRUZ, M.; GUTIÉRREZ-ANTÓN, M.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.; FARRÉS, A.; HIDALGO-LARA, M. E. Improvement of catalytical properties of two invertases highly

tolerant to sucrose after expression in *Pichia pastoris*. Effect of glycosylation on enzyme properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 83, p. 48-56, nov. 2016.

DE OLIVEIRA, R. L.; DOS SANTOS, V. L. V.; DA SILVA, M. F.; PORTO, T. S. Kinetic/thermodynamic study of immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus tamarii* URM4634 in chitosan beads and application on invert sugar production in packed bed reactor. **Food Research International**, v. 137, p. 109730, nov. 2020.

DESTRO, T. M.; PRATES, D. D. F.; WATANABE, L. S.; GARCIA, S.; BIZ, G.; SPINOSA, W, A. Organic brown sugar and jaboticaba pulp influence on water kefir fermentation. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, p. e005619, jul. 2019.

DEUTSCHER, Murray P. Maintaining protein stability. In: HANS, R (Coord). **Methods in enzymology**. ed, New York : Academic Press, 1990.

DIAS, E. C.; DANTAS, G. C. B.; FARIAS, H. M.; DE SOUZA BRITO, A. F.; SILVA, C. T. A.; GERVÁSIO, D. K. L.; VAZ, M. R. F. Análise da produção da enzima invertase a partir da fermentação em estado sólido utilizando substratos não convencionais. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 352-369, ago. 2018.

DINARVAND, M.; REZAEI, M.; FOROUGHI, M. Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *Brazilian journal of microbiology*, v. 48, p. 427-441, feb. 2017.

DIPASQUALE, L.; GAMBACORTA, A.; SICILIANO, R. A.; MAZZEO, M. F.; LAMA, L. Purification and biochemical characterization of a native invertase from the hydrogen-producing *Thermotoga neapolitana* (DSM 4359). **Extremophiles**, v. 13, p. 345-354, mar. 2009.

DOAN, C. T., TRAN, T. N., NGUYEN, T. T., TRAN, T. P. H., NGUYEN, V. B., TRAN, T. D.; WANG, S. L. Production of Sucrolytic Enzyme by *Bacillus licheniformis* by the Bioconversion of Pomelo Albedo as a Carbon Source. **Polymers**, v. 13, n. 12, p. 1959, may. 2021.

DONG, S. DONG, S.; JIANG, Z.; LIU, Z.; CHEN, L.; ZHANG, Q., TIAN, Y.; CAO, C. Purification of low-abundance lysozyme in egg white via free-flow electrophoresis with gel-filtration chromatography. **Electrophoresis**, v. 41, n. 17, p. 1529–1538, jun. 2020.

DONG-YEON, D.L.; GALERA-LAPORTA, L.; BIALECKA-FORNAL, M.; MOON, E.C.; SHEN, Z.; BRIGGS, S.P., SÜEL, G.M. Magnesium flux modulates ribosomes to increase bacterial survival. **Cell**, v. 177, n. 2, p. 352-360, mar. 2019.

DOS SANTOS, K. A.; FONTAN, R. D. C. I.; SANTOS, L. S.; DE CARVALHO BATISTA, I.; GANDOLFI, O. R. R.; DE SOUSA CASTRO, S.; BONOMO, R. C. F. Partitioning of amylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using aqueous two-phase systems. **Process biochemistry**, v. 94, p. 116-125, jul. 2020.

DU, L.; PANG, H.; WANG, Z., LU, J.; WEI, Y.; HUANG, R. Characterization of an invertase with pH tolerance and truncation of its N-terminal to shift optimum activity toward neutral pH. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p.62306, apr. 2013.

EL-GHONEMY, D. H.; ALI, T. H.; SELIM, M. S. Extracellular  $\beta$ -d-fructofuranosidase from a novel *Aspergillus* sp. DHE1 with high potential for biotechnological applications: Purification and biochemical characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 48, p. 102644, mar. 2023.

ERIKSSON, K.O. Hydrophobic interaction chromatography. In: *Biopharmaceutical Processing*. 1. ed. Elsevier, 2018. p. 401-408.

ESAWY, M. A.; KANSOH, A. L.; KHEIRALLA, Z. H.; AHMED, H. E.; KAHIL, T. A. K.; EL-HAMEED, E. K. Production and immobilization of halophilic invertase produced from honey isolate *Aspergillus niger* EM77 (KF774181). **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 3, n. 2, p. 36-45, jul.2014.

FARSANGE, E.; GUILLARME, D.; VEUTHEY, J. L. B. A.; LAUBER, M.; SCHAMUDLAVH, A.; FEKETE, S. Coupling non-denaturing chromatography to mass spectrometry for the characterization of monoclonal antibodies and related products. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 185, p. 113207, jun. 2020.

FASIM, A.; MORE, V. S.; MORE, S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current opinion in biotechnology**, v. 69, p. 68-76, jun.2021.

FEKETE, S.; BECK, A.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 113, p. 43-55, sep. 2015.

FEKETE, S.; SCHAPPLER, J.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. Current and future trends in UHPLC. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2-13, dec.2014.

FERNANDES, M.L.P.; JORGE, J.A.;GUIMARES,L,H,S.Characterization of an extracellular b-D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus niveus* during solid-state fermentation (SSF) of cassava husk. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. e12443, feb. 2018.

FISCHER, J.; LOPES, V.; SANTOS, E. F. Q.; FILHO, U.; CARDOSO, V. Second generation ethanol production using crude enzyme complex produced by fungi collected in Brazilian Cerrado (Brazilian Savanna). **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 487-492, sep. 2014.

FÜHR, Claudia. Valor nutricional, características fermentativas e microbiológicas da silagem de sorgo BRS 658 com o uso de aditivos. Dissertação (Mestrado em zootecnia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, p.67. 2020

GARRIDO, J, V; BISPO, D, F; SILVA, C, F. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase e otimização da produção enzimática. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, mai. 2018.

GAVRAILOV, S.; IVANOVA, V. Effects of nitrogen and carbon sources on the production of inulinase from strain *Bacillus sp.* SG113. **Acta Scientifica Naturalis**, v. 3, n. 1, p. 69-74, mar. 2016.

GAVRAILOV, S; IVANOVA, V. Isolation and characteristics of a thermophilic *Bacillus strain*, producer of inulinase. **Journal of BioScience e Biotechnology**, v 1.p. 83–94.2014.

GHAZI, I.; GARCIA-ARELLANO, H.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Purification and kinetic properties of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n.1,p. 204-211, jan. 2007.

GHORAI S.; BANIK S, P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE.; S, KHOWALA S.Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Res.** v 42, p. 577-587, jul. 2009.

GHOSH, Raja. **Principles of Bioseparations Engineering**. Singapore: World Scientific Publishing, 2006.

GIMENO-PÉREZ, M.; LINDE, D.; FERNÁNDEZ-ARROJO, L.; PLOU, F. J.; FERNÁNDEZ-LOBATO, M. Heterologous overproduction of  $\beta$ -fructofuranosidase from yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*, an enzyme producing prebiotic sugars. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 3459-3467, oct. 2015.

GINES, S. C. D.; MALDONADO, M. C.; VALDEZ, G. F. D. Purification and characterization of invertase from *Lactobacillus reuteri* CRL 1100. **Current Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 181, aug. 2000.

GINÉSY, M.; RUSANOVA-NAYDENOVA, D.; ROVA, U. Tuning of the Carbon-to-Nitrogen Ratio for the Production of L-Arginine by *Escherichia coli*. **Fermentation**, v. 3, n. 4, p. 60, oct. 2017.

GIRALDO, M. A.; GONÇALVES H, B.; FURRIEL, R. D. P. M.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of the co-purified invertase and  $\beta$ -glucosidase of a multifunctional extract from *Aspergillus terreus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 1501-1510,dec.2014.

GRATÃO, A. C. A.; BERTO, M. I.; SILVEIRA Jr., V. Reologia do açúcar líquido invertido: Influência da temperatura na viscosidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p.652–656, dez. 2004.

GU, Y.; XU, X.; WU, Y.; NIU, T.; LIU, Y.; LI, J.; LIU, L. Advances, and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications. **Metabolic engineering**, v. 50, p. 109-121, nov. 2018.

GUERRERO-URRUTIA, C.; VOLKE-SEPULVEDA, T.; FIGUEROA-MARTINEZ, F.; FAVELA-TORRES, E. Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. **Process Biochemistry**, v. 108, p. 169-175, set 2021.

HAKKOYMAZ, O; MAZI, H. An immobilized invertase enzyme for the selective determination of sucrose in fruit juices. **Analytical Biochemistry**, v. 611, p. 114000, dec. 2020.

HAN, S.; YE, T.; LENG, S.; PAN, L.; ZENG, W.; CHEN, G.; LIANG, Z. Purification and biochemical characteristics of a novel fructosyltransferase with a high FOS transfructosylation activity from *Aspergillus oryzae* S719. **Protein Expression and Purification**, v. 167, p. 105549, mar.2020.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Partial purification and characterization of extracellular fructofuranosidase with transfructosylating activity from *Candida sp.* **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 568-576, may.2010.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Properties of thermostable extracellular FOS-producing fructofuranosidase from *Cryptococcus sp.* **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 213-221, jul. 2008.

HOFFMANN, J, J.; HÖVELS, M.; KOSCIOW, K.; DEPPENMEIER, U. Synthesis of the alternative sweetener 5-ketofructose from sucrose by fructose dehydrogenase and invertase producing *Gluconobacter strains*. **Journal of biotechnology**, v. 307, p. 164-174, jan. 2020.

HORAK, I.; ENGELBRECHT, G.; VAN RENSBURG, P. J.; CLAASSENS, S. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. **Journal of Applied Microbiology, Potchefstroom**, v. 127, n. 2, p. 326-343, aug. 2019.

HUSSAIN, A.; RASHID, M. H.; PERVEEN, R.; ASHRAF, M. Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 188-194, mar.2009.

IVANOVA, V.; GAVRAILOV, S.; PASHKOULOVA, V. Purification of an exo-inulinase from *Bacillus Sp. SG7*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v.8, n.1, p. 685-691, aug. 2021.

JAYA, P.; SURESH, S.; ARYA, K.; SARKAR, A.; RAO, K. B. A Study on Marine bacterial invertase enzyme sourced from Bay of Bengal, West Bengal, Its Isolation and Optimization. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 13, n. 11, p. 5219-5223, mar. 2020.

JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA, M.; TKACZUK, K. L.; BIELECKI, S. Biosynthesis, purification and characterization of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* KN29. 1. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1963-1972, oct. 2011.

JIANG, H.; MA, Y.; CHI, Z.; LIU, G. L.; CHI, Z. M. Production, purification, and gene cloning of a  $\beta$ -fructofuranosidase with a high inulin-hydrolyzing activity produced by a novel yeast *Aureobasidium sp.* P6 isolated from a mangrove ecosystem. **Marine Biotechnology**, New York, v. 18, p. 500-510, june.2016.

JOHANSON, K. E.; WATT, T. J.; MCINTYRE, N. R.; THOMPSON, M. Purification and characterization of enzymes from yeast: An extended undergraduate laboratory sequence for large classes. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 41, n. 4, p. 251-261, apr.2013.

KARKAŞ, T.; ÖNAL, S. Characteristics of invertase partitioned in poly (ethylene glycol)/magnesium sulfate aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 142-150, jan.2012.

KAUR, M; TEOTIA, P. Isolation, characterization and strain improvement of soil bacteria *Bacillus subtilis* for invertase production. **Uttar Pradesh Journal of Zoology**, v. 42, n. 18, p. 97-104, sep. 2021.

KAUR, N.; SHARMA, A. D. Production, optimization and characterization of extracellular invertase by an *Actinomycete strain*. **J. Sci. Ind.**, v 64, p. 515-519, jul. 2005.

KAZEEM, M. O.; SHAH, U. K. M.; BAHARUDDIN, A. S. I. Enhanced cellulase production by a novel thermophilic *Bacillus licheniformis* 2D55: characterization and application in lignocellulosic saccharification. **Bio Resources**, v. 11, n. 2, p. 5404-5423, mar.2016.

KERAMAT, A.; KARGARI, A.; SOHRABI, M.; MIRSHEKAR, H.; SANAEEPUR, H. Kinetic model for invertase-induced sucrose hydrolysis: initial time lag. **Chem. Eng. Technol**, v. 40, n. 3, p. 529-536, aug.2017.

KESKIN GÜNDOĞDU, T.; DENİZ, I.; ÇALIŞKAN, G.; ŞAHİN, E. S., R.; AZBAN. Experimental design methods for bioengineering applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 368-388, nov. 2016.

KHAN, J. A.; PRIYA, R A. Study on partial purification and characterization of extracellular amylases from *Bacillus subtilis*. **Adv. Appl. Sci. Res**, v. 2, n. 3, p. 509-519, feb. 2011.

KHANDEKAR, D. C., PALAI, T., AGARWAL, A., BHATTACHARYA, P. K. Kinetics of sucrose conversion to fructo-oligosaccharides using enzyme (invertase) under free condition. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 2529-2537, jun.2014.

KHASKHELI, S. A.; ABRO, A. A.; NAQVI, S. H. A. Isolation of *Saccharomyces Cerevisiae* and Production of Invertase Enzyme. **International Journal of Modern Agriculture**, v. 10, n. 2, p. 4577-4587, jul. 2021.

KILIKIAN, Beatriz. V.; PESSOA JR. A Recuperação de produtos obtidos em bioprocessos (downstream processing). In: SCHIMIDELL, W. (Coord), **Coleção Biotecnologia Industrial**, 2.ed. São Paulo: Blucher, 2021. p.395-454.

KILIKIAN, Beatriz. V.; PESSOA JR, A. **Purificação de produtos biotecnológicos - operações e processos com aplicação industrial**. 2.ed. São Paulo: Blücher, 2020

KIM, B. W.; KWON, H. J.; PARK, H. Y.; NAM, S. W.; PARK, J. P.; YUN, J. W. Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 11-16, jul. 2000.

KLASSON, K. T; STURM, M, P.; COLE, M, R. Acid hydrolysis of sucrose in sweet sorghum syrup followed by succinic acid production using a genetically engineered *Escherichia coli*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102-231, jan 2022.

KOBLITZ, Maria. G. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KÖSE, K. Characterization of magnetic polymeric microparticles. **Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 185-204, aug. 2016.

KOZIOROWSKI J. Simple method for the quality control of. **Appl. Radiat.** v. 68, p. 1740-1742, set. 2010.

KUBOTA, A.; KAWAI, R.; LI, D.; KOZONO, T.; SASAKI, N., NISHIKAWA, A., TONOZUKA, T. Enzymatic and structural characterization of  $\beta$ -fructofuranosidase from the honeybee gut bacterium *Frischella perrara*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 7, p. 2455-2470, mar.2022.

KUDDUS, MOHAMMED. **Enzymes in food technology: Improvements and innovations**. 1. ed. Singapore: Springer, 2018.

KULSHRESTHA, S.; TYAGI, P.; SINDHI, V.; YADAVILLI, K, S. Invertase and its applications—a brief review. **Journal of pharmacy research**, v. 7, n. 9, p. 792-797, sep.2013.

KUMAR, R.; KESAVAPILLAI, B. Stimulation of extracellular invertase production from spent yeast when sugarcane pressmud used as substrate through solid state fermentation. **Springer Plus**, v. 1, p. 1-6, 2012.

KUMARI, N.; SETHY, K. THE INVERTASE-A REVIEW. **International Journal of Biopharmacology, Biotechnology and Allied Sciences**, v. 1, n. 2, p. 192-209, dec. 2020.

KURIBAYASHI, L, M.; DO RIO RIBEIRO, V, P.; DE SANTANA, R. C.; RIBEIRO, E. J.; DOS SANTOS, M, G.; FALLEIROS, L. N. S. S.; GUIDINI, C. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* for application in the dairy industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 3601-3610, may. 2021.

KWON, S.J.; YI, SH.; LEE, D. H.; LEE, J,S. Purification and properties of intracellular invertase from alkalophilic and thermophilic *Bacillus cereus* TA-11. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 196-201, nov. 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, aug. 1970.

LAHIRI, S.; BASU, A.; SENGUPTA, S.; BANERJEE, S.; DUTTA, T.; SOREN, D.; GHOSH, A. K. Purification, and characterization of a trehalase–invertase enzyme with dual activity from *Candida utilis*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 522, n. 2, p. 90-99, jun. 2012.

LAOTHANACHAREON, T.; BUNTERNGSOOK, B.; CHAMPREDA, V. Profiling multi-enzyme activities of *Aspergillus niger* strains growing on various agro-industrial residues. **3 Biotech**, v. 12, n. 1, p. 1-16,dec. 2022.

LAROSA, C, P.; BALTHAZAR, C, F.; GUIMARÃES, J. T.; MARGALHO, L, P.; LEMOS, F. S.; OLIVEIRA, F. L.; CRUZ, A. G. Can sucrose-substitutes increase the antagonistic activity against foodborne pathogens, and improve the technological and functional properties of sheep milk kefir? **Food Chemistry**, v. 351, p. 129290, jul. 2021.

LASE, E, R, K.; GIYANTO, G.; SANTOSA, D. A. Isolation, identification, and analysis of the invertase-producing bacteria abundance in sugarcane rhizosphere soil with different plant productivity levels. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 22, n. 8, aug.2021.

LAZAR, Z., WALCZAK, E.; ROBAK, M. Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. **Bioresource technology**, v. 102, n. 13, p. 6982-6989, jul.2011.

LEON-GONZ ALEZ, G.; GONZALEZ-VALDEZ, J.; MAYOLO-DELOISA, K.; RITO-PALOMARES, M. Intensified fractionation of brewery yeast waste for the recovery of invertase using aqueous two-phase systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 6, p. 886-894, aug. 2016.

LGIN, M.; GERMEC, M.; TURHAN, I. Statistical and kinetic modeling of *Aspergillus niger* inulinase fermentation from carob extract and its partial concentration. **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112866, nov.2020.

Li, Y.; WANG, Y.; LIU, Y.; LI, X.; FENG, L. Optimization of an economical medium composition for the coculture of *Clostridium butyricum* and *Bacillus coagulans*. **AMB Express**, v. 12, n. 19, feb. 2022.

LIANG, H.; LI, C.; YUAN, Q.; VRIESEKOOOP, F. Separation and purification of sulforaphane from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.20, p. 8047-8053, sep. 2007.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D.Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p.105-110, apr. 2003

LINCOLN, L.; MORE, S. S. Comparative evaluation of extracellular  $\beta$ -d-fructofuranosidase in submerged and solid-state fermentation produced by newly identified *Bacillus subtilis* strain. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 2, p. 441-456, apr. 2018.

LINCOLN, L.; MORE, S.; REDDY, S. Purification and biochemical characterization of  $\beta$ -d-fructofuranosidase from *Bacillus subtilis* LYN12. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 12592, jul. 2018.

LINCOLN, L.; MORE, S.S. Bacterial invertases: occurrence, production, biochemical characterization, and significance of transfructosylation. **Journal of basic microbiology**, v. 57, n. 10, p. 803-813, jul 2017.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American chemical society**, v. 56, n. 3, p. 658-666, mar. 1934.

LIU, J.; CHENG, J.; HUANG, M.; SHEN, C.; XU, K.; XIAO, Y., FANG, Z. Identification of an invertase with High specific activity for raffinose hydrolysis and its application in soymilk treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 646801, apr. 2021.

LIU, J.; MA, Y.; ZHANG, M.; LAI, T.; WANG, Y.; YANG, Z. Biosynthesis of lactosucrose by a new source of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bacillus methanolicus* LB-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 135, n. 2, p. 118-126, feb. 2023.

LIU, J.; YANG, J.; WANG, R.; LIU, L.; ZHANG, Y.; BAO, H.; JANG, J.; WANG, E.; YUAN, H. Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 288-294, apr. 2020.

LYNCH, K. M.; WILKINSON, S.; DAENEN, L.; ARENDT, E. K. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 345, p. 109128, may. 2021

MA, X., KEXIN, Z.; YONGGANG, W.; EBADI, A. G.; TOUGHANI, M. Optimization of Low-Temperature Lipase Production Conditions and Study on Enzymatic Properties of *Aspergillus Niger*. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)**, v. 40, n. 4, p. 1364-1374, mar.2021.

MACHÍN, B.; CHAVES, S.; ÁVILA, C.; PERA, L. M.; CHEHÍN, R. N.; PINGITORE, E. V. HIGHLY reusable invertase biocatalyst: Biological fibrils functionalized by photocrosslinking. **Food chemistry**, v. 331, p. 127322, nov.2020.

MADHAN, S. S.; SATHYAVANI, R.; NIKET, B. Production and partial purification of invertase using *Cymopogan caecius* leaf powder as substrate. **Indian journal of microbiology**, v. 50, n. 3, p. 318, sep. 2010.

MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. Aqueous two phase extraction of invertase from baker's yeast: Effect of process parameters on partitioning. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2014-2020, oct. 2011.

MAGHRABY, Y. R; EL-SHABASY, R. M; IBRAHIM, A. H; AZZAZY, H. M. E. S. Enzyme immobilization technologies and industrial applications. **ACS omega**, v. 8, n. 6, p. 5184-5196,feb. 2023.

MALHOTRA, I.; BASIR, S, F, Immobilization of invertase in calcium alginate and calcium alginate-kappa-carrageenan beads and its application in bioethanol production. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 494-503, jan.2020.

MALIK, W, A.; KHAN, H, M.; JAVED, S. Bioprocess Optimization for Enhanced Production of Bacterial Cellulase and Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. **Bioenergia. Res.** v.15, p.1116–1129, feb.2022.

MANOOCHEHRI, H.; HOSSEINI, N. F.; SAIDIJAM, M.; TAHERI, M.; REZAEI, H.; NOURI, F.A review on invertase: Its potentials and applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 101599, may.2020.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo, B. **Bioquímica básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MEHTA, D.; SATYANARAYANA, T. Bacterial and archaeal  $\alpha$ -amylases: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1129, jul.2016.

MENÉNDEZ, C.; MARTÍNEZ, D.; TRUJILLO, L. E.; MAZOLA, Y.; GONZÁLEZ, E.; PÉREZ, E. R.; HERNÁNDEZ, L. Constitutive high-level expression of a codon-optimized  $\beta$ -fructosidase gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1201-1212, jul.2013.

MIAO, M.; JIANG, B.; JIN, Z.; BEMILLER, J. Microbial Starch-Converting Enzymes: Recent Insights and perspectives. **Revisões abrangentes em Ciência Alimentar e Segurança Alimentar**, v. 17, n. 5, p. 1238-1260, aug.2018.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, mar.1959.

MILLER, N.; RICEEVANS, C.; DAVIES, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, vol. 84, p. 407-412, mar. 1993.

MIRANDA, M. V.; MAGRI, M. L.; DEL CANIZO, A. N.; CASCONI, O. Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A-Agarose. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 537-543, dec. 2002.

MOHANDESI, N.; HAGHBEEN, K.; RANAELI, O.; ARAB, S. S., & HASSANI, S. Catalytic efficiency and thermostability improvement of Suc2 invertase through rational site-directed mutagenesis. **Enzyme and microbial technology**, v. 96, p. 14-22, jan. 2017.

MORSY, F. M.; IBRAHIM, S. H. Concomitant hydrolysis of sucrose by the long half-life time yeast invertase and hydrogen production by the hydrogen over-producing *Escherichia coli* HD701. **Energy**, v. 109, p. 412-419, aug. 2016.

MOTESHAFI, H.; JABBARI, L.; HASHEMI, M. Performance of *Bacillus subtilis* D3d xylanase separated through optimized aqueous two-phase system in bio-bleaching of sugar beet pulp. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 159, p. 749-756, mar. 2022.

MOUELHI, R.; ABIDI, F.; GALAI, S.; MARZOUKI, M. N. Immobilized *Sclerotinia sclerotiorum* invertase to produce invert sugar syrup from industrial beet molasses by

product. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1063-1073, oct. 2014.

MUKHERJEE, Soumya. Isolation and purification of industrial enzymes: In: SINGH, R(Coord). **Advances in Enzyme Technology**. 1.ed. Elsevier: 2019.

MURAMATSU, K., ONODERA, S., KIKUCHI, M., SHIOMI, N. Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 57, n. 10, p. 1681-1685, jan. 1993.

NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 931-957, aug. 2017.

NADEEM, H.; RASHID, M.H.; SIDDIQUE, M.H.; AZEEM, F.; MUZAMMIL, S., JAVED, M. R.; RIAZ, M. Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1202-1210, aug.2015.

NANJUNDASWAMY, A; OKEKE, B, C. Comprehensive optimization of cultivation conditions for production of *Trichoderma* SG2 biomass hydrolyzing enzymes in submerged and solid-state fermentation. **Bioquímica Aplicada e Biotecnologia**, v. 191, n. 1, pág. 444-462, apr.2020.

NASCIMENTO, G, C, D.; BATISTA, R. D.; SANTOS, C, C, A, D, A.; SILVA, E,M, D.; DE PAULA, F, C., MENDES, D, B., ALMEIDA, A, F, D.  $\beta$ -fructofuranosidase and  $\beta$ -D-fructosyltransferase from new *Aspergillus carbonarius* PC-4 strain isolated from canned peach syrup: effect of carbon and nitrogen sources on enzyme production. **The Scientific World Journal**, v.19, p. 13, jan. 2019.

NATALINO, R.; REIS, E. L.; REIS, C.; FIDÊNCIO, P. H.; MAYRINK, M, I. Brown sugar characterization based on sucrose, Cu, Ca, Na, Fe and Mg. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – jCEC**. v.7, n. 3, sep.2021.

NAZIR, A.; KHAN, K.; MAAN, A.; ZIA, R.; GIORNO, L.; SCHROËN, K. Membrane separation technology for the recovery of nutraceuticals from food industrial streams. **Trends in Food Science & Technology**, v. 86, p. 426-438, apr.2019.

NEHAD, E. A.; ATALLA, S. M. Production and immobilization of invertase from *Penicillium* sp. using orange peel waste as substrate. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 2, p. 103, jun. 2020.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninge**. 6<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Artemed, 2014.

NORIZAN, N, H, M.; TAN, J. S.; ABBASILIASI, S.; MAT SAHRI, M.; OTHMAN, F.; ARIFF, A, B. Enhancement of  $\beta$ -mannanase production by *Bacillus subtilis* ATCC11774 through optimization of medium composition. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3516, jul.2020.

OBODOVYCH, O.; SHEVCHENKO, O.; MIRONCHUK, V.; LYMAR, V., SYDORENKO, V., YAKOBCHUK, R. Intensification of the inverted sugar syrup production using the rotor-pulsation processing. **Ukrainian Food Journal**. v.10, n.3, p. 605-610, set.2021.

OH, T,S., YUN, H., SIM,Y,J., KIM,J,W., CHOI,M,J., YUN, J,W. Production of Invertase from Newly Isolated Strain *Bacillus flexus*. **KSBB Journal**, v. 25, n. 1, p. 79-84, feb. 2010.

OJWACH, J.; KUMAR, A.; MUKARATIRWA, S.; MUTANDA, T. Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase enzyme from *Aspergillus niger* sp. XOBP48: implication in fructooligosaccharide production. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-12, sep. 2020.

OKAFOR, C. A.; OKANLAWON, T, S.; OLAGUNJU, A, M.; ISATOYE, E, F.; ONI, T,R.; ADEYEMO, S. M. Invertase activities of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk (“nono”), agadagidi and palm wine obtained from different locations in Ile-Ife, Osun-State, Nigeria. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 147-156, jan. 2023.

OKPALLA, J.; DIM, L. O.; ONYEKURU, D.A.; DURU, I. Optimization of Process Parameters for L-Glutaminase Production by *Pseudomonas Sp* ALG3. **Archives of Current Research International**, v. 22, n. 8, p. 35-45, aug.2022.

OLIVEIRA, R. L.; SILVA, M. F.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Production of  $\beta$ -fructofuranosidase with transfructosylating activity by *Aspergillus tamaris* URM4634 Solid-State Fermentation on agroindustrial by-products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 343-350, feb. 2020.

OMORI, T.; UENO, K.; MURAMATSU, K.; KIKUCHI, M.; ONODERA, S.; SHIOMI, N. Characterization of recombinant  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. **Chemistry Central Journal**, v. 4, p. 1-10, apr.2010.

O'MULLAN, P. J.; CHASE, T.; EVELEIGH, D. E. Purification and some properties of extracellular invertase B from *Zymomonas mobilis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 38, p. 341-346, jul. 1992.

ORAK, T.; CAGLAR, O.; ORTUCU, S.; OZKAN, H.; TASKIN, M. Chicken feather peptone: A new alternative nitrogen source for pigment production by *Monascus purpureus*. **Journal of biotechnology**, v. 271, p. 56-62, 2018.

OTTONI, C. A.; UERVO-FERNÁNDEZ, R.; PICCOLI, R. M.; MOREIRA, R.; GUILARTE-MARESMA, B.; SILVA, E.; MAIORANO, A. E. Média optimization for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 49-59, apr.2012.

OYEDEJI, O.; BAKARE, M. K.; ADEWALE, I. O.; OLUTIOLA, P. O.; OMOBOYE, O. Optimized production and characterization of thermostable invertase from *Aspergillus niger* IBK1, using pineapple peel as alternate substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 218-223, jan.2017.

PALOMARES, L.A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O.T. Production of recombinant proteins in. BALBÁS, P., LORENCE, A. (coord). **Recombinant Gene Expression**. Methods in Molecular Biology. 2.ed. Totowa: Humana Press, 2004.p 15-51.

PANDA, S. K.; MISHRA, S. S.; KAYITESI, E.; RAY, R. C. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental research**, v. 146, p. 161-172, apr.2016.

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

PANG, W. C.; RAMLI, A. N. M.; JOHARI, N. D. Structural properties, production, and commercialisation of Invertase. **Sains Malaysiana**, v. 48, n. 3, p. 523-531, mar.2019.

PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, K.; ASSIMOPOULOU, A.; MANTZOURIDOU, F. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. **Bioresource technology**, v. 309, p. 123317, aug.2020.

PARK, J. P.; OH, T. K.; YUN, J. W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 471-476, dez. 2001.

PASSOS, M. L.; SARAIVA, M. L. M. Detectors, detection systems, and detection strategies. **Measurement**, v. 135, p. 896-904, mar. 2019.

PAUL, J. S.; GUPTA, N.; BELIYA, E., TIWARI, S.; JADHAV, S. K. Aspects and recent trends in microbial  $\alpha$ -amylase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 2649-2698, mar. 2021.

PEK, H. B.; LIM, P. Y.; LIU, C.; LEE, D. Y.; BI, X.; WONG, F. T.; OW, D. S. W. Cytoplasmic expression of a thermostable invertase from *Thermotoga maritima* in *Lactococcus lactis*. **Biotechnology letters**, v. 39, p. 759-765, feb. 2017.

PISCITELLI, A.; PEZZELLA, C.; GIARDINA, P.; FARACO, V.; SANNIA, G. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. **Bioengineered bugs**, v. 1, n. 4, p. 254-264, jul. 2010.

PLASCENCIA-ESPINOSA, M.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, A.; PAVÓN-OROZCO, P.; VALLEJO-BECERRA, V.; TREJO-ESTRADA, S.; SOSA-PEINADO, A.; HIDALGO-LARA, M. E. Effect of deglycosylation on the properties of thermophilic invertase purified from the yeast *Candida guilliermondii* MpIIIa. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1480-1487, sep.2014.

POPOVA, E.; WATANABE.; E. O.; PESSÔA FILHO, P. A.; MAURER, G. Phase equilibria for salt-induced lysozyme precipitation: Effect of salt concentration and pH. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p.1026- 1033, jul.2008

PRAMANIK, S, K.; MAHMUD, S.; PAUL, G.K.; JABIN, T.; NAHER, K.; UDDIN, M.S., SALEH, M, A. Fermentation optimization of cellulase production from sugarcane bagasse by *Bacillus pseudomycoides* and molecular modeling study of cellulase. **Current research in microbial sciences**, v. 2, dez. 2021.

QUITÉRIO, E.; SOARES, C.; FERRAZ, R.; DELERUE-MATOS, C.; GROSSO, C. Marine health-promoting compounds: Recent trends for their characterization and human applications. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 3100, dez. 2021.

RAFATULLAH, M.; SULAIMAN, O.; HASHIM, R.; AHMAD, A. Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: a review. *Journal of hazardous materials*, v. 177, n. 1-3, p. 70-80, may. 2010.

RAMAMOORTHY, N, K.; SAMBAVI, T, R.; RENGANATHAN, S. A study on cellulase production from a mixture of lignocellulosic wastes. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 148–158, aug.2019.

RANA, K.; RANA, N.; CHAUHAN, N.; GHABRU, A.; DEVI, S.; CHAUHAN, S. Comparative study of *Bacillus* and *Enterobacter* for upscaling of invertase production for utilization in food industry. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.18, p. 1-10, aug. 2023.

RASBOLD, L. M.; HEINEN, SILVA, P. R.; SIMÃO. J. L.C., R.; KADOWAKI, M. K., MALLER, A. *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM invertase: Biochemical

characterization of a promiscuous enzyme. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 4, feb. 2021.

REDDY, P. P.; REDDY, G.S.N.; SULOCHANA, M.B. Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase producers with high transfructosylation activity and its 3 experimental run studies on reaction rate of enzyme. **Journal of Biological Sciences**. v.10, n.3, p. 237-241, jun.2010.

REIS, A. P.; GUIMARÃES, V. M.; FERREIRA, J. G.; QUEIROZ, J. H. D.; OLIVEIRA, M. G. A.; FALKOSKI, D. L.; REZENDE, S. T. D. Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soy molasses by  $\alpha$ -galactosidases and invertase from *Aspergillus terreus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 719-729, jun. 2010.

RIBEIRO, T. R.; PIROLLA, N. F. F.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Adoçantes Artificiais e Naturais: Propriedades Químicas e Biológicas, Processos de Produção e Potenciais Efeitos Nocivos. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 5, p. 1-41, ago.2020.

ROBINSON, P. K., PETER, K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1-41, nov. 2015.

RODRIGUES, M.V.N.; RODRIGUES, R.A.F.; SERRA, G.E.; ANDRITTA, S.R.; FRANCO, T.T. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 20, n.1, p. 103–109, abr. 2000.

RODRIGUEZ, E. L.; PODDAR, S.; IFTEKHAR, S.; SUH, K.; WOOLFORK, A. G., OVBUDE, S.; HAGE, D. S. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. **Journal of Chromatography B**, v. 1157, nov. 2020.

RUBIO, M. C.; RUNCO, R.; NAVARRO, A. R. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 6, p. 605-609, nov. 2002.

RUSTIGUEL, C. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermo-tolerant mycelial  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis* under submerged fermentation using wheat bran as carbon source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 362-369, jul. 2015.

RYAN, S. M.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Transcriptional regulation and characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase-encoding gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3475-3482, jul. 2005.

SADH, P.K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1-15, jan. 2018.

SAIBI, W.; GARGOURI, A. Purification and biochemical characterization of an atypical  $\beta$ -glucosidase from *Stachybotrys microspora*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 107-115, nov. 2011.

SANTOS, P. S. D.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; SAMPAIO G.; BRAGA Jr, A. C. R.; ASSIS, F. G. D. V. D.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC**, V. 4, n 2, fev. 2018.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus sp.* for industrial production. **Canadian journal of microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1-17, jan. 2004.

SCHMIDELL, Willibaldo.; DE ALMEIDA, Urgel.; BORZANI, Walter.; AQUARONE, Eugenio. **Biotecnologia industrial-vol.** São Paulo: Blucher, 2001.

SHAH, H. S.; PATEL, C. M.; PARIKH, S. C. Production of invertase from bacteria by using waste jaggery. **Microbes**, v. 3, p. 19-23, aug. 2013.

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

SHEHADUL I, M.; ARYASOMAYAJULA, A.; SELVAGANAPATHY, P. R. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. **Micromachines**, v. 8, n. 3, p. 83, mar.2017.

SIDDIQA, A., G, AMIN. Invertase enzyme. **International Journal of Advanced Biochemistry Research**, v. 6, n 2, p 120-126, apr.2023.

SILVA, A.F.V.; SANTOS, L.A.; VALENÇA, R.B.; PORTO, T.S.; SOBRINHO, M.D.M.; GOMES, G.J.C.; SANTOS, A.F.M.S. Cellulase production to obtain biogas from passion fruit (*Passiflora edulis*) peel waste hydrolysate. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 6, p. 103510, dec. 2019.

SILVA, Anna Flavia de Souza. **Caracterização e determinação de minerais em amostras de açúcares brasileiros**. 2017. Tese de Doutorado (Doutorado em ciência e tecnologia de alimentos). Universidade de São Paulo.

SILVA, C. G. A. D., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H. Cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC): Estado da arte e aplicações. **Química Nova**, v. 39, p. 210-220, fev.2016.

SILVA, J. F. M.; MIRANDA, W. L.; LEÃO, G, M, A. Isolamento e identificação de *Lactobacillus sp.* e *Saccharomyces sp.* da fermentação espontânea do fruto amazônico (pupunha) com potencial probiótico e biotecnológico para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios. **Desafios-Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**. v. 8, p. 14-22, nov.2021.

SILVA, R. D. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D., ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 337-341, dez.2003.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; KENNEDY, J. F. A panorama of bacterial inulinases: production, purification, characterization and industrial applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 96, p. 312-322, mar 2017.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P, K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-15, aug. 2016.

SIVAKUMAR, T.; RAVIKUMAR, M.; PRAKASH, M.; SHANMUGARAJU, V. Production of extracellular invertase from *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from grapes. **Int J Curr Res Acad Rev**, v. 1, p. 72-83, jan. 2013.

SOCCOL, C. R.; DA COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L., DE SOUZA., VANDENBERGHE, L. P. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52-71, jan. 2017.

SRIVASTAVA, N.; RATHOUR, R, J.H.A. S.; PANDEY, K.; SRIVASTAVA, M.; THAKUR, V. K.; MISHRA, P. K. Microbial beta glucosidase enzymes: Recent advances in biomass conversion for biofuels application. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 220, may 2019

SUNMONU, M. O.; SANUSI, M. S. Prospects and Challenges in Food-Grade Enzymes Industrial Production. In: DUTT, A. (coord.). **Novel Food Grade Enzymes: Applications in Food Processing and Preservation Industries**, Singapore: Springer, 2022. p. 439-453.

SZYMAŃSKI, K.; HAPETA, P.; MOROZ, P.; WAŚSIK, B.; ROBAK, M.; LAZAR, Z. The Influence of *Yarrowia lipolytica* Glycosylation on the Biochemical Properties and Oligomerization of Heterologous Invertase. **Sustainability**, v. 14, n. 13, Jun. 2022.

TALEKAR, S.; SHAH, V.; PATIL, S.; NIMBALKAR, M. Porous cross linked enzyme aggregates (p-CLEAs) of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. **Catalysis Science & Technology**, v. 2, n. 8, p. 1575-1579, jun. 2012.

TIMERMAN, A, P, The isolation of invertase from baker's yeast—an introduction to protein purification strategies. In: KAUMAYA, P.(coord). **Protein Purif**, Rijeka: Intech Open, 2012. p. 29-52, 2012.

TOLEDO, L.; GARCIA, D.; CRUZ, E.; INTRIAGO, L.; PÉREZ, J. PAÍS CHANFREAU, J. Fructosyltransferases and invertases: useful enzymes in the food and feed industries. In: MOHAMMED.K.(coord). **Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects**. Academic Press, 2019. p. 451-469.

TRIPATHI, P.; CHANDRA, R., SINGH, P.; SINGH, S. K. Cloning and expression of invertase gene from invertase producing bacteria to non-producing bacteria. **Int J Adv Res Bio-Technol**, v. 3, n. 1, p. 1-5, jan.2015

TURGUT, T.; GÜRLER, K.; YÜCEL, H., ÖZKÖSE, E., EKİNCİ, M, S., SILAJDAN, E, E. Enzyme activities *Lactobacillus sp.* and *Lb. rhamnosus*. **Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi**, n. 39, p. 109-112, jul. 2022.

VARADAVENKATESAN, T.; PAI, S.; VINAYAGAM, R.; PUGAZHENDHI, A.; SELVARAJ, R. Recovery of value-added products from wastewater using Aqueous Two-Phase Systems—A review. **Science of The Total Environment**, v. 778, p. 146293, jul.2021.

VÁSQUEZ-BAHENA, J. M.; VEGA-ESTRADA, J.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, J. A.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; FLORES-COTERA, L. B.; MONTES-HORCASITAS, M. C.; HIDALGO-LARA, M. E. Expression and improved production of the soluble extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, n. 1, p. 61-66, dec.2006.

VAVITSAS, K.; GLEKAS, P. D.; HATZINIKOLAOU, D. G. Synthetic biology of thermophiles: Taking bioengineering to the extremes? **Applied Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 165-174, feb. 2022

VITOLO, M. Autolysis of baker' s yeast and partial purification of invertase in the presence of surfactants. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 6, n. 5, p. 84-90, may. 2019.

VITOLO, M. Overview on invertase. **World J. Pharm. Pharm.** v. 10, p. 49-73, sep. 2021.

VLADU.S M, G.; PETRESCU, M, M.; EREMIA, C. Comparative Study for Obtaining Inulinase and Invertase by Yeasts. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 26, p. 3002-3007, nov. 2020.

VO T., D.; MEETRO J.; LYNCH B, TAFAZOLI S.; ICHIHARA A.; CHIKAMATSU, G., SAFETY. Assessment of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus brunneoviolaceus*. **Toxicology Research and Application**, v. 5, p 1-17, nov.2021.

WANG, S. A.; LI, F. L. Invertase SUC2 is the key hydrolase for inulin degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 403-406, jan 2013.

WARCHOL, M.; PERRIN, S.; GRILL, J. P.; SCHNEIDER, F. Characterization of a purified  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 462-467, dec.2002.

WIN, T. T.; ISONO, N.; KUSNADI, Y.; WATANABE, K.; OBAE, K.; ITO, H.; MATSUI, H. Enzymatic synthesis of two novel non-reducing oligosaccharides using transfructosylation activity with  $\beta$ -fructofuranosidase from *Arthrobacter globiformis*. **Biotechnology letters**, v. 26, p. 499-503, mar.2004.

WINZOR, Donald J. Analytical exclusion chromatography. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 56, n. 1-3, pág. 15-52, jun. 2003.

WU, R.; CHEN, G.; PAN, S.; ZENG, J.; LIANG, Z. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose. **Scientific reports**, v. 9, n.1, may.2019.

XU, C.; COLEMAN, W. K.; MENG, F. R.; BONIERBALE, M.; LI, X. Q. Relationship between glucose accumulation and activities of acid invertase and its inhibitors in potatoes under simulated commercial conditions. **Potato Journal**, v. 36, n. 1-2, p. 35-44, nov. 2009.

XU, Q.; ZHENG, X.; HUANG, M.; WU, M.; YAN, Y.; PAN, J.; FENG, J.X. Purification and biochemical characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1237-1246, aug.2015.

YALÇIN, H. T.; FINDIK, B.; TERZI, Y.; UYAR, E.; SHATILA, F. Isolation and molecular identification of industrially important enzyme producer yeasts from tree barks and fruits. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 3, p. 1079-1088, apr. 2021.

YAMAMOTO, K.; KITAMOTO, Y.; OHATA, N.; ISSHIKI, S.; ICHIKAWA, Y. Purification and properties of invertase from a glutamate-producing bacterium. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, n. 4, p. 285-291, dez.1986.

YANASE, H.; FUKUSHI, H.; UEDA, N.; MAEDA, Y.; TOYODA, A.; TONOMURA, K. Cloning, sequencing, and characterization of the intracellular invertase gene from *Zymomonas mobilis*. **Agricultural and biological chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1383-1390, dez. 1991.

YINGHUA, L.U.; XU, D.; CHENG, Z.; QINGBIAO, L.I.; GANG, L.M.H. Enhanced production of hybrid extracellular  $\beta$ -glucanase by recombinant *Escherichia coli* using experimental design method. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 15, n. 2, p. 172-177, mar. 2007.

YUIVAR, Y.; BARAHONA, S.; ALCAÍÑO, J.; CIFUENTES, V.; BAEZA, M. Biochemical and thermodynamical characterization of glucose oxidase, invertase, and alkaline phosphatase secreted by antarctic yeasts. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, p. 86, dez. 2017.

ZANELATO, A. I. Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo. 2011. 116f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

ZHANG, K.; WANG, M.; LIU, T.; CHU, Z.; I, N. W. Scalable Printing of Prussian Blue Analogue. Au Edge-Rich Microcubes as Flexible Biosensing Microchips Performing Ultrasensitive Sucrose Fermentation Monitoring. **ACS applied materials & interfaces**, v. 14, n. 36, p. 40569-40578, sep.2022.

ZHOU, J.; HE, L.; GAO, Y.; HAN, N.; ZHANG, R.; WU, Q.; HUANG, Z. Characterization of a novel low-temperature-active, alkaline and sucrose-tolerant invertase. **Scientific Reports**, Londres, v. 6, n. 1, aug. 2016.

ZIDAN, D.; AZLAN, A. AZRINA. Non-centrifugal sugar (NCS) and health: A review on functional components and health benefits. **Applied Sciences**, v. 12, n. 1, p. 460, jan. 2022.