

UMA BREVE REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA SOBRE A PRODUÇÃO DE INVERTASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Édipo da Silva Almeida¹, Emanuele Cardoso Dias¹, Vitor Troccoli Ribeiro², Abimaelle Chibério da Silva², Carlos Eduardo Araújo Padilha³, Francisco Canindé de Sousa³ Júnior, Franklin Ferreira de Farias Nóbrega⁴, Michelle Rossana Ferreira Vaz⁵

1. Discente em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos pela Universidade Federal de Campina Grande/Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (UFCG/CDSA).
2. Graduando em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
3. Doutorado em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
4. Professor Universidade Federal de Campina Grande/Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (UFCG/CDSA)
5. Professora orientadora. Universidade Federal de Campina Grande/Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (UFCG/CDSA)

RESUMO

Os microrganismos são os principais seres vivos produtores de enzimas, confirmando sua importância na produção e aquisição de enzimas por processos fermentativos. A invertase é a enzima responsável pela formação do produto da hidrólise da sacarose: o “açúcar invertido”, produto com diversas aplicações na indústria de alimentos e bebidas. Um dos métodos mais aplicados na produção de invertase é através de fermentação em estado sólido, tal processo vem sendo bastante utilizado devido as suas características vantajosas na execução do processo, características essas que vão desde a simplicidade na operação até a utilização de substratos renováveis oriundos da agroindústria. O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão dos principais aspectos envolvidos na produção de invertase por fermentação em estado sólido descritos na literatura. O resumo descrito aborda desde os principais fundamentos da fermentação em estado sólido, os substratos que oferecem melhor rendimento e otimização no processo e os microrganismos que melhor se adequam a operação, bem como os resultados mais satisfatórios da produção da invertase descritos na literatura. Os principais resultados na produção dessa enzima demonstram a eficiência e importância da escolha do processo fermentativo adequado, onde a fermentação em estado sólido executa um papel não somente satisfatório na produção de uma enzima de grande importância na indústria, mas também refutando a criação de uma conscientização ecológica no processo, agregando valor não só na utilização de produtos renováveis na realização do processo, mas também na produção de bens e serviços oriundo de bioprocessos que abrange sustentabilidade ambiental.

Descritores: Enzimas, Invertase, Fermentação em estado sólido, Bioprocessos.

A BRIEF SYSTEMATIC REVIEW OF THE LITERATURE ABOUT PRODUCTION OF INVERTASE IN SOLID STATE FERMENTATION

ABSTRACT

The microorganisms are the main living organisms that synthesize enzymes, confirming the importance of the production and acquisition of enzymes by fermentation processes. The invertase is the enzyme responsible for the formation of the product of hydrolysis of sucrose: the "invert sugar", this product has many applications in the food and beverage industry. One of the most used methods to produce invertase is by solid state fermentation, this process has long been used for their advantageous characteristics in process execution, characteristics that go from its simplicity in operation until the use of renewable substrates agribusiness. The objective of this paper is to review the main aspects involved in the production of invertase by solid state fermentation in the literature. The summary described approaches from major foundations of solid state fermentation, substrates that offer better performance and optimization in process and the microorganisms that are best suited to operation as well as the most satisfactory results in the

production of invertase in the literature. The main results in the production of this enzyme demonstrates the efficiency and importance of choosing the appropriate fermentation process where the solid-state fermentation satisfactory not only performs a role in the production of an enzyme of great importance in industry, but also rejecting the establishment of an awareness the ecological process, adding value not only in the use of renewables in the realization of the process, but also in the production of goods and services derived from bioprocesses covering environmental sustainability.

Keywords: Enzymes, Invertase, Solid State Fermentation, Bioprocess.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas estão presentes em todas as células vivas ao qual desempenham o ofício de serem catalisadoras das reações bioquímicas que constituem as vias anabólicas e catabólicas do metabolismo das células. Os microrganismos são os principais seres vivos produtores de enzimas devido a grande disposição de atividades catalíticas, sendo assim, existem de fato, a grande possibilidade da produção de enzimas por processos fermentativos, desde que as normalizações necessárias e a simplicidade das exigências nutricionais sejam atendidas (1).

A enzima β -frutofuranosidase, mais conhecida como invertase, é uma enzima termoestável e está classificada na família GH32, como um glicosídeo hidrolase, ao qual esta classificação inclui mais de 370 membros de enzimas (2). As invertases catalisam a hidrólise da ligação glicosídica da molécula de sacarose (2) a qual atua no terminal não redutor do resíduo β -D-frutofuranosídeo em frutofuranosídeos (3), sendo assim, a enzima invertase possui papel importante na produção de uma solução equimolar dos monossacarídeos que compõem a sacarose, processo esse, conhecido como inversão (4, 5).

Um aspecto importante a ser mencionado é que o produto gerado pela invertase oriundo da hidrólise da sacarose é mais doce que a própria sacarose (6). Além disso, a invertase também catalisa reações de transferência com outros aceptores, além da água. Tal reação produz a formação de oligossacarídeos constituídos por unidades de glicose e frutose (4), a presença de unidades de frutose justifica o fato de que o produto da inversão da sacarose pela invertase seja mais doce que a própria sacarose (6).

A invertase é responsável por promover a formação do produto de hidrólise da sacarose, o xarope de glicose-frutose ou mais conhecido como “açúcar invertido”, este possui algumas particularidades importantes em relação ao xarope de sacarose, como maior vigor edulcorante (5). Atualmente o açúcar invertido possui diversas aplicações na indústria de alimentos e bebidas podendo também, em alguns casos, ser utilizado diretamente como adoçante de mesa (6). Na indústria alimentícia o açúcar invertido é aplicado na fabricação de confeitos, na panificação e criação de cremes para recheio e

geleias (7). Além da fabricação do açúcar invertido, a invertase possui outras aplicações relevantes na indústria alimentícia: como a produção de mel de sacarose; fabricação de licores; na obstrução da cristalização do açúcar na fabricação de sorvetes (8); fabricação de produtos para higiene bucal (9) e na produção de frutose cristalina (5).

A presença da enzima invertase vem sendo relatada em diversos organismos, como em vegetais (10), leveduras, sobretudo na espécie *Saccharomyces cerevisiae*(5), fungos filamentosos como o *Aspergillus sp* (2, 8), *Rhodotorula glutinis* (11) têm destaque quanto a produção de invertase de interesse industrial (12). Outros fungos como *Candida utilis* e *Fusarium oxysporum* (6) também têm sido relatados como produtores de invertase.

Um dos métodos mais utilizados para produção de invertase é através de fermentação em estado sólido (FES). Processo esse já bastante disseminado nos últimos anos na produção de produtos de origem biológica advindo dos bioprocessos. O interesse nesse tipo de fermentação advém de sua simplicidade de operação e da possibilidade de aproximação do crescimento natural de muitos microrganismos, principalmente fungos (13). Outra característica importante e vantajosa que implica na utilização da FES para produção de invertase, é que este processo permite a utilização de substratos oriundos da agricultura ou subprodutos da agroindústria (14). Esta característica reflete em uma alternativa proeminente para solucionar problemas de poluição e custo de enzima, bem como o aumento da conscientização ecológica oriundo de um processo que envolve a utilização de fontes sustentáveis para sua execução na produção de um produto biotecnológico de grande interesse no mercado industrial.

O objetivo deste trabalho é expor de maneira sintética ou resumida a produção da enzima invertase por fermentação em estado sólido sob o desenvolvimento de diversos autores na literatura, bem como a normatização e as metodologias mais utilizadas na produção dessa enzima abordando sempre a utilização de métodos simples de caráter sustentável visando expor o fato de que uma enzima biotecnológica com relevantes aplicações na indústria pode ser produzida por métodos sem complexidades e sem grandes custos para sua realização.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser denominada como o processo no qual está relacionado com a cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde o conteúdo líquido ligado a matriz está a um nível de atividade

de água que ao mesmo tempo garanta o crescimento e metabolismo das células microbianas e não supere a máxima capacidade da água ligar-se à matriz sólida (15), neste caso o substrato atua como fonte de carbono (16). A FES apresenta diversas características vantajosas quanto ao seu uso como por exemplo, a simplicidade em seu preparo e a redução gradual do risco de contaminação (12).

A FES reproduz processos microbiológicos naturais. No caso de aplicações industriais, estes processos naturais, se controlados corretamente, produzem o produto desejado (17). Diferentes tipos de microrganismos como bactérias leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos (12). Porém, Na fermentação em estado sólido os fungos representam um dos microrganismos mais promissores pela variedade de produtos de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento das hifas que permite aos mesmos maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre as partículas da matéria-prima (15).

Como a maioria dos processos de produção de invertase por FES revistos em literatura utilizam o princípio em que o suporte sólido atua também como fonte de nutrientes, os substratos para FES são em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria como farelos, cascas, bagaços e outros materiais tidos como exequíveis para a biotransformação (12). Neste caso, uma das maiores vantagens na produção de enzimas por FES, é que esse método permite ao fungo produzir um complexo natural de enzimas específicas aos substratos encontrados nos alimentos, ao invés de produzir uma enzima apenas (18). A estrutura dos substratos possuem como seus principais constituintes: celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, a presença dessas biomoléculas na constituição dos substratos da FES os caracteriza como materiais excepcionalmente heterogêneos, atuando tanto no suporte ao crescimento microbiano como também atuando como fonte de carbono e energia aos microrganismos (19).

2.2 – Substratos para FES na produção de invertase

Torna-se importante destacar que, é importante comentar o fato de que o termo fermentação em estado sólido refere à ideia de dois tipos de materiais insolúveis em água, sobre os quais os microrganismos irão crescer: o caso em que o suporte sólido atua, ele próprio como fonte de nutrientes e no caso em que os nutrientes são solúveis em água e os microrganismos estão aderidos a uma matriz sólida, inerte ou não, que irá absorver o meio de cultura líquido (19).

Geralmente, na produção de invertase, os substratos para FES são compostos ou produtos heterogêneos da agricultura ou subprodutos da agroindústria. Suas estruturas macromoleculares básicas (celulose, amido, pectina, lignocelulose, fibras) conferem propriedades de sólido aos substratos, além disso, esses materiais orgânicos atuam como fonte de carbono e nitrogênio (12). Muitas vezes é necessário que estes substratos sólidos naturais passem por um pré-tratamento para deixar seus componentes químicos mais acessíveis e sua conformação física mais suscetível para penetração dos micélios. Tais pré-tratamentos incluem a trituração ou a moagem para tornar suas partículas mais acessíveis (12).

(5), por exemplo, produziu, caracterizou e purificou parcialmente a enzima invertase obtida por FES utilizando farelo de soja como substrato ao microrganismo. Neste trabalho foram usados frascos erlenmeyer de 250 mL, nos quais foram adicionados: 2,0 g de farelo de soja, 2,0 mL de água corrente, a FES ocorreu por períodos variáveis de 72 a 220h. (6) produziu e purificou invertase por FES ao qual o substrato utilizado foi farelo de trigo (10g de farelo de trigo e 20 mL de água destilada em frascos de erlenmeyer de 250 mL), neste experimento o cultivo ocorreu por sete dias.

(15) avaliou o tempo de produção da enzima invertase por FES utilizando resíduos de casca de maracujá e farelo de arroz como substrato. Anteriormente ao processo de fermentação às cascas de maracujá foram secadas ao sol durante cinco dias, no processo de fermentação foram utilizadas 30 g de material composto por metade de casca de maracujá e metade de farelo de arroz, este conjunto foi posteriormente hidratado com 30 mL do inóculo a temperatura ambiente. O tempo de fermentação foi de 160 horas. Consta na literatura que (21) e (12) também utilizaram resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase. Consta também na literatura que (22) utilizou em diferentes substratos / fontes de carbono, tais como: bagaço de cana, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de aveia, milho moído, farinha de centeio e palha de arroz, todos umedecidos com diferentes soluções salinas, água destilada e água de torneira em diferentes proporções na produção caracterização e purificação da enzima invertase.

2.3 – Microrganismos utilizados na produção de invertase por FES

(20) revela que os processos por fermentação em estado sólido podem utilizar tanto microrganismos em seu estado natural, ou também na forma de culturas individuais puras, nesse caso enquadra-se maior parte das pesquisas experimentais. Entretanto os fungos filamentosos possuem melhores condições de se desenvolverem

na água livre, pois os meios naturais para o crescimento desses microrganismos são idênticos aos meios sólidos empregados em FES (5). Dentre os fungos, a cultura de *Aspergillus niger* merece destaque, pois este microrganismo tem a capacidade de produzir nada menos do que 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato utilizado (20).

Na produção de invertase, os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* é bastante citado na literatura, (8) cita os fungos *Aspergillus niger*, *flavus orizae* e *orizae*, como três dos principais fungos produtores da enzima invertase com aplicação na indústria alimentícia. Assim como citado por (8); (12, 21) utilizaram o fungo *Aspergillus niger* na produção de invertase em processo por FES.

Registra-se também na literatura que (22) purificou e caracterizou invertase produzida por *Aspergillus phoenicis* com o objetivo de fornecer dados adicionais importantes para o entendimento da diversidade das propriedades das invertases para aplicação biotecnológica. A autora também cita outros trabalhos constatados na literatura, voltados para a produção de invertase utilizando o fungo do gênero *Aspergillus* como inóculo: (23) utilizou *Aspergillus japonicus* e (24) utilizou *Aspergillus ochraceus*. Outro exemplo da utilização do fungo do gênero *Aspergillus* é descrito por (7), que utilizou o fungo *Aspergillus casei* na produção de invertase em fermentação semi-sólida, com condições ótimas em pH 4,0 a 70°C.

Outras espécies de fungos filamentosos utilizados na produção de invertase por FES também podem ser encontrados na literatura. (6), por exemplo, determinou a temperatura ótima de 45° C e atividades de pHs entre 6,0 e 9,0 para produção de invertase oriundo do fungo filamentoso *Rhizopus sp.*

Outro exemplo é descrito por (11) e (25) que utilizaram respectivamente os fungos *Rhodotorula glutinis* e *Thermomyces lanuginosus* para produção de invertase.

É importante frisar que não só os fungos filamentosos mas também outros microrganismos como bactérias (26, 27) e leveduras (1) têm obtido espaço na produção de invertase, porém como o fator que irá determinar a escolha da linhagem mais adequada, durante a fase de seleção do microrganismo, sobretudo para produção de invertase, é o tipo de processo a ser executado, visando o melhor desempenho do microrganismo; a utilização de bactérias e leveduras na produção de invertase por FES não é apropriada devido a não aptidão do microrganismo ao processo fermentativo na produção dessa enzima. Bem como o aparecimento de características desvantajosas no processo diante da utilização desses microrganismos.

2.4 – Meios de cultura utilizados na produção de invertase

As características físico-químicas do meio de cultivo são de fundamental importância, não apenas para o crescimento celular como também para o rendimento em produto. Assim, sempre torna-se muito difícil citar as características de microrganismos para um determinado processo, sem associa-los a um determinado meio de cultivo (1), pois as características indicadas para a escolha de um microrganismo específico, na verdade em muitos casos, dependem do meio utilizado, e este deve apresentar características básicas como ser o mais barato possível e atender as necessidades nutricionais do microrganismo, devem ser consideradas na escolha do meio em questão (13).

Pode-se notar que na literatura voltada para produção da enzima invertase, os meios de cultura utilizados no processo são exclusivamente meios complexos, estes empregam matérias-primas industriais, especialmente do setor agrícola. Ex.: melaço, açúcar não refinado, sucos de fruta e materiais amiláceos (1). A utilização de Bioprocessos envolvendo uso de meios de cultivo complexos na produção de invertase representa assim, uma forma de se agregar valor a resíduos abundantes, dando uma solução para o seu acúmulo, pois a matéria-prima é um dos componentes mais relevantes nos custos de produção de uma enzima, representando cerca de 75% do custo total, sendo esta uma das razões para a recente aquisição de resíduos agroindustriais na formulação de meios de cultura (1).

Torna-se necessário lembrar que, como os fungos filamentosos são os microrganismos mais utilizados em FES na produção de invertase; com relação aos meios utilizados no cultivo de fungos, (28), cita que em laboratório, muitos fungos podem crescer em uma mistura simples, uma fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico e alguns minerais. Em geral os meios para cultivo de fungos têm uma concentração maior de açúcar (4%) e um pH menor (3,8 a 5,6) que o meio para cultivo bacteriano.

Na literatura podemos citar os trabalhos realizados por (21), que no preparo do inoculo de esporos de *A. niger* para produção de invertase, utilizou como meio de cultura uma solução de água de batata e glicose 20 g/L, esse mesmo meio de cultura também foi utilizado por (12) e (15) também no preparo de inóculo de esporos de *A. niger* na produção de invertase.

Já (7) utilizou meio BDA (batata, dextrose e ágar) no preparo do *A. caseiellus* na produção de invertase por FES a partir de farelo de soja. E (29), produziu invertase e amilase à partir de *A. caseiellus* por FES, utilizando o meio de cultura PDA (potato dextrose ágar) no preparo do inóculo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha do substrato para a produção da enzima de interesse é de extrema importância, uma vez que interfere diretamente nos resultados finais da produção. Também podemos destacar a dependência de certos fatores, como a viabilidade e o custo de produção, que influenciarão na seleção do substrato ideal para o processo. Como auxílio para a redução dos custos, os resíduos agroindustriais são alternativas que suprem a necessidade nutricional para o desenvolvimento dos microrganismos na produção de enzimas por fermentação em estado sólido. Fato este, que pode ser observado na literatura, onde diversos autores comprovam este crescimento.

(5), observou que o melhor tempo para o crescimento foi de 72 horas após a fermentação, e o substrato utilizado (Farelo de trigo) com o acréscimo de água corrente, sem adição de nutrientes à 25 °C em um processo de batelada. Neste tempo de 72 horas, (30), cultivaram *Aspergillus niger* utilizando o bagaço de cana-de-açúcar em condições de fermentação em estado sólido à 30 °C.

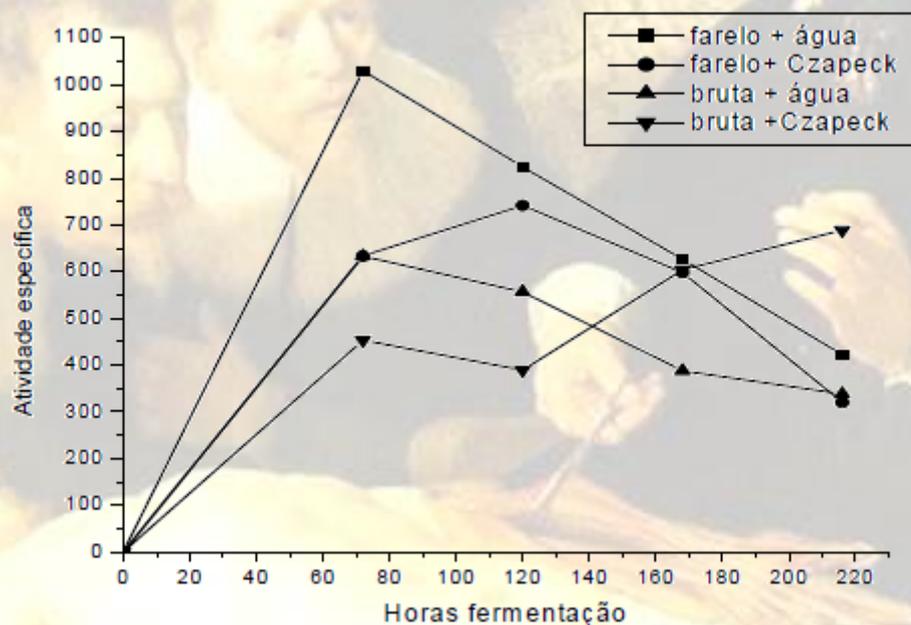


Figura 1 – Seleção do substrato em FSS por NOVAKI *et al* (2009).

Para substratos como a casca de maracujá e farelo de arroz, (21), relatou que após 4 dias, a atividade enzimática foi superior para a cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16404 em comparação com a cepa ATCC 10577, embora a cepa ATCC 10577 tenha crescido até o sétimo dia.

(22), em seu trabalho, analisou a influência de diferentes fontes de carbono, diferentes soluções e o tempo de cultivo. Constatou-se que os maiores níveis enzimáticos foram adquiridos por meio de dois substratos, o farelo de trigo e o farelo de soja (566,43 U/g). Mas, de forma unitária, o farelo de soja prepondera quaisquer outros substratos, e para posteriores estudos, houve a sua padronização devido a facilidade para purificação. Para melhor visualização das fontes utilizadas e os seus desempenhos, podemos observar a tabela abaixo (Figura 2).

TIPOS DE SUBSTRATO	Atividade invertásica	
	EXTRACELULAR (U/G)	PROTEÍNA (MG/G)
Bagaço de cana de açúcar	18,00 +- 0,00	4,95
Farelo de aveia	21,34 +- 0,03	2,37
Farelo de soja	470,54 +- 1,42	12,76
Farelo de trigo	35,27 +- 1,02	6,11
Farinha de centeio	16,19 +- 0,00	2,30
Milho moído	3,88 +- 0,08	6,19
Palha de arroz	78,18 +- 0,73	2,73
Bagaço de cana + farelo de soja	27,26 +- 0,23	10,25
Centeio + milho moído	79,70+- 1,13	4,75
Farelo de soja + farelo de trigo	566,43 +- 2,72	11,41
Milho moído + farelo de soja	456,43 +- 1,36	10,75
Palha de arroz + farelo de soja	64,79 +- 1,02	10,49

As culturas foram mantidas em estufa a 40°C com umidade relativa ao redor de 76% por um período de 72 horas.

Figura 2 - Influência de diferentes fontes de carbono na produção de invertases pelo fungo *A. phoenicis* em FSS por RUSTIGUEL (2009).

Para as influências de diferentes soluções na produção de invertase, (22), resultou que a produtividade foi maior utilizando água da torneira para umidificar o substrato previamente, comparado a outras soluções como a sais SR, sais de Khanna e sais de Vogel. Quanto a produção invertásica em função do tempo de cultivo em FSS, o autor deduz que a produção do fungo foi ascendente até as 72h, e logo após ocorreu uma redução de 29% na atividade.

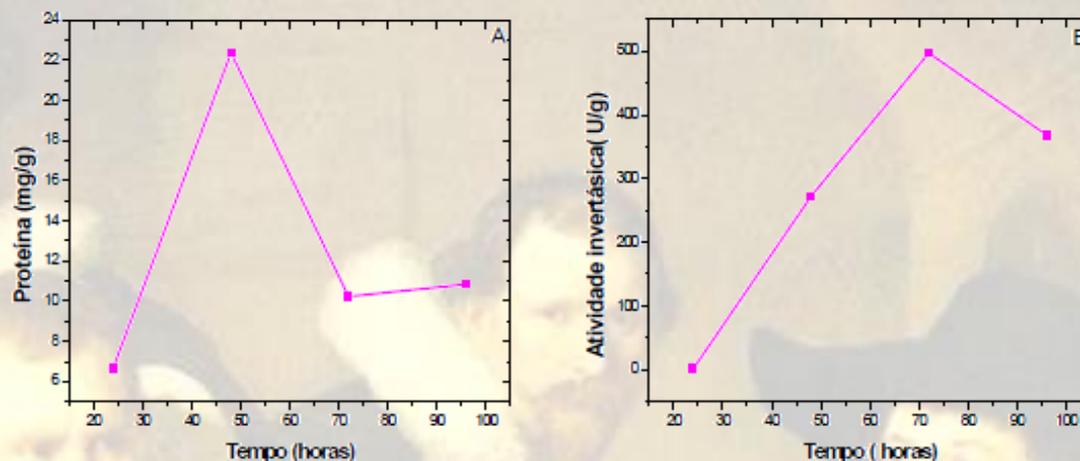


Figura 3 - Influência do tempo de cultivo em FSS na secreção de proteínas (A) e na produção de invertase (B) por *A. phoenicis* por RUSTIGUEL (2009).

(12), obteve seu objetivo geral, que foi o reaproveitamento dos resíduos industriais. E dentro destes objetivos, um dos objetivos específicos alcançados foi o de avaliar qual cepa utilizar de *Aspergillus niger* com base na capacidade de produção enzimática e no melhor tempo de fermentação. Como resultado líquido desta seleção, a cepa que melhor se destacou entre as demais foi a ATCC 16404, onde produziu em todos os dias de fermentação em maior escala a enzima de interesse.

Foi visto também na literatura, o trabalho realizado por (31), em que objetivou o enriquecimento protéico do bagaço do caju, através da fermentação semi-sólida com linhagens de *Aspergillus niger*, e em seus resultados, obteve-se que a linhagem mais produtiva foi à linhagem 2270 em comparação com a linhagem 332, e também vale salientar que estes resultados foram superiores aos efeitos contidos nas literaturas analisadas.

Amostra	Linhagem de <i>Aspergillus niger</i>	% Proteína total produzida na fermentação (30h)
A	2270	4,7 +- 0,82
B	332	4,6 +- 0,57

Figura 4 – Proteínas quantificadas após fermentação do bagaço do caju com a umidade média de 77,5 % de *Aspergillus niger* 2270 e 332 em 30 horas por PONTES (2009).

(32), em seu trabalho na produção de invertase utilizando o fungo *Sphaceloma ampelinum*, obteve uma produção máxima de invertase extracelular em 7 dias com 127,57 U totais, e o efeito indutor foi maior na concentração de 1,25% de germe de trigo, que por sua vez, forneceu foi a fonte de carbono tanto no meio líquido Khouvine,

quanto o meio Czapeck com valores de 5,90 e 4,73 U totais. A temperatura ótima obtida foi de 50 °C e pH em torno de 5,5.

(33), em seu trabalho com *Saccharomyces cerevisiae*, obteve os seguintes resultados quanto à atividade enzimática:

Fonte	Proteína (mg/ml)	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot
Invertase extraída	3,20	46,51	14,93
Invertase extraída dialisada	0,273	41,44	151,79
Invertase comercial	1,35	126,84	93,95

Figura 5 – Atividade enzimática de acordo com DOS SANTOS (2010).

O pH ótimo da obtenção da enzima ficou em entre as faixas de 4,0 à 6,0, mostrando-se também sua estabilidade divergindo com a variação do tempo. Em relação à temperatura, a temperatura ideal para o processo ficou em torno dos 35 à 65 °C.

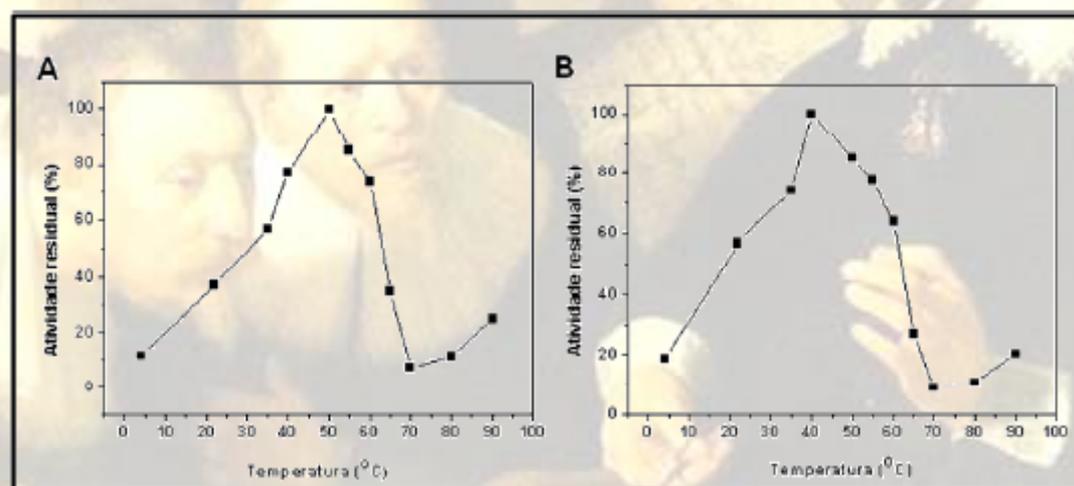


Figura 6 -Efeito da temperatura sobre a atividade da invertase livre extraída e comercial de *Saccharomyces cerevisiae*.

5. CONCLUSÃO

Ao analisarmos a literatura, finalizamos com a certeza de que se torna extremamente extraordinário os avanços até aqui realizados, no caminho ao qual se prosseguiram. Afunilando as informações, obteve-se que a utilização de variadas fontes de carbono/substratos, gera-se uma gama de opções para a produção de invertase extracelular, a partir de resíduos agroindustriais como farelo de trigo, farelo de soja, farelo de arroz, casca de côco, entre outras fontes.

Entre tantas opções de produção, há destaque para a escolha do tipo de fermentação utilizada e o microrganismo empregado, sendo que a fermentação em estado sólido ou fermentação semi-sólida possui mais resultados significativos na obtenção da enzima, juntamente com os fungos da família *Aspergillus niger*, respectivamente na produção da invertase desejada.

6. REFERÊNCIAS

1. Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML. Enzimas em Biotecnologia. Rio de Janeiro, Interciência, 2008.
2. Paiva Alegre AC, Polizeli MLTM, Terenzi HF, Jorge JA, Guimarães LHS. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. Department of Biology , Faculty of Philosophy , Sciences and Letters of Ribeirão Preto , University of São Paulo. 2009; 612-13.
3. Marquez LDS. Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas. [Dissertação]. Uberlândia: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia; 2007.
4. Santana LNS, Cabral LDS, Ribeiro EJ. Estudo da imobilização de invertase em resinas de troca iônica e produção de açúcar invertido. VIII Encontro Interno, XII Seminário de iniciação Científica. 2008; (Pt 1-2): 1-2.
5. Novaki L. Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus casingii*. [Dissertação]. Toledo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2009.
6. Goulart AJ, Adalberto PR, Monti R. Purificação parcial de invertase a partir de *Rhizopus sp* em fermentação semi-sólida. Alim. Nutr., Araraquara/SP. 2003; (v.14): 199-203.
7. Novaki L, Hasan SDM, Kadowaki MK, Andrade D. Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. ENGEVISTA. 2010; (v. 12): 131-140.
8. Evangelista J. Tecnologia de alimentos. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu Rio; 2001.
9. Said S, Pietro RCLR. Enzimas como agentes biotecnológicos. 1ª ed. Ribeirão Preto: Legis Summa; 2004.
10. Fotopoulos V. Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family. Journal of Biological Research. 2005 May [Accepted after revision: 4 Nov 2005]: 127-37. J. Biol. Res. is available online at <http://www.jbr.gr>.
11. Rubio MC, Runco R, Navarro AR. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. Phytochemistry. 2002; (v. 61): 605-609.
12. Rocha CP. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. [Dissertação]. Uberlândia: Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia; 2010.
13. Schmidell W. Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica. 1. ed. Vol 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA; 2001.
14. Dos Santos G. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori*. [Dissertação]. Ponta Grossa: Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2006.
15. Correa SL, Rocha CP, Filho UC, Cardoso VL. Avaliação do tempo de fermentação para produção de enzimas empregando resíduos agroindustriais. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em iniciação Científica. 2009.
16. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. Process Biochemistry. 2000; (v. 35): 1153-1169.
17. Couto SR, Sandromán MA. Application of solid stat fermentation to food industry – A review. ELSEVIER; Journal Food Engineering. 2006; (ed. 76): 291-302.
18. Rutz F, Torero A, Filer K. Fermentação em estado sólido: a evolução na produção de enzimas. Aveworld. 2008; (ed. 29).
19. Pandey A. Solid state fermentation. Biochemical. Engineering Journal. 2003; (v. 13): 81-84.

20. Del Bianchi VL, Moraes IO, Capalbo DMF. Fermentação em estado sólido. In: Schmidell W. Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica. 1. ed. Vol. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA; 2001. p 247-248.
21. Rodrigues, ABC, Almeida CAV, Rocha CP, Filho UC, Cardoso VL. Fermentação de resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase e amilase por *Aspergillus niger*. IX Encontro Interno, XIII Seminário de Iniciação Científica. 2009; (Pt 2): 2.
22. Rustiguel CB. Produção, purificação e caracterização bioquímica das invertases do fungo filamentosso *Aspergillus phoenicis*. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - SP, Universidade de São Paulo; 2009.
23. Cheng TC, Duan KJ, Chyi Cheu D. Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* on chitosan using tris hydroxymethyl phosphine or glutaraldehyde as a coupling agent. Biotechnol. 2005; (L. 27): 335-38.
24. Guimarães LHS, Terenzi HF, Polizeli MLT, Jorge JA. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon source. Enzyme Microbiol. 2007; Tech. 42 (1): 52-57.
25. Chaudhuri A, Bharadway G, Maheshwari R. An unusual patter of invertase activity development in the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. FEMS Microbiol. 1999; (L. 177): 39 – 45.
26. Vargas W, Cumino A, Salerno GI. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol. Planta. 2003 (v. 216): 951–960.
27. Oda Y, Ito M. Characterization of a mutant from *Lactobacillus amylovorus*. JCM 1126T with improved utilization of sucrose. Curr. Microbiol. 2000: 392-395.
28. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiologia: Conceitos e aplicações. Vol. 1. 2º ed. São Paulo: Makron Books; 1996.
29. Paris LD, Scheufele FB, Júnior AT, Guerreiro TL, Hassan SDM. Estudo do crescimento de *A. caseiellus* em farelo de soja convencional para produção de enzimas. Estudos tecnológicos. 2010; (v. 6): 22-35.
30. Ashokkumar B, Kayalvizhi N, Gunasekaran P. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. Process Biochmistry. 2001; (n. 37): 331-338.
31. Pontes, C. R. Enriquecimento protéico do bagaço de caju através de fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger*. Fortaleza: Departamento de Tecnologia em Alimentos. Centro de Ciências Agrárias. Pós - graduação em tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2009.
32. Breda, A.E; Marese, A.C.M.; Knob. A.; Silva, S.A.V.; Barbieri, K.C.; Kadowaki, M.K. Estudo da produção da invertase extracelular pelo fungo *Sphaceloma ampelinum*. XI Encontro Anual de Iniciação Científica. 2002.
33. Dos Santos AF. Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. [Dissertação]. Araraquara – SP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista; 2010.