

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICADO A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA β -FRUTOFURANOSIDASE OBTIDA DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR *ASPERGILLUS CASIELLUS*

Thiago Luiz Guerreiro, Fabiano Bisinella Scheufele, Camila Gonçalves Negami, Leandro Daniel de Paris, Salah Din Mahmud Hasan (Orientador/UNIOESTE), e-mail: thiagoguerreiro@gmail.com

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Engenharias e Ciências Exatas – Toledo – PR

Palavras-chave: Plackett & Burman, *A. asiellus*, β -frutofuranosidase.

Resumo:

A β -frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26), ou invertase, é uma enzima que não só catalisa a hidrólise de sacarose à glicose e frutose. Mas em algumas condições também é capaz de catalisar a transfrutossilacção para produzir frutooligosacarídeos (FOS) como a kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosilnistose (GF4). Invertases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes de açúcar invertido com alto teor de frutose e glicose a partir da sacarose como matéria-prima. Um método de se obter a invertase é através da Fermentação em Estado Sólido (FES) devido à sua simplicidade e proximidade das condições de crescimento natural de muitos microorganismos, especialmente fungos. Dentre os vários substratos citados na literatura para FES, como o farelo de trigo, a torta de coco e o babaçu estão à soja, que pode ser usada na forma de farelo ou grãos triturados. O objetivo deste trabalho compreendeu o estudo cinético da atividade da enzima β -frutofuranosidase obtida previamente de processo de FES com o microrganismo *Aspergillus asiellus*, usando como substrato o farelo de soja. A metodologia desse trabalho consistiu na aplicação de planejamentos fatoriais para a otimização dos parâmetros de determinação da atividade da β -frutofuranosidase como a temperatura, concentração inicial de enzima e de substrato, pH e tempo de incubação. A partir dos resultados dos planejamentos, concluiu-se que as variáveis fração volumétrica de extrato enzimático e o tempo de incubação influenciaram a atividade da invertase. Isto foi comprovado tanto no planejamento Plackett & Burman quanto no planejamento do tipo delineamento composto central rotacional - DCCR. Entretanto, para o tempo de incubação em ambos os planejamentos verificou-se que quanto menor o tempo de incubação maior a atividade enzimática.

Introdução

A invertase é uma enzima da classe das hidrolases, também denominada de β -frutofuranosidase. Dentre suas várias aplicações se

destaca a fabricação do açúcar invertido que tem grande importância industrial por ter poder adoçante superior ao da sacarose.

Em função da facilidade de produção, muitas enzimas são obtidas a partir de fermentações microbianas, sendo a produção de enzimas um dos campos da biotecnologia que mais tem avançado. Neste contexto, encontram-se as invertases que são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose e glicose a partir da sacarose como matéria-prima (Rubio et al., 2002). Segundo Chen e Liu (1996), a invertase obtida de plantas e fungos possui atividades enzimáticas muito similares. Estas enzimas têm sido bastante estudadas, especialmente as das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schwanniomyces occidentalis* (Fontana et al., 1992; Costaglioli et al., 1997) e dos fungos *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 (Hayashi et al., 1992) e *Aspergillus niger* (Romero-Gómez et al., 2000). Entretanto, não há referências quanto à produção de invertases pelo fungo *Aspergillus caseiellus* por FES.

Guimarães et al. (2007) produziram a enzima β -d-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) de *Aspergillus ochraceus*. A enzima foi purificada e caracterizada, sendo o pH e temperatura ótimas definidos como 4,5 e 60°C, respectivamente.

Nguyen et al. (2005) purificaram a β -fructofuranosidase a partir de *A. Níger* IMI 303386 e verificaram que a mesma é estável na faixa de pH 4,0 a 8,0 com pH ótimo de 5,5. A temperatura ótima foi de 50°C, sendo a enzima estável para valores acima de 55°C. Os autores obtiveram a enzima, aproximadamente 90% da atividade residual ficou mantida após 5h de incubação.

L'Hocine et al. (2000) purificaram e caracterizaram parcialmente a fructosiltransferase (FTS) e a invertase (INV) obtidas de *A. Níger* AS 0023 e obtiveram pH e temperatura ótimas de 5,8 e 50°C para a FTS, respectivamente e 4,4 e 55°C para a INV, respectivamente. Concluíram também que as atividades tanto da FTS como da INV eram dependentes da concentração de sacarose, sendo que a atividade de FTS aumentava com o aumento da concentração de sacarose, ao passo que a atividade de INV diminuía acentuadamente com o aumento da concentração de sacarose.

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a atividade da enzima β -fructofuranosidase obtida de FES de *A. caseiellus*, mediante a variação dos principais parâmetros operacionais envolvidos na análise de atividade, tais como fração volumétrica de enzima, concentração de substrato, tempo de incubação, pH e temperatura.

Materiais e Métodos

Extrato enzimático

Foi utilizado o extrato enzimático contendo a invertase obtida previamente por fermentação em FES a partir do fungo *Aspergillus caseiellus*, usando como substrato o farelo de soja. A FES foi conduzida em frascos

Erlenmeyer em estufa bacteriológica à 30°C, por 7 dias, com umidade inicial do meio de 50% e farelo enriquecido com sais.

Determinação da atividade enzimática

Preparou-se a solução de sacarose 0,6 M com tampão Maclluaine 50mM. Em um tubo de ensaio adicionou-se 500µL de solução de sacarose 0,6M e 500µL do extrato de enzima e levou-se a banho-maria a 40°C, por 15min. Adicionou-se 125µL de DNS para a quantificação dos açúcares liberados na hidrólise enzimática, conforme metodologia de Miller (1959). Após levou-se a banho fervente durante 5 minutos. Resfriou-se os tubos em água corrente. Adicione 1mL de água destilada a estes tubos. Fez-se a leitura da absorbância a 540nm, usando o como branco água no lugar da solução de sacarose. Mediante curva padrão de glicose, determinou-se os açúcares redutores liberados. Uma unidade de atividade de invertase é definida como a quantidade de micromoles de açúcares redutores liberados por volume da amostra enzimática sob as condições de ensaio descritas (U = µmol AR/mL).

Caracterização da invertase

Para a caracterização da invertase, foram feitos dois planejamentos experimentais. Inicialmente, foi usado o planejamento de Plackett & Burman, com 8 ensaios para avaliar 5 parâmetros: pH, temperatura (T, °C), concentração do substrato (C_S, M), fração volumétrica (X_{enz}, %v/v) da enzima e tempo de incubação (t_{inc}, min). Foram feitas triplicatas no ponto central para a estimativa do erro experimental. A Tabela 2 apresenta os valores codificados e reais dos parâmetros para o planejamento Plackett & Burman. Para a escolha dos valores dos parâmetros da Tabela 1, primeiramente definiu-se o valor do ponto central, e posteriormente os valores para os níveis inferiores e superiores.

Tabela 1 - Valores codificados e reais para o Planejamento Plackett & Burman

Variável	Nível		
	-1	0	+1
pH	2	6	10
T (°C)	35	60	85
C _S (M)	0,2	0,6	1,0
X _{enz} (%v/v)	7	36	64
t _{inc} (min)	10	35	60

Para a triplicata utilizou-se solução de sacarose em tampão fosfato pH 6,0 no ponto central com temperatura 60°C, concentração do substrato 0,6M, fração volumétrica da enzima de 36% e tempo de incubação de 35min.

O planejamento do tipo Plackett & Burman é do tipo saturado e permite apenas a seleção das variáveis significativas do estudo para então, na seqüência, utilizar outro planejamento com estas variáveis significativas.

Assim, realizou-se, em seguida, um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) com uma quadruplicata no ponto central (Rodrigues & lemma, 2005), considerando-se as variáveis significativas determinadas no primeiro planejamento. Este tipo de planejamento gera modelos não lineares (quadráticos). Finalmente, determinou-se o perfil cinético da invertase, onde se variou apenas o tempo de incubação, mantendo todos os outros parâmetros fixados em seus valores ótimos.

No planejamento de Plackett-Burman, para a execução dos ensaios de determinação da atividade enzimática, com diferentes pHs, preparou-se três soluções de sacarose com diferentes tampões. Para pH 2,0 utilizou-se tampão de Clark-Lubs, pH 6,0 tampão fosfato e para o pH 10,0 utilizou-se tampão Bórax-NaOH. Para a variação da concentração de sacarose utilizou-se soluções de 0,2 M, 0,6 M e 1,0 M.

Resultados e Discussão

Seleção de variáveis operacionais

Na Tabela 2, encontra-se a matriz do planejamento Plackett & Burman com os resultados da atividade de invertase, onde pode-se verificar que o ensaio que resultou em maior atividade foi o ensaio 4, com pH 2,0, T=85 °C, C_s=1,0 M, X_{enz}=64 % e t_{inc}=10 min. Por outro lado, o ensaio 2 resultou em menor atividade da enzima invertase sendo o pH 10, T=85°C, C_s= 0,2 M, X_{enz}= 7 % e t_{inc}= 60 min.

Fazendo a análise estatística dos dados, obteve-se a tabela de efeitos (Tabela 3), em que se verifica que os valores em negrito são significativos no intervalo de confiança de 95% (p< 0,05), isto é, a variável fração de enzima (X_{enz}) exerce influência positiva sobre a atividade de invertase e o tempo de incubação (t_{inc}) exerce influência negativa (sinal negativo) sobre a atividade de invertase.

Tabela 2 - Matriz de dados para o planejamento Plackett e Burman com os resultados de atividade da invertase

Experimento	pH	T (°C)	C _s (M)	X _{enz} (%v/v)	t _{inc} (min)	Atividade (U/mL)
1	1 (10)	-1 (35)	-1 (0,2)	1 (64)	-1 (10)	5,411
2	1 (10)	1 (85)	-1 (0,2)	-1 (7)	1 (60)	0,023
3	1 (10)	1 (85)	1 (1,0)	-1 (7)	-1 (10)	0,680
4	-1 (2)	1 (85)	1 (1,0)	1 (64)	-1 (10)	9,379
5	1 (10)	-1 (35)	1 (1,0)	1 (64)	1 (60)	1,406
6	-1 (2)	1 (85)	-1 (0,2)	1 (64)	1 (60)	1,804
7	-1 (2)	-1 (35)	1 (1,0)	-1 (7)	1 (60)	1,609
8	-1 (2)	-1 (35)	-1 (0,2)	-1 (7)	-1 (10)	2,579
9	0 (6)	0 (60)	0 (0,6)	0 (36)	0 (35)	2,862
10	0 (6)	0 (60)	0 (0,6)	0 (36)	0 (35)	2,848
11	0 (6)	0 (60)	0 (0,6)	0 (36)	0 (35)	3,131

Isto significa que para aumentar-se a atividade é necessário aumentar a concentração da enzima e diminuir o tempo de incubação.

Tabela 3 - Tabela de efeitos do planejamento Plackett & Burman

	Efeito	Erro padrão	t(5)	p	Coefficiente
Média/Interc.	2,88502	0,510529	5,65105	0,002410	2,88502
(1)pH	-1,96296	1,197296	-1,63949	0,162036	-0,98148
(2)T	0,22008	1,197296	0,18381	0,861382	0,11004
(3)Cs	0,81434	1,197296	0,68015	0,526619	0,40717
(4)X_{enz}	3,27729	1,197296	2,73724	0,040926	1,63864
(5)t_{inc}	-3,30169	1,197296	-2,75762	0,039947	-1,65085

Avaliação da influência da X_{enz} e t_{inc} sobre a atividade de invertase

A partir dos resultados do planejamento Plackett & Burman, em que se verifica a as variáveis fração volumétrica da enzima (X_{enz}) e tempo de incubação (t_{inc}) foram significativas, elaborou-se um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), conforme a Tabela 4. Nesse planejamento utilizou-se apenas 2 variáveis do planejamento anterior. Já que os parâmetros temperatura, pH e concentração do substrato não foram significativos no primeiro planejamento. Desta forma, fixou-se estes parâmetros nos seus valores ótimos: T = 60 °C e 0,5 mL da solução 0,2M de sacarose com pH 3,0. Na Tabela 4 são apresentados os novos níveis das variáveis, onde aumentou-se os valores de X_{enz} e diminuiu-se os valores de t_{inc} .

Comparando com os resultados obtidos de outros autores, verificamos que Guimarães et al. (2007) obtiveram β -d-fructofuranosidase de *Aspergillus ochraceus* com temperatura e pH ótimos de 4,5 e 60°C, respectivamente. Nguyen et al. (2005) obtiveram a mesma enzima a partir de *A. Níger* IMI 303386 com pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima de 50°C, sendo a enzima estável para valores acima de 55°C. L'Hocine et al. (2000) produziram invertase de *A. Níger* e obtiveram pH e temperatura ótima de 4,4 e 55°C, respectivamente. Assim, pode-se destacar que a invertase obtida neste trabalho, a partir de *A. caseiellus*, com valores ótimos de 60°C está de acordo com os resultados obtidos pelos autores citados. O pH 3,0 usado neste trabalho para o planejamento seguinte de DCCR, indica uma característica de invertase ácida.

Tabela 4 - Tabela de valores codificados e reais do planejamento DCCR

Variável	Nível				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
X_{enz} (%v/v)	28	34	50	66	72
t_{inc} (min)	5	9	20	31	35

Os resultados das atividades obtidas para cada ensaio no planejamento estão apresentadas na Tabela 5, junto à matriz do planejamento DCCR, onde pode-se verificar que no ensaio 2 obteve-se maior nível de atividade de invertase para uma fração de enzima igual a 66 % e um tempo de incubação de 9 min. Por outro lado, o ensaio que resultou em menor atividade, que corresponde à fração de enzima de 50 % e tempo de incubação de 35 min. Realizando a análise estatística dos dados obtidos no planejamento DCCR, verificou-se que, assim como no planejamento anterior, os valores destacados na Tabela 6 são significativos no intervalo de confiança de 95%. A variação da fração volumétrica da enzima (X_{enz}) linear exerce influência positiva sobre a atividade de invertase e o tempo de incubação (t_{inc}) exerce influência negativa sobre a atividade de invertase em sua parte linear e influência positiva em seu termo quadrático.

Tabela 5 - Matriz do planejamento DCCR, com resultado de atividade de invertase

Ensaio	X_{enz} (%v/v)	t_{inc} (min)	Atividade da Invertase (U/mL)
1	-1 (34)	-1 (9)	6,475
2	1 (66)	-1 (9)	10,284
3	-1 (34)	1 (31)	1,318
4	1 (66)	1 (31)	3,004
5	-1,414 (28)	0 (20)	2,075
6	1,414 (72)	0 (20)	3,720
7	0 (50)	-1,414 (5)	9,363
8	0 (50)	1,414 (35)	1,256
9	0 (50)	0 (20)	3,097
10	0 (50)	0 (20)	1,322
11	0 (50)	0 (20)	1,951
12	0 (50)	0 (20)	2,125

Tabela 6 - Tabela de efeitos do DCCR ($R^2 = 94,77\%$):

	Efeito	Erro padrão	t(6)	p	Coefficiente
Média/Interc.	2,12430	0,487796	4,35489	0,004797	2,12430
(1)X_{enz} (L)	1,95537	0,689900	2,83428	0,029790	0,97769
X_{enz} (Q)	1,35705	0,771436	1,75912	0,129053	0,67852
(2)t_{inc} (L)	-5,97597	0,689900	-8,66209	0,000131	-2,98799
t_{inc} (Q)	3,76980	0,771436	4,88673	0,002747	1,88490
1L by 2L	-1,06195	0,975592	-1,08852	0,318146	-0,53097

A análise de variância nos permite determinar se o modelo é satisfatório através do teste F (Tabela 7). Dado o valor de F tabelado (4,39), e calculando-se o F do modelo (21,754), percebe-se que como $F(\text{calc}) \gg F(\text{tab})$, ou $F(\text{calc})/F(\text{tab}) = 5$, então o modelo ajusta os dados experimentais de forma satisfatória.

Equação do Modelo da Atividade de Invertase=

$$2,12 + 0,98 \cdot X_{enz} - 2,98 \cdot t_{inc} + 1,88t_{inc}^2$$

Na Figura 1 encontra-se o gráfico da superfície de resposta onde percebe-se que nos pontos centrais os valores de atividade encontrados foram baixos, entretanto para altos valores de fração da enzima e para baixos tempos de incubação resultou em altos níveis de atividade de invertase, assim como se esperava pelos resultados apresentados na tabela de efeitos.

Tabela 7 - Análise de variância e teste F para verificar se o modelo é satisfatório

	SQ	GL	QM	F
Modelo	103,52	5	20,7	21,754
Resíduo	5,7107	6	0,95178	
Total	109,2336	11		

SQ=soma quadrática, GL=graus de liberdade, QM=quadrado médio.

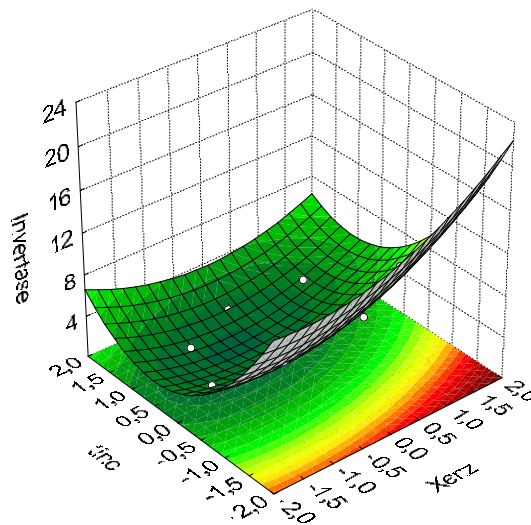


Figura 1 - Superfície de Resposta da invertase obtida para o DCCR

Varição temporal da atividade de invertase

Foi realizada uma curva cinética de invertase, variando apenas o tempo de incubação, fixando os demais parâmetros em seus valores ótimos, quais são: T=60°C, concentração de substrato 0,2M em pH 3,0 e 72 % de fração volumétrica de extrato enzimático, variando de zero a 10min, com amostras retiradas em intervalos de 1 min de incubação, para análise da invertase.

Na Tabela 8, encontram-se os valores de atividade da invertase pelo tempo de incubação, sendo que para o tempo de 1 minuto encontrou-se o maior valor de atividade da invertase (107,8 U/mL).

Tabela 8 - Resultados da cinética de invertase:

Tempo Inc. (min)	Atividade Invertase (U/mL)
1	107,8
2	52,9
3	34,2
4	24,7
5	19,3
6	14,5
7	12,9
8	11,4
9	10,2
10	8,9

Na figura 2 se percebe um comportamento decrescente da atividade da invertase em função do tempo de incubação, ou seja, a maior atividade foi para o tempo de 1 min, sendo que após este tempo houve um decaimento da atividade até ela chegar a um valor praticamente constante. Além disso, pode-se verificar que a ação da enzima é praticamente instantânea, ou seja, a invertase age sobre o substrato em um período de tempo muito curto.

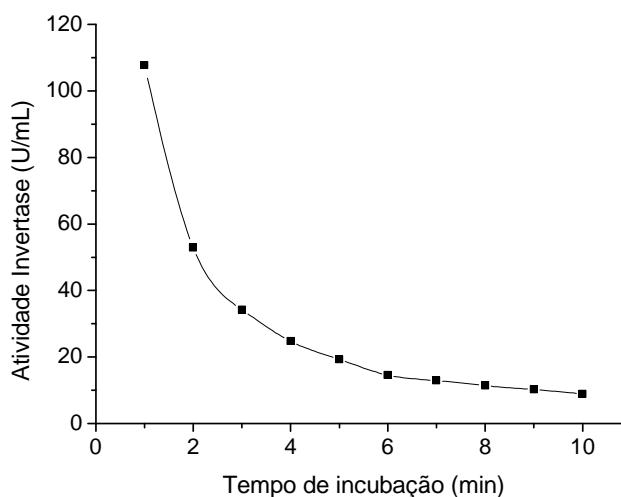


Figura 2 - Perfil temporal da invertase

Conclusões

A partir dos resultados dos planejamentos, pode-se concluir que as variáveis fração volumétrica de extrato enzimático e o tempo de incubação influenciaram a atividade da invertase. Isto foi comprovado tanto no planejamento Plackett & Burman quanto no DCCR. Entretanto, para o tempo de incubação em ambos os planejamentos verificou-se que quanto menor o tempo de incubação maior a atividade enzimática.

Fazendo a análise cinética, considerando os pontos ótimos para todas as variáveis estudadas, pH (3,0), concentração de substrato (0,2 M), temperatura (60 °C) e fração volumétrica de extrato enzimático (72 %), percebeu-se que a reação era muito rápida, sendo praticamente instantânea, já que a maior atividade obtida foi para o tempo de 1 min, assim como já se esperava pelos planejamentos dada a influência negativa do tempo de incubação.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Referências

- Chen, W. C. E Liu, C. H., Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18, 2, 153-160.
- Costaglioli, P.; Meilhoc, F.; Janatova, I.; Klein, R. E Masson, J. Secretion of invertase from *Schwanniomyces occidentalis*. *Biotechnology Letters*, 1997, 19, 623-627.
- Fontana, A.; Ghommidh, C.; Guiraud, J. E Navarro, J. Continuous alcoholic fermentation of sucrose using flocculating yeast - *The limits of invertase activity*. *Biotechnology Letters*, 1992, 14, 2, 505-510.
- Guimarães, L.H.S.; Terenzi, H.F.; Polizeli, M.L.T.M.; Jorge, J.A. Production and characterization of a thermostable extracellular β -d-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 42, 52–57.
- Hayashi, S.; Matsuzaki, K.; Takasaki, Y.; Ueno, H. E Imada, K. Purification and properties of beta-fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1992, 8, 3, 276-279.
- L'hocine, L.; Wang, Z.; Jiang, B.; Xu, S. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *Journal of Biotechnology*, 2000, 81, 73–84.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 1959, 31, 3, 426-428.

Nguyen, Q. D., Rezessy-Szabó, J.M., Bhat, M. H. Purification and some properties of β -frutofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochemistry*, 2005, 40, 2461-2466.

Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. Ed.: Casa do Pão (ed.) Campinas-SP; 2005, 326.

Romero-Gómez, S.; Augur, C. E Vinegra-González, G. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letter*, 2000, 22, 15, 1255-1258.

Rubio, M. C.; Runco, R. E Navarro, A. R. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, 2002, 61, 6, 605-609.