



Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARINE MASCENA PEIXOTO

PRODUÇÃO DE INULINASE PELA LEVEDURA
***Kluyveromyces marxianus* NRRLY-7571 EM XAROPE DE**
YACON

CRUZ DAS ALMAS – BA

NOVEMBRO 2012



Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM BIOLOGIA

CARINE MASCENA PEIXOTO

PRODUÇÃO DE INULINASE PELA LEVEDURA
***Kluyveromyces marxianus* NRRLY-7571 EM XAROPE DE**
YACON

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado ao Centro de Ciências
Agrárias, Ambientais e Biológicas da
Universidade Federal do Recôncavo da
Bahia como requisito à obtenção do título
de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Luciana Cazetta

CRUZ DAS ALMAS, BA

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

P379

Peixoto, Carine Mascena.

Produção de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* em xarope de yacon / Carine Mascena Peixoto. _
Cruz das Almas, BA, 2012.

52f.; il.

Orientadora: Márcia Luciana Cazetta.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais
e Biológicas.

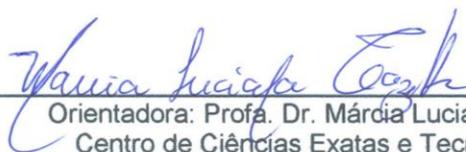
Carine Mascena Peixoto

PRODUÇÃO DE INULINASE PELA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* EM XAROPE DE YACON

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), apresentada como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Aprovada em 21 de Novembro de 2012.

Banca Examinadora



Orientadora: Profa. Dr. Márcia Luciana Cazetta
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Examinador 01: Profa. Dr. Norma Suely Evangelista Barreto
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Examinador 02: Profa. Msc. Aline Simões da Rocha Bispo
Universidade Estadual de Feira de Santana

Dedico

A Deus, autor da minha fé,

Ao meu esposo querido, pelo amor, atenção, paciência e incentivo,

A minha família, por sempre acreditarem em mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por se fazer presente em minha vida dando-me forças para prosseguir e guiando os meus passos pelos caminhos corretos, enchendo minha vida com sua presença sempre me fazendo acreditar que os meus sonhos seriam capazes, e me ajudando a concluir mais uma etapa da minha vida.

Ao meu esposo Messias, pelo amor que sempre me dedicou, pelo apoio, incentivo e paciência nesses anos de graduação! Obrigado pela sua compreensão em meio a tantas lutas que foram nossas e que superamos juntos!

Aos meus pais e irmãos pelo amor e carinho de sempre! Pela formação e conselhos durante esta caminhada que me fizeram acreditar ser capaz!

Agradeço à minha orientadora, Márcia Luciana Cazetta, pelo incentivo, dedicação e aprendizado que me fizeram crescer como profissional, dedicando-me seu tempo sempre que necessário, pois foste um exemplo nesta caminhada!

A todos os meus professores do curso de biologia, que são verdadeiros mestres no ensinar! E como não poderia esquecer, obrigada ao professor Márcio Lacerda pelas orientações iniciais nesta trajetória!

Aos amigos que fiz durante o curso, pela verdadeira amizade que construímos em particular aqueles que estavam sempre ao meu lado, em especial Eliane, Mônica, Leonardo que fizeram com que essa caminhada se tornasse mais especial ao lado deles!

Aos amigos de laboratório, Juliana, Èrcia, Tiago, Tiaguinho, Thiara e principalmente Luana que foi mais que uma amiga, me ensinando e ajudando nos trabalhos do laboratório! Muito obrigada!

Enfim, a todos que fizeram parte dessa trajetória e realização!

Muitíssimo obrigada!

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço que a minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e tornar-se autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não".

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo... "

(Fernando Pessoa)

RESUMO

As leveduras são fungos unicelulares que apresentam uma grande diversidade sendo conhecidas por suas aplicações industriais, principalmente na produção de enzimas. As leveduras do gênero *Kluyveromyces* são descritas por sua capacidade de produzir a enzima inulinase, que é utilizada para hidrolisar o polímero de inulina em até 95% de frutose pura e vêm sendo estudadas por muitos pesquisadores a fim de se elevar a produção desta enzima empregando substratos a base de inulina como o xarope de yacon. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de inulinase utilizando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio pela levedura *K. marxianus* NRRLY 7571, além de acompanhar a evolução do pH e o crescimento celular no final do processo fermentativo e realizar a caracterização parcial da enzima determinando temperatura e pH ótimo e termoestabilidade. Neste estudo, foi obtido uma atividade enzimática de 56,66 U/mL e uma produção de biomassa 76,25 g/L após 96 horas de fermentação. A caracterização parcial da enzima mostrou que a temperatura de 60°C e o pH 5,0 foram considerados os melhores parâmetros reacionais para esta enzima, como também, apresentou estabilidade térmica durante os 30 minutos iniciais de reação nas temperaturas de 50°C, 55°C e 60°C. O xarope de yacon apresentou-se como substrato viável para produção de inulinase e biomassa.

Palavras chave: Fermentação, enzimas, micro-organismos.

ABSTRACT

Yeast are unicellular fungi that differ widely been known for their industrial applications, particularly in the production of enzymes. Yeasts of the genus *Kluyveromyces* are described for their ability to produce the enzyme inulinase, which is used to hydrolyze the polymer inulin up to 95% pure and fructose have been studied by many researchers in order to increase the production of this enzyme substrates employing as the base inulin syrup yacon. This work aimed to study the production of inulinase using yacon syrup as carbon source and yeast extract as nitrogen source by the yeast *K. marxianus* NRRLY 7571, as well as monitor the pH and cell growth by the end of the fermentation process and perform partial characterization of enzyme determining temperature and pH optimum and thermostability. In this study, one was obtained enzymatic activity of 56.66 U / mL and a biomass yield 76.25 g / L after 96 hours of fermentation. Partial characterization of the enzyme showed that at 60 ° C and pH 5.0 were considered the best reaction parameters for this enzyme, but also showed thermal stability during the first 30 minutes of reaction at temperatures of 50 ° C, 55 ° C and 60 ° C. The syrup yacon presented as viable substrate for production of inulinase and biomass.

Keywords: Fermentation, enzymes, microorganism

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura do polissacarídeo inulina. (Fonte: [www.Albanesi.it/ Alimentazione/ inulina.htm](http://www.Albanesi.it/Alimentazione/inulina.htm))..... 5
- Figura 2:** Estrutura dos principais frutooligossacarídeos (FOS): A) cestose;B) nistose e C) frutofuranosil nistose. (Fonte: www.scielo.br/scielo.php)..... 6
- Figura 3:** Reprodução assexuada de leveduras por brotamento. (Fonte: <http://www.Grupoescolar.com/materia/fungos.html>; microbiovirtual.blogspot.com/2010_05_01_archi..z.)..... 9
- Figura 4:** Reprodução assexuada de leveduras por fissão binária. (Fonte: marcianomercy.blogspot.com)..... 9
- Figura 5:** Diagrama de Pareto da atividade enzimática produzida pela *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de Carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação..... 21
- Figura 6:** Valores preditos e observados para atividade enzimática produzida pela *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de Carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação..... 20
- Figura 7:** Gráfico de superfície de resposta da atividade inulinolítica produzida por *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de Carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação..... 21
- Figura 8:** Gráfico de curvas de contorno da atividade inulinolítica produzida pela *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de Carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação..... 22
- Figura 9:** Diagrama de Pareto da produção de biomassa pela levedura *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação..... 25
- Figura 10:** Valores observados e valores preditos para produção de biomassa pela levedura *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação.....26

Figura 11: Gráfico de superfície de resposta da produção de biomassa pela levedura <i>K. marxianus</i> usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação.....	27
Figura 12: Gráfico de curvas de contorno da produção de biomassa por <i>K. marxianus</i> usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação.....	27
Figura 13: Efeito da temperatura da atividade inulolítica produzida pela levedura <i>K. marxianus</i> NRRL-Y 7571, utilizando xarope de yacon e extrato de levedura como substratos.....	30
Figura 14: Termoestabilidade observada na enzima inulinase produzida pela levedura <i>K. marxianus</i> usando xarope de yacon e extrato de levedura como substratos.....	31
Figura 15: Efeito da variação de pH na atividade da enzima inulinase produzida pela levedura <i>K. marxianus</i> NRRL-Y 7571, utilizando xarope de yacon e extrato de levedura como substratos.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso fresco inulina (%) em plantas utilizadas na alimentação humana. (Fonte: VAN LOO et al., 1995 apud GALANTE, 2008).....	4
Tabela 2: Principais leveduras do gênero <i>Kluyveromyces</i> produtoras da enzima inulinase. (¹ FS: Fermentação Submersa; ² FES: Fermentação em Estado Sólido). (Mazutti, 2007).....	11
Tabela 3: Valores utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional 2 ²	15
Tabela 4: Delineamento Composto Central Rotacional 2 ² para produção da enzima inulinase.....	15
Tabela 5: Atividade enzimática da inulinase, produção de biomassa e efeito do pH produzido pela <i>K. marxianus</i> usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.....	18
Tabela 6: Efeitos estimados para produção de inulinase pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> utilizando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação.....	19
Tabela 7: ANOVA calculada da atividade enzimática produzida pela <i>K. marxianus</i> usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.....	21
Tabela 8: Efeitos estimados para produção de biomassa pela levedura <i>K. marxianus</i> usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.....	25
Tabela 9: ANOVA calculada da biomassa produzida pela levedura <i>K. marxianus</i> usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.....	26

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Inulina.....	3
2.2. Enzima inulinase.....	5
2.3. Leveduras.....	8
3. JUSTIFICATIVA	12
4. OBJETIVOS	13
4.1. Objetivo geral.....	13
4.2. Objetivos específicos.....	13
5. METODOLOGIA	14
5.1. Micro-organismo e manutenção.....	14
5.2. Estudo da produção de inulinase em fermentação submersa.....	14
5.3. Atividade enzimática.....	16
5.4. Crescimento celular.....	16
5.5. Determinação do pH.....	16
5.6. Determinação do perfil ótimo de temperatura.....	17
5.7. Determinação do perfil ótimo de pH.....	17
5.8. Termoestabilidade.....	17
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6.1. Produção enzimática.....	18
6.2. Produção de biomassa.....	24
6.3. Efeito do pH nos ensaios.....	28

6.4. Caracterização enzimática.....	29
6.4.1. Perfil ótimo de temperatura e termoestabilidade.....	29
6.4.2. Perfil ótimo de pH.....	32
7. CONCLUSÕES.....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

As leveduras estão classificadas dentro do Reino Fungi como micro-organismos eucariotos unicelulares e microscópicos, e vêm sendo utilizadas há milhares de anos pelo homem, na fabricação de pães, vinho e cerveja através do processo de fermentação, o qual é usado para se retirar energia dos açúcares destes alimentos na ausência de oxigênio, tendo como produto final o etanol ou o CO₂ (TORTORA, FUNKE e CASE, 2006).

Atualmente, além dos alimentos as leveduras são muito utilizadas para produção de biocombustíveis, pigmentos, polissacarídeos e enzimas, sendo citadas como os micro-organismos mais promissores para a produção da enzima inulinase (GRZYBOWSKI, 2008).

Pesquisas realizadas recentemente indicam que certas espécies de leveduras são capazes de sintetizar a enzima inulinase, que tem a propriedade de hidrolisar o polímero inulina em frutose praticamente pura (concentrados de até 95% de frutose), o qual é um açúcar com poder adoçante maior que o da sacarose e, por isso, é largamente utilizado na indústria de alimentos (PESSONI et al., 2004).

O interesse por esta enzima tem aumentado também devido à sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos (FOS), considerados fibras solúveis com elevado poder prebiótico, além da produção de bioetanol. Outra vantagem da inulinase é que esta enzima não é específica para inulina, atuando também nas ligações glicosídicas de outros açúcares como sacarose, rafinose e estaquiose (CHI et al., 2011).

A inulina é um polissacarídeo de reserva vegetal e apresenta um custo relativamente elevado no mercado, pois é encontrada em poucos tipos de plantas, tais como nos tubérculos de chicória (*Cichorium intybus*), dália (*Dhalia pinnata*), alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) e yacon (*Polymnia sonchifolia*) (OLIVEIRA et al., 2004; CHI et al., 2011).

Porém, a produção desta enzima no Brasil pode ser obtida utilizando-se substratos de baixo custo, como por exemplo, a sacarose e resíduos agro-industriais como a cana-de-açúcar e a milhocina (SILVA-SANTISTEBAN e MAUGERI FILHO, 2005).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* vem sendo empregada por vários pesquisadores (KALIL et al., 2001; TREICHEL, 2004; CAZETTA, 2005; CAZETTA et

al., 2005; MENDES, 2006; MAZUTTI, 2007; OLIVEIRA, 2012) através de estudos de otimização e ensaios fermentativos para a obtenção da enzima inulinase utilizando substratos de baixo custo.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de inulinase utilizando xarope de yacon (meio complexo) como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 7571, além de estudar o seu comportamento neste meio de cultivo avaliando o crescimento celular, o pH, e realizar a caracterização enzimática da inulinase.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Inulina

De um modo geral, as pessoas estão mais conscientes da relação que existe entre alimentação e saúde, e por isso a indústria vem buscando novas alternativas para o desenvolvimento de alimentos de boa aceitabilidade e com benefícios múltiplos associados ao sabor e aparência (HAULY e MOSCATTO, 2002; FUCHS et al., 2005).

Novos ingredientes têm sido investigados para atenderem às exigências do mercado consumidor atual, que almeja produtos com qualidade sensorial, além de produtos nutritivos que trazem benefícios para a saúde. A inulina é um carboidrato bastante utilizado na indústria alimentícia, pois apresenta propriedades promotoras de saúde, além de poder melhorar os aspectos sensoriais nos alimentos (MOSCATTO, PRUDÊNCIO-FERREIRA e HAULY, 2004).

Entre os oligossacarídeos, a inulina tem se destacado, pois tem sido estudada nos últimos anos em relação ao seu uso em alimentos e seus efeitos fisiológicos associados aos seres humanos, sendo encontrada como reserva de carboidrato em muitas plantas dicotiledôneas (RUPÉREZ, 1998).

Inicialmente a aplicação da inulina na indústria de alimentos ocorreu na produção de bebidas similares ao café, pois ela apresenta sabor amargo. Porém, descobriu-se que esse polímero pode atuar como substituto do açúcar com a vantagem de não resultar no aumento de calorias. Além disso, a inulina apresenta, também, algumas propriedades funcionais, atuando no organismo de maneira similar às fibras dietéticas, contribuindo para melhorar as condições do sistema gastrointestinal (OLIVEIRA et al., 2004).

A inulina é um alimento nutracêutico apresentando inúmeros benefícios, tanto em indivíduos saudáveis como em enfermos, tais como a prevenção de câncer do trato gastrointestinal, controle glicêmico, melhora da imunidade e benefícios sobre os níveis de triglicérides e colesterol sanguíneo prevenindo assim doenças cardiovasculares. Além disso, ao contrário dos outros nutrientes pertencentes à classe dos Frutooligossacarídeos (FOS), a inulina é resistente à ação das enzimas gástricas, não sofrendo digestão no estômago, chegando assim intacta ao intestino, influenciando diretamente a função intestinal (D'AVILA, 2012).

De acordo com Oliveira et al. (2004), a inulina é um polímero encontrado na natureza como carboidrato de reserva em algumas plantas. Porém, este polissacarídeo é encontrado em porcentagens maiores (20% do peso fresco) apenas em certas plantas como a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.), chicória (*Cichorium intybus* L.), dália (*Dhalia pinnata*) e yacon (*Polymnia sanchifolia*) e, por isso, apresenta um custo relativamente alto no mercado (Tabela 1).

Tabela 1: Peso fresco de inulina (%) em plantas utilizadas na alimentação humana.

Plantas	Parte comestível	Inulina (%)
Cebola	Bulbo	2-6
Alcachofra de Jerusalém	Tubérculo	16-20
Chicória	Raiz	15-20
Alho-porro	Bulbo	3-10
Alho	Bulbo	9-16
Alcachofra	Folhas centrais	3-10
Banana	Fruta	0,3-0,7
Centeio	Cereal	0,5-10
Cevada	Cereal	0,5-1,5
Dente de leão	Folhas	12-15
Yacon	Tubérculo	3-19
Barba de bode	Folhas	4-11
Trigo	Cereal	1-4

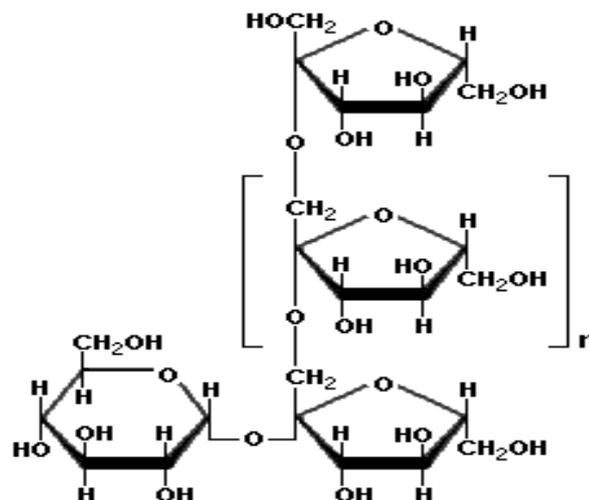
Fonte: VAN LOO et al., 1995 apud GALANTE, 2008.

Em países europeus a chicória vem sendo utilizada com maior frequência para a produção industrial da inulina, já que ela apresenta características industriais importantes, tais como à sua estabilidade na produção de cadeias longas de glicose e frutose e sua constante produção, mesmo em condições de clima moderado (OLIVEIRA et al., 2004).

Como a inulina é produzida apenas no exterior, toda inulina encontrada no Brasil é importada e, por isso, é necessária sua aprovação pelos órgãos responsáveis, o que faz com que sua aquisição seja onerosa (D'AVILA, 2012).

A inulina pertence ao grupo das frutanas e é um polímero linear com ligações glicosídicas $\beta(2-1)$, sendo constituída de uma mistura de polímeros e oligômeros lineares de frutose. Suas unidades de β -D-frutofuranosil são mantidas entre si por ligações do tipo $\beta(2-1)$, apresentando uma molécula de glicose na porção inicial da cadeia linear de frutose, unida por uma ligação tipo $\alpha(1-2)\beta$ (HAULY e MOSCATTO, 2002; SAAD, 2006) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura do polissacarídeo inulina.



Fonte: www.albanesi.it/Alimentazione/inulina.htm

A inulina é uma fonte potencial para a produção industrial de concentrados de frutose e sua hidrólise é realizada pela ação de enzimas denominadas inulinases (exoinulinase e endoinulinase) que são secretadas, em condições ótimas, por leveduras (RIBEIRO et al., 2010).

2.2. Enzima inulinase

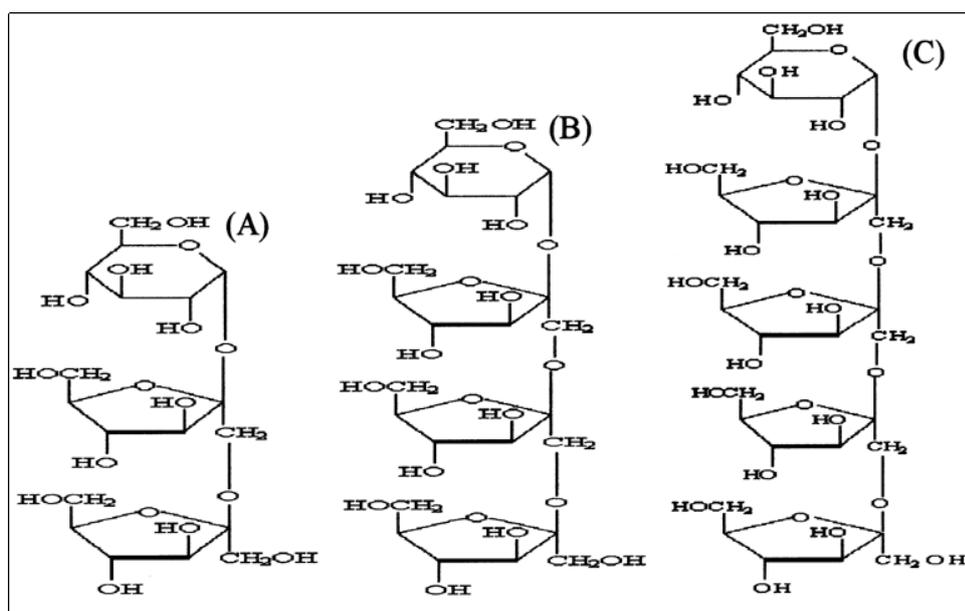
O interesse pela inulinase (β -D frutanofrutanohidrolase) iniciou-se com a descoberta de sua habilidade de hidrolisar inulina em concentrados de frutose. Porém a obtenção da frutose é devidamente onerosa, pois a produção deste

polímero ocorre pela hidrólise do amido através de um processo que envolve três etapas enzimáticas usando alfa-amilase, amiloglicosidase e glicose isomerase, o que onera o custo da sua produção (PESSONI et al., 2004).

Uma alternativa para a produção de concentrados de frutose é a hidrólise enzimática da inulina pela enzima inulinase, que de maneira vantajosa e econômica, pode ocorrer em uma única etapa enzimática obtendo-se concentrados com até 95% de frutose, o qual apresenta grande importância na indústria alimentícia já que é considerada uma alternativa segura como adoçante em relação à sacarose por possuir maior poder adoçante, menor cariogenicidade e teor calórico, e por esta razão é largamente utilizada no setor alimentício (PESSONI et al., 2004; MAKINO et al., 2005; SANTIAGO e SOUZA-MOTA, 2006).

Existem dois tipos de inulinase capazes de hidrolisar o polímero inulina: exoinulinase (β -D-frutanohidrolase) e endoinulinase (2,1- β -D frutanohidrolase). As exoinulinases hidrolisam a inulina liberando resíduos de frutose e, por isso são monomerizantes, enquanto que as endoinulinases quebram as ligações frutosídicas ao acaso produzindo inulotriose, inulotetraose e inulopentaose (Figura 2) e a série subsequente que são os fruto-oligossacarídeos (FOS), como produtos principais dessa hidrólise (GRZYBOWSKI, 2008).

Figura 2: Estrutura dos principais frutooligossacarídeos (FOS): A) cestose; B) nistose e C) frutofuranosil nistose. **Fonte:** www.scielo.br/scielo.php.



A inulina e o FOS são quimicamente similares apresentando as mesmas propriedades funcionais. Essas semelhanças estão relacionadas à estrutura básica dessas moléculas e as suas diferenças estão relacionada ao número de unidades de monossacarídeos que constituem essas moléculas (2 a 150 subunidades de frutose na inulina e inferior a 10 subunidades de frutose no FOS) (SAAD, 2006).

Os FOS classificam-se como fibras solúveis com propriedades de atuar no desenvolvimento da microbiota intestinal benéfica, além de evitar o desenvolvimento de vários tipos de cânceres intestinais. Assim, devido a estas propriedades, os FOS têm sido utilizados como suplementos alimentares em iogurtes, queijos, bebidas não alcoólicas, entre outros (SAAD, 2006; D'ÁVILA, 2012).

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos que tem como principal unidade monomérica a frutose em diferentes graus de monomerização, sendo normalmente encontrados em vegetais. Entre os alimentos ricos em oligossacarídeos estão o alho, a cevada, o mel, a banana, entre outros, podendo também serem produzidos comercialmente pela ação de enzimas, tais como a enzima frutofuranosidade e inulinase sobre a sacarose ou inulina (OETTERER, REGITANO-D'ARCE e SPOTO, 2006).

Existem duas alternativas para obtenção da inulinase: através da extração de vegetais, a qual apresenta um baixo rendimento, aumentando o valor comercial da enzima, ou a produção de inulinase através de processos fermentativos, sendo uma alternativa a esse impasse, uma vez que, bioprocessos apresentam como principais vantagens a facilidade de produção das enzimas, produção contínua durante todo o ano e possibilidade da utilização de substratos de baixo custo (TREICHEL, 2004).

A obtenção desta enzima no mercado exterior é realizada principalmente usando este polímero (inulina) como fonte de carbono, o qual apresenta um custo relativamente elevado. Porém, no Brasil, a produção desta enzima a partir de resíduos industriais como a cana-de-açúcar e o milho poderá ter grande apelo econômico, devido à abundância e ao baixo custo destes subprodutos, apresentando todas as características para ser a melhor alternativa para produção de álcool na entressafra de cana-de-açúcar (TREICHEL, 2004; MAZUTTI, 2007).

O seu emprego a nível industrial é promissor, pois ela apresenta uma série de características interessantes, dentre elas sua grande estabilidade diante das variações de temperatura, pH e tempo de estocagem. Pelo fato da inulinase ser uma

enzima de uso industrial, é preciso que os processos para sua obtenção e purificação sejam economicamente viáveis (JUNIOR, 1995).

Pesquisas realizadas mostram que esta enzima pode ser obtida de vários micro-organismos, dentre eles as bactérias (ZHEREBTSOV, SHELAMOVA e ABRAMOVA, 2002; SHARMA, KAINTH e GILL, 2006; DILIPKUMAR, RAJASIMMAN e RAJAMOHAN, 2011), os fungos (JING, ZHENGYU e AUGUSTINE, 2003; SOUZA-MOTTA et al., 2005; SKORONEK e FIEDUREK, 2006; DINARVAND et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2012) e as leveduras (KALIL et al., 2001; CAZETTA, 2005; CAZETTA et al., 2005 b; MENDES, 2006; CAZETTA, MONTI e CONTIERO, 2010; RIBEIRO et al., 2010; JAIN, JAIN e KANGO, 2012; OLIVEIRA, 2012).

Inicialmente as inulinases foram purificadas a partir de plantas, porém as quantidades resultantes desse processo foram insuficientes para serem exploradas comercialmente. Devido a esse motivo, inulinases produzidas pelas leveduras, principalmente as do gênero *Kluyveromyces* (a mais estudada para a produção desta enzima), têm recebido especial atenção na última década, pois esses micro-organismos podem ser induzidos pelas condições de cultivo (PESSONI et al., 2004).

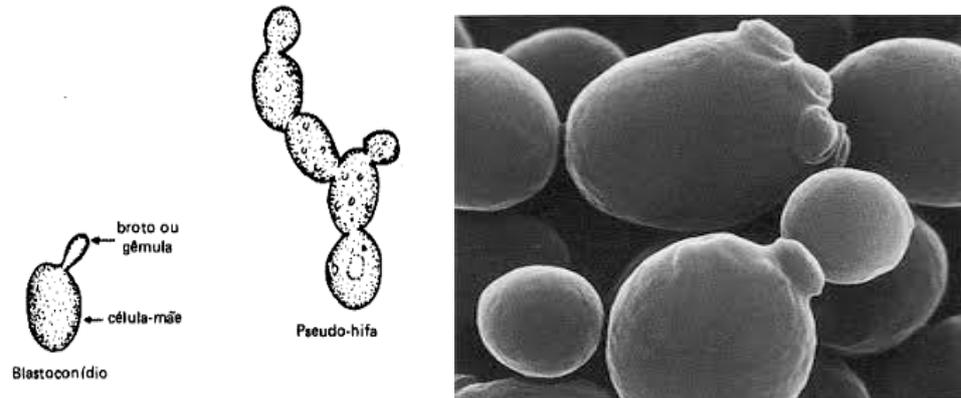
2.3. Leveduras

As leveduras são fungos microscópicos, unicelulares, eucariotos, não filamentosos, conhecidas vulgarmente como fermentos e amplamente distribuídas na natureza tanto na água, no ar, no solo, como em animais e plantas, sendo principalmente encontradas em frutas e flores. Estão distribuídas dentro de dois Filos do Reino Fungi, denominados Ascomycota e Basidiomycota (TORTORA, FUNKE e CASE, 2006). Apresentam-se em diversas formas, podendo ser esféricas, cilíndricas ou triangulares e, assim como os bolores, as leveduras são tão benéficas quanto prejudiciais. As leveduras não apresentam flagelo, e por isso, são imóveis. Esses micro-organismos apresentam dimensões variadas em relação à espécie, nutrição e idade (PELZAR, CHAN e KRIEG, 1996; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; OETTERER, REGITANO-D'ARCE e SPOTO, 2006; FRANCO e LANGRAF, 2008; GAVA, SILVA e FRIAS, 2008).

As leveduras reproduzem-se por dois processos denominados brotamento e fissão binária. No brotamento, a célula parental forma uma protuberância (broto) na sua superfície externa e, à medida que o broto se desenvolve, o núcleo da célula parental se divide e um dos núcleos migra para o broto. O material da parede celular

é então sintetizado entre o broto e a célula parental, e o broto acaba se separando (Figura 3) (TORTORA, FUNKE e CASE, 2006).

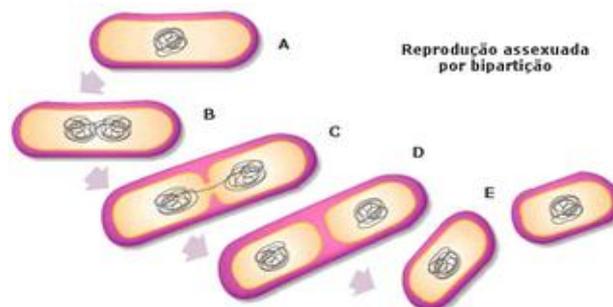
Figura 3: Reprodução assexuada de leveduras por brotamento.



Fonte: <http://www.grupoescolar.com/materia/fungos.html>; microbiovirtual.blogspot.com/2010_05_01_archi..z.

Uma célula de levedura pode produzir mais de 24 células-filhas por brotamento. Algumas produzem brotos que não se separam uns dos outros, formando uma pequena cadeia de células chamadas pseudo-hifas. Para dobrarem a massa celular, através da formação de brotos levam, em geral, de duas a três horas, em condições ótimas (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008). As leveduras que se reproduzem por fissão binária (ou bipartição), como *Schizosaccharomyces*, dividem-se produzindo duas novas células iguais (Figura 4). Durante esse processo, as células parentais se alongam, seus núcleos se dividem, e duas células-filhas são produzidas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2006).

Figura 4: Reprodução assexuada de leveduras por fissão binária.



Fonte: marcianomercy.blogspot.com

As leveduras diferem dos outros grupos de fungos por serem unicelulares e não apresentarem hifas, e se diferem das bactérias por possuírem dimensões maiores e em virtude de suas propriedades morfológicas. Além disso, esses micro-organismos diferem das algas, pois não realizam fotossíntese, como também não são considerados protozoários já que possuem uma parede celular mais rígida constituída de quitina (PELZAR, CHAN e KRIEG, 1996; TORTORA, FUNKE e CASE, 2006).

As leveduras estão normalmente envolvidas em processos de deterioração de vários tipos de alimentos tais como frutas, hortaliças, laticínios, bebidas alcoólicas, refrigerantes e mel, sendo que meios com pH ácido favorecem o seu desenvolvimento (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008).

As leveduras são capazes de crescimento anaeróbico facultativo, podendo utilizar oxigênio ou outro componente orgânico como aceptor final de elétrons. Esse é um atributo valioso porque permite que esses fungos sobrevivam em vários ambientes (TORTORA, FUNKE e CASE, 2006).

A maioria das leveduras apresentam funções benéficas, em especial na produção de alimentos. Estes micro-organismos vêm sendo utilizados pelo homem há milhares de anos na fabricação do pão, da cerveja e do vinho, sendo estes produtos os mais expressivos produzidos pelo processo de manipulação das leveduras ao longo do tempo (TORRES e MORAES, 2000).

Desde 2.600 anos antes de Cristo, os egípcios usando estes micro-organismos já apresentavam e dominavam a tecnologia de fabricação de pães, enquanto que Pasteur conseguiu caracterizar a levedura como um organismo vivo com características próprias, descobrindo sua atuação na transformação de açúcares através do processo de fermentação. Estes micro-organismos são as fontes mais antigas de proteínas unicelulares consumidas pelo homem através de produtos oriundos da fermentação (PANDEY, 1992; COSTA, 2004).

Todavia, foi na década de 1940 a 1950 que ocorreu o desenvolvimento da fermentação industrial, com a produção da penicilina pelo fungo *Penicillium* sp. A partir de então, as leveduras tem apresentado um papel de destaque nos processos fermentativos, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* seu principal representante, já que é considerada um dos micro-organismos mais úteis ao homem, pois é um dos sistemas eucarióticos mais bem conhecidos (TORRES e MORAES, 2000).

Atualmente, além dos alimentos as leveduras são muito utilizadas para produção de biocombustíveis, pigmentos, polissacarídeos e enzimas, sendo citadas como os micro-organismos mais promissores para a produção da enzima inulinase, principalmente as do gênero *Kluyveromyces* (GRZYBOWSKI, 2008).

A tabela abaixo apresenta um resumo das principais leveduras do gênero *Kluyveromyces* produtoras de inulinase publicados nos últimos anos, mostrando os principais substratos empregados e a produção máxima alcançada em cada trabalho.

Tabela 2: Principais leveduras do gênero *Kluyveromyces* produtoras da enzima inulinase.

Levedura	Substratos	Formas de cultivo	Produção	Referência
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 16045	Sacarose, peptona, extrato de levedura	FS ¹	127 U/mL	KALIL et al. (2001)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 16045	Sacarose, extrato de levedura, peptona, K ₂ HPO ₄	FS ¹	176 U/mL	SILVA-SANTISTEBAN et al. (2005)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRLL Y-7571	Bagaço de cana, água de maceração de milho	FES ²	392 U/mL	MAZUTTI et al. (2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRLL Y-7571	Melaço de cana, água de maceração de milho, extrato de levedura	FS ¹	1300 U/mL	TREICHEL (2004)
<i>Kluyveromyces Marxianus</i> NRLL Y-7571	Melaço de cana, água de maceração de milho, extrato de levedura	FS ¹	974 U/mL	MENDES (2006)

¹FS: Fermentação Submersa; ²FES: Fermentação em Estado Sólido. **Fonte:** (Mazutti, 2007).

Assim, devido à importância da enzima inulinase e à necessidade de diminuir os custos de produção, este trabalho teve como objetivo estudar substratos alternativos, como xarope de yacon, na produção da enzima pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRLY-7571, e otimizar sua produção utilizando ferramentas estatísticas.

3. JUSTIFICATIVA

O interesse pela inulinase surgiu devido a sua capacidade de hidrolisar o polímero inulina em frutose praticamente pura (95%), que é um açúcar com poder adoçante maior que o da sacarose e, por isso, tem grande importância na indústria de alimentos. Outra vantagem é que esta enzima não é específica para inulina, atuando também nas ligações glicosídicas de outros açúcares como sacarose, rafinose e estaquiose. O interesse por esta enzima tem aumentado também devido à sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos (FOS), considerados fibras solúveis com elevado poder prebiótico, além da produção de bioetanol.

Devido ao elevado custo da inulina, tem se buscado fontes renováveis e baratas para a produção desta enzima. No Brasil, subprodutos agro-industriais como o melão de cana-de-açúcar e a milhocina são substratos considerados promissores para a produção desta enzima, devido ao seu elevado conteúdo nutricional, sua abundância e baixo custo. Entretanto são crescentes os estudos de produção de inulinase com inulina e, para isso, vem sendo pesquisadas fontes mais baratas deste polímero. São vários os trabalhos recentes na literatura que descrevem a produção de inulinase e bioetanol com alho, chicória e alcachofra de Jerusalém.

No Brasil, a inulina pode ser encontrada nos tubérculos da planta yacon (*Polymnia sonchifolia*), cujo consumo é crescente, uma vez que os tubérculos desta planta são uma boa fonte de fibras prebióticas, que podem ser consumidos por diabéticos, não resultando na elevação da glicemia no sangue. Além dos tubérculos, a inulina já pode ser encontrada no xarope e na farinha de yacon. O xarope de yacon nunca foi testado como substrato para síntese de inulinase, sendo uma potencial fonte desta enzima com grande aplicação industrial, já que este substrato constitui-se de meio complexo apresentando nutrientes em sua composição. As leveduras são citadas como os micro-organismos mais promissores para a produção de inulinase, principalmente as do gênero *Kluyveromyces*, o mais estudado para esta finalidade.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Otimizar a produção de inulinase e biomassa utilizando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 7571.

4.2. Objetivos específicos

- Testar diferentes concentrações de xarope de yacon e extrato de levedura e verificar a influência dessas variáveis na produção da inulinase.
- Acompanhar o crescimento celular e a evolução do pH em cada condição experimental no final do processo fermentativo.
- Realizar a caracterização parcial da enzima: determinar temperatura e pH ótimo e estabilidade térmica.

5. METODOLOGIA

5.1. Micro-organismo e manutenção

Foi utilizado durante os experimentos a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 7571, adquirida na Fundação André Toselo, Campinas – SP, sendo mantida em meio líquido composto de extrato de levedura 0,3%; extrato de malte 0,3%; peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1% e glicerol 20 %, a -80°C.

Inicialmente, a levedura foi inoculada em placas de Petri contendo meio Ágar Extrato de Malte-Levedura (YMA) e incubada para crescimento em B.O.D. durante 24 horas a 28°C. Posteriormente, a cultura foi repicada em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de pré-inóculo composto de: sacarose 1,0%; extrato de levedura 0,5%; KH₂PO₄ 0,5%; NH₄Cl 0,15%; KCl 0,12%; MgSO₄.7H₂O 0,07% e incubada a 28°C por 24 horas a 150 rpm. Após as 24 horas de cultivo esse meio contendo a levedura em tubo de ensaio foi misturada, em 50 mL do mesmo meio em frasco Erlenmeyer, o qual foi incubado durante 24 horas a 28°C sob agitação de 150 rpm em câmara agitadora.

5.2. Estudo da Produção de Inulinase em Fermentação Submersa

As fermentações com a levedura foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 30 mL de meio de cultura, utilizando como fonte de carbono o xarope de yacon e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Os frascos de Erlenmeyers foram colocados em uma incubadora shaker a 28±2°C, 150 rpm, durante 96 horas. O pH dos meios de cultivo foram inicialmente ajustados para 5,0 com ácido-ortofosfórico.

As fermentações ocorreram em condições de cultivo variadas, onde foram estudadas diferentes concentrações das fontes de carbono e nitrogênio, a fim de se determinar as melhores condições de fermentação, através de metodologia estatística de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), de acordo com a matriz do planejamento fatorial 2² (tabelas 3 e 4), segundo Rodrigues e Lema (2009).

Essa metodologia experimental foi escolhida, pois permite o estudo de todas as combinações possíveis entre as variáveis escolhidas (Tabela 4). Esse delineamento fatorial é denominado 2², pois trabalha com dois níveis (+1 e -1), mais um ponto central (0). O ponto central é o único onde serão realizadas 3 repetições, para determinação do rigor da metodologia. Além disso, serão estudadas 2

variáveis: fonte de carbono e fonte de nitrogênio Para ajustar as respostas experimentais e utilizar um modelo quadrático, foram acrescentados dois pontos axiais (+1,41 e -1,41), que consistem em um planejamento idêntico, girado 45° em relação à orientação original. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software STATISTICA 7.0® (StatSoft).

Tabela 3: Valores utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional 2².

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Extrato de levedura	0,2	0,3	0,5	0,7	0,8
Xarope de yacon	4,2	5	7	9	9,8

Tabela 4: Delineamento Composto Central Rotacional 2² para produção da enzima inulinase.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂
	Xarope de yacon	Extrato de levedura	Xarope de yacon (%)	Extrato de levedura (%)
1	-1	-1	5	0,3
2	+1	-1	9	0,3
3	-1	+1	5	0,7
4	+1	+1	9	0,7
5	-1,41	0	4,2	0,5
6	+1,41	0	9,8	0,5
7	0	-1,41	7	0,2
8	0	+1,41	7	0,8
9	0	0	7	0,5
10	0	0	7	0,5
11	0	0	7	0,5

As variáveis escolhidas são os principais fatores que influenciam em um processo fermentativo e os valores de cada variável foram definidos com base na literatura especializada, com o que se conhece sobre a produção de inulinase por leveduras. Esse delineamento experimental resultou em 11 ensaios que ocorreu durante o tempo 96 horas. Foram avaliados o crescimento celular e a produção da inulinase (variáveis dependentes ou respostas), além da caracterização parcial enzimática.

5.3. Atividade enzimática

Após o cultivo, a amostra foi centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática, de acordo com Suzuki, Ozawa e Maeda (1988), através da determinação dos açúcares redutores. Para isto, 1mL da enzima foi incubado em sacarose 2%, tampão citrato-fosfato (0,05M e pH 3,7) a 40⁰C, durante 15 minutos, utilizando o reagente ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS), de acordo com Miller (1959). Em seguida, as amostras foram esquentadas por 5 minutos e após esse período foi adicionado 2,5mL de água destilada em cada amostra de tempo, sendo lidas em espectrofotômetro a 540nm posteriormente.

A atividade enzimática foi expressa em U (unidade). Uma unidade de atividade de inulinase é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de sacarose por minuto ou como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μ mol de açúcar redutor por minuto, sob as condições descritas acima.

5.4. Crescimento celular

Após o cultivo, a amostra foi centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos. Logo após, o precipitado foi ressuspenso em água destilada e novamente centrifugado para lavagem das células. Em seguida a biomassa foi ressuspenso, em água destilada, no mesmo volume do meio (30mL) em água destilada e determinada por turbidimetria, no comprimento de onda de 600nm. Os cálculos foram realizados através dos fatores obtidos de uma curva de calibração cuja densidade óptica (DO) obtida foi correlacionada com o peso seco.

5.5. Determinação do pH

O pH foi determinado através de pHmetro digital de bancada.

5.6. Determinação do perfil ótimo de temperatura

A temperatura ótima de atividade da inulinase foi obtida através da determinação da atividade enzimática nas seguintes temperaturas: 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C e 70°C. A atividade enzimática foi medida sob as mesmas condições descritas no item 5.3.

5.7. Determinação do perfil ótimo de pH

Para determinar o pH ótimo de atividade da inulinase, a mistura reacional foi incubada em banho-maria, com as faixas de pH variando de 2,0 a 10,0, utilizando como tampões: glicina-HCl 50mM (pH 2,0–3,0), citrato de sódio 50mM (pH 3,0-6,0), fosfato 50mM (pH 6,0-8,0), tris-HCl 50mM (pH 8,0-9,0) e glicina-NaOH (pH 9,0-10,0). Os tampões foram preparados de acordo com os procedimentos descritos por Colowick e Kaplan (1995). A atividade enzimática foi medida sob as mesmas condições descritas no item 5.3.

5.8. Termoestabilidade

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada incubando-se o extrato enzimático bruto nas temperaturas de 50°C, 55°C e 60°C em banho maria durante 5 horas. Nos tempos 5, 15, 30 minutos e a cada hora foi retirada uma amostra desse extrato bruto e realizado sua atividade enzimática. A atividade enzimática foi medida sob as mesmas condições descritas no item 5.3.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Produção Enzimática

O xarope de yacon é derivado da batata yacon (*Polymnia sonchifolia*), uma planta pertencente à família Asteraceae. Esta família abrange 19 espécies americanas, sendo o yacon a mais importante e com maior potencial para atrair o interesse mundial devido às propriedades funcionais e dietéticas desta cultura, além de ser rica no polissacarídeo inulina (ZARDINI, 1991). Entretanto, esta planta tem sido pouco estudada como substrato para processos fermentativos, como na produção de enzimas. Um dos únicos trabalhos existentes na literatura é de Cazetta et al. (2005), que empregou o extrato de yacon como substrato para produção da enzima inulinase, porém apresentou baixa atividade (cerca de 4 U/mL).

No presente trabalho, utilizando o xarope de yacon, foi alcançado uma boa atividade enzimática (56,66 U/mL), após 96 horas de fermentação. Estes resultados foram obtidos nas concentrações de 7% de xarope de yacon e 0,8% de extrato de levedura (ensaio 8) (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade enzimática da inulinase, produção de biomassa e efeito do pH produzido pela *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.

Ensaio	X ₁ Xarope de yacon (%)	X ₂ Extrato de levedura (%)	Atividade Enzimática (U/mL)	Biomassa (g/L)	pH
1	5	0,3	0,19	65,33	2,52
2	9	0,3	23,03	71,27	3,26
3	5	0,7	47,94	71,13	2,77
4	9	0,7	6,43	74,72	3,21
5	4,2	0,5	3,15	68,68	2,54
6	9,8	0,5	6,99	73,38	3,18
7	7	0,2	15,7	69,35	2,88
8	7	0,8	56,66	76,25	3,12
9	7	0,5	51,53	69,64	2,98
10	7	0,5	47,13	74,43	2,98
11	7	0,5	41,89	69,83	2,99

Além desta, outras condições de cultivo foram favoráveis, sendo atingidas atividades enzimáticas similares, como no ensaio 3 (5% de xarope de yacon e 0,7% de extrato de levedura), com 47,94 U/mL e nos ensaios do ponto central (ensaios 9,

10 e 11), nas concentrações de 7% de xarope de yacon e 0,5% de extrato de levedura, com uma média de 46,85 U/mL, após 96 horas de fermentação (Tabela 5).

Nesse caso, podemos inferir que as melhores condições para se obter as melhores atividades enzimáticas, com estes substratos, podem ser alcançadas utilizando uma combinação de 5% a 7% da fonte de carbono e entre 0,5% a 0,8% de extrato de levedura (ensaios 3 e ponto central) (Tabela 5).

É possível observar na Tabela 5, a influência da fonte de nitrogênio na produção da enzima. Em uma mesma concentração da fonte de carbono, o aumento da concentração da fonte de nitrogênio (ensaios 1, 3, 7, 8 e ponto central) provocou um aumento na produção da enzima.

Essas observações foram comprovadas através das análises estatísticas (Tabela 6), que mostram que a variação nas concentrações do extrato de levedura foi estatisticamente significativa em nível de 95% (p-valor de 0,004586), pois observa-se que, de um modo geral, o aumento da concentração da fonte de nitrogênio provocou um aumento de 22,26 U/mL na produção de inulinase.

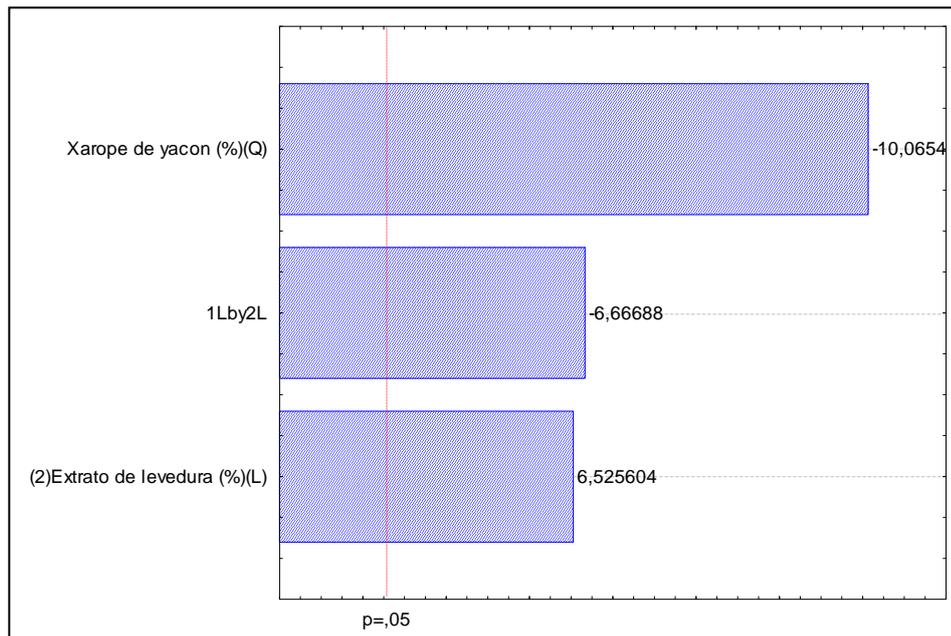
Com relação ao xarope de yacon, de acordo com os efeitos estimados para produção de inulinase (Tabela 6), é possível comprovar que o aumento da concentração do xarope de yacon provocou efeitos negativos na atividade enzimática, que diminuiu em 39,08 U/mL. A interação entre as variáveis também levou à diminuição da atividade, apresentando efeitos negativos e significativos em nível de 95% (p-valor 0,004104).

Tabela 6: Efeitos estimados para produção de inulinase pela levedura *K.marxianus* utilizando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação.

	Efeitos	Erro padrão	t(7)	p
Média	41,5400	3,228607	12,86623	0,000004
(1) Xarope de yacon (%)	-39,0750	6,182313	-6,32045	0,000396
(2) Extrato de levedura (%)	22,2690	5,434556	4,09768	0,004586
1 x 2	-32,1750	7,685623	-4,18639	0,004104

Estas observações podem ser confirmadas pelo diagrama de Pareto, que mostra que a variação nas concentrações do xarope de yacon, do extrato de levedura e a interação entre essas variáveis foram significativas, já que as variáveis em questão obtiveram p valores $p < 0,05$ (Figura 5).

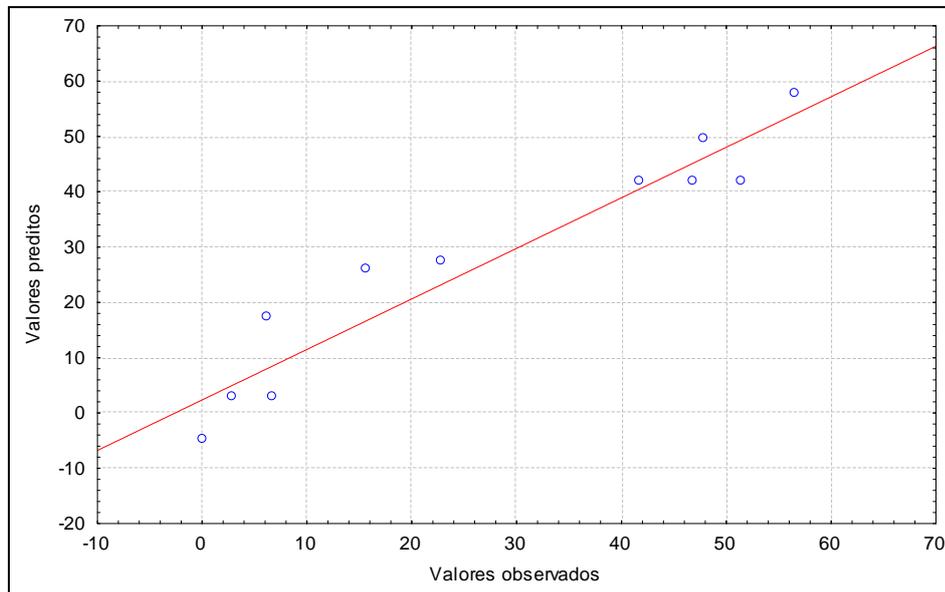
Figura 5: Diagrama de Pareto da atividade enzimática produzida pela *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de Carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.



O efeito das concentrações do xarope de yacon quadrático e a interação entre as concentrações dos substratos empregados nesse estudo foi negativo, de maneira que o aumento em suas concentrações levou à diminuição nos valores das atividades, confirmando os resultados observados. Pôde-se observar ainda, que as concentrações do extrato de levedura linear apresentou efeito positivo, já que o aumento da concentração dessa variável acarretou no aumento da produção inulolítica (Figura 5).

Neste delineamento todos os valores observados, nas condições pré-estabelecidas no experimento, relacionados à produção da enzima, estão próximos da reta dos valores preditos pelo programa Statistic 7.0, comprovando que todos os valores encontrados são similares aos valores de atividade que seriam considerados os melhores pelo programa em cada condição, mostrando a confiabilidade desses resultados (Figura 6).

Figura 6: Valores preditos e observados para atividade enzimática produzida pela *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de Carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.



Com os resultados obtidos foi possível construir um gráfico de superfície de resposta e um gráfico de curvas de contorno (Figuras 7 e 8), que mostram que a condição de cultivo do ensaio 8, do ensaio 3 e do ponto central foram as melhores para a produção da enzima, atingindo as produções mais elevadas nessas faixas.

Figura 7: Gráfico de superfície de resposta da atividade inulinolítica produzida por *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de Carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.

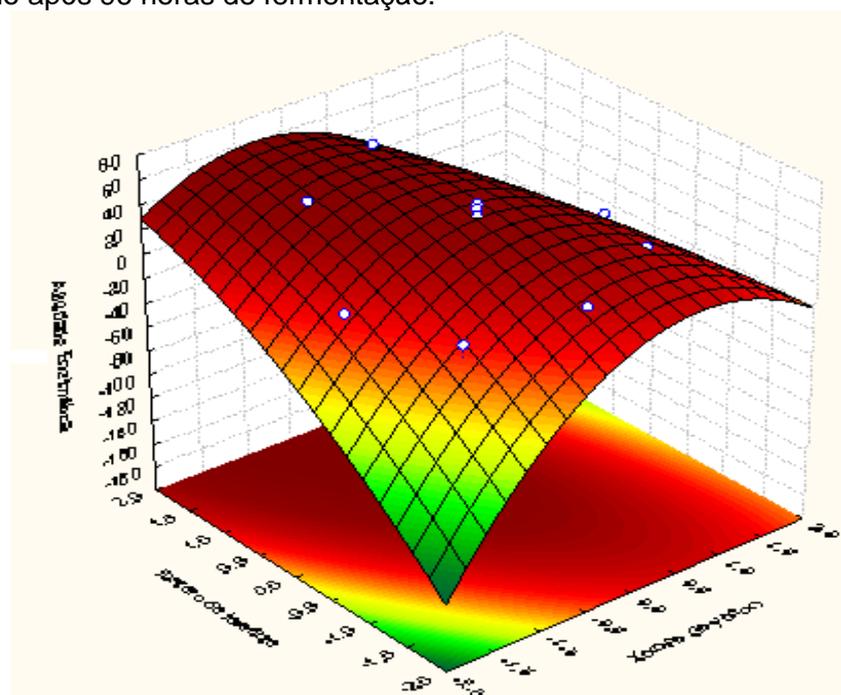
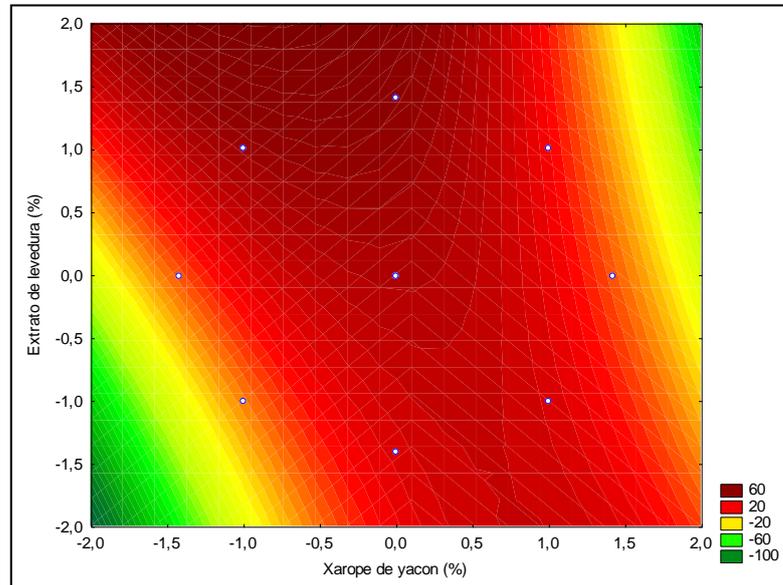


Figura 8: Gráfico de curvas de contorno da atividade inulinolítica produzida pela *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de Carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.



A análise de variância demonstrou que o modelo foi bem ajustado, obtendo-se um valor de R^2 igual a 0,91. O valor de F calculado (24,7) foi maior que o F tabelado (4,35), confirmando que a função está bem ajustada às respostas obtidas, ratificando a significância para o nível de 95% de confiança dos experimentos (Tabela 7).

Tabela 7: ANOVA calculada da atividade enzimática produzida pela *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.

Fte de variação	SQ	GL	QM	Fcal.	Ftab.
Regressão	4386,7	3	1462,2	24,7	4,35
Resíduo	413,5	7	59,1		
Total	4800,2	10			

$$R^2 = 0,91.$$

O uso de um planejamento experimental associado a uma análise de superfície de respostas tem sido uma ferramenta muito útil para a otimização de processos fermentativos, pois minimiza o custo e o tempo do processo, maximizando sua produtividade e rendimento. Além disso, com o planejamento

experimental, todos os fatores estudados durante o processo são analisados simultaneamente, sendo possível otimizar mais de uma resposta, como também calcular e avaliar o erro experimental (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Devido a essas vantagens, vários autores desenvolveram trabalhos usando um planejamento experimental com análise de superfície de resposta a fim de se obter elevadas produções da enzima inulinase. Essa ferramenta foi utilizada por Sinh e Lotey (2010), com o objetivo de estudar a otimização para a produção de exoinulinase em fermentação submersa por *Kluyveromyces marxianus* YS-1, investigando diferentes concentrações de 5 variáveis (inulina, extrato de carne, cloreto de cálcio, dodecil sulfato de sódio e pH) em seu planejamento. Os valores ótimos obtidos pela metodologia foram com 2% de inulina, 2,17% de extrato de carne, 0,65mM de cloreto de cálcio, 0,10mM de dodecil sulfato de sódio e pH 5,5, atingindo uma produção inulinolítica de 63,6 U/ML.

Chen et al. (2011), usando a metodologia de superfície de resposta, estudou a produção de inulinase, através da fermentação em estado sólido, empregando o micro-organismo *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 e alcançando uma produção enzimática de 205,63 U/g em meio contendo 11,47% de inulina, 0,76% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 5,71% de milho-cina.

Com a utilização do planejamento fatorial neste trabalho foi possível obter resultados similares, e até superiores, aos descritos por micro-organismos utilizados tradicionalmente na produção desta enzima. Souza-Motta et al. (2005) obteve, com inulina pura a 20g/L, uma atividade máxima de inulinase de 11 U/ML após 72 horas, utilizando *Aspergillus niger*, considerado um excelente produtor desta enzima. Isto mostra que o xarope de yacon apresenta bom potencial para a produção da inulinase frente a um substrato de custo elevado, como a inulina comercial.

Singh, Dhaliwal e Puri (2006) utilizaram raízes de *Asparagus racemosus* como fonte de inulina para a produção de inulinase empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* YS-1 e obtendo uma produção máxima de inulinase de 47,3 U/ML em um meio contendo inulina a 4%, a 30°C, após 60 horas de fermentação. Singh, Sooch e Puri (2007), em outros estudos, alcançaram uma produção enzimática de 55,4 U/ML utilizando o extrato bruto de inulina proveniente de turbéculos de *Dhalia* a 30°C, após 60 horas de fermentação.

Leveduras do gênero *Kluyveromyces* têm sido estudados por alguns autores, principalmente por serem destacados como bons produtores para esta enzima.

Trabalhos como os de Mazutti (2007), Mendes (2006) e Treichel (2004) descreveram elevadas produções de inulinase (392 U/ML, 974 U/ML e 1300U/ML, respectivamente), utilizando resíduos industriais como cana-de-açúcar e água de maceração de milho, em reatores semi-industriais. Quando estes resultados são comparados com outros trabalhos como os de Kalil et al. (2001) e Silva-Santisteban e Filho (2005), nos quais foram usados substratos sintéticos (sacarose), é possível observar que os substratos de origem agro-industrial foram mais eficientes para a produção da enzima.

Além disso, com os substratos sintéticos foram utilizadas concentrações maiores, confirmando que o uso de substratos agro-industriais, além de mais eficientes, podem ser mais econômicos, pois exigem menores concentrações para a produção da enzima. O mesmo foi observado com o xarope de yacon, com o qual foram obtidas as melhores produções nas concentrações mais baixas de substrato. Uma possível explicação para isto é a presença de sais minerais naturalmente presentes nos extratos vegetais, que podem estar contribuindo para aumento da atividade enzimática.

6.2. Produção de Biomassa

Em relação à biomassa, as produções foram similares em todas as condições de cultivo estudadas, mostrando que as diferentes concentrações dos substratos não influenciaram na produção da biomassa, nas condições estudada. A maior produção foi de 76,25 g/L, nas condições do ensaio 8 (7% de xarope de yacon e 0,8% de extrato de levedura), e a menor produção de biomassa foi de 65,33 g/L nas condições do ensaio 1 (usando 5% de xarope de yacon e 0,3% de extrato de levedura) (Tabela 5).

É possível observar a influência positiva do aumento do extrato de levedura na produção da biomassa, já que, em uma mesma concentração da fonte de carbono, 5% (ensaio 1 e 3), 9% (ensaios 2 e 4) e 7% (ensaios 7, 8 e ponto central), o aumento do extrato de levedura teve, como consequência, o aumento na produção biomassa (Tabela 5).

A mesma relação é observada com o xarope de yacon. Em condições contendo a mesma concentração de extrato de levedura, 0,3% (ensaio 1 e 2) e 0,7% (ensaio 3 e 4), aumentando-se as concentrações do xarope de yacon, há um aumento na produção da biomassa (Tabela 5).

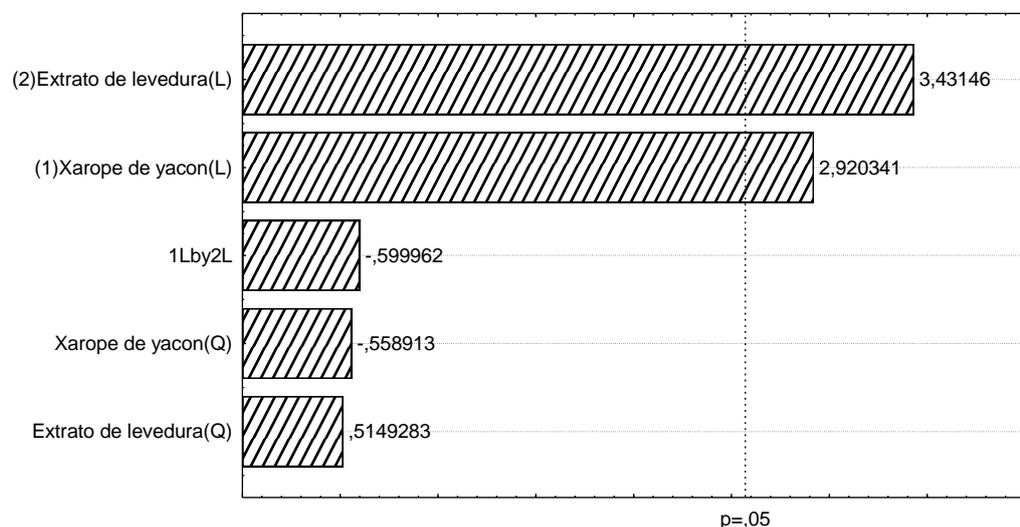
Essas observações se confirmaram nas análises estatísticas (Tabela 8) que mostraram que a variação nas concentrações do xarope de yacon, bem como do extrato de levedura, foram estatisticamente significativos em nível de 95%. O aumento da concentração da fonte de carbono provocou um aumento de 4,04 g/L e o aumento na concentração da fonte de nitrogênio teve como consequência um aumento em 4,75 g/L na produção de biomassa.

Tabela 8: Efeitos estimados para produção de biomassa pela levedura *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t(7)	p
Média	71,30000	1,130716	63,05739	0,000000
(1)Xarope de yacon (L)	4,04420	1,384839	2,92034	0,033001
Xarope de yacon(Q)	-0,92125	1,648288	-0,55891	0,600327
(2) Extrato de levedura(L)	4,75202	1,384839	3,43146	0,018606
Extrato de levedura (Q)	0,84875	1,648288	0,51493	0,628550
1L x 2L	-1,17500	1,958458	-0,59996	0,574684

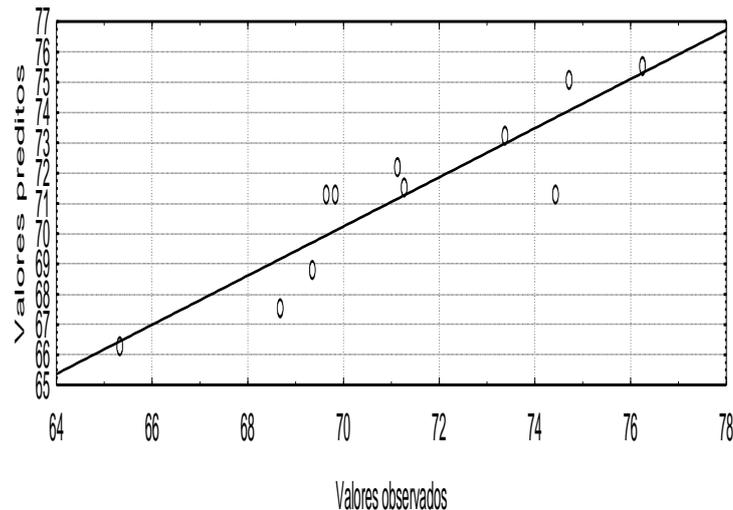
O diagrama de Pareto (Figura 9) confirma estes resultados e mostra que apenas as variações nas concentrações do xarope de yacon e do extrato de levedura lineares foram significativos, já que estas variáveis obtiveram p-valores menores que 0,05 (0,033001 e 0,018606, respectivamente).

Figura 9: Diagrama de Pareto da produção de biomassa pela levedura *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação.



De acordo com a figura 10, os resultados obtidos no experimento realizado estão bem próximos dos resultados previstos pelo programa Statistic 7.0, comprovando que estes resultados são confiáveis.

Figura 10: Valores observados e valores preditos para produção de biomassa pela levedura *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação.



A análise de variância (ANOVA) representada na Tabela 9, foi utilizada para avaliação de significância do modelo. Através dela foi possível observar que o modelo foi bem ajustado, já que obteve-se um valor de R^2 igual a 0,81 e o valor de F calculado (10,04) foi maior que o F tabelado (4,35).

Tabela 9: ANOVA calculada da biomassa produzida pela levedura *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas de fermentação.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal.	Ftab.
Regressão	82,4	3	27,5	10,0	4,3
Resíduo	19,1	7	2,7		
Total		10			

$$R^2 = 0,81.$$

Com os resultados obtidos, foi possível construir os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno (Figuras 11 e 12), que mostram que as condições dos

ensaios 2, 3, 4, 6, 8 e ponto central foram as melhores para produção da biomassa, produzindo as concentrações mais elevadas, excetuando-se as condições dos ensaios 1, 5 e 7 que não se ajustaram ao gráfico, sendo as menores produções obtidas no experimento.

Figura 11: Gráfico de superfície de resposta da produção de biomassa pela levedura *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação.

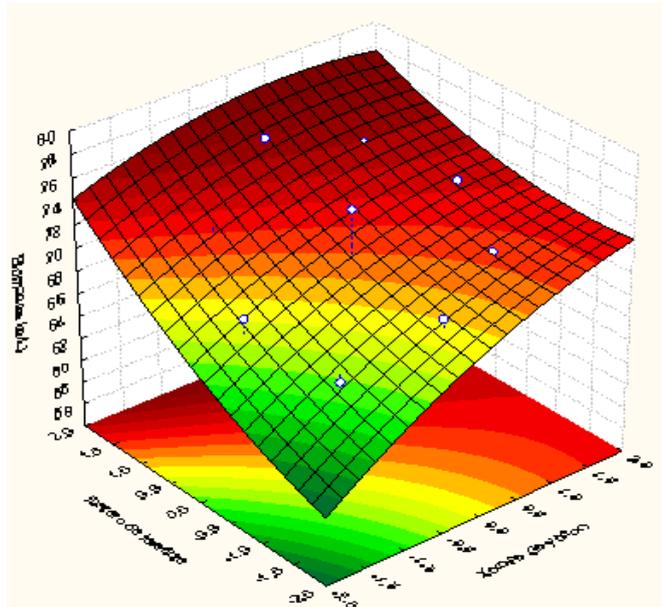
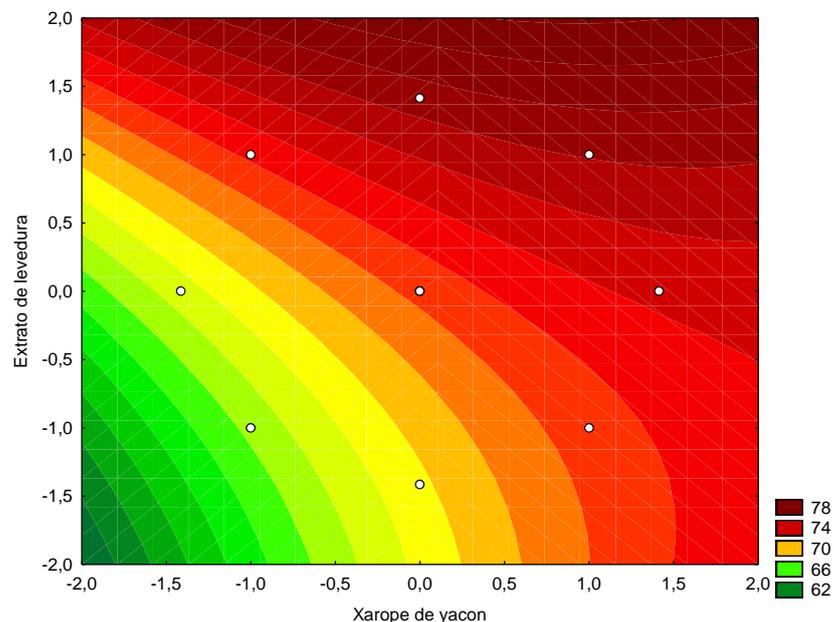


Figura 12: Gráfico de curvas de contorno da produção de biomassa por *K. marxianus* usando xarope de yacon como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação.



Estes resultados foram melhores do que aqueles observados por Cazetta (2005), em fermentação do tipo batelada alimentada, empregando como micro-organismo a *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* para o estudo da produção de inulinase em sacarose, que obteve um crescimento celular de apenas 14g/L. Isso mostra que o xarope de yacon, além de ser um substrato promissor para produção de inulinase, também tem elevado potencial para a produção de biomassa microbiana.

Em um estudo utilizando o xarope de agave como fonte de carbono pela levedura *K. marxianus* NRRL Y-7571 (o mesmo micro-organismo empregado neste trabalho) foi obtido uma produção de biomassa que se manteve constante, em torno de 20g/L. Neste mesmo estudo, empregando o extrato de sisal como substrato, os resultados observados estavam bem abaixo dos obtidos neste trabalho (76,25g/L), atingindo um crescimento celular máximo de, aproximadamente 7g/L, em uma concentração de 40% de extrato de sisal e 1,5% de extrato de levedura (OLIVEIRA, 2012). Isso mostra que o xarope de yacon pode ser considerado um substrato promissor para a produção de biomassa, já que os nossos resultados são superiores aos vários trabalhos descritos na literatura.

6.3. Efeito do pH nos ensaios

De um modo geral, considerando que os ensaios foram ajustados para um pH inicial de 5,0, podemos observar que este tornou-se mais ácido no final da fermentação, caindo para valores entre 2,52 e 3,26 (Tabela 5).

Essa acidez gerada no meio pode ter ocorrido pela formação de ácidos orgânicos que são produzidos durante a fermentação, tais como ácido acético, pirúvico, entre outros, os quais fazem parte do processo fermentativo (KUCK, 2008).

Nos ensaios 7, 8 e ponto central podemos observar que, aparentemente, o pH do meio foi influenciado pela concentração da fonte de nitrogênio, de maneira que à medida em que se aumentava as concentrações do extrato de levedura o pH também se elevava de 2,88 para 3,12. Podemos dizer também que esta variável foi influenciada pela concentração da fonte de carbono, pois numa mesma concentração do extrato de levedura, 0,3% (ensaio 1 e 2) e 0,7% (ensaios 3 e 4), o aumento da concentração do xarope de yacon provocou o aumento do pH (Tabela 5).

A variação no pH, ao longo do processo fermentativo, mostra que é necessário realizar novos estudos utilizando este parâmetro como variável, para definir se a sua queda pode influenciar na atividade enzimática e se é necessário utilizar mecanismos para seu controle no meio de fermentação.

Na literatura são descritos diferentes valores de pH para os micro-organismos produtores de inulinase e, em sua maioria, ocorre queda do pH no final do processo fermentativo: para *A. niger* o pH diminuiu de 5,4 para 4,5 (POORNA e KULKARNI, 1995). Souza-Motta et al. (2005), utilizando inulina como substrato, mostrou uma ótima produção da enzima em pH 4,0 e 4,8. Cazetta et al. (2005), entretanto, em cultivo com extrato de yacon, observou que o pH permaneceu constante ao longo de todo o processo. Além disso, o comportamento do pH varia de micro-organismo para micro-organismo e também com o tipo de substrato utilizado.

6.4. Caracterização Enzimática

6.4.1 Perfil ótimo de temperatura e termoestabilidade

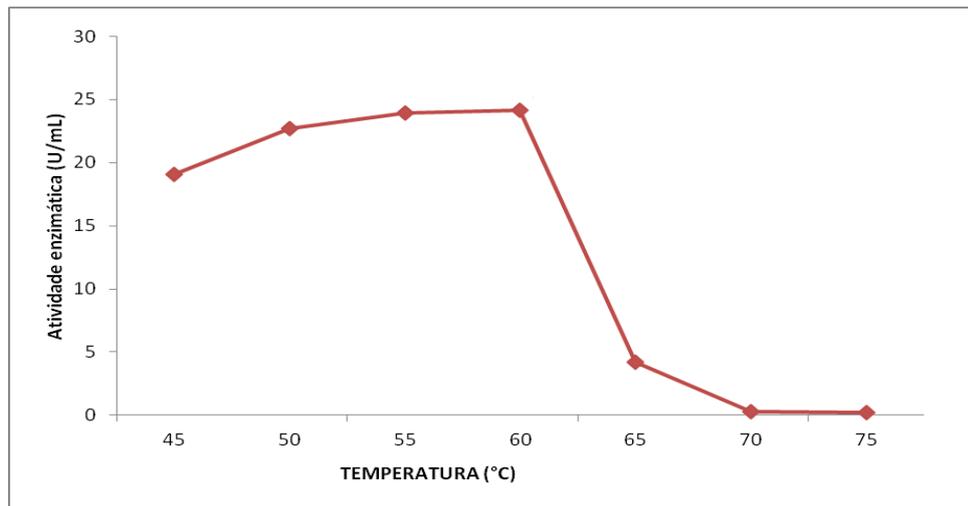
De acordo com Oliveira (2012), a caracterização enzimática apresenta uma grande importância para se estabelecer as condições de trabalho e também na determinação de temperatura, estabilidade térmica e pH ótimo para a atividade máxima da enzima.

As enzimas são proteínas complexas que apresentam estrutura terciária, sendo a sua atividade catalítica dependente da manutenção desta estrutura. A temperatura exerce uma grande influência na atividade enzimática, de modo que o aumento deste fator a cada 10°C duplica a velocidade da reação. O ponto ótimo de temperatura representa o ponto máximo para a atividade catalítica. Porém, por serem proteínas, elevadas temperaturas levam a desnaturação da enzima, desconfigurando assim sua estrutura tridimensional devido a alterações nas ligações que mantêm essa estrutura (LEHNINGER, 2002).

Neste trabalho, foram realizados testes de atividade enzimática nas temperaturas de 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C a 70°C, a fim de se obter o ponto ótimo de temperatura da inulinase. As melhores atividades foram alcançadas nas temperaturas de 45°C a 60°C, sendo a temperatura ótima obtida a 60°C. Temperaturas acima desse valor levaram à perda parcial ou total da atividade

catalítica, caindo bruscamente para valores de 4,21, 0,31 e 0,23 nas temperaturas de 65°C, 70°C e 75°C, respectivamente (Figura 13).

Figura 13: Efeito da temperatura sobre a atividade da inulinase produzida pela levedura *K. marxianus* NRRL-Y 7571, utilizando xarope de yacon e extrato de levedura como substratos.



A perda da atividade catalítica pode ter ocorrido devido à ação desnaturante da estrutura da inulinase.

Estudos descritos na literatura mostraram resultados similares aos deste trabalho. Ribeiro et al. (2010), empregando a levedura *Pseudozyma sp* (CCMB 300), em um meio contendo glicose como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, observaram que os valores de temperatura ótima, também encontraram-se entre 45°C e 60°C.

Paula (2007) realizou a determinação da temperatura ótima de atividade tanto da inulinase livre como também da inulinase imobilizada, as quais apresentaram temperatura ótima de 55°C e 60°C, respectivamente.

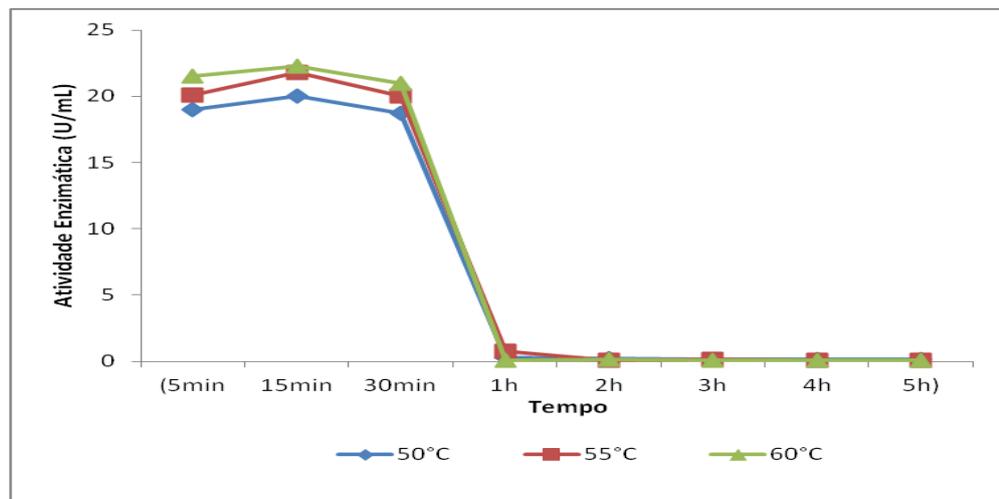
A temperatura de 55°C também foi considerada ótima para a produção máxima de inulinase pelo micro-organismo *K. marxianus var. bulgaricus* (KUSHI, MONTI e CONTIERO, 2000), enquanto que a temperatura ótima para a produção da enzima tendo como micro-organismo *Aspergillus fumigatus* foi de 60°C (GILL, MANHAS e SINGH, 2006).

Em relação à estabilidade térmica da inulinase, através da Figura 14 podemos observar que a enzima se manteve estável até os primeiros 30 minutos, após esse

período a atividade enzimática caiu drasticamente para produções próximas de zero, nas temperaturas de 50°C, 55°C e 60°C.

Segundo Oliveira (2012), embora a temperatura ótima de atividade inulinolítica ocorra em 60°C, esta temperatura não é aconselhável durante a realização do trabalho devido à perda rápida da atividade nestas condições.

Figura 14: Termoestabilidade observada na enzima inulinase produzida pela levedura *K. marxianus* usando xarope de yacon e extrato de levedura como substratos.



Estudos relacionados à estabilidade térmica na produção da enzima inulinase, como o de Cazzetta (2005), empregando *K.marxianus* var. *bulgaricus* como micro-organismo, mostrou que a atividade enzimática manteve-se constante até 3 horas de reação em pH 3,5 a 30°C e manteve-se estável até 4 horas em pH 8,0 a 40°C. Neste mesmo trabalho, na temperatura de 55°C, a perda da atividade ocorreu após 15 minutos, chegando a zero depois de 5 horas de reação.

Oliveira (2012) em seus estudos utilizando xarope de agave como fonte de carbono observou que a temperatura de 50°C a enzima manteve-se estável durante 4 horas, enquanto que temperaturas de 55°C e 60°C levou a uma diminuição da atividade enzimática a partir de 15 minutos de reação. Após 1 hora, a 60°C, a atividade caiu drasticamente levando a perda da atividade.

Por outro lado, Oliveira (2012) observou um comportamento um pouco diferente da enzima produzida com extrato de sisal como fonte de carbono. Nestas condições a enzima permaneceu estável por apenas 30 minutos, mesmo a 55°C. Isto mostra que, aparentemente, o substrato onde a enzima é produzida influencia

na sua estrutura conformacional, resultando em uma proteína mais ou menos estável. Os motivos pelos quais isto ocorre ainda são desconhecidos.

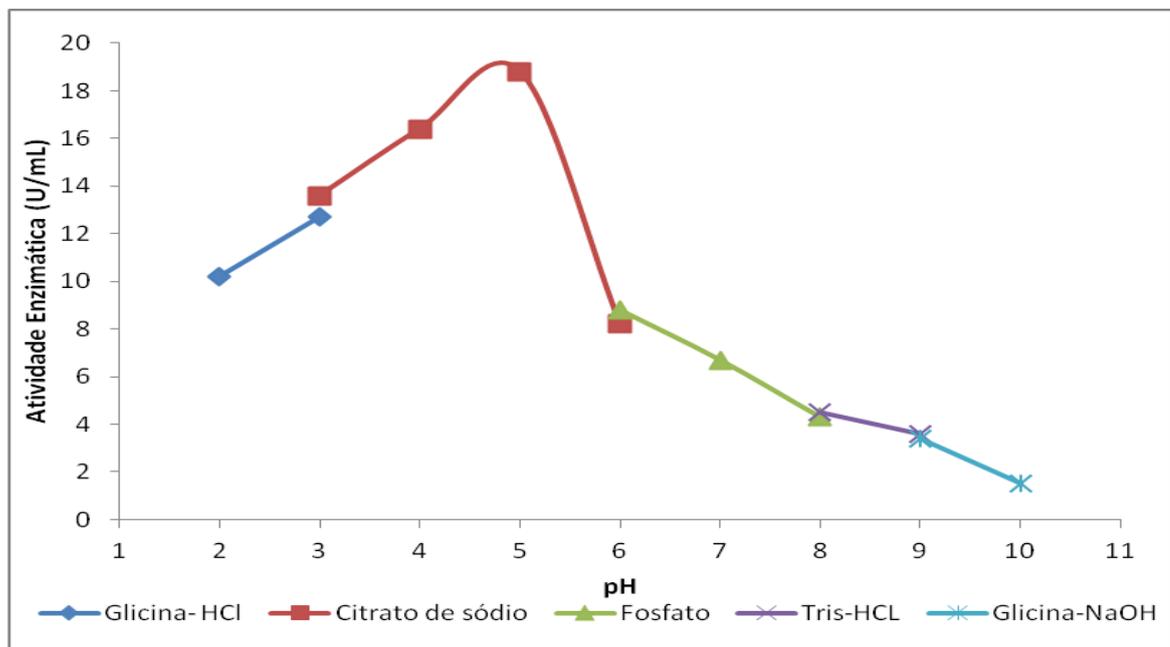
6.4.2 Perfil ótimo de pH

O valor ótimo de pH varia de acordo com os vários tipos de enzima e substratos empregados durante o trabalho. A ação do pH sobre a atividade enzimática está relacionada à alteração das cargas elétricas dos aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima.

De acordo com Lourenço (2004), a medida em que o pH se afasta do valor ótimo para produção enzimática, a velocidade de reação diminui sendo que, na maioria das vezes, o pH ótimo está próximo da neutralidade.

Em relação ao perfil ótimo de pH para produção de inulinase, a Figura 15 mostra que a atividade de inulinase se elevou à medida que se aumentou o pH de 2,0 para 5,0, sendo este pH considerado ótimo para a atividade inulinolítica. Em pHs maiores que 5,0, a produção da enzima caiu até valores próximos a zero.

Figura 15: Efeito da variação de pH na atividade da enzima inulinase produzida pela levedura *K. marxianus* NRRL-Y 7571, utilizando xarope de yacon e extrato de levedura como substratos.



Risso et al. (2010), em um estudo comparativo entre inulinase livre e imobilizada alcançaram a máxima atividade inulinolítica, para os dois tipos da enzima, em pH 4,8, pelo micro-organismo *K. marxianus* NRRL Y-7571.

Oliveira (2012), em seus estudos de perfil ótimo de pH, observou que a atividade enzimática manteve-se elevada numa faixa de pH que variou de 2 a 5, alcançando o pico de produção em pH 4 e as menores atividades em pHs básicos.

Através dos resultados obtidos em relação ao perfil ótimo de pH, podemos observar que para atingir maiores produções inulinolíticas empregando o xarope de yacon como fonte de carbono e o extrato de levedura como fonte de nitrogênio é necessário que durante a atividade enzimática o tampão ideal precisa apresentar um pH de 5,0 a fim de se aumentar a produção da enzima.

7. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que o xarope de yacon apresentou-se como um substrato viável para a produção da enzima inulinase, uma vez que obteve-se resultados superiores a vários trabalhos descritos na literatura.

No ensaio onde foi obtido a maior produção da enzima e a maior produção de biomassa (ensaio 8 - 7% xarope de yacon e 0,8% de e extrato de levedura) foram empregados pequenas concentrações dos substratos, o que é muito importante do ponto de vista industrial já que torna o processo mais econômico.

O pH torna-se mais ácido ao final da fermentação, devido à formação de ácidos durante a fermentação, caindo para valores entre 2,52 e 3,26, utilizando os substratos empregados nesse estudo.

Embora a enzima apresente temperatura ótima reacional a 60°C, a mesma não se mantém estável acima de 55°C por mais de 30 minutos. Assim, a melhor faixa de trabalho para a inulinase precisa estar abaixo desta temperatura. O pH reacional de 5,0, onde se obteve a máxima atividade enzimática, foi definido como pH ótimo.

O pH reacional de 5,0 foi definido como pH ótimo, que é considerado muito importante pois impede o crescimento de outros micro-organismos no meio de cultivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAZETTA M. L. Produção de biomassa e inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*: influência das condições de cultivo. Tese (Doutorado) Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – Universidade Estadual Paulista. 113 p. 2005.
- CAZETTA, M.L; MARTINS, P. M.M; MONTI, R; CONTIERO, J. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Journal of Food Engineering**. v. 66, p. 301-305, 2005.
- CAZETTA, M. L; MONTI, R; CONTIERO, J. Effects of culture conditions on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 53, n. 3, p.701-707, 2010.
- CHI, Z; ZHANG, T; CAO, T; LIU, X; CUI, W; ZHAO, C. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 4295-4303, 2011.
- CHEN, H.-QING; CHEN, X.-MING; CHEN, T.-XIANG; XU, X.-MING; JIN, Z.-YU. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 249-254, 2011.
- COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (eds.). Section I. General Preparative. Procedures. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 138-146, 1995.
- COSTA, L.F. Leveduras na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**. v.1, n.1, p.1-6, 2004.
- D'AVILA, M.F. **Inulina**. Acessado em: 07.05.12. Disponível em: http://www.marianaferridavila.com.br/dicas_pdf/Inulina%20e%20seus%20beneficios.pdf. 2012.
- DILIPKUMAR, M; RAJASIMMAN, M; RAJAMOHAN, N. Application of statistical design for the production of inulinase by *Streptomyces* sp. using pressmud. **Frontiers of Chemical science and engineering**. v.5, n.4, p.463-470, 2011.
- DINARVAND, M; ARIFF, A.B; MOEINI, H; MASOMIAN, M; MOUSAVI, S.S; NAHAVANDI, R; MUSTAFA, S. Effect of extrinsic and intrinsic parameters on inulinase production by *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Electronic Journal of Biotechnolgy**. Valparaíso, v. 15, n. 4, 2012.
- FRANCO, B.D.G. e LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, p.182, 2008.
- FUCHS, R.H.B; BORSATO, D; BONA, E; HAULY, M.C.O. “Iorgute” de soja suplementado como oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 25, n. 1, p.175-181, 2005.

GALANTE, R.M. **Extração de inulina do alho (*Allium sativum* L. var. *Chonan*) e simulação dos processos em batelada e em leito fixo.** Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

GAVA, A.J; SILVA, C.A.B.S; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações.** São Paulo: Nobel, p.89, 2008.

GERN, R. M. M.; JONAS, M. F. C.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L. Utilização do extrato de chicória na produção de endo-inulinase por *Paenibacillus* sp. **Revista Saúde e Ambiente**, v.1, n.1, p.73-76, 2000.

GILL, P.K.; MANHAS, R.K.; SINGH, P. Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 369-375, 2006.

GRZYBOWSKI, A. **Hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de fruto-oligossacarídeos (FOS).** Dissertação de mestrado (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

HAULY, M.C.O e MOSCATTO, J.A. Inulina e oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas.** Londrina, v.23, n.1, p.105-118, 2002.

JAIN, S.C; JAIN, P.C.; KANGO, N. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Dahlia tuber extract. **Brazilian Journal of Microbiology.** São Paulo, v. 43, n. 1, 2012.

JING. W; ZHENGYU, J; BO, J; AUGUSTINE, A. Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry.** London, v. 39, p. 5-11, 2003.

JUNIOR, A.P. **Obtenção de inulinase: recuperação e ampliação de escala.** Tese de Doutorado (Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo - SP, 181 p, 1995.

KALIL, S. J; SUZAN, R; MAUGERI, F; RODRIGUES, M.I. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** Rio Grande do sul, v. 94, n.3, p. 257-264, 2001.

KUCK, L.S. **Cerveja: sabor e aroma.** Trabalho acadêmico (Curso de Bacharelado em química de alimentos). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2008.

KUSHI, R.T; MONTI, R; CONTIERO, J. Production, purification and characterization of an extracelular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.** v. 25, p. 63-69, 2000.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica.** 3. ed., São Paulo: Sarvier, p. 278-388, 2002.

LOURENÇO, C. **Desenvolvimento de processo contínuo de obtenção de frutose a partir de sacarose**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia de Alimento). Universidade Estadual de Campinas. 2004.

MAKINO, Y; LIMA, P.S.C; FILHO, F.M; RODRIGUES, M.I. Adsorption of the inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 on streamline DEAE resin. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. São Paulo, v.22, n.4, p539- 540, 2005.

MAZUTTI, M.A. **Modelagem matemática da produção de inulinase em biorreator batelada**. Tese de mestrado (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Erechim, RS, 2007.

MENDES, G. L., **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

MOREIRA, F.M.S e SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, p.626, 2003.

MOSCATTO, J.A; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S.H; HAULY, M.C.O. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. **Ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas, São Paulo, v.24, n.4, p. 634-640, 2004.

NASCIMENTO, D. S; JÚNIOR, G,V; FERNANDES, P; RIBEIRO, G.C.A; LIMA, D.M; GÓES-NETO, A; OLIVEIRA,R.Q; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L; ASSIS, S.A. Production, characterization and application of inulinase from fungal endophytic CCMB 328. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v. 84, n. 2, 2012.

OETTERER, M; REGITANO-D'ARCE, M.A.B; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri, São Paulo. Editora: Manole, 2006.

OLIVEIRA, L.P.A. **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y- 7571 utilizando xarope de agave (*Agave tequilana*) e extrato de sisal (*Agave sisalana*) como substratos**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das almas, Bahia, 2012.

OLIVEIRA, R.A; PARK, K.J; CHIORATO, M; PARK, K.J.B. e NOGUEIRA, R.I. Otimização de extração de inulina de raízes de chicória. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.6, n.2, p.131-140, 2004.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v.27, p.109-117, 1992.

PAULA, F. C. **Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045: caracterização e produção de açúcar invertido em biorreator**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"-Campus de Rio Claro. Rio Claro - SP, 2007.

PELZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PESSONI, R.A.B; OLMEDO, P.M.O.; CLEMENTE FILHA, A.C. e FIGUIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Produção de concentrados de frutose por inulinasas de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas - São Paulo, v.24, n.3, p. 373-377, 2004.

POORNA, V; KULKARNI, P.R. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design. **Bioresource Technology**. v. 54, p. 315-320, 1995.

RIBEIRO, G.C.A; ASSIS, S.A; NASCIMENTO, D.S; JUNIOR, G.L.V. **Otimização da produção e caracterização da enzima inulinase produzida pela levedura *Pseudozyma sp* (CCMB 300)**. Anais do XIV Seminário de Iniciação científica da Universidade Estadual de Feira de Santana. UEFS, Feira de Santana, 2010.

RISSE, F. V. A; MAZUTTI, M. A; COSTA, F; TREICHEL, H; MAUGERI, F; RODRIGUES, M. I. Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic solutions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 27, n. 4, 2010.

RODRIGUES, M. I e IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2ª ed, 325p. 2009.

RUPÉREZ, P. Bifidogenic oligosaccharides. **Food Science and Technology International**. v. 4, n. 4, p. 237-243, 1998.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 42, n. 1, 2006

SANTIAGO, A.L.C.M.A; SOUZA-MOTTA, C.M. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase. **Acta Botanica Brasilica**. São Paulo, v.20, n.3, p. 641-647, 2006.

SHARMA, A.D; KAINTH,S; GILL, P.K. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces sp*. **Journal of Food Engineering**. v.77, p. 486-491, 2006.

SILVA-SANTISTEBAN, B.O.Y e MAUGERI FILHO, F. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbiology Technology**. Campinas – SP, v. 36, p. 717-724, 2005.

SINGH, R. S; DHALIWAL, R; PURI, M. Production of inulinase from *kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 1703-1707, 2006.

SINGH, R. S; LOTEY, S. Enhanced exoinulinase production from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using response surface methodology. **Brazilian archives of biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 5, 2010.

SINGH, R. S; SOOCH, B.S; PURI, M. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *kluveromyces marxianus* YS-1. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 2518-2525, 2007.

SKOWRONEK M, FIEDUREK J. Purification and Properties of Extracellular Endoinulinase from *Aspergillus niger* 20 OSM. **Food Technology and Biotechnology**. v.44, n.1, p.53-58, 2006.

SOUZA-MOTTA, C. M; CAVALCANTI, M.A.Q; PORTO, A.L.F; MOREIRA, K.A; FILHO, J.L.L . *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 48, n. 3, 2005.

SUZUKI H, OZAWA Y, MAEDA H. Studies of water-insoluble yeast invertase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 30, p.807-812, 1988.

TORRES, F.A.G; MORAES, L.M.P. Proteínas recombinantes produzidas em levedura. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**. n. 12, ano. 2, p. 20-22, 2000.

TORTORA, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre. Editora Artmed, ed.8, p. 894, 2006.

TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados**. Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on “yacon”, *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). **Economic Botany**. v. 45, n.1, p.72-85, 1991.

ZHEREBTSOV, N.A; SHELAMOVA, S.A; ABRAMOVA, I.N. Biosynthesis of inulinase by *Bacillus* bacteria. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v.38, n. 6, p.544-548, 2002.