

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**EXTRATO E FARINHA DE YACON COMO FONTES DE
CARBONO PARA PRODUÇÃO DE INULINASE PELA
LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571**

LEONARDO DE AMORIM SATHLER

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
SETEMBRO - 2013**

**EXTRATO E FARINHA DE YACON COMO FONTES DE
CARBONO PARA PRODUÇÃO DE INULINASE PELA
LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571**

LEONARDO DE AMORIM SATHLER

Biólogo – Centro Universitário de Caratinga – UNEC/2007

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: **Márcia Luciana Cazetta**

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

SETEMBRO - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

S253

Sathler, Leonardo de Amorim

Extrato e farinha de yacon como fontes de carbono para produção de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 / Leonardo de Amorim Sathler. _ Cruz das Almas, BA, 2013. 59f.; il.

Orientadora: Márcia Luciana Cazetta.

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

1.Enzimas – Inulinase. 2.Fermentação – Microorganismos.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 572.7

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
LEONARDO DE AMORIM SATHLER**

Profa. Dra. Márcia Luciana Cazetta
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Eliseth de Souza Viana
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Prof. Dr. Givanildo Bezerra de Oliveira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
SETEMBRO - 2013**

DEDICATÓRIA

A toda minha família e amigos que estiveram do meu lado torcendo por mim. Em especial, dedico ao meu pai Timóteo Sathler Delgado, minha mãe Margarida de Amorim Delgado e minha tia Luiza Moreira Pimenta e toda a sua família. Sem vocês eu não poderia ter iniciado e muito menos terminado este curso, sem vocês nada teria sentido. Tudo que aprendi neste período são dedicados a vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a esta família maravilhosa que Deus me concedeu, por toda força, torcida e preocupação com meu bem estar.

Ao meu amigo Washington Luiz Brito Menezes por ter sido este grande amigo nos momentos ruins e bons que passei nesta cidade.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Márcia Luciana Cazetta por ter tido paciência comigo em minhas dificuldades.

Agradeço a Dra. Pia Ekatherine Tavera por ter sido esta pessoa importante na minha vida e estado comigo em um momento tão especial.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| Figura 01 – (A) Plantas de yacon em crescimento, (B) PARTES SUBTERRÂNEAS E REAÍZES..... | 3 |
| Figura 02 - Estrutura química do polímero de inulina. | 5 |
| Figura 03 - Estrutura química dos frutooligossacarídeos. | 6 |
| Figura 04 - Classificação das enzimas inulinases | 8 |
| CAPÍTULO I | 22 |
| Figura 1 - Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a produção de inulinase em função da concentração do extrato de yacon e pH por <i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas. | 30 |
| FIGURA 2 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVAS DE CONTOURNO (B) PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DE YACON E pH POR <i>K. MARXIANUS</i> NRRL Y-7571 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA APÓS 96 HORAS..... | 31 |
| Figura 3 - Efeito do pH na atividade enzimática de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y- 7571..... | 33 |
| Figura 4 - Efeito da temperatura na atividade enzimática de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 | 34 |
| Figura 5 - Estabilidade térmica da enzima inulinase nas temperaturas de reação de 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C e pH 4.0. | 34 |
| CAPÍTULO II | 41 |
| FIGURA 1 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a produção da enzima inulinase em função da concentração da farinha de yacon e milhocina por <i>K.</i> <i>marxianus</i> NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas..... | 48 |
| FIGURA 2 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a produção de biomassa em função da concentração da farinha de yacon e milhocina por <i>K.</i> <i>marxianus</i> NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas..... | 51 |
| FIGURA 3 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a produção da enzima inulinase em função da concentração da farinha de yacon e milhocina por <i>K.</i> <i>marxianus</i> NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas..... | 51 |
| FIGURA 4 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a produção de biomassa em função da concentração da farinha de yacon e milhocina por <i>K.</i> <i>marxianus</i> NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas..... | 52 |
| FIGURA 5 Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade enzimática de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 | 55 |

Figura 6 Estabilidade térmica da enzima inulinase nas temperaturas de reação de 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C e pH 4,0.....55

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 01 Principais frutanos presentes em vegetais..... 4

Tabela 02 Principais micro-organismos produtores da enzima inulinase..... 9

CAPÍTULO I.....22

TABELA 1 VALORES CODIFICADOS E REAIS USADOS NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) 2² UTILIZANDO EXTRATO DE YACON COMO FONTE DE CARBONO.....26

TABELA 2 MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL DCCR 2², COM VALORES CODIFICADOS E REAIS DAS VARIÁVEIS E RESPOSTAS (ATIVIDADE ENZIMÁTICA E BIOMASSA) APÓS 96 HORAS..... 29

Tabela 3 Coeficientes de regressão para atividade enzimática.....30

TABELA 4 COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA BIOMASSA..... 31

Tabela 5 Análise de variância para atividade enzimática.....32

Tabela 6 Análise de variância para a produção de biomassa.....32

Tabela 7 Valores reais utilizados no processo de validação.....33

CAPÍTULO II41

Tabela 1 Matriz do Planejamento EXPERIMENTAL 1 COM AS RESPOSTAS PRODUÇÃO DE BIOMASSA E INULINASE47

Tabela 2 Coeficientes de regressão para PRODUÇÃO DE INULINASE.....48

Tabela 3 Coeficientes de regressão para biomassa.....49

Tabela 4 Matriz do Planejamento EXPERIMENTAL 2 COM AS RESPOSTAS PRODUÇÃO DE BIOMASSA E INULINASE50

Tabela 5 COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA PRODUÇÃO DE INULINASE51

Tabela 6 COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....52

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| DEDICATÓRIA | |
| AGRADECIMENTOS | |
| LISTA DE FIGURAS | |
| LISTA DE TABELAS | |
| RESUMO | |
| ABSTRACT | |
| 1.REVISÃO DA LITERATURA | 1 |
| 1.1 Yacon como substrato para produção de enzimas e suas aplicações | 1 |
| 1.2 Enzima inulinase | 7 |
| 1.3 Produção de inulinase por <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 9 |
| 2.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 14 |
| CAPÍTULO I | 22 |
| Extrato de yacon como fonte de carbono para produção de inulinase pela levedura <i>kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 | 22 |
| Resumo | 23 |
| Introdução..... | 24 |
| Material e métodos | 25 |
| Resultados..... | 29 |
| Discussão | 35 |
| Conclusões..... | 36 |
| Referências bibliográficas..... | 38 |
| CAPÍTULO II | 41 |
| Produção de inulinase e biomassa utilizando farinha de yacon e milhocina como substratos alternativos pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 | 41 |
| Resumo | 42 |
| Introdução..... | 42 |
| Material e métodos | 44 |

| | |
|---------------------------------|----|
| Resultados e discussão | 46 |
| Conclusões..... | 59 |
| Referências bibliográficas..... | 59 |

SATHLER, L. A. Extrato e farinha de yacon como fontes de carbono para produção de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

RESUMO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma planta herbácea da família Asteracea que vem recebendo muita atenção por ser uma fonte rica em frutooligossacarídeos, considerados ingredientes funcionais. Entretanto existem poucos trabalhos descritos na literatura que utilizam esta planta como substrato para produção de substância de interesse industrial por fermentação, a exemplo das inulinases. Este trabalho teve como objetivo estudar a produção da enzima inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 por fermentação do tipo batelada utilizando o extrato bruto e a farinha do tubérculo do yacon. Foram investigados os efeitos das concentrações do extrato e da farinha de yacon, como fontes de carbono, milhocina como fonte de nitrogênio e pH sobre a produção de inulinase e de biomassa, por meio do Delineamento Composto Central Rotacional de Resposta (DCCR) 2². A máxima atividade enzimática com a farinha do yacon foi de 36,1 U/mL e a produção de biomassa de 8,95 g/L, obtidas na condição de 7% e 2% da fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente. Para o extrato de yacon, a melhor condição de fermentação foi 55% da fonte de carbono e pH 5,5, sendo atingida a atividade máxima de 14,48 U/mL e produção de biomassa de 9,03 g/L. A inulinase produzida em ambos os substratos apresentaram o perfil enzimático de pH ótimo em 4.0 e temperatura ótima de 60°C. Os resultados dos testes de estabilidade térmica mostraram que a enzima manteve mais de 95% da sua atividade por 3 horas a 45°C e acima de 90% por 4 horas a 50°C. As análises mostraram que as respostas se ajustaram bem ao modelo estatístico, principalmente levando-se em consideração a grande variabilidade inerente aos processos biológicos que envolvem enzimas e micro-organismos, especialmente quando se utiliza substratos complexos como meios de fermentação.

Palavras-chave: enzimas, leveduras, otimização.

ABSTRACT

The yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a herbaceous plant of the Asteraceae family that has received much attention for being a rich source of fructo-oligosaccharides, which are considered functional ingredients. However there are few studies in the literature that use this plant as substrate for substances production of industrial interest by fermentation. This work aimed to study the production of enzyme inulinase by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 by batch fermentation using the crude extract and flour of yacon tubers. Were investigated the effects of extract and flour of yacon concentrations as carbon source, corn steep liquor as nitrogen source and pH on the inulinase and biomass production, utilizing the Central Composite Rotational (CCR) design 2². Maximum enzymatic activity was 36.1 U/ mL and biomass was 8.95 g/L obtained in the condition of 7% of yacon flour and 2% of corn steep liquor. For the yacon extract the best fermentation condition was 55% and pH 5.5, reaching enzymatic activity of 14.48 U / mL and biomass of 9.03 g/ L. Partial characterization of inulinase, produced in both substrates, showed that the optimum pH was reached at 4.0 and optimum temperature at 60 °C. The results of thermal stability tests showed that the enzyme retained more than 95% of its enzymatic activity for 3 hours at 45 °C and above 90% for 4 hours at 50 °C. The analysis showed that the responses have adjusted well to the statistical model, especially taking into account the great variability inherent in biological processes involving enzymes and micro-organisms, especially when using complex substrates such as fermentation substrates.

Key-words: agro industrial substrates, yeasts, enzyme

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Yacon como substrato para produção de enzimas e suas aplicações

Resíduos e produtos agroindustriais de origem vegetal têm recebido grande atenção nos últimos anos como fonte alternativa de carbono e nitrogênio para pesquisas que utilizam micro-organismos como ferramentas biológicas para produção de substâncias de interesse industrial e ambiental como: proteínas microbianas, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (SANCHÉS, 2009; CHANDEL et al., 2013; JAGANMOHAN et al., 2013; SRIVASTAVA, 2013). Isto se justifica devido à necessidade de diminuir os custos de produção, produzir substâncias de alta aceitabilidade comercial e promover a sustentabilidade, agregando valor a compostos descartados pelo setor agroindustrial (CASTRO e PEREIRA Jr., 2009; LADEIRA et al., 2010; NATHIYA et al., 2011; MALLER et al., 2012; JAIN et al., 2012). Dentre os resíduos que podem ser empregados estão incluídos: bagaço de laranja, tegumento de milho, farelo de trigo, cascas de manga e banana, bagaço de cana, resíduos hemicelulósicos e lignocelulósicos como fontes de carbono. Como fonte de nitrogênio, destac-se a milhocina, um subproduto da indústria do milho, rica em sais minerais, vitaminas, aminoácidos e outros nutrientes essenciais para o crescimento de micro-organismos (SILVA et al., 2002; TRIVEDI et al., 2012; DELABONA et al., 2013; ZIMBARDI et al., 2013). Os extratos vegetais também tem sido muito estudados e, na produção de inulinase, destacam-se os extratos de aspartago (*Asparagus racemosus*), dália (*Dahlia pinnata*), chicória (*Cichorium endívia*) (SINGH et al., 2006; FAWZI, 2011; JAIN et al., 2012). Entre os produtos de origem vegetal, o yacon (*Smallanthus sonchifolius*) vem recebendo atenção pelos acadêmicos e profissionais da saúde por ser uma fonte de alimento funcional (VANINI et al., 2009; FORTES e MUNIZ, 2009; ALBUQUERQUE e ROLIM, 2011).

O yacon é uma planta perene e herbácea, medindo entre 1,0 - 2,5 metros de altura, que pertence à família Asteraceae (SEMINARIO, 2003). São originários dos vales andinos da Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Noroeste da Argentina, em altitudes de 2.000 a 3.100 metros (VILHENA et al., 2000).

Também é popularmente conhecido como Ilaqon, Ilacum, Ilacuma, yacumpi, aricama, chicama, jiquima e jiquimilla. Seu nome científico é *Smallanthus sonchifolius*, tendo como sinônimos *Polymnia edulis* e *Polymnia sonchifolia* e o cultivo e o consumo do tubérculo dessa planta datam dos tempos pré-incas (VILHENA, 2000; SEMINARIO et al., 2003). O cultivo comercial no Brasil e outros países, como Paraguai, Estados Unidos, Eslováquia, China e Coreia, começou na década de 90 (LACHMAN et al., 2004). No Brasil, o maior consumo deste tubérculo se iniciou em meados dos anos 2000 e a raiz tornou-se conhecida popularmente como batata yacon ou batata “diet”, principalmente entre os consumidores de alimentos com baixo teor calórico (MOSCATTO et al., 2004). Este tubérculo é uma espécie pouco exigente e o Brasil propicia clima e solo adequados para seu plantio e, mesmo sendo de origem andina, o yacon é uma planta com desenvolvimento extremamente adaptável a condições adversas e vem recebendo grande atenção dos agricultores nas últimas décadas (SEMINARIO, 2003). Sua resistência ao frio e à seca está relacionada à grande quantidade de carboidratos de reserva nos órgãos subterrâneos (MANRIQUE et al., 2005), embora ainda exista pouco conhecimento sobre a morfologia e a natureza do sistema subterrâneo desta planta. Machado et al. (2004) realizaram um estudo botânico e de morfoanatomia do sistema subterrâneo do yacon, definindo que:

“a planta apresenta eixos aéreos, com folhas e gemas vegetativas e florais, e um sistema subterrâneo espessado de natureza mista representado por rizóforos e raízes. Todo o sistema radicular é formado por raízes adventícias, sendo que algumas permanecem delgadas e outras sofrem intensa tuberação” (Figura 01).



Figura 1 (A) plantas de yacon em crescimento, (B) partes subterrâneas e raízes.
Fonte: Seminario et al., 2003

Os frutoolissacarídeos (FOS) são os principais carboidratos de reserva do yacon, embora muitos autores erroneamente refiram-se à inulina como polissacarídeo predominante (Tabela 01). A água representa 83% a 90% da composição de seus tubérculos e 90% da matéria seca é constituída de carboidratos de reserva, sendo até 70% de FOS e o restante constituído de inulina, glicose, frutose e sacarose (SEMINÁRIO et al., 2003; LACHMAN et al., 2004). O yacon também apresenta na composição química de suas raízes tuberosas α -caroteno, β -caroteno, vitamina A, compostos polifenólicos, ácido cafeico, substâncias antioxidantes e várias fitoalexinas como agentes antifúngicos (TAKASUGI e MASUDA, 1996; QUINTEROS, 2000; TEKENAKA et al., 2003; SEMINARIO et al., 2003; CASTRO et al., 2012). Silva (2007) comparou diferentes trabalhos sobre a composição química do yacon e observou que os carboidratos são predominantes, atingindo 85,55% da massa seca, seguido por até 23% de cinzas, 6-7% de proteínas, 0,75% de lipídios e entre 3,16% e 9,12% o conteúdo de fibras alimentares solúveis, insolúveis e totais.

A inulina e os FOS podem ser utilizados como ingredientes funcionais, aqueles que promovem benefícios para a saúde além de sua nutrição básica, podendo substituir o açúcar nos alimentos (DURO et al., 2012). A inulina e os FOS não são digeridos durante a alimentação, sendo muito utilizado em dietas

para diabéticos (ALBUQUERQUE et al., 2011). Assim, grande atenção tem sido dada aos carboidratos da dieta, com foco especial aos FOS e frutose, que podem auxiliar a saúde de várias formas como: absorção de ferro em crianças (SINGH e GILL, 2006), substituição da sacarose no caso dos diabéticos e auxílio da flora intestinal no tratamento de constipação, eliminando substâncias putrefativas no trato intestinal e melhorando o perfil dos lipídios no sangue (ROBERFROID, 2005; RICHETTI et al., 2012).

Tabela 01 Principais frutanos presentes em alguns vegetais

| Nome comum | Nome científico | Família | Orgão utilizado | Frutano predominante |
|-------------------|---|----------------|------------------------|-----------------------------|
| Chicoria | <i>Cichorium intybus</i> | Asteraceae | Raiz | Inulina |
| Topinambo | <i>Helianthus tuberosus</i> | Asteraceae | Tuberculo | Inulina |
| Dalia | <i>Dahlia</i> sp. | Asteraceae | Rizoma | Inulina |
| Yacon | <i>Smallanthus sonchifolius</i> | Asteraceae | Raiz | FOS |
| Alho | <i>Alium sativum</i> | Liliaceae | Bulbo | Inulina |
| Cebola | <i>Alium cepa</i> | Liliaceae | Bulbo | Inulina |
| Aspargagos | <i>Asparagus officinalis</i> | Liliaceae | Bulbo | Inulina |
| Trigo | <i>Triticum durum</i> | Poaceae | Grão | Inulina |
| Banana | <i>Musa</i> sp. | Musaceae | Fruto | Inulina |
| Centeio | <i>Secale cereale</i> | Poaceae | Cereal | Inulina |
| Dente de Leão | <i>Taraxacum officinale</i> | Asteraceae | Folhas | Inulina |
| Cevada | <i>Hordeum vulgare</i> sp. <i>vulgare</i> | Poaceae | Cereal | Inulina |

Seminario et al., 2003.

A principal diferença química entre os FOS e a inulina é o grau de polimerização da cadeia e, por este motivo, os FOS também são conhecidos como inulo-oligossacarídeos (MÜLLER et al., 2006). Normalmente o termo oligofrutose (OF) é utilizado para designar o produto de hidrólise da inulina por ação enzimática e os FOS são nomes utilizados para designar carboidratos oligossacarídicos do tipo inulina, com grau de polimerização inferior a 10 unidades de monômeros de frutose (FORTES e MUNIZ, 2011). A inulina é um polissacarídeo formado pela condensação de monossacarídeos de frutose e o número de unidades (GF_n) varia entre 10 e 60 (Figura 02), enquanto para os FOS varia entre 2 e 10 unidade na cadeia (Figura 03). A inulina é um polissacarídeo de polifrutano, linear, amplamente encontrado na natureza, que

serve como um carboidrato de reserva nas plantas das famílias Compositae e Gramineae e é acumulada nas partes subterrâneas de plantas da família Asteracea como alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*), dalia (*Dahlia pinnata*), chicória (*Cichoriumendivia*), dente de leão (*Taraxacum officinale*), yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e em pequenas quantidades no alho e cebola (Tabela 01) (LACHMAN et al., 2004; YUAN et al., 2008; KANGO, 2008; BONCIU et al., 2012). Na alcachofra de Jerusalém, chicória, dália e yacon as concentrações de inulina e frutooligossacarídeos podem chegar até 20% do peso fresco, fazendo destes vegetais importantes fontes de inulina e oligofrutoses (SEMINARIO, 2003).

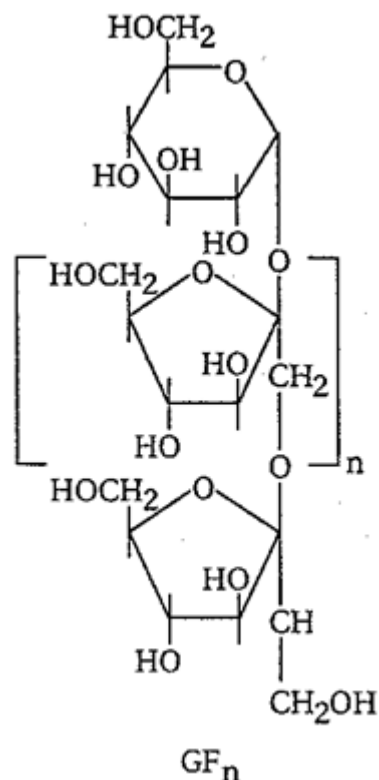


Figura 02 Estrutura química do polímero de inulina. O número de moléculas de frutose (GF_n) pode variar entre 10 a 60 unidades ligadas entre si por ligações do tipo β (2→1). Fonte: Roberfroid, 1993.

As unidades de frutose da inulina e FOS são do tipo β (2→1), com as cadeias poliméricas terminadas em resíduos de glicose na extremidade (BASTON et al., 2012). Os FOS ou oligofrutanos pertencem também à classe dos frutanos e são definidos pela combinação dos açúcares 1-kestose (GF₂),

nistose (GF₃) e frutofuranosilnistose (GF₄), com unidades frutose (F) com ligação β(2→1) e na posição da sacarose β(2→1), variando em seu grau de polimerização de 2 a 10 (Figura 03) (SANTOS e MAUGERI., 2006). O grau de polimerização (GF_n) e (F_n) depende da planta, clima, fonte, condições de cultivo e tempo de armazenamento após a colheita (SEMINÁRIO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004).

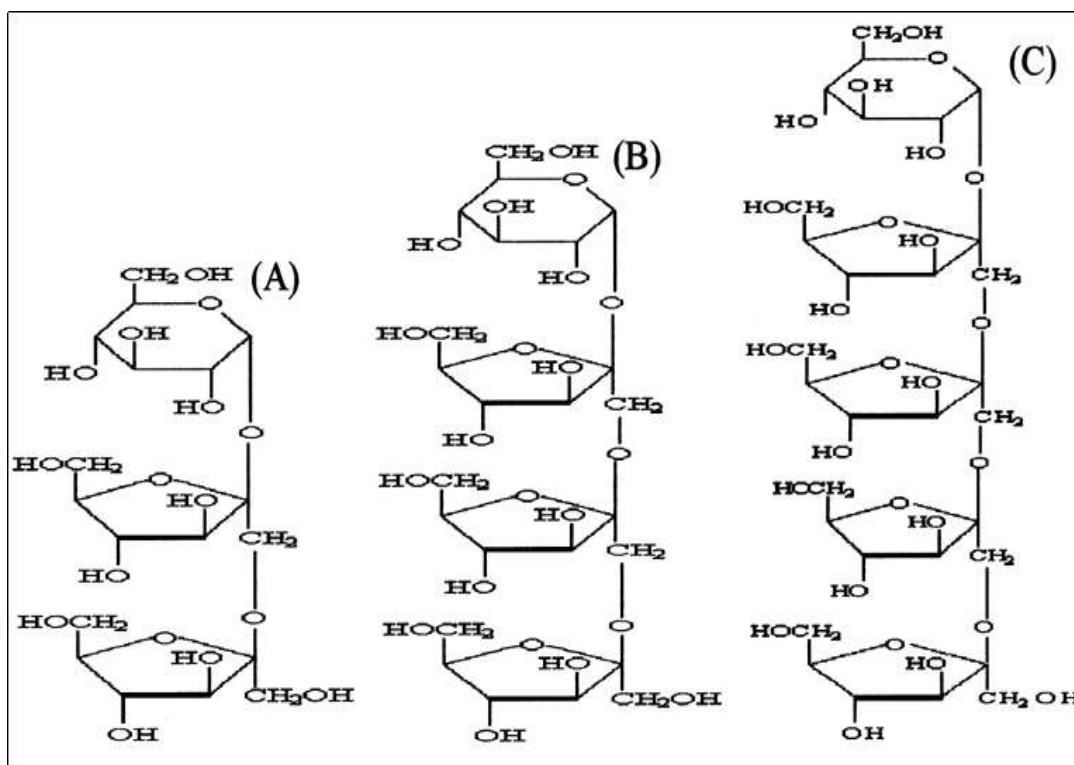


FIGURA 03 Estrutura química dos frutooligossacarídeos: A) kestose (GF₂); B) nistose (GF₃) e C) frutofuranosil nistose (GF₄). Fonte: Passos e Park, 2003.

Os frutanos tem recebido grande atenção das indústrias como uma matéria-prima para a produção de frutose e bioetanol e estão sendo utilizados amplamente nas indústrias alimentícias, sendo usados como aditivos de alimentos e suplementos de dieta (YUAN et al., 2008; RISSO et al., 2012).

Entretanto, o yacon tem sido pouco explorado como substrato para a produção de substâncias de origem microbiana. Apenas recentemente surgiram alguns trabalhos utilizando os derivados desta planta como fonte de carbono para micro-organismos na produção de enzimas (CAZETTA et al., 2005; VANINI et al., 2009; DURO et al., 2012; PEIXOTO et al., 2012). Cazetta et al. (2005) estudaram a produção de inulinase utilizando extrato de yacon por

Kluyveromyces marxianus. Peixoto (2012) utilizou xarope de yacon como substrato e obteve boas produções de inulinase por *K. marxianus*.

1.2 ENZIMA INULINASE

As enzimas são classificadas como catalisadores protéicos que atuam aumentando a velocidade das reações químicas e biológicas (BROCK, 2010). Pelo fato de serem altamente específicas e ativas sob condições ambientais brandas, consistem em biocatalisadores ideais para processos biotecnológicos, explicando sua crescente utilização em processos industriais (DALLA-VECCHIA et al., 2004; UENOJO e PASTORE, 2007).

As inulinases são enzimas promissoras para a produção de xaropes com elevado teor de frutose (HFS) por hidrólise da inulina, FOS, sacarose e outros frutanos, apresentando rendimento elevado, de até 95% do produto final (ETTALIBI e BARATTI, 2001; MAZZUTI et al., 2010; NARAYANAN et al., 2013). Em função disto, esta enzima vem recebendo grande atenção pelas indústrias e pelos pesquisadores, uma vez que pode substituir, com vantagens, a produção de frutose por hidrólise convencional do amido, a qual é obtida a partir de 3 etapas, que incluem: a ação de α -amilases, amiloglicosidases e isomerases, obtendo-se apenas 45% de frutose no produto final devido ao equilíbrio termodinâmico da reação, formação de anidridos difrutose (que não possui capacidade adoçante) e provocam formação de coloração indesejável (VANDAME e DERYCKE, 1983; MAZUTTI et al., 2006).

Devido à importância das inulinases, existe um interesse crescente no isolamento, caracterização e produção dessas enzimas a partir de fontes microbianas. A enzima inulinase é pertence à classe das hidrolases, sendo classificada como uma frutanohidrolase 2,1- β -D-frutano (BONCIU et al., 2011). Fazem parte de uma importante classe de enzimas para produção de frutose e frutooligossacarídeos, que são amplamente utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia (ERDAL et al., 2011; NGUYEN et al., 2012). Estas enzimas podem ser classificadas em endo e exoinulinases, dependendo do seu modo de ação (Figura 4) (BONCIU et al., 2010). Endo-inulinases (2,1- β -D-frutano frutanohidrolase-EC 3.2.1.7) são específicas para hidrolisar as ligações entre

as unidades de frutose que estão localizados longe das extremidades da cadeia do polímero e, como produto, são liberados para o meio os oligossacarídeos como: inulobiose (Frutose 2), inulotriose (Frutose 3), inulotetraose (Frutose 4) e compostos que contém uma molécula de glicose cuja fórmula é GF(n). Nesse conjunto estão: sacarose (GF), kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4). As exo-inulinasas (β -D-frutohidrolase-EC 3.2.1.80) hidrolisam as unidades terminais da cadeia de frutose, liberando sacarose, frutose e glicose (ROBERFROID, 2005; MÜLLER et al., 2006; NGUYEN et al., 2012). O produto de hidrolise pelo conjunto de exo e endo-inulinase são comumente reportados como inulo-oligossacarídeos (IOS), frutos-oligossacarídeo (FOS), oligofrutanas ou oligofrutoses (MÜLLER et al., 2006; MAZUTTI et al., 2010; COGHETTO et al., 2012; NGUYEN et al., 2012).

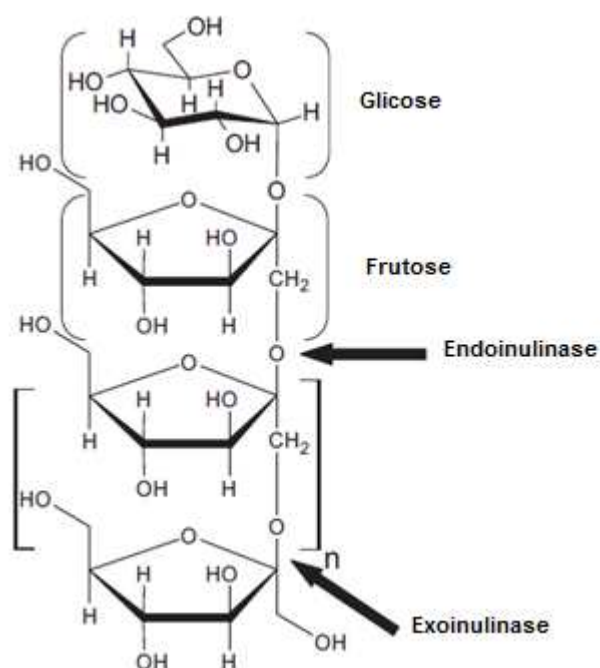


FIGURA 04 As enzimas inulinase são classificadas em endoinulinase e exoinulinase, de acordo com seu modo de ação das inulinasas microbianas sobre FOS. Fonte: Singh e Singh (2010).

Diversos trabalhos são relatados na literatura utilizando vegetais como fonte de inulina e FOS para estudos de produção de enzimas pois, segundo Trivedi et al., (2012), os compostos de carbono são fontes de energia para os micro-organismos. Um estudo de otimização de produção da enzima inulinase

por um novo isolado do fungo *Aspergillus tubingensis* CR16, utilizando diversas fontes de carbono, obteve, com o pó da raiz da chicória, os melhores resultados. Outros vegetais também são explorados e citados como substratos promissores na produção de enzimas. Em um trabalho realizado por Kango (2008) utilizaram-se fontes de carbono de diferentes origens vegetais que continham inulina como carboidrato de reserva, e obteve-se a maior produção da enzima com raízes de dente-de-leão, atingindo 52,5 UI/mL.

1.3 Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus*

Vários micro-organismos são descritos na literatura como produtores de inulinase (Tabela 2). Entre eles bactérias como *Xanthomonas*, *Rhizoctonia*, *Streptomyces*, entre outras. Fungos filamentosos como algumas espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, com destaque para o *A. Niger*, e leveduras, entre elas várias espécies dos gêneros *Candida* e *Pichia*. Entretanto, as leveduras do gênero *Kluyveromyces*, como *K. Fragilis* e *K. Marxianus*, são descritas como algumas das melhores produtoras desta enzima (DILIPKUMAR et al., 2011; JAIN et al., 2012; TRIVEDI et al., 2012; YUAN et al., 2012; BONCIU et al., 2012; NARAYANAN et al., 2013).

TABELA 2 Principais micro-organismos produtores da enzima inulinase

| Microorganismo | Atividade Enzimática | Substrato | Referência |
|---|----------------------|---|--------------------------------|
| Fungos Filamentosos | | | |
| <i>Aspergillus niger</i> ATCC 26913 | 21,9 U/mL | Raízes de chicória, trigo e bagaço de cana | Trivedi et al., (2012) |
| <i>Streptomyces sp.</i> MTCC- 3119 | 76 U/mL | Alho | Dilipkumar et al., (2011) |
| <i>Aspergillus niger</i> I-1-1 | 1,76 UI/mL | Alcachofra de Jerusalém | Bonciu et al., (2010) |
| <i>Rhizoctonia</i> I-PN4 | 1,8 U/mL | Trigo (buckwheat) | Bonciu et al., (2012) |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 20614 | 3199 U/ml | Dália, Alcachofra de Jerusalém | Baston et al., (2012) |
| <i>Streptomyces</i> SP. CP01 | 1,60 U/mL | Alcachofra de Jerusalém | Laowkton et al., (2012) |
| <i>Penicillium</i> ESS | 1,87 U/mL | Dália | Flores Gallegos et al., (2012) |
| <i>Faenibacillus</i> sp | 200 U/gds | Inulina pura | Müller et al., (2006) |
| <i>Januginosus</i> IMI 340524 | 34,6 U/mL | casca de banana, casca de melão, farelo de trigo e melão de arroz | Nguyen et al., (2013) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> gal80 | 34,6 U/mL | Alcachofra de Jerusalém | Lim et al., (2010) |

| | | | |
|---|-------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 16045 | 15,29 U/mL | Sacarose | Cazetta et al., (2010) |
| <i>K. marxianus</i> MTCC 3995 | 17,9 nkat mL | Dalia | Jain et al., (2012) |
| <i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 | 463 U/mL | Bagaço e melação de cana | Mazutti et al., (2010) |
| <i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 | 1,139 U/ml | Bagaço de cana | Squarezi et al., (2009) |
| <i>K. marxianus</i> YS-1 | 47,3 IU/mL | Aspartagos | Singh et al., (2006) |
| <i>Kluyveromyces</i> S120 | 409,8 U/g | Inulina | Xiong et al., (2007) |
| <i>K. marxianus</i> ATCC 16045 | 4,1 U/mL | Extrato de yacon | Cazetta et al., (2005) |
| <i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 | 212 U/mL | Inulina, frutose, sacarose e licose | Parekh e Margaritis, (1985) |
| <i>K. marxianus</i> MTCC-188 | 463 U/gds ⁻¹ | Alho | Dilipkumar et al., (2011) |
| <i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 | 4,0 U/mL | Sacarose | Risso et al., (2011) |
| <i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 | 391,9 U/g | Bagaço de cana | Mazutti et al., (2006) |

U^a, IU^a - atividade inulinase expressa como atividade internacional. gds⁻¹ grama de substrato seco

As leveduras são citadas como um dos principais micro-organismos produtores de inulinase, as quais podem crescer rapidamente produzindo grandes quantidades de biomassa e enzimas, principalmente as do gênero *Kluyveromyces* (LANE et al., 2011). Recentemente Cazetta et al. (2010) investigaram a influencia da concentração da sacarose como fonte de carbono, pH e aeração sobre a produção de inulinase e biomassa por *K. marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045, obtendo os melhores resultados na concentração 10 g/L⁻¹ de sacarose, pH 5.0 e aeração 1 vvm, atingindo a produção máxima da enzima cerca de 98,0 U/mL. Recentemente, foram publicados estudos de

produção de inulinase por *K. marxianus* em aspargos e tubérculos de dália, a fim de avaliar a produção da enzima inulinase, alcançando 50,2 U/mL e 55,4 U/mL respectivamente (SINGH et al., 2007, SINGH E BHERMI, 2008).

Devido à sua importância, novas cepas de *K. marxianus* mutantes estão sendo pesquisadas (MAZUTTI et al., 2007; MUGHAL et al., 2009; BONCIU e BAHRIM, 2011). Têm sido clonados genes de inulinase INU1 de *Pichia guilliermondii* e novas cepas recombinantes têm sido criadas para expressar este gene em *K. marxianus* CBS 6556 (YU et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

Entretanto, uma parte importante das pesquisas está focada na otimização das condições de produção desta enzima, incluindo os parâmetros operacionais como: pH, temperatura, agitação e aeração, além da influência das fontes de carbono e nitrogênio (TRIVEDI et al., 2012; ZHANG et al., 2012; ZIMBARDI et al., 2013).

Para se obter o rendimento máximo, e conseguir otimizar os processos de produção de enzimas, é necessário encontrar as condições ideais de cultivo nos processos fermentativos. Dentre os diversos parâmetros que afetam o crescimento microbiano, o pH desempenha um papel importante, pois induz mudanças morfológicas e influencia na secreção e no funcionamento das enzimas (SPIER, 2005). Todas as enzimas apresentam um valor de pH ótimo de reação, entretanto, este valor pode variar muito dependendo do micro-organismo em estudo, assim como dos substratos utilizados (LOURENÇO, 2004). Diferentes faixas de pH para a atividade da inulinases são descritas, em geral, entre 4 e 7. Para inulinases de *Aspergillus tubingensis* CR16 e *A. niger* NK-126 foram descritos pH ótimos em 5,0 (KANGO et al., 2008; TRIVEDI et al., 2012) e pH 6,5 para a cepa *A. niger* ATCC 20611 (DINARVAND et al., 2012). Inulinases produzidas por *Streptomyces* sp. CP01 tem o pH ideal em 6,0, no entanto, ainda manteve mais do que 80% da atividade máxima a um pH variando de 5,5 a 9,0, sendo estável a temperaturas até 50°C e em ampla faixa de pH (5,0-9,0), durante 30 minutos (LAOWKLOM et al., 2012). *G. candidum* OC-7 produz inulinases que apresentaram pH ótimo em 5 (ERDAL et al., 2011). Inulinases produzidas pela cepa *A. niger*, isolada de rizosfera em diferentes regiões da Índia, apresentaram pH ótimo para produção em pH 4,6 e 4,8 (NARAYANAN et al., 2013).

Sucessos biotecnológicos na aplicação de inulinas explicam claramente a crescente atenção sobre estas enzimas. Plantas que contêm inulina representam uma fonte nova, material barato e abundante para a indústria. Após a hidrólise de inulina, a frutose e inulo-oligossacarídeos obtidos pelas exo- e endoinulinas podem ser usadas para muitas aplicações práticas como a produção de bioetanol, na indústria de alimentos, óleo de origem microbiana e proteínas unicelulares, ácido cítrico e outras substâncias de interesse no setor químico (BONCIU e BAHRIM, 2011).

Diferentes processos fermentativos são utilizados para produção da enzima inulinase, como fermentação sólida e semi-sólida, fermentações do tipo batelada (ou descontínua), batelada alimentada (fed-batch) e contínua, mas merece destaque a fermentação em batelada do tipo submersa (MAZUTTI et al., 2010; CAZETTA et al., 2010; NGUYEN et al., 2012; DINARVAND et al., 2012; NARAYANAN et al., 2013; ALI e VIDHALE, 2013), por ser uma metodologia mais simples e que exige equipamentos menos sofisticados. Neste tipo de metodologia os ensaios fermentativos são preparados com todas as condições necessárias para o crescimento do micro-organismo e o processo só é interrompido quando termina o período de fermentação (PACHECO, 2010).

Aliado a isto, técnicas de planejamento experimental e otimização de processos têm sido cada vez mais utilizadas para otimização dos fatores que influenciam os processos fermentativos (REDDY et al., 2003; SINGH e LOTEY, 2010; RAJESHKUMAR et al., 2013; ZIMBARDI et al., 2013). A aplicação de análises estatísticas permite avaliar a ação simultânea dos parâmetros que afetam a fermentação, o que pode melhorar o rendimento do produto, reduzir o tempo do processo, reduzir a concentração dos substratos e, conseqüentemente, diminuir os custos globais, tornando o processo mais rentável (ELIBOL, 2004; XIONG et al., 2007).

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é um método eficiente para determinar as condições ótimas de fermentação e estabelecer quais os melhores parâmetros operacionais para produção de enzimas, e consiste em um grupo de procedimentos matemáticos e estatísticos que são usados para estudar a relação entre uma ou mais respostas (variáveis dependentes) e um número de fatores (variáveis independentes) (RODRIGUES e IEMMA, 2009; SINGH e LOTEY, 2010). Esta metodologia permite criar

gráficos de superfície de resposta que são muitos úteis para indicar à direção a ser tomada nos processos (SCHEUFELE et al., 2012). Estes métodos são mais eficientes que os métodos tradicionais que lidam com um único parâmetro por ensaio fermentativo, os quais frequentemente falham em localizar as condições ótimas, porque não consideram o efeito de possíveis interações entre as variáveis (JUNG et al., 1989; OLIVEIRA et al., 2004; SANTOS et al., 2007).

Diversos fatores estão envolvidos nos processos bioquímicos e influenciam diretamente a produção de enzimas, por isso é importante testar o maior número de variáveis possíveis e suas interações. O DCCR visa diminuir o número de ensaios fermentativos e fornecer informações mais confiáveis e completas (JUNG et al., 1989; SANTOS et al., 2007; RODRIGUES e IEMMA, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, E. N.; ROLIM, P. M. Potencialidades do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) no diabetes *Mellitus*¹. **Ciências Médicas**, Campinas, v. 20, p. 99-108, 2011.

ALI, S. S.; VIDHALE, N. N. Protease Production by *Fusarium oxysporum* in Solid- State Fermentation Using Rice Bran. **American Journal of Microbiological Research**, v. 1, n. 3, p. 45-47, 2013.

BASTON, O.; BONCIU, C. N.; BAHRIM, G. Preliminary study of lactic acid production from inulin Hydrolysates using *Lactobacillus acidophilus* la-5. **Scientific Bulletin**, Series F, Biotechnologies, v. 16, 2012.

BONCIU, C.; STRUTA, V.; BAHRIM, G.; Isolation and screening of new mould strains Able for inulinase biosynthesis and inulin from Jerusalem artichoke hydrolysis. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 7, p. 77-81, 2010.

BONCIU, C, N e BAHRIM, G. *Inulinases* – a Innovative Romanian Food Biotechnology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 9, p. 1-11, 2011.

BONCIU, N.; BAHRIM: Fuel ethanol bioproduction from inulin rich feedstock. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.11, p. 1- 8, 2012.

CASTRO, A. M e PEREIRA Jr, N. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo *termofílico Bacillus* sp em fermentação submersa:

otimização do meio de cultura usando a técnica de Planejamento experimental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2009.

CASTRO, A.; CABALLERO, M.; HERBAS, A.; CARBALLO, S. Antioxidants in yacon products and effect of long term storage. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32(3), p. 432-435, 2012.

CAZETTA, M.; MARTINS, P.; 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 Biophy and Technology**, v. 53, n.3, p. 701-707, 2010.

CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A.; ANJOS, V.; Bell, M. J. V ; Rodrigues, L. N.; SINGH, O. V.; ROSA, C. A.; PAGNOCCA, F. C e SILVA, S. S. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6:4, p. 2-15, 2013.

COGHETTO, C. C.; SCHERER, R. P.; SILVA, F.; GOLUNSKI, S.; PERGHER, B. C.; OLIVEIRA C, A.; OLIVEIRA C, V.; TREICHEL, H. Natural montmorillonite a support for the immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 284–289, 2012.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DELABONA, P.S; PIROTA, R. P. B.; CODIMA, A.C.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236–242, 2013.

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOHAN, N. Optimization of Inulinase Production from Garlic by *Streptomyces* sp, in Solid State Fermentation Using Statistical Designs. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 7, 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 Biotechnology**, v. 15, p. 9, 2012.

DURO, H. L.; HURTADA, W. A.; RODRIGUEZ, F. M. Functional Components and Sensory Evaluation of Yacon (*Polymnia sonchifolia* L.) Chips at Various Drying Conditions. **Philippine Agricultural Scientist**, v. 95 n. 3, p. 300–304, 2012.

ELIBOL, M. Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1057-1062, 2004.

ERDAL S.; CANLI, O.; ALGUR, F. O. Inulinase production by *Geotrichum candidum* using Jerusalem artichoke as sole carbon source, **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, p. 4, 2011.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *aspergillus ficuum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 596- 601, 2001.

FAWZI, E. M. Comparative study of two purified inulinases from thermophile *thielavia terrestris* nr1 8126 and mesophile *aspergillus foetidus* nr1 337 grown on *cichorium intybus* l. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 633-649, 2011.

FLORES-GALLEGOS, A. C.; MORLETT-CHÁVEZ, J.; AGUILAR, N.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. Inulinase Production by a Mexican Semi-Desert Xerophytic *Penicillium citrinum* Strain under Submerged Culture. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 4(1) p. 46-50, 2012.

FORTES, R. C e MUNIZ, L. B. Efeitos da suplementação dietética com frutooligossacarídeos e inulina no organismo humano: estudo baseado em evidências. **Comunidade Ciências Saúde**, v. 20(3), p. 241-252, 2009.

JAGANMOHAN, P; PURUSHOTTAM D. B e PRASAD, S. V. Production of Single Cell Protein (SCP) with *Aspergillus terreus* Using Solid State Fermentation. **European Journal of Biological Sciences**, v. 5 (2), p. 38-43, 2013.

JAIN, S C.; JAIN, N. K. Production of inulinase from *kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 62-69, 2012.

JUNG, K. H.; YUN, K. R.; KANG.; J.Y.; LIM.; LEE, J. H. Mathematical model for enzymatic for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. **Enzyme Microbial Technology**, v. 11, p. 491-494, 1989.

KANGO N. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. **Jornal of Food Engineering**, v. 85, p. 473-478, 2008.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V, H.; MARTINS, M. L. L. utilização de resíduos agroindustriais para a produção de

proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

LACHMAN, J.; HAVRLAND, B.; FERNÁNDEZ, E. C.; DUDJAK, J. Saccharides of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] tubers and rhizomes and factors affecting their content. **Plant Soil Environmental**, v. 50, p. 383–390, 2004.

LANE, M. M, MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p. 17–26, 2010.

LAOWKLOM, N.; CHANTANAPHAN, R.; PINPHANICHAKARN, P. Production, Purification and Characterization of Inulinase from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. CP01. **Natural Resources**, v. 3, p. 137-144, 2012.

LIM, SEOK-HWAN.; LEE, H.; SOK, D.; CHOI, E. Recombinant Production of an Inulinase in a *Saccharomyces cerevisiae* gal80 Strain. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, V. 20(11), p. 1529–1533, 2010.

LOURENÇO, C. **Desenvolvimento de processo contínuo de obtenção de frutose a partir de sacarose**. Campinas – SP, 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimento). Universidade Estadual de Campinas.

MACHADO, S. R.; DENISE, M. T.; MARÍCIA, R. D.; NANUZA L. M. Morfoanatomia do sistema subterrâneo de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (*Asteraceae*). **Revista Brasileira de Botânica**, Botucatu, v.27, n.1, p.115-123, 2004.

MALLER, T. M. A.; DA SILVA, A. R. L.; DAMÁSIO, V. R. A.; REIS, J. A.; JORGE, M. L. T. M. POLIZELI. Production of Pectin Lyase by *Aspergillus niveus* under Submerged and Solid State Fermentations Using Agro Industrial Residues as Carbon Sources. **International Research Journal of Microbiology**, v. 3(1) p. 029-035, 2012.

MANRIQUE, I. A.; PÁRRAGA, M.; HERMANN. Jarabe de yacón: Principios y Procesamiento. **Serie: Conservación y uso de La biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)**. No. **8A**. Centro Internacional de la Papa, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Fundación Erbacher, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. p. 31, 2005.

MAZUTTI, M.; BENDER, J. P.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 56–59, 2006.

MAZUTTI, M.; CENI, G.; LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, p. 297–304, 2007.

MAZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; SKOVRONSKI, A.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F. Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Food Chemistry**, v. 120, p.163–173, 2010.

MOSCATTO, J. A. et al. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.4, p.634-640, 2004.

MUGHAL, M. S.; ALI, S.; ASHIQ, M.; TALISH, A. S. Kinetics of an extracellular exo-inulinase production from a 5-fluorocytosine resistant mutant of *Geotrichum candidum* using twofactorial design, **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3657-3662, 2009.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, 1959.

MÜLLER, J. M. et al. Caracterização de oligofrutoses produzidas por endo-inulinases de *Paenibacillus sp.* **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 363-374, 2006.

NASCIMENTO, D. S. **Aplicação de inulinases de leveduras isoladas do semi-árido para a produção de concentrados de frutose**. Feira de Santana - BA, 2010. Dissertação (mestrado em biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana.

NARAYANAN, M.; SRINIVASAN, B.; GAYATHIRI, A.; AYYADURAI, A.; MANI, A. Studies on the Optimization and Characterization for the Biosynthesis of Inulinase under Solid state Fermentation. **International Journal of Chemistry Technology Research**, v.5, n.1, p. 376-384, 2013.

NATHIYA, K.; NATH, J.; ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M. Optimised production of L-glutaminase: A tumour inhibitor from *Aspergillus flavus* cultured on agro industrial residues. **African Journal of Biotechnology**, v. 10(63), p. 13887-13894, 2011.

NGUYEN, Q. D.; SUJTÓ, N. M.; BUJNA, E.; HOSCHKE, A.; REZESSY-SZABÓ, J. M. Effects of Medium Composition and Process Parameters on the Production of Extracellular Inulinase by *Thermomyces lanuginosus*. **Food Technology Biotechnology**, v. 51 (1) p. 36–44, 2013.

OLIVEIRA, R. A.; PARK, K. J.; CHIORATO, M.; PARK, K. J. B.; 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.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Uberlândia – MG, 2010. Dissertação (mestrado em engenharia química). Universidade Federal de Uberlândia.

PAREKH, S.; MARGARITIS, A. Inulinase (β -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 446 - 448, 1985.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Fructooligosaccharides: implications in human health being and use in foods. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p385-390, 2003.

QUINTEROS, E. T. T. **Produção com tratamento enzimático e avaliação do suco de yacon**. Campinas, 2000. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

RAJESHKUMAR, G. S.; JOBITHA, G.; MALARKODI, C.; KANNAN, C.; ANNADURAI, G. Optimization of Marine Bacteria *Enterococcus* sp. Biomass Growth by using Response Surface Methodology. **Journal Environmental nanotechnology**, v. 2, n. 1, p. 20 - 27, 2013.

REDDY, P. R. M.; RAMESH, B.; MRUDULA, S.; REDDY, G.; SEENAYYA, G. Production of thermostable β -amylase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation: optimization of nutrient levels using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 267-277, 2003.

RICHETTI, A.; MUNARETTO, C. B. et al. Immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using modified sodium alginate beads. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, P. 383–388, 2012.

RISSE, F. V., A.; MAZUTTI, M. A. H.; TREICHEL, E. C.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Assessment of fructooligosaccharides production from sucrose in aqueous and aqueous-organic systems using immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-757. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, p. 245-249, 2012.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. **Nutrition reviews**, v. 51(5), p.137-46, 1993.

ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v. 93, Suppl. 1, p. 13–25, 2005.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 2ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2009.

SANCHÉS, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnological Advances**, Berlin, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANTOS, M.P. A.; MAUGERI, F. Synthesis of Fructooligosaccharides, **Food Technology Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 181–186, 2007.

SANTOS, S. F. M.; SOUZA, R. L. ALVES.; ALCÂNTARA, S. R.; PINTO, G. A. S.; SILVA, FLÁVIO, L. H.; MACEDO, G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo Da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do Pedúnculo de caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.10, n. 2, p.101-109, 2008.

SCHEUFELE, F. B.; BUTZKE, A. S.; MARRA, I. F.; HASAN, S. M.; FIORESE, L. M. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço De cana-de-açúcar. **Engevista**, v. 14, n. 3, p. 310-321, 2012.

SEMINARIO, J.; VALDEMARRA, M.; MANRIQUE, L. **El Yacon: fundamentos para el aprovechamiento de um recurso promisorio**. Centro Internacional de La papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, agencia suiza para El desarrollo y La cooperacion (COSUDE), Lima, Peru, p. 60, 2003.

SQUAREZI, C.; LONGO, C.; CENI, G.; BONI, G.; SILVA, M. F.; LUCCIO, M.; MAZUTTI, M.A.; MAUGERI, A.; RODRIGUES, M.I.; TREICHEL, H. Inulinase Production by Agro-Industrial Residues: Optimization of Pretreatment of Substrates and Production Medium. **Food Bioprocess Technology**, v. 2, p. 409–414, 2009.

SILVA, D.; MARTINS, E.S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *penicillium viridicatum* rfc3 by Solid State Fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p. 318-324, 2002.

SILVA, A. S. S. **A raiz da yacon (*Smallanthus sonchifolius* poepping & endlicher) como fonte de fibras alimentares, sua caracterização físico-química, uso na panificação e sua influência na glicemia pós-prandial**. Florianópolis - SC, 2007. Tese (doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina.

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

SINGH, R. S.; BHERMI, H. Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root tubers of *Asparagus officinalis*. **Bioresource Technology**, v. 99, n,15, p. 7418-7423, 2008.

SINGH, R. S. e LOTEY, S. Enhanced Exoinulinase Production from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using Response Surface Methodology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1005-1013, 2010.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P. Fructooligosaccharides from Inulin as Prebiotics, **Food Technology and Biotechnology**, v. 48 (4), p. 435–450, 2010.

SKOWRONEK, M.; FIEDUREK, J. Optimization of Inulinase Production by *A. niger*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 3, p. 141–146, 2004.

SRIVASTAVA, A. Comparative Assessment of Antibacterial Activity of Secondary Metabolites from Three Medicinal Plants: *Ocimum sanctum*, *Azadirachta indica* and *Mentha arvensis*. **Helix**, v. 2, p. 301-304, 2013.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Curitiba – PR, 2005. Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná.

TAKASUGI, M.; MASUDA, T. Three 4'-hydroxyacetophenone-related phytoalexins from *Polymnia sonchifolia* **Phytochemistry**, v. 43 (5), p. 1019 – 1021, 1996.

TRIVEDI, S.; DIVECHA, J.; SHAH, A. Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates, **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 483– 490, 2012.

VANDAMME, E. J.; DERYKE, D. G. Microbial inulinases fermentation process, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 139-176, 1983.

VANINI, M.; BARBIERI, R. L.; CEOLIN, T.; HECK, R.M.; MESQUITA, M.K. A relação do tubérculo andino yacon com a saúde humana. **Ciencia, Cuidado e Saúde**, v. 8, p. 92-96, 2009.

VILHENA, S. M. C.; CÂMARA, F. L. A.; KAKIHARA, S. T. O cultivo de yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 5-8, 2000.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. PECTINASES: APLICAÇÕES INDUSTRIAIS E PERSPECTIVAS. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

XIONG, C.; JINHUA, W.; DONGSHENG, L. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 179–184, 2007.

ZHANG, S.; YANG, Z.; WANG, Q.; HUAA, Y.; K. ZHAO, Z. High-level secretory expression and characterization of the recombinant *Kluyveromyces marxianus* inulinase. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 151–155, 2012.

ZIMBARDI, L. R. L. A.; SEHN, C.; MELEIRO, P.; SOUZA, F. H. M.; MASUI, C. D.; NOZAWA, M. S. F.; GUIMARÃES, L. H. S.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Optimization of β -Glucosidase, β -Xylosidase and Xylanase Production by *Colletotrichum graminicola* under Solid-State Fermentation and Application in

Raw Sugarcane Trash Saccharification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 2875-2902, 2013.

YU, X.; GUO, N.; CHI Z.; GONG, F.; SHENG, J.; CHI, Z. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 266-271, 2009.

YUAN, W. J.; ZHAO, X. Q.; GE, X. M.; BAI, F. W. Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 2076–2083, 2008.

YUAN, B.; HU, N.; SUN, J.; WANG, S. A.; FU-LI, L. Purification and characterization of a novel extracellular inulinase from a new yeast species *Candida kutaonensis* sp. nov. KRF1T. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n.6, p. 1517-26, 2012.

CAPÍTULO I

EXTRATO DE YACON COMO FONTE DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE INULINASE PELA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Artigo formatado nas normas da revista *Journal of Applied Microbiology*

Resumo

Objetivos: Estudar a influência da concentração do extrato de yacon, como fonte de carbono, e do pH sobre a produção da enzima inulinase e de biomassa pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Métodos e Resultados: Foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 para planejamento dos experimentos e superfície de resposta para análise dos resultados, respectivamente. A máxima atividade enzimática foi de 14,48 U/mL e de biomassa foi de 9,03 g/L, obtidas na condição de 55% de extrato de yacon e pH 5,5. O pH foi à única variável que apresentou influência significativa ($p < 0,05$) sobre a produção da biomassa e da enzima. Os coeficientes de correlação para inulinase ($R^2 = 0,92$) e para biomassa ($R^2 = 0,70$) indicaram que existe boa correlação entre os valores observados experimentalmente e os valores preditos pelo modelo. Os valores do teste F, de 26,77 para atividade enzimática e de 10,33 para biomassa, mostraram que o modelo é altamente confiável no nível de 95% de confiança.

Conclusões: A produção de inulinase e biomassa por *K. marxianus* NRRL Y-7571 em extrato de yacon foi fortemente influenciada pela variação do pH do meio de cultivo. A utilização do (DCCR) 2^2 , em comparação com outros trabalhos utilizando esta mesma fonte de carbono, foi altamente eficiente na otimização do processo, proporcionando um aumento de cerca de 3,5 vezes na produção de inulinase.

Palavras-chave: enzimas, leveduras, otimização

Introdução

Os frutoolissacarídeos são os principais carboidratos de reserva do yacon, embora muitos autores erroneamente refiram-se à inulina como polissacarídeo predominante. A água representa 83% a 90% da composição de seus tubérculos e 90% da matéria seca é constituída de carboidratos de reserva, sendo até 70% de FOS e o restante constituído de inulina, glicose, frutose e sacarose (Seminário *et al.* 2003; Lachman *et al.* 2004). A inulina e os FOS são formados por cadeias de oligofrutanas encontradas como polissacarídeos de reserva nas plantas das famílias Compositae e Gramineae e são acumuladas nas partes subterrâneas de plantas da família Asteracea como Alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*), dalia (*Dahlia pinnata*), chicória (*Cichoriumendivia*), dente-de-leão (*Taraxacum officinale*), yacon (*Smallanthus; sonchifolius*) e, em pequenas quantidades, no alho e cebola (Lachman *et al.* 2004; Kango 2008; Bonciu *et al.* 2012; Yuan *et al.* 2012). As enzimas que atuam nestes polissacarídeos são denominadas inulinases. Estas enzimas despertaram interesse na produção de xaropes com elevado teor de frutose (HFS) por hidrólise da inulina, FOS, sacarose, além de rafinose e estaquiose, com um rendimento em frutose de até 95% do produto final (Ettalibi e Baratti 2001; Mazzuti *et al.* 2010; Narayanan *et al.* 2013). A hidrólise da inulina e FOS por estas enzimas pode substituir a produção de frutose por hidrólise convencional do amido, que ocorre a partir de 3 etapas, que incluem a ação de α -amilases, amiloglicosidases e isomerases, obtendo-se apenas 45% de frutose no produto final, devido ao equilíbrio dinâmico da reação, além da formação de anidridos de difrutose, que não possuem capacidade adoçante, e conferem coloração indesejável ao produto final (Vandame e Derycke 1983; Mazutti *et al.* 2006).

Devido à sua importância em bioprocessos, existe um interesse crescente nas inulinases de origem microbiana. Estas enzimas são classificadas como hidrolases, sendo denominadas β -2,1-frutanohidrolase (Bonciu *et al.* 2011; Nguyen *et al.* 2013). Estas enzimas podem ser classificadas em endo e exoinulinases, dependendo do seu modo de ação. Endo-inulinases (2,1- β -D-frutano frutanohidrolase) (EC 3.2.1.7) são específicas para hidrolisar as ligações entre as unidades de frutose que estão localizados

longe das extremidades do polímero e, como produtos, são liberados para o meio oligossacarídeos como inulobiose (F2), inulotriose (F3), inulotetraose (F4) e compostos que contém uma molécula de glicose cuja fórmula é GF(n). Nesse conjunto estão: sacarose (GF), kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4). Exo-inulinases (β -D-frutohidrolase) (EC 3.2.1.80) hidrolisam as unidades terminais da cadeia de frutose, liberando, sacarose, rafinose e frutose, entre outros açúcares (Roberfroid 2005; Müller *et al.* 2006; Nguyen *et al.* 2013). Os produtos de hidrolise do conjunto de exo- e endo-inulinases são comumente reportados como inulo-oligossacarídeos (IOS), frutooligossacarídeo (FOS), oligofrutanas ou oligofrutoses (Müller *et al.* 2006; Mazutti *et al.* 2010; Coghetto *et al.* 2012; Nguyen *et al.* 2013).

Embora muitos micro-organismos sejam descritos como produtores de inulinases, as leveduras do gênero *Kluyveromyces* estão entre os melhores e mais bem estudados (Mazutti *et al.* 2007; Mughal *et al.* 2009; Bonciu e Bahrim 2011). As fontes de carbono contendo inulina têm despertado grande interesse, uma vez que representam substratos renováveis e abundantes para a produção de xaropes de frutose e frutooligossacarídeos, que são amplamente utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia (Xiong *et al.* 2007; Chi *et al.* 2011). Assim, este trabalho teve como objetivo, estudar a influência do extrato de yacon, como fonte de carbono, e do pH na produção de inulinase por *K. marxianus* NRRL Y-7571.

Material e métodos

Micro-organismo e condição de cultura:

- Preparo do pré-inóculo e inóculo

A levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi obtida da Fundação André Tosello, de Campinas, Brasil (referência 7073). A cultura estoque foi preservada sob congelamento em tubos criogênicos com glicerol a 20%. Após crescimento de 2 a 3 dias, uma alçada da cultura da levedura foi transferida para tubo de ensaio contendo o meio basal composto de: extrato de levedura 0,5%, sacarose 1%; KH_2PO_4 1,5%; NH_4Cl 0,15%; KCl 0,12%;

MgSO₄.7H₂O 0,07%; milhocina 1,5% e incubado a 37°C, 150 rpm durante 24 horas. Em seguida, o conteúdo do tubo foi transferido para o meio de inóculo contendo: extrato de yacon 20%; milhocina 1,5%; KH₂PO₄ 1,5%; NH₄Cl 0,15%; KCl 0,12%; MgSO₄.7H₂O 0,07% e incubado a 37°C, 150 rpm durante 24 horas. Após este período, 10% do volume final dos ensaios foi transferido para os frascos da fermentação.

Planejamento experimental

O meio de fermentação utilizado nos experimentos foi de extrato concentrado do yacon, obtido por extração do suco dos tubérculos em extrator de suco (juicer) e, em seguida congelado, sendo desprezado o bagaço. As fermentações foram realizadas em batelada utilizando frascos Erlenmeyer contendo 30 mL de meio de cultura com a seguinte composição: milhocina 1,5%; KH₂PO₄ 1,5%; NH₄Cl 0,15%; KCl 0,12%; MgSO₄.7H₂O 0,07%. O cultivo foi realizado em agitador tipo shaker com a rotação de 150 rpm a 37°C por 96 horas.

Foram estudados os efeitos das variáveis independentes bem como suas interações. Para analisar a influência das variáveis selecionadas sobre a produção enzimática, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2², segundo Rodrigues e Iema (2009), e os parâmetros escolhidos foram (X₁) extrato de yacon e (X₂) pH, cujos valores variaram conforme os níveis apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Valores codificados e reais usados no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2² utilizando extrato de yacon como fonte de carbono.

| Variáveis Independentes | Níveis | | | | |
|---------------------------------------|--------|-----|-----|-----|------|
| | - 1,41 | -1 | 0 | 1 | 1,41 |
| X ₁ - Extrato de yacon (%) | 53 | 55 | 60 | 65 | 67 |
| X ₂ - pH | 5,2 | 5,5 | 7,5 | 9,5 | 10,3 |

Os valores experimentais obtidos foram ajustados ao modelo de segunda ordem conforme a Equação (1):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde: y é a resposta predita de produção de inulinase; X_1 e X_2 são as formas codificadas das variáveis independentes (extrato de yacon e pH, respectivamente); b_0 refere-se ao ponto de interseção; b_1 e b_2 são coeficientes lineares; b_{12} coeficiente de interação dupla; b_{11} e b_{22} são coeficientes quadráticos. Os valores dos níveis estudados foram calculados pela equação geral:

$$x_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad \text{Eq. (2)}$$

onde, X_n é o valor codificado; X é o valor real da variável independente; X_0 o valor real do ponto central; X_{+1} é o valor do nível superior; X_{-1} é o valor do nível inferior. Utilizando o software STATISTICA™ (v. 7.0) foi realizada a estimativa dos efeitos das variáveis e suas interações sobre a resposta analisada, considerando o nível de significância de 95%. O experimento foi validado pela análise de variância (ANOVA), considerando o test F, e a qualidade do ajuste do modelo quadrático foi expresso pelo coeficiente de determinação (R^2).

Crescimento celular

Após os cultivos, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos sob temperatura de refrigeração a 4°C e, em seguida, ressuspensas em 5 mL de água destilada e novamente centrifugadas para lavagem das células. A biomassa foi determinada por meio da densidade ótica a 600 nm e os cálculos foram realizados utilizando-se uma curva padrão de absorbância versus massa seca.

Atividade enzimática

A atividade enzimática do sobrenadante foi avaliada de acordo com Suzuki et al. (1988), pela determinação dos açúcares redutores formados durante a incubação de 5 mL de sacarose 2%; 2,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 4,0; 1,5 mL de água destilada, adicionando 1 mL do sobrenadante da cultura convenientemente diluído. O meio reacional foi colocado em banho-maria a 40°C, sob agitação, em agitador magnético com aquecimento durante 15 minutos. Alíquotas de 250 µL foram retiradas nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 e 15 minutos para determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalicílico-DNS (Miller 1959). A leitura das atividades enzimáticas foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Para elaboração da curva padrão, que relaciona a concentração de glicose (g/L) com a absorbância a 540 nm, foi utilizada solução de glicose a 1% e realizadas leituras, a 540 nm, das concentrações de 0,1 a 1%.

Os resultados foram apresentados em U/mL, onde cada unidade (U) de atividade de inulinase foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa um µmol de sacarose por minuto ou como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de um µmol de açúcar redutor por minuto de reação, sob as condições do ensaio.

Determinação do pH ótimo de atividade da inulinase

Foi obtido por meio da determinação da atividade enzimática em diferentes valores de pH, nos seguintes tampões: Glicina-HCl 0,05 M (2,0 e 3,0), tampão citrato de sódio 0,05 M na faixa de 3,0-6,0, tampão fosfato 0,05 M na faixa de 6,0 a 8,0, tampão Tris-HCl 0,05 M para a faixa de 8,0 e 9,0, Glicina-NaOH 0,05 M na faixa de 09-11.

Determinação da temperatura ótima de atividade e estabilidade térmica da enzima

A atividade enzimática foi determinada na faixa de 45°C a 70°C e a estabilidade térmica da enzima foi avaliada incubando-se amostras enzimáticas nas temperaturas de 45 °C, 50°C, 55°C e 60°C, durante 5 horas.

Resultados

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2² resultou em 11 ensaios, com 3 repetições no ponto central. A Tabela 2 apresenta as respostas obtidas, mostrando que a maior atividade enzimática (14,48 U/mL) e a maior produção de biomassa (9,03 g/L) ocorreram no ensaio 1, na condição de 55% de extrato de yacon e pH 5,5.

Tabela 2 Matriz do planejamento fatorial DCCR 2² com valores codificados e reais das variáveis e respostas (atividade enzimática e biomassa) após 96 horas.

| Ensaio | Variáveis codificadas | | Variáveis Não codificadas | | Valores Observados | | Valores preditos | |
|--------|-----------------------|----------------|---------------------------|------|--------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------------|
| | X ₁ | X ₂ | Extrato de yacon (%) | pH | Biomassa (g/L) | Atividade enzimática (U/mL) | Biomassa (g/L) | Atividade enzimática (U/mL) |
| 1 | -1 | -1 | 55 | 5,5 | 9,03 | 14,48 | 8,19 | 12,62 |
| 2 | 1 | -1 | 65 | 5,5 | 7,24 | 11,59 | 6,85 | 9,56 |
| 3 | -1 | 1 | 55 | 9,5 | 5,19 | 1,50 | 5,42 | 2,18 |
| 4 | 1 | 1 | 65 | 9,5 | 5,47 | 1,59 | 6,15 | 2,09 |
| 5 | -1,41 | 0 | 53 | 7,5 | 6,25 | 6,83 | 6,64 | 7,37 |
| 6 | 1,41 | 0 | 67 | 7,5 | 6,45 | 4,36 | 6,20 | 5,15 |
| 7 | 0 | -1,41 | 60 | 5,2 | 7,29 | 10,84 | 8,11 | 13,30 |
| 8 | 0 | 1,41 | 60 | 10,3 | 6,34 | 1,76 | 5,66 | 0,63 |
| 9 | 0 | 0 | 60 | 7,5 | 6,28 | 3,70 | 6,83 | 3,31 |
| 10 | 0 | 0 | 60 | 7,5 | 7,12 | 3,22 | 6,83 | 3,31 |
| 11 | 0 | 0 | 60 | 7,5 | 7,11 | 3,01 | 6,83 | 3,31 |

Os resultados variaram de 1,50 U/mL no ensaio 3 até 14,48 U/mL na ensaio 1 (Tabela 2). Pode-se observar que, de um modo geral, em uma concentração fixa de extrato de yacon, o aumento do pH resultou em queda da produção da enzima. As análises estatísticas confirmaram esta observação, pois o termo linear da variável pH (X₂) foi o único significativo (p<0,05) e

negativo. A interação entre as variáveis apresentou efeito positivo, embora não significativo, como mostram os valores dos coeficientes de regressão (Tabela 3). A fonte de carbono não apresentou efeito significativo ($p > 0,05$) sobre a produção de inulinase, não apresentando influência na faixa estudada (Fig. 1 A e B). De fato, pode ser observado que, nos ensaios com pH entre 5,2 e 5,5, encontram-se as maiores atividades enzimáticas (ensaios 1, 2 e 7) e, à medida que o pH aumentou, a atividade enzimática foi progressivamente diminuindo, obtendo-se valores menores que 2,0U/mL nos ensaios 1, 4 e 8 (pH 9,5 e 10,0) (Tabela 2).

Tabela 3 Coeficientes de regressão para atividade enzimática

| | Coeficientes de Regressão | Erro padrão | t(5) | p-valor |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------|-------------|----------------|
| Média | 3,31000 | 1,057186 | 3,1309 | 0,02593 |
| Extrato de yacon (%) (L) | -0,78664 | 0,647391 | -1,2150 | 0,27858 |
| Extrato de yacon (%) (Q) | 1,47812 | 0,770550 | 1,9182 | 0,11318 |
| pH (L) | -4,47763 | 0,647391 | -6,9164 | 0,00097 |
| pH (Q) | 1,83062 | 0,770550 | 2,3757 | 0,06349 |
| Extrato de yacon x pH | 0,74500 | 0,915550 | 0,8137 | 0,45280 |

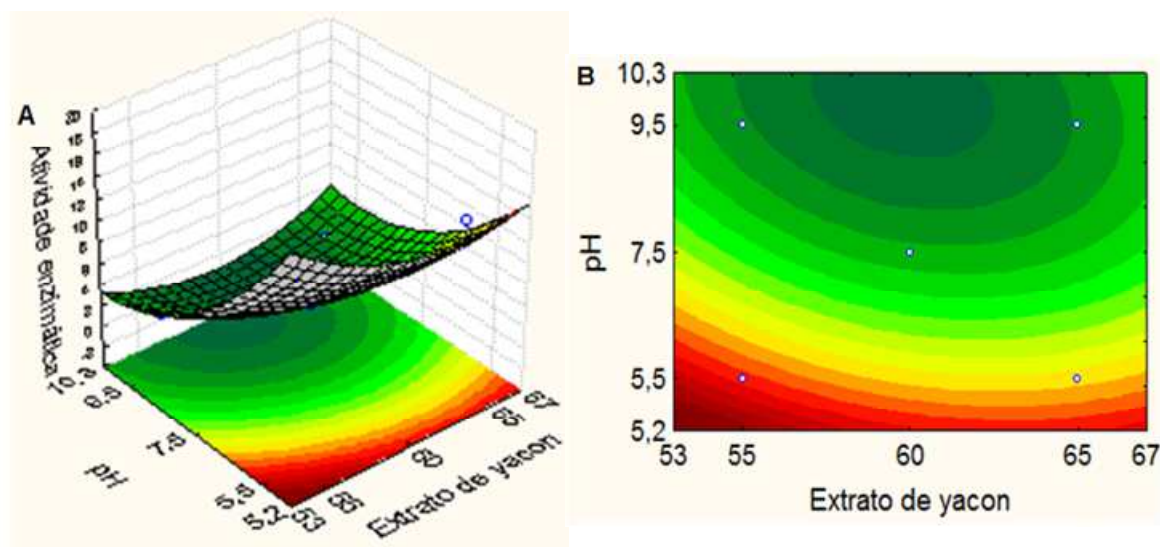


FIGURA 1 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a atividade de inulinase em função da concentração do extrato de yacon e pH por *K. marxianus* NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas, geradas de acordo com o primeiro planejamento.

O aumento do pH também causou um efeito negativo no crescimento celular, embora menos acentuado do que na atividade enzimática, que variou de 5,19 g/L (ensaio 3) até 9,03g/L (ensaio 1). Os ensaios que apresentaram as menores produções de biomassa (5,33 g/L, em média) foram o 3 e o 4, ambos com pH 9,5 (Tabela 02). As análises estatísticas mostraram que, para a produção de biomassa, apenas o pH, em seu termo linear, apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), como mostram os coeficientes de regressão (Tabela 4). Embora não significativo, o aumento da concentração do extrato de yacon levou à diminuição da biomassa em todos os pH testados, o que pode ser confirmado pelas Fig. 2A e 2B.

Tabela 4 Coeficientes de regressão para biomassa

| | Coeficientes de Regressão | Erro padrão | t(5) | p-valor |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------|-------------|----------------|
| Média | 6,836667 | 0,460943 | 14,8319 | 0,00003 |
| Extrato de yacon (%) (L) | -0,153395 | 0,282269 | -0,5434 | 0,61017 |
| Extrato de yacon (%) (Q) | -0,205833 | 0,335967 | -0,6127 | 0,56689 |
| pH (L) | -0,869188 | 0,282269 | -3,0793 | 0,02749 |
| pH (Q) | 0,026667 | 0,335967 | 0,0794 | 0,93982 |
| Extrato de yacon x pH | 0,517500 | 0,399188 | 1,2964 | 0,25145 |

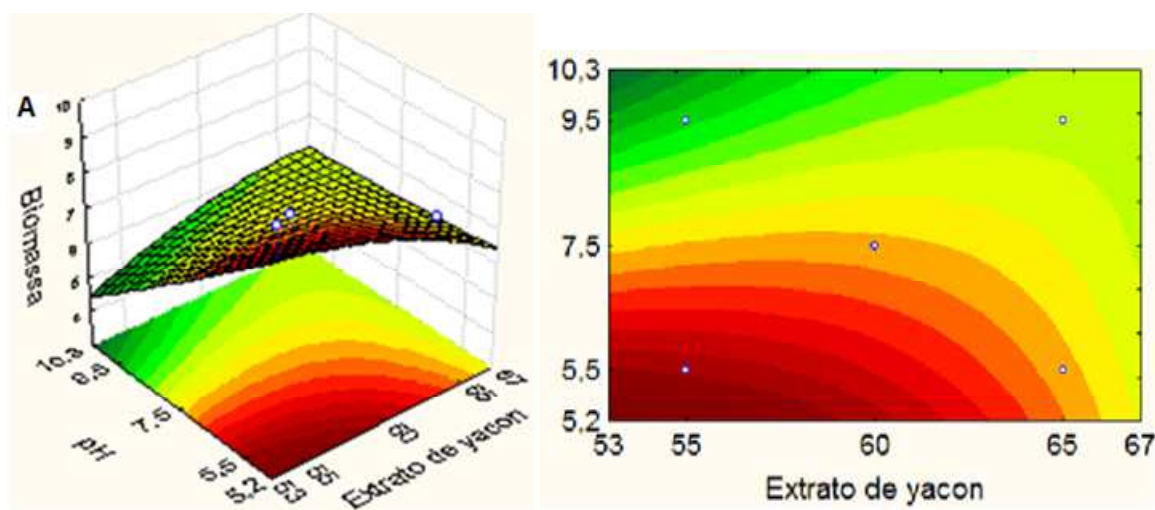


FIGURA 2 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para produção de biomassa em função da concentração do extrato de yacon e pH por *K. marxianus* NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas, geradas de acordo com o primeiro planejamento.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo foi estatisticamente significativo a um nível de confiança de 95%, uma vez que o F calculado foi de 26,77 para atividade enzimática e de 10,11 para a biomassa, portanto, mais do que 6 e 2 vezes maiores que o F tabelado (4,35), respectivamente (Tabelas 5 e 6). O coeficiente de correlação (R^2) de 0,9196 para a atividade enzimática demonstra que há uma excelente correlação entre os valores observados e preditos e o modelo pode explicar quase 92,0% dos resultados. Para biomassa, o R^2 de 0,7043 sugere que o modelo gerado pode explicar 70% da variação total dos resultados, o que implica numa representação satisfatória do processo pelo modelo, levando-se em consideração a grande variabilidade inerente aos processos biológicos que envolvem enzimas e micro-organismos, especialmente quando se utiliza substratos complexos como meios de fermentação.

Os modelos matemáticos que relacionam a atividade de inulinase (AI) e a biomassa (B) em função das variáveis extrato de yacon (X_1) e pH (X_2) podem ser expressos pelas equações 4 e 5, respectivamente.

$$AI = 3,31 - 0,79X_1 + 1,48 X_1^2 - 4,48X_2 + 1,83X_2^2 + 0,75X_1.X_2 \quad \text{Eq. (4)}$$

$$B = 6,84 - 0,15X_1 - 0,21X_1^2 - 0,87X_2 + 0,03X_2^2 + 0,52X_1.X_2 \quad \text{Eq. (5)}$$

Tabela 5 Análise de variância para atividade enzimática

| Fontes de variação | SQ | GL | QM | F _{calc} |
|--------------------|----------|----|-------|-------------------|
| Regressão | 191,96 | 3 | 66,99 | 26,77 |
| Resíduo | 16,76 | 7 | 2,39 | |
| Total | 208,7119 | 10 | | |

Significância estatística 95%; $R^2 = 0,92$; $F_{3;7;0,05} = 4,35$; SQ=soma dos quadrados; GL=graus de liberdade; QM=quadrado médio; F_{calc}=F calculado

Tabela 6 Análise de variância para a produção de biomassa

| Fontes de variação | SQ | GL | QM | F _{calc} |
|--------------------|-------|----|------|-------------------|
| Regressão | 13,96 | 3 | 4,65 | 10,11 |
| Resíduo | 3,19 | 7 | 0,46 | |
| Total | 17,15 | 10 | | |

Significância estatística 95%; $R^2 = 0,70$; $F_{3;7;0,05} = 4,35$; SQ=soma dos quadrados; GL=graus de liberdade; QM=quadrado médio; $F_{calc}=F$ calculado

A validação do modelo matemático para produção da biomassa e da enzima inulinase por *K. marxianus* NRRL Y 7571, baseados nos resultados do DCCR, foram realizados fixando-se a concentração da fonte carbono (X_1) e variando os valores do pH (X_2) em 3,5, 5,5 e 7,5, em triplicata. Os resultados da validação confirmaram que o pH ideal foi o 5,5, sendo atingido 16,33U/mL de atividade enzimática e 7,02 g/L de biomassa. Acima e abaixo deste valor, ambas as respostas diminuíram significativamente (Tabela 7).

Tabela 7 Valores reais utilizados no processo de validação

| Ensaio | Fonte de C (%) | pH | Atividade Enzimática (U.mL ⁻¹) | Biomassa (g/L) |
|--------|----------------|-----|--|----------------|
| 1 | 55 | 3,5 | 1,33 | 3,21 |
| 2 | 55 | 5,5 | 16,33 | 7,02 |
| 3 | 55 | 7,5 | 4,33 | 5,6 |

O perfil de temperatura e pH ótimos para inulinase de *K. marxianus* NRRL Y 7571 foram atingidos em 60°C e na faixa de pH de 4,0 a 5,0, com pico no pH 4.0 (Figuras 3 e 4). Os resultados dos testes de estabilidade térmica mostraram que a enzima manteve mais de 95% da sua atividade por 3 horas a 45°C e acima de 90% por 4 horas a 50°C (Figura 5).

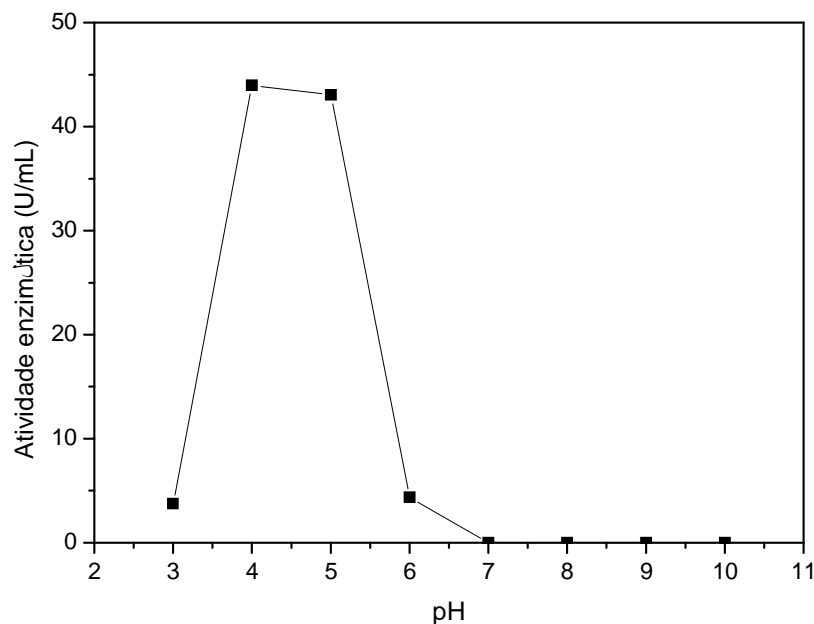


FIGURA 3 Efeito do pH na atividade enzimática de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-571

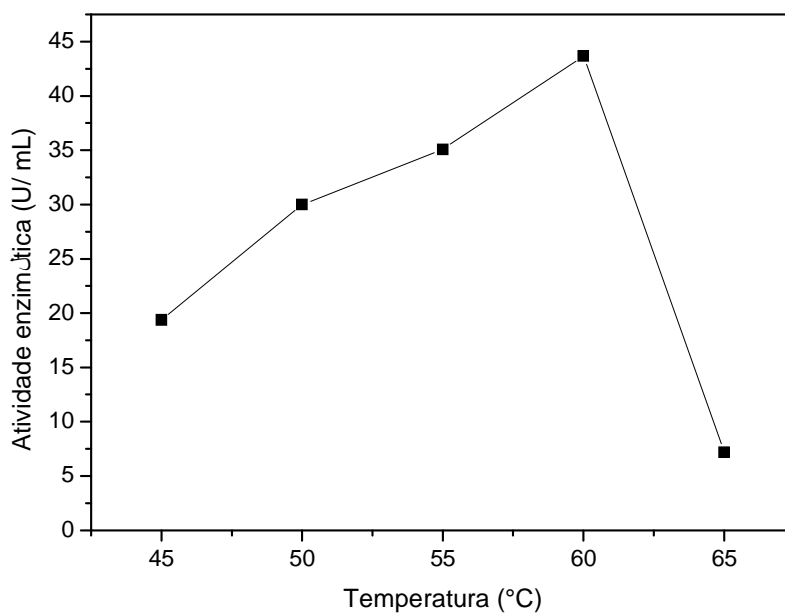


FIGURA 4 Efeito da temperatura na atividade enzimática de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-571

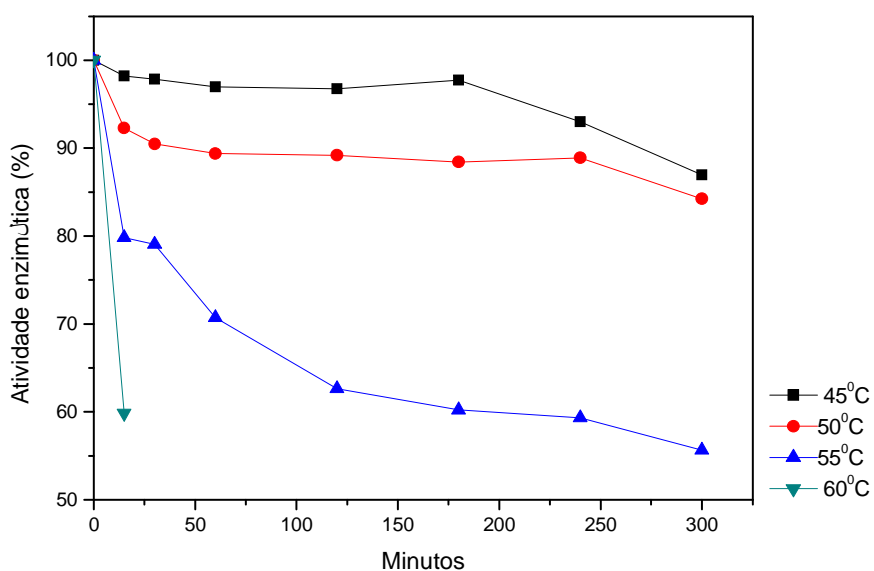


FIGURA 5 Estabilidade térmica da enzima inulinase nas temperaturas de reação de 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C e pH 4.0.

Discussão

Os planejamentos fatoriais e análises de superfícies de resposta permitem investigar quais variáveis estão influenciando o processo, as interações elas, além de estabelecer as condições que maximizem a produção (Santos *et al.* 2008). Neste estudo, foi estudada a influência do extrato de yacon e do pH na produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 7571 utilizando planejamento fatorial do tipo DCCR 2². Diversos estudos relatam o efeito do pH na produção da inulinase, sendo que a resposta da produção da enzima para este parâmetro depende, principalmente, do meio de cultura. Neste estudo, a análise de regressão do modelo indicou que o pH foi a única variável que influenciou tanto na produção da inulinase quanto de biomassa (Tabelas 3 e 4). Valores de pH muito ácidos ou muito alcalinos não foram benéficos nem para a produção da enzima nem no crescimento celular, como confirmado pela validação (Tabela 7). É notório que o pH do meio de cultivo influencia diretamente na produção de enzimas e para a enzima inulinase a resposta da produção da enzima para este parâmetro parece depender, principalmente, do meio de cultura. A literatura mostra que as inulinases produzidas por diferentes cepas *K. marxianus* apresentam uma faixa variável de pH. Cazetta *et al.* (2005) obtiveram a máxima produção de inulinase em pH 3,5 por *K. marxianus* var. *bulgaricus* em extrato de yacon e sacarose em experimentos do tipo “one-at-a time”. Entretanto, Singh *et al.* (2006) e Singh *et al.* (2007) relataram que o melhor pH para produção de inulinase por *K.marxianus* YS-1 foi 6,5 em extrato de *Asparagus racemosus*, mas observaram um pH ótimo de 5,5 quando o substrato foi inulina.

Com relação à fonte de carbono, as diferentes concentrações de extrato de yacon testadas neste estudo não apresentaram influência significativa na produção da inulinase (Tabelas 3 e 4). Na literatura são descritos vários substratos como fonte de carbono e nitrogênio para produção de enzimas em diferentes concentrações. Entretanto, os extratos vegetais que contém inulina apresentam vantagens em comparação com meios sintéticos, pois diminuem os custos dos processos fermentativos. Por isto, é crescente o interesse por substratos complexos, como os resíduos e substratos agro-industriais a base

de inulina, para produção de enzimas microbianas (Jain 2012). Diferentes concentrações ótimas das fontes de carbono e nitrogênio de origem vegetal são encontradas em estudos relacionados à produção de inulinase: 4% para extrato de raiz de chicória (Fawzi 2011), 3% para alcachofra de Jerusalém (Erdal *et al.* 2011), 40% para extrato de raiz de dente de leão (Kango 2008), 20% para extrato de dália (Jain *et al.* 2012), 3,5% para pectina cítrica (Maller *et al.* 2012) e 3,0 g/L de pectina de maçã (Ladeira *et al.* 2010). Com relação à milhocina os valores da literatura variam de 3% a 20%, dependendo das condições cultivo, da espécie da planta, bem como tempo de cultivo e interação com outros suplementos dos processos fermentativos (El-Hersh *et al.* 2011; Trivedi *et al.* 2012).

Os valores de pH e temperatura ótimos foram similares aos descritos por diversos trabalhos utilizando *K. marxianus* (Mazutti *et al.* 2007; Cazetta *et al.* 2010; Jain *et al.* 2012; Narayanan *et al.* 2013). Isto mostra que a inulinase de *K. marxianus* é bastante estável, não sofrendo influência significativa do meio de cultura onde foi produzida, o que torna esta enzima bastante interessante do ponto de vista industrial.

Quanto à estabilidade térmica, os resultados indicam um caráter de termoestabilidade desta enzima, uma característica bastante desejável para aplicação em processos biotecnológicos. Entretanto, foi rapidamente inativada a 55°C, um comportamento esperado e comumente descrito para inulinases microbianas (Cazetta *et al.* 2005; Cazetta *et al.* 2010; Mazutti *et al.* 2010; Jain *et al.* 2012).

Conclusões

Embora o aumento da concentração do extrato de yacon tenha influenciado na produção de biomassa e na atividade enzimática, o pH foi o fator que apresentou maior influência nas respostas sendo, inclusive, a única variável estatisticamente significativa. Neste substrato, o pH de cultivo mais ácido, de 5,5, mostrou-se o mais adequado para a produção da enzima

inulinase. Esta característica é bastante interessante, uma vez que nestas condições evita-se a contaminação por micro-organismos competidores.

O planejamento fatorial do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) mostrou-se muito útil no estudo de produção de inulinase e de biomassa pela levedura *K. marxianus*, tornando possível a otimização do processo com um número menor de experimentos. Além disso, as análises de superfície de resposta tornaram possível a visualização da interação entre as variáveis, o que dá uma visão mais completa do comportamento do micro-organismo no processo fermentativo.

Referências bibliográficas

- Bonciu, C.N. and Bahrim, G. (2011) Inulinases – a versatile tool for biotechnology. *Roma. Innov Rom Food Biotechnol* **9**, 1-11.
- Bonciu, C.N. e Bahrim, G. (2012) Fuel ethanol bioproduction from inulin rich feedstock. *Innov Roman Food Biotechnol* **11**, 1-8.
- Cazetta, M., Martins, P., Montl, R. e Contiero, J. (2005) Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var, *bulgaricus*. *J Food Eng* **66**, 301-305.
- Cazetta, M.L., Monti, R. e Contiero, J. (2010) Effects of culture conditions on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Braz Arch Biol Technol* **53**, 701-707.
- Chi, Z.M., Zhang T., Cao, T.S., Liu, X.Y., Cui, W. e Zhao, C.H. (2011) Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technol* **102**, 4295-4303.
- Coghetto, C.C., Scherer, R.P., Silva, F., Golunski, S., Pergher, B.C., Oliveira, C,A e Oliveira, C,V., Treichel, H. (2012) Natural montmorillonite a support for the immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Bioc Agric Biotechnol* **1**, 284–289.
- El-Hersh, S.M, Saber, W.A e El-Naggar, N.E.A (2011) Production strategy of inulinase by *Penicillium citrinum* AR-IN2 on some agricultural by-products. *Microbiol J* **1** (3), 78-88
- Erdal, S., Canli, O e Algur, F.O. (2011) Inulinase production by *Geotrichum candidum* using Jerusalem artichoke as sole carbon source. *Rom Biotechnol Lett.* **16**, 4.

- Ettalibi, M. e Baratti, J.C. (2001) Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. *Enzyme Microb Technol* **28**, 596- 601.
- Jain, SC. e Jain, N.K. (2012) Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract. *Braz J Chem Eng* 62-69.
- Kango, N. (2008) Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. *Food Eng J* **85**, 473-478.
- Lachman, J., Havrland, B., Fernández, E.C. e Dudjak, J. (2004) Saccharides of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] tubers and rhizomes and factors affecting their content. *Plant Soil Environ* **50**, 383 –390.
- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Victor Haber Perez, V.H. e Martins, M.L.L. (2010) Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Quim Nova* **33**, (2), 324-328.
- Maller, M., Silva, T.M., Damásio, R.L., Reis, V.R.A., Jorge, J.A., Polizeli, M.L.T. M. (2012) Production of pectin lyase by *Aspergillus niveus* under submerged and solid state fermentations using agro- industrial residues as carbon sources. *Int Res J Microbiol* **3**, 029-035.
- Manrique, L.A., Párraga, M. e Hermann. Jarabe de yacón: Principios y Procesamiento. **Serie:** Conservación y uso de La biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. **8A**. Centro Internacional de la Papa, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Fundación Erbacher, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Peru. P, 31, 2005.
- Mazutti, M., Bender, J.P., Treichel, H. e Luccio, M. (2006) Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme Microb Technol* **39**, 56–59.
- Mazutti, M., Ceni, G., Luccio, M. e Treichel, H. (2007) Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess Biosyst Eng* **30**, 297–304.
- Mazutti, M.A., Zobot, G., Boni, G., Skovronski, A., oliveira, D., Luccio, M., Rodrigues, M. I., Treichel, H. e Maugeri, F. (2010) Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Food Chem* **120**, 163–173.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, **31**, 426-428.
- Narayanan, M., Srinivasan, B., Gayathiri, A., Ayyadurai, A. e Mani, A. (2013) Studies on the optimization and characterization for the biosynthesis of inulinase under solid state fermentation. *Int J Chem Tech Res* **5**, (1), 376-384.
- Nguyen, Q.D., Sujt6, N.M., Bujna, E., Hoschke, A. e Rezessy-szab6, J.M. (2013) Effects of medium composition and process parameters on the

- production of extracellular inulinase by *Thermomyces lanuginosus*. *Food Technol Biotechnol* **51** (1), 36–44.
- Roberfroid, M.B. (2005) Introducing inulin-type fructans. *Brit J Nutr* **93** (1), 13–25.
- Rodrigues, M.I. e Iemma, A.F. (2009) *Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos*. Campinas, SP: Casa do Pão Editora.
- Santos, S.F.M., Souza, R.L.A., Alcântara, S.R., Pinto, G.A.S., Silva, F.L.H. e Macedo, G.R. (2008) Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo Da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do Pedúnculo de caju. *Rev Bras Prod Agr*, **10** (2), 101-109.
- Seminario, J., Valdemarra, M. e Manrique, L. El Yacon: fundamentos para el aprovechamiento de um recurso promisorio. Centro Internacional de La papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, agencia suiza para El desarrollo y La cooperacion (COSUDE), Lima, Peru **60**, 2003.
- Singh, R.S., Dhaliwal, R., Puri, M. (2006) Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. *Process Biochem* **41**, 1703–1707.
- Singh, R., Singh, B. e Puri, M. (2007) Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-I, *Bioresource Technol* **98**, 2518 – 2525.
- Suzuki, H., Ozawa, Y. e Maeda, H. (1988) Studies of water-insoluble yeast invertase. *Agricul Biol Chem* **30**, 807-812.
- Vandamme, E.J. e Deryke, D.G. (1983) Microbial inulinases fermentation process, properties and applications. *Adv Appl Microbiol* **29**, 139-176.
- Xiong, C., Jinhua, W. e Dongsheng, Li. (2007) Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. *Biochem Eng J* **34**, 179–184.
- Yuan, B.H.N., Sun, J., Wang S.A., Fu-li., L. (2012) Purification and characterization of a novel extracellular inulinase from a new yeast species *Candida kutaonensis* sp. nov. KRF1T. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**(6), 1517-26.

CAPÍTULO II

FARINHA DE YACON E MILHOCINA COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE INULINASE E BIOMASSA POR *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Artigo formatado segundo as normas da revista *Journal of Industrial
Microbiology and Biotechnology*

Resumo

O yacon é uma planta herbácea originária dos Andes que armazena polifrutanas do tipo inulina como carboidratos de reserva em seus tubérculos. As enzimas que hidrolizam as ligações glicosídicas da inulina são denominadas inulinases, muito utilizadas na produção de xaropes com alto teor de frutose e etanol. Neste trabalho foi investigada a produção de inulinase e biomassa por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando farinha de yacon como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio por meio de planejamento fatorial completo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2² para realização dos experimentos e Metodologia de Superfície de Resposta para análise dos resultados. A máxima atividade enzimática obtida foi de 36.1 U/mL e a produção de biomassa foi de 8.95 g/L, obtidas na condição de 7.0% de farinha de yacon e 2.0% de milhocina, respectivamente. Os testes de caracterização do extrato enzimático bruto mostraram que a inulinase apresentou pH ótimo em 4.0 e temperatura ótima em 60°C. A enzima manteve acima de 90% da sua atividade durante 4 horas a 45°C e 50°C.

Palavras-chave: enzima, levedura, otimização, Metodologia de Superfície de Resposta, substratos agroindustriais

Introdução

As polifrutanas do tipo inulina são carboidratos lineares com ligações $\beta(2\rightarrow1)$ entre as unidade de frutose que tem recebido grande atenção nas últimas décadas devido às suas propriedades funcionais, pois melhoram a textura e aumentam o teor de fibras dos alimentos sem alterar a aparência e o sabor do produto final, além de resultar em ação benéfica sobre a flora intestinal e parâmetros séricos devido à sua indigeribilidade [4, 15, 33, 34]. Além disso, vem sendo utilizadas como matéria-prima renovável para a produção de várias substâncias de interesse industrial, especialmente xaropes com alto teor de frutose e bioetanol [3, 6, 22, 49]. Muitas plantas armazenam inulina como carboidrato de reserva, a maioria delas em bulbos, tubérculos ou raízes tuberosas, como Alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*), dalia

(*Dahlia pinnata*), chicória (*Cichoriumendivia*), dente-de-leão (*Taraxacum officinale*) e yacon (*Smallanthus sonchifolius*) [6, 20]. Dentre estas, o yacon vem se destacando como alimento funcional devido à sua composição rica em frutooligossacarídeos (FOS).

O yacon é uma planta perene e herbácea que pertence à família Asteraceae, medindo entre 1,0-2,5 metros de altura. São originários dos vales andinos da Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Noroeste da Argentina. Em meados da década de 80 o yacon começou a ser cultivado fora dos Andes, inicialmente na Nova Zelândia e Japão, de onde se dispersou para outros países, podendo ser encontrado, desde a década de 90, no Brasil, Paraguai, Estados Unidos, Eslováquia, China, Coreia e Taiwan [38]. No Brasil, esta cultura foi introduzida no início da década de 90, no estado de São Paulo [46], mas o consumo se popularizou somente em meados dos anos 2000, quando este tubérculo tornou-se popularmente conhecido como batata yacon ou batata “diet” [37], principalmente entre os portadores de diabetes e os consumidores de alimentos com baixo teor calórico.

Os principais açúcares de reserva do yacon são os frutooligossacarídeos (FOS), além de inulina, glicose, frutose e sacarose [16, 20], o que torna este tubérculo um substrato interessante para processos fermentativos. As enzimas que atuam nas ligações glicosídicas de polifrutanas como a inulina são denominadas inulinases. Essas enzimas pertencem à classe das hidrolases, sendo classificadas como 2,1- β -D-frutano frutano-hidrolases [12, 30, 45], e são utilizadas para a produção de xaropes com elevado teor de frutose (HFS) por hidrólise enzimática da inulina, embora também possam hidrolisar as ligações de outros açúcares como sacarose, rafinose e estaquiase, apresentando rendimento elevado, de até 95% do produto final [10, 41, 45]. Embora algumas bactérias, como *Xanthomonas* e *Streptomyces*, sejam citadas como boas produtoras de inulinase [7, 9, 21], os fungos estão entre os mais utilizados, especialmente do gênero *Aspergillus* [10, 18, 28, 31, 42, 44]. Entre as leveduras são descritas produções entre os gêneros *Pichia* [46, 48] e *Saccharomyces* [39], mas são as leveduras do gênero *Kluyveromyces*, especialmente *K. marxianus*, as mais estudadas e promissoras [1, 32, 41, 50] devido à sua elevada produção, rápido crescimento

e classificação GRAS (Generally Recognized As Safe) [23]. Assim, este trabalho teve como objetivo, verificar o potencial da farinha de yacon como fonte de carbono na produção de inulinase por *K. marxianus* NRRL Y-7571 utilizando o planejamento fatorial completo Delineamento Composto Central Rotacional para realização dos experimentos e a metodologia de Superfície de Resposta para análise dos resultados.

Material e métodos

Obtenção da farinha de yacon

Os tubérculos de yacon foram lavados com água, cortados em rodela finas e submetidos à secagem a 65°C durante 48 horas, em estufa com circulação de ar. Os pedaços secos foram triturados em liquidificador até obtenção de um pó fino e armazenados em temperatura ambiente.

Meios de inóculo e fermentação

A levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi adquirida na Fundação André Tosello, de Campinas, Brasil (referência 7073). O pré-inóculo foi composto de meio basal contendo (%): sacarose 1, KH₂PO₄ 1.5, NH₄Cl 0.15, KCl 0.12, MgSO₄.7H₂O 0.07 e incubado a 37°C, 150 rpm, durante 24 horas. Para o inóculo, a sacarose foi substituída pela farinha de yacon e milhocina.

Planejamentos experimentais

Para realização dos experimentos, foram escolhidas como variáveis independentes a farinha de yacon (X₁) e milhocina (X₂). Os efeitos destas variáveis, bem como de suas interações, sobre a produção de inulinase foram estudadas por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2², segundo Rodrigues e Lemma [35]. As variáveis dependentes (respostas) foram produção de inulinase (U/mL) e biomassa (g/L). Foram realizados dois DCCR

denominados Planejamento Experimental 1 e Planejamento Experimental 2. No Planejamento 1 as concentrações de farinha de yacon variaram de 2.0% a 7.8% e de milhocina de 0.8% a 2.2% (Tabela 1) e no Planejamento 2 as concentrações variaram entre 5.5% e 8.5% para a farinha de yacon e entre 1.3% e 2.7% para a milhocina (Tabela 2). Fermentações do tipo batelada foram realizadas em frascos Erlenmeyer contendo 30 mL de meio de cultura com pH 5.0, a 150 rpm e 37°C durante 96 horas, inoculados com 10% (v/v) de inóculo.

Dois níveis foram escolhidos, um superior (+1) e um inferior (-1), além de mais um ponto central (0), o qual foi realizado em três repetições para determinação do rigor da metodologia, e dois pontos axiais (+1,41 e -1,41). Este modelo é representado por uma regressão polinomial de segunda ordem conforme Eq.(1):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde: y é a resposta predita; X_1 e X_2 são as formas codificadas das variáveis independentes (extrato de yacon e milhocina, respectivamente); b_0 refere-se ao ponto de interseção; b_1 e b_2 são coeficientes lineares; b_{12} coeficiente de interação dupla; b_{11} e b_{22} são coeficientes quadráticos. Utilizando o software STATISTICA 7.0 foi realizada a estimativa dos efeitos das variáveis e suas interações sobre as respostas analisadas, considerando o nível de significância de 5%. O experimento foi validado pela análise de variância (ANOVA), considerando o teste F, e a qualidade do ajuste do modelo quadrático foi expresso pelo coeficiente correlação (R^2).

Crescimento celular

A biomassa foi determinada medindo-se a densidade ótica a 600 nm e os cálculos foram realizados utilizando-se uma curva padrão de absorbância versus massa seca.

Atividade enzimática

A atividade enzimática do sobrenadante foi determinada de acordo com Suzuki et al. [43], por meio da determinação dos açúcares redutores formados

pela incubação de 1mL da enzima em sacarose a 2%, tampão citrate-fosfato 0,05M em pH 4.0, utilizando o reagent ácido 3,5-dinitrosalicílico de acordo com Miller [26]. Glicose (1 g/L) foi utilizada para a curva padrão.

Determinação do pH ótimo de atividade da inulinase

O pH ótimo de atividade enzimática foi obtido por meio da determinação da atividade enzimática do sobrenadante em diferentes valores de pH, utilizando os seguintes tampões (0.05M): Glicina-HCl (pH 2-3), tampão citrato de sódio (pH 3-6), tampão fosfato (pH 6-8), tampão Tris-HCl (pH 8-9), Glicina-NaOH (pH 9-11).

Determinação da temperatura ótima de atividade e estabilidade térmica da enzima

A temperatura ótima de atividade da enzima foi obtida por meio da determinação da atividade enzimática em diferentes temperaturas, na faixa de 45°C a 60°C. A estabilidade térmica da enzima foi avaliada incubando-se a enzima nas temperaturas de 45 °C a 60°C durante 5 horas.

Resultados e discussão

Planejamento Experimental 1

A Tabela 1 apresenta as respostas obtidas quando a concentração da farinha de yacon variou de 2.0% a 7,8% e de milhocina entre 0.8% e 2.5%. A maior produção de inulinase (31.0 U/mL) e a maior produção de biomassa (7.69 g/L) ocorreram no ensaio 4, na condição de 7.0% de farinha de yacon e 2.0% de milhocina.

Tabela 1 Matriz do planejamento experimental 1 com as respostas produção de biomassa e inulinase

| Ensaio | Variáveis | | Valores observados | | Valores preditos | |
|--------|----------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| | X ₁ | X ₂ | Atividade enzimática (U/mL) | Biomassa (g/L) | Atividade enzimática (U/mL) | Biomassa (g/L) |
| 1 | -1 | -1 | 10,0 | 5,75 | 8.84 | 5.54 |
| 2 | 1 | -1 | 25,7 | 5,79 | 25.9 | 5.70 |
| 3 | -1 | 1 | 14,0 | 5,69 | 13.3 | 5.59 |
| 4 | 1 | 1 | 31,0 | 7,69 | 31.7 | 7.70 |
| 5 | -1.41 | 0 | 3,0 | 5,08 | 4.16 | 5.25 |
| 6 | 1.41 | 0 | 30,0 | 6,86 | 29.2 | 6.86 |
| 7 | 0 | -1.41 | 19,0 | 5,33 | 19.5 | 5.49 |
| 8 | 0 | 1.41 | 27,1 | 6,94 | 26.9 | 6.95 |
| 9 | 0 | 0 | 26,6 | 6,21 | 24.4 | 6.11 |
| 10 | 0 | 0 | 21,6 | 6,11 | 24.4 | 6.11 |
| 11 | 0 | 0 | 25,2 | 6,01 | 24.4 | 6.11 |

| | | Níveis reais | | | | |
|----------------|----------------------|--------------|-----|-----|-----|-------|
| | | -1.41 | -1 | 0 | +1 | +1.41 |
| X ₁ | Farinha de yacon (%) | 2.0 | 3.0 | 5.0 | 7.0 | 7.8 |
| X | Milhocina (%) | 0.8 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.2 |

As análises estatísticas indicaram que a variável farinha de yacon (X₁) apresentou efeito significativo ($p < 0.05$) sobre a produção de inulinase nos termos linear (L) e quadrático (Q) do modelo, porém apresentou influência positiva apenas no termo linear. Isto significa que o aumento da concentração da farinha de yacon até 7.0% levou ao aumento da produção da inulinase e acima desta concentração a produção começou a declinar (Fig. 1). A interação entre as variáveis também apresentou efeito positivo, embora não significativo ($p > 0.05$), como mostram os coeficientes de regressão (Tabela 2). Pode ser observado que nos ensaios com as maiores concentrações da fonte de carbono encontram-se as maiores produções enzimáticas (ensaios 2, 4, 6, 8 e ponto central). Por outro, nos ensaios com as menores concentrações de farinha de yacon, entre 2.0% e 3.0% (ensaios 1, 3 e 5), a atividade enzimática foi progressivamente diminuindo, chegando a 3.0 U/mL no ensaio 5 (Tabela 1).

A milhocina (X₂) não apresentou influência estatisticamente significativa na faixa de concentração estudada ($p > 0.05$) (Tabela 2). Entretanto, por meio

da Fig. 1 é possível observar que o aumento da concentração da fonte de nitrogênio influenciou de forma positiva sobre a produção da enzima.

Tabela 2 Coeficiente de regressão para biomassa

| | Coeficiente de regressão | Desvio padrão | t(5) | p-valor |
|---------------------------|--------------------------|---------------|----------|----------|
| Média | 24.46667 | 1.094416 | 22.35591 | 0.000003 |
| Farinha de yacon (%) (L) | 8.86047 | 0.670190 | 13.22083 | 0.000044 |
| Farinha de yacon (%) (Q) | -3.88333 | 0.797686 | -4.86825 | 0.004600 |
| Milhocina (%) (L) | 2.59439 | 0.670190 | 3.87113 | 0.011747 |
| Milhocina (%) (Q) | -0.60833 | 0.797686 | -0.76262 | 0.480100 |
| Farinha yacon x milhocina | 0.32500 | 0.947792 | 0.34290 | 0.745618 |

L: Linear; Q: Quadrático

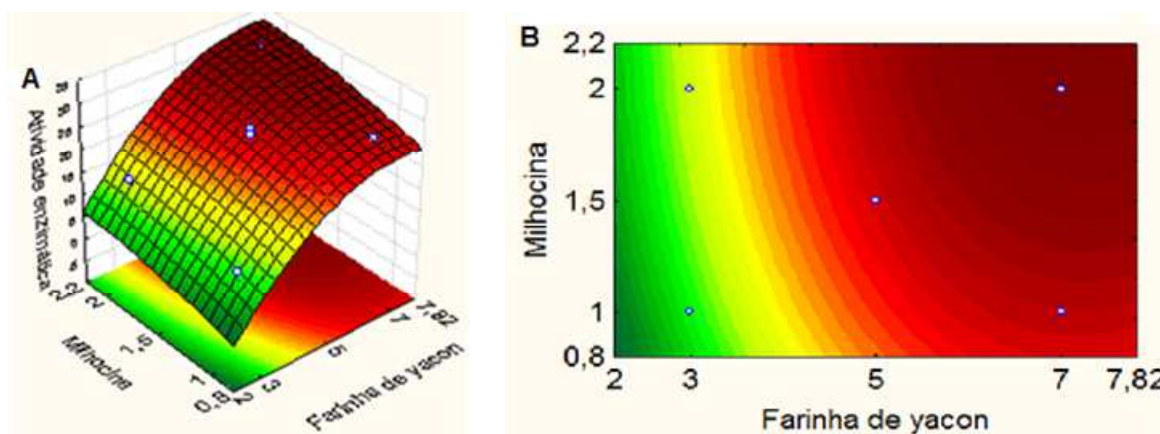


FIG.1 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a produção da enzima inulinase em função da concentração da farinha de yacon e milhocina por *K. marxianus* NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas.

O aumento da concentração das fontes de carbono (X_1) e nitrogênio (X_2) também causaram um efeito positivo na produção de biomassa, embora menos acentuado do que na produção da enzima, que variou de 5.08 g/L (ensaio 5) até 7.69 g/L (ensaio 4). Os ensaios que apresentaram as menores produções de biomassa (5.53 g/L, em média) foram 1, 2, 3, 5 e 7 nas concentrações de milhocina entre 0.8% e 2.0% (Tabela 1). As análises estatísticas mostraram que apenas os termos lineares de X_1 e X_2 apresentaram efeitos significativos ($p < 0.05$) (Tabela 3). Assim, é possível concluir que o aumento das concentrações de X_1 e X_2 pode levar ao aumento da produção da biomassa como mostra a Figura 2.

Tabela 3 Coeficiente de regressão para biomassa

| | Coeficiente de regressão | Desvio padrão | t(5) | p-valor |
|---------------------------|--------------------------|---------------|----------|----------|
| Média | 6.110000 | 0.094990 | 64.32224 | 0.000000 |
| Farinha de yacon (%) (L) | 0.569663 | 0.058170 | 9.79314 | 0.000189 |
| Farinha de yacon (%) (Q) | -0.025625 | 0.069236 | -0.37011 | 0.726459 |
| Milhocina (%) (L) | 0.514610 | 0.058170 | 8.84673 | 0.000307 |
| Milhocina (%) (Q) | 0.056875 | 0.069236 | 0.82147 | 0.448761 |
| Farinha yacon x milhocina | 0.490000 | 0.082264 | 5.95642 | 0.001907 |

L: Linear; Q: Quadrático

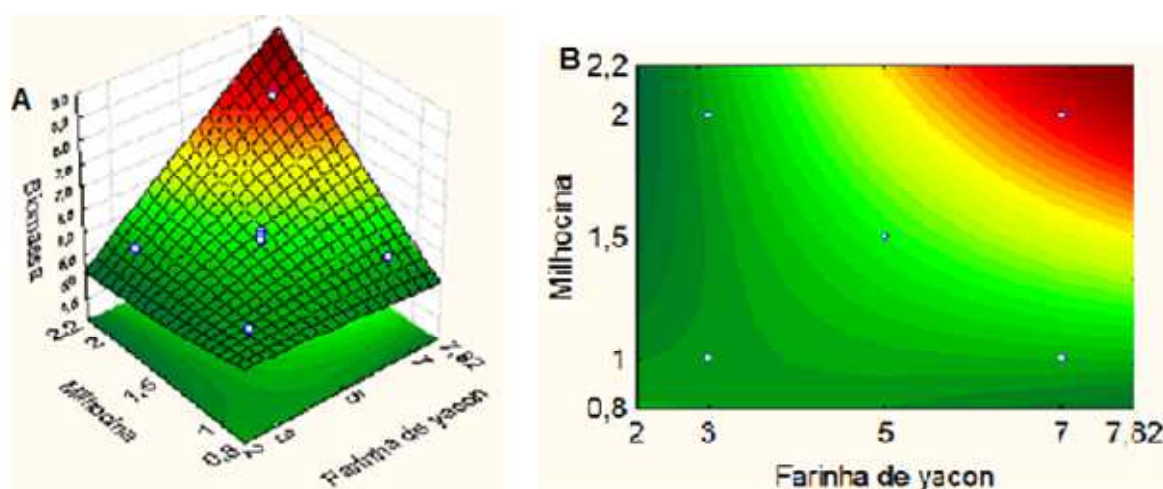


FIG. 2 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a produção de biomassa em função da concentração da farinha de yacon e milhocina por *K. marxianus* NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo foi estatisticamente significativo a um nível de confiança de 95%, uma vez que o F calculado foi de 100.16 para atividade enzimática e 96.31 para biomassa. Os coeficientes de correlação (R^2) de 0.9771 para a atividade enzimática e de 0.9768 para a biomassa demonstram que há uma excelente correlação entre os valores observados e preditos e o modelo pode explicar acima de 97.0% dos resultados.

Planejamento Experimental 2

Diante dos resultados do primeiro planejamento experimental foi estabelecido um novo DCCR 2². A fim de encontrar as melhores condições para produção da inulinase e biomassa por *K. marxianus* NRRL Y-7571, novas concentrações foram estabelecidas (Tabela 4). O aumento das concentrações

das variáveis X_1 e X_2 influenciaram positivamente tanto na produção da inulinase quanto no crescimento celular. A maior atividade enzimática (36.1 U/mL) e a maior produção de biomassa (8.95 g/L) ocorreram no ensaio 8, na condição de 7.0% de farinha de yacon e 2.7% de milhocina. Isto representa um aumento de cerca de 14% em ambas as respostas, em comparação com o Planejamento 1.

Tabela 4 Matriz do planejamento experimental 2 com as respostas produção de biomassa e inulinase

| Ensaio | Variáveis | | Valores observados | | Valores preditos | | | |
|--------|----------------------|-------|----------------------|--------------|----------------------|----------|-----|-------|
| | | | Atividade enzimática | Biomassa | Atividade enzimática | Biomassa | | |
| | X_1 | X_2 | (U/mL) | (g/L) | (U/mL) | (g/L) | | |
| 1 | -1 | -1 | 24,4 | 6,47 | 23.84 | 6.30 | | |
| 2 | 1 | -1 | 22,3 | 5,19 | 19.62 | 5.68 | | |
| 3 | -1 | 1 | 25,3 | 7,91 | 29.04 | 7.65 | | |
| 4 | 1 | 1 | 26,1 | 7,98 | 27.73 | 8.39 | | |
| 5 | -1.41 | 0 | 26,3 | 6,18 | 24.26 | 6.52 | | |
| 6 | 1.41 | 0 | 19,4 | 7,20 | 20.35 | 6.60 | | |
| 7 | 0 | -1.41 | 20,6 | 6,20 | 23.10 | 6.01 | | |
| 8 | 0 | 1.41 | 36,1 | 8,95 | 32.51 | 8.88 | | |
| 9 | 0 | 0 | 29,5 | 8,33 | 28.23 | 8.62 | | |
| 10 | 0 | 0 | 28,1 | 8,93 | 28.23 | 8.62 | | |
| 11 | 0 | 0 | 27,1 | 8,61 | 28.23 | 8.62 | | |
| | | | | Níveis reais | | | | |
| | | | | -1.41 | -1 | 0 | +1 | +1.41 |
| X_1 | Farinha de yacon (%) | | | 5.5 | 6 | 7 | 8 | 8.5 |
| X_2 | Milhocina (%) | | | 1.3 | 1.5 | 2 | 2.5 | 2.7 |

A variável farinha de yacon (X_1) não apresentou influência estatisticamente significativa nem no termo linear nem no quadrático ($p > 0.05$), ou seja, o aumento da concentração, na faixa estudada, não influenciou na produção enzimática (Tabela 5). Entretanto, a Figura 3 mostra que a concentração de 7.0% foi a melhor condição e em concentrações abaixo e acima deste valor ocorreu diminuição da produção. A milhocina mostrou efeito estatisticamente significativo no termo linear ($P\text{-value} < 0.05$), indicando que o aumento da sua concentração influenciou positivamente, elevando a produção enzimática (Figura 3). A interação entre as variáveis mostrou efeito positivo, embora não significativo ($p > 0.05$) (Tabela 5).

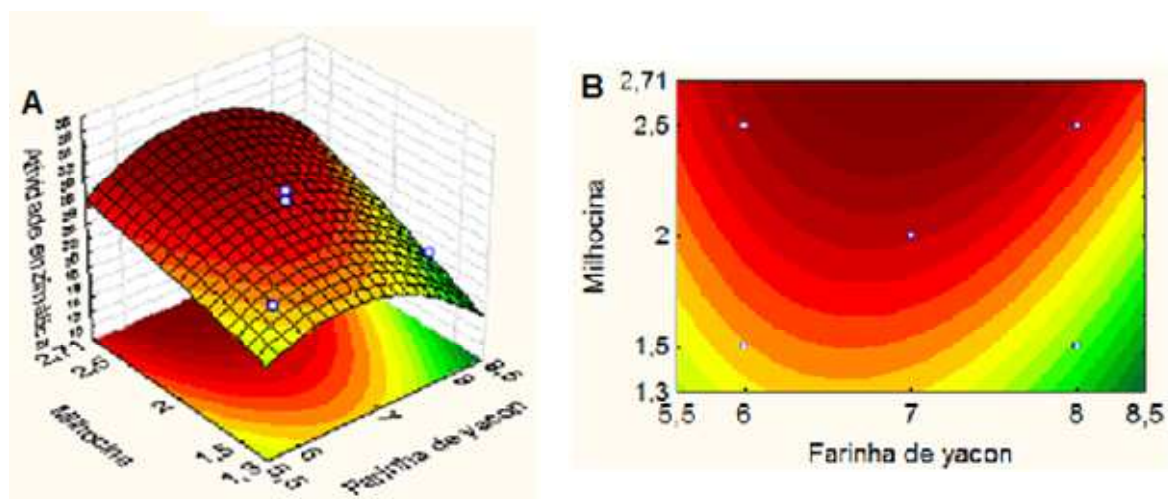


FIG. 3 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a produção da enzima inulinase em função da concentração da farinha de yacon e milhocina por *K. marxianus* NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas.

Tabela 5 Coeficiente de regressão para produção de inulinase

| | Coeficiente de regressão | Desvio padrão | t(5) | p-valor |
|---------------------------|--------------------------|---------------|----------|----------|
| Média | 28.23333 | 1.848020 | 15.27761 | 0.000022 |
| Farinha de yacon (%) (L) | -1.38226 | 1.848020 | -1.22143 | 0.276369 |
| Farinha de yacon (%) (Q) | -2.96042 | 1.346965 | -2.19784 | 0.079309 |
| Milhocina (%) (L) | 3.32754 | 1.131677 | 2.94036 | 0.032243 |
| Milhocina (%) (Q) | -0.21042 | 1.346965 | -0.15622 | 0.881975 |
| Farinha yacon x milhocina | 0.72500 | 1.600432 | 0.45300 | 0.669527 |

L: Linear; Q: Quadrático

Para a produção de biomassa, tanto a farinha de yacon quanto a milhocina apresentaram efeitos significativos, com p-valor <0.05 para os termos quadráticos de X_1 e X_2 e o termo linear de X_2 , como mostram os coeficientes de regressão (Tabela 6). A Figura 4 mostra que, para a biomassa, foi possível otimizar o processo, e as melhores condições de cultivo foram atingidas nos ensaios 8 e ponto central (ensaios 9, 10 e 11), com 7.0% de farinha de yacon e na faixa de 2.0% a 2.7 % de milhocina.

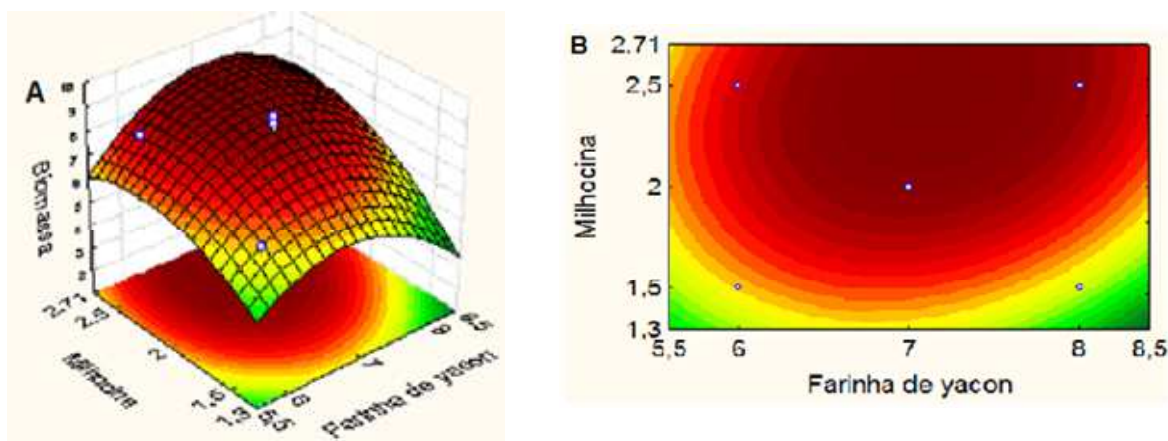


FIG. 4 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a produção de biomassa em função da concentração da farinha de yacon e milhocina por *K. marxianus* NRRL Y-7571 em fermentação submersa após 96 horas.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo foi estatisticamente significativo a um nível de confiança de 95%, uma vez que o F calculado foi de 7.21 para atividade enzimática e 29.70 para a biomassa. Os coeficientes de correlação (R^2) de 0.75534 para a produção de inulinase demonstra que há uma boa correlação entre os valores observados e preditos e o modelo pode explicar quase 76.0% dos resultados. Para biomassa o R^2 de 0.92699 sugere que o modelo gerado pode explicar cerca de 93.0% da variação total dos resultados, o que implica em uma excelente representação do processo pelo modelo.

Tabela 6 Coeficiente de regressão para biomassa

| | Coeficiente de regressão | Desvio padrão | t(5) | p-valor |
|---------------------------|--------------------------|---------------|----------|----------|
| Média | 8.62333 | 0.282172 | 30.56060 | 0.000001 |
| Farinha de yacon (%) (L) | 0.02906 | 0.172794 | 0.16819 | 0.873026 |
| Farinha de yacon (%) (Q) | -1.02792 | 0.205666 | -4.99799 | 0.004112 |
| Milhocina (%) (L) | 1.01489 | 0.172794 | 5.87338 | 0.002031 |
| Milhocina (%) (Q) | -0.58542 | 0.205666 | -2.84644 | 0.035974 |
| Farinha yacon x milhocina | 0.33750 | 0.244368 | 1.38111 | 0.225781 |

L: Linear; Q: Quadrático

Os modelos matemáticos que relacionam a produção da inulinase (Y) e a biomassa (Y') em função das variáveis farinha de yacon (X_1) e milhocina (X_2)

podem ser expressos pelas equações 2 e 3, respectivamente, e estes modelos podem ser utilizados para prever a produção de inulinase e biomassa dentro dos limites dos fatores experimentais.

$$Y = 28.23 - 1.38X_1 - 2.96X_1^2 + 1.02X_2 - 0.59X_2^2 + 0.34.X_1.X_2 \quad (2)$$

$$Y' = 8.62 + 0.03X_1 - 1.03X_1^2 + 1.01X_2 - 0.59X_2^2 + 0.34X_1.X_2 \quad (3)$$

Encontra-se bem estabelecido na literatura que as fontes de carbono e nitrogênio são alguns dos fatores que mais influenciam nos processos fermentativos, podendo causar grande variabilidade nos resultados, principalmente quando se tratam de substratos complexos como extratos vegetais ou subprodutos da agroindústria. Entretanto, com a intenção de diminuir os custos do processo, substratos de origem agro-industrial são cada vez mais estudados e o estabelecimento de sua concentração ideal no meio de cultura é o objetivo de muitas pesquisas nesta área. A inulina, uma polifrutana bastante difundida entre as plantas como fonte de reserva energética, tem despertado crescente interesse por ser um substrato relativamente barato e abundante para a produção de xarope de frutose e etanol [49]. Os substratos vegetais que contém inulina mais descritos na literatura como meio de cultivo para os processos fermentativos são a Alcachofra de Jerusalém [6, 11, 21], raiz de chicória [18, 44] e tubérculos de dália [17]. O yacon apenas recentemente vem sendo estudado como substrato fermentativo [Cazetta et al., 2005]. Com relação à farinha de yacon, sua utilização tem sido descrita apenas na formulação de alimentos, como bolos [27, 36].

Naturalmente, o ideal é atingir elevadas produções do metabólito de interesse na menor concentração possível dos substratos. Neste caso, a farinha de yacon e a milhocina apresentaram bons resultados, uma vez que as melhores produções de biomassa e inulinase foram atingidas em concentrações relativamente baixas destas fontes de carbono e nitrogênio, 7.0% e 2.7%, respectivamente. Esta é uma característica comum nos trabalhos descritos para produção de inulinase, e a maioria descreve as melhores produções em baixas concentrações da fonte de carbono: 4% de extrato de

raiz de chicória [13], 3% de alcachofra de Jerusalém [11], 2.5% a 6% de trigo sacarreceno [3]. Isso ocorre porque a inulinase é uma enzima que apresenta repressão catabólica na presença de excesso de substrato, especialmente, da fonte de carbono [29]. Além disso, a composição complexa dos substratos agroindustriais pode provocar um efeito negativo devido ao aumento da concentração de alguns de seus constituintes [3]. Com relação à milhocina, diferentes concentrações são encontradas nos trabalhos científicos, variando desde 0,3% a 20%, ou até mais [1, 8, 24, 25], mostrando que a resposta frente a este substrato depende, principalmente, do micro-organismo utilizado, devendo ser ajustado às necessidades metabólicas de cada um.

Caracterização parcial da enzima

O perfil de temperatura e pH ótimos para inulinase de *K. marxianus* NRRL Y-7571 produzida com farinha de yacon foram observados em 60°C e no pH 4.0, respectivamente (Fig. 5 A e B). Outros autores também relataram valores similares de pH e temperatura ótimos para *K. marxianus* [5, 17, 19, 25], mas as inulinases de outras espécies de fungos também apresentam características bioquímicas semelhantes [10, 14, 44]. Esta característica é muito interessante para o setor industrial, uma vez que pHs mais ácidos e temperaturas elevadas diminuem o risco de contaminação [45].

Os testes de estabilidade térmica mostraram que a inulinase manteve mais de 95% da sua atividade por 3 horas a 45°C e cerca de 90% por 4 horas a 50°C. Estes resultados indicam certo caráter de termoestabilidade desta enzima, que é uma característica bastante desejável para aplicação em processos biotecnológicos. Entretanto, a enzima foi rapidamente inativada a 60°C, um comportamento comumente descrito para a maioria das inulinases microbianas [41]. De acordo com Zhou e Chen [51] a temperatura atua na atividade enzimática do mesmo modo que um catalizador enzimático até o valor ótimo, acima do qual a atividade diminui devido à desnaturação.

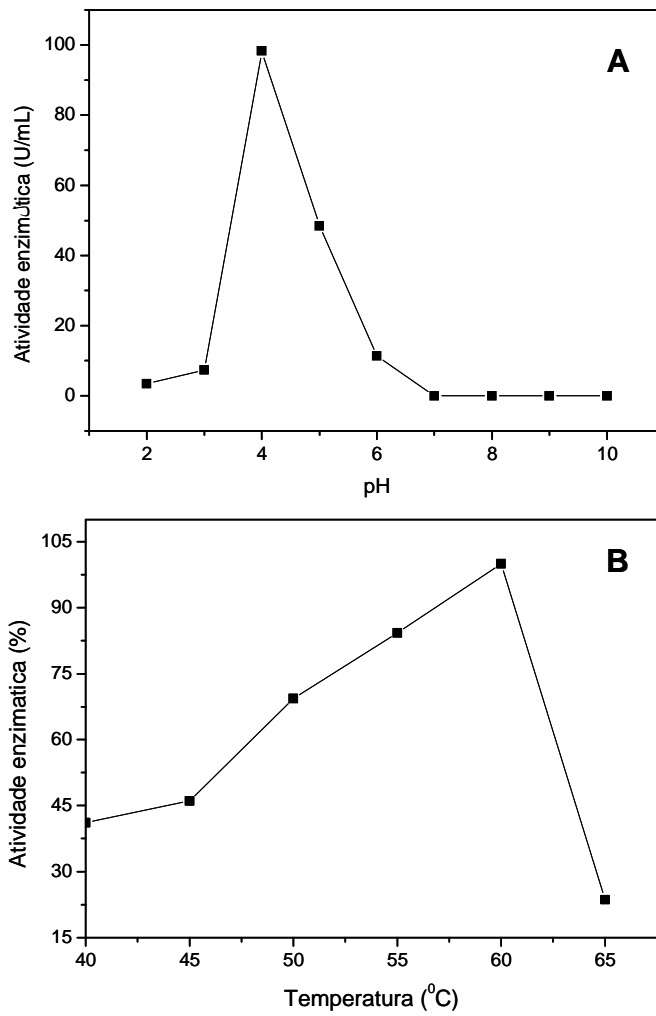


FIG.5 Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade enzimática de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

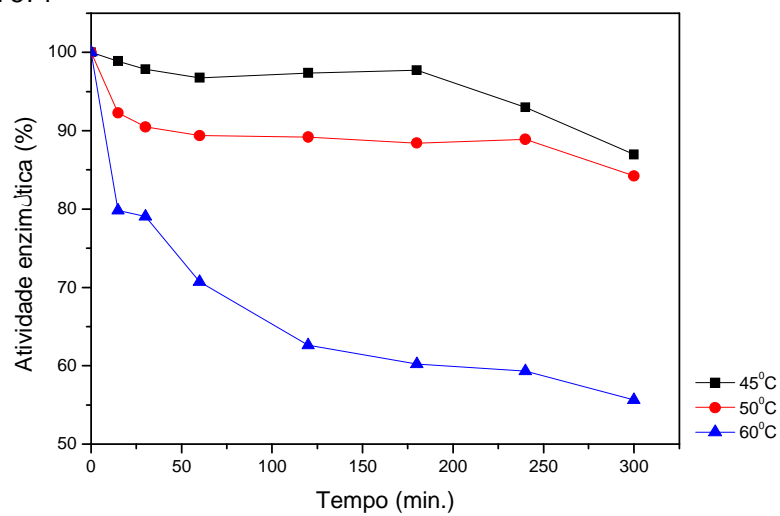


FIG.6 Estabilidade térmica da enzima inulinase à temperatura de reação de 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C e pH 4.0.

Conclusões

A farinha do yacon foi um substrato bastante viável para aplicação em processos fermentativos, não somente por causa das boas produções de inulinase e biomassa que proporcionou, mas também por apresentar pouca variabilidade.

Por meio dos resultados obtidos, foi possível observar que o aumento da concentração da farinha de yacon, nas faixas estudadas, influenciou positivamente até o limite de 7.0%, sendo esta a melhor concentração para a produção tanto de biomassa quanto de inulinase. Este resultado é bastante desejável, uma vez que não há necessidade de grande quantidade de substrato para obtenção da enzima, o que pode ajudar a diminuir os custos do processo. Do mesmo modo, a milhocina também apresentou os melhores resultados em baixas concentrações, mostrando-se uma boa fonte de nitrogênio para a produção da enzima inulinase. Esta característica é bastante interessante, uma vez que este substrato apresenta custo menor em comparação com outras fontes de nitrogênio como peptona e extrato de levedura.

O planejamento fatorial Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi muito útil para estabelecer as melhores concentrações dos substratos, tornando possível a otimização do processo com um número menor de experimentos. Além disso, as análises de superfície de resposta tornaram possível a visualização da interação entre as variáveis, fornecendo uma visão mais completa do comportamento do micro-organismo durante o processo.

Referências

1. Bender JP, Mazutti MA, Oliveria D, Di Luccio M, Treichel H (2006) Inulinase Production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 Using Solid State Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 129-132:951-958.
2. Bonciu CN, Bahrim G (2011) Inulinases-*a* innovative Romanian Food Biotechnology. *Innov Rom Food Biotechnol* 9:1-11
3. Bonciu CN, Bahrim G (2012) Fuel ethanol bioproduction from inulin rich feedstock. *Innov Rom Food Biotechnol* 11:1- 8
4. Campos D, Betalleluz-Pallardel I, Chirinos R, Aguilar-Galvez A, Noratto G, Pedreschi R (2012) Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a

- source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chem* 135:1592–1599
5. Cazetta M, Martins P, Montl, R, Contiero J (2005) Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *J Food Eng* 66:301-3056. Chi ZM, Zhang T, Cao TS, Liu XY, Cui W, Zhao CH (2011) Biotechnological potential of inulin for bioprocess *Bioresour Technol* 102: 4295-4303.
 7. Cho YJ, Yun JW (2002) Purification and characterization of an inulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. *Proc Biochem* 37(11):1325-1331.
 8. Corrêa TLR, Stella KS, Moutinho MLL, Martins MAM (2011) Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMI-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: compatibility of enzymes with commercial detergents. *Ciênc Tecnol Aliment*, 31(4):843-84
 9. Dilipkumar M, Rajasimman M, Rajamohan N (2011) Optimization of Inulinase production from garlic by *Streptomyces* sp, in solid state fermentation using statistical designs. *Biotechnol Res Int* 2011:1-7
 10. Dinarvand M, Ariff AB, Moeini H, Masomian M, Mousavi SS, Nahavandi R, Mustafa S (2012) Effect of extrinsic and intrinsic parameters on inulinase production by *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Electron J Biotechnol* 15(4):1-9
 11. Erdal S, Canli O, Algur FO (2011) Inulinase production by *Geotrichum candidum* using Jerusalem artichoke as sole carbon source. *Rom Biotechnol Lett* 16:4
 12. Ettalibi M, Baratti JC (2001) Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. *Enzyme Microbial Technol* 2:596- 601
 13. Fawzi EM (2011) Comparative study of two purified inulinases from thermophile *thielavia terrestris* NRRL 8126 and mesophile *Aspergillus foetidus* NRRL 337 grown on *Cichorium intybus* l. *Braz J Microbiol* 42:633-649
 14. Guimarães LHS, Terenzi HF, Polizeli ML, Jorge JA (2007) Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon source *Enzyme Microb Technol* 42: 52-57
 15. Haully COM, Moscatto JA (2002) Inulin and oligofructosis: a review about functional properties, prebiotic effects and importance for food industry. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*. 23(1):105-118.
 16. Hermman M, Freire I, Pazos C (1998) Compositional diversity of the yacon storage root. Impact on a changing world. *Program Report* 425-432.
 17. Jain SC, Jain NK (2012) Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract. *Braz J Microbiol* 43(1):62-69
 18. Kango, N (2008) Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. *J Food Eng* 85:473–47819.
 19. Kushi RT, Monti R, Contiero J (2000) Production, purification and characterization of an extracelular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 25: 63-6920.
 20. Lachman J, Havrland B, Fernández EC, Dudjak J (2004) Saccharides of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] tubers and rhizomes and factors affecting their content. *Plant Soil Environ* 50:383 –39021.
 21. Laowklom N, Chantanaphan R, Pinphanichakarn P (2012) Production, purification and characterization of inulinase from a newly isolated *Streptomyces* sp. CP01. *Nat Resources* 3:137-14422.

22. Lim SH, Ryu JM, Lee H, Jeon JH, Sok DE, Choi ES (2011) Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis *Bioresour Technol* 102: 2109-2111
23. Makino Y, Treichel, H, Mazutti MA, Maugeri Filho F, Rodrigues MI (2009) Inulinase bio-producing using agroindustrial residues: screening of microorganisms and process parameters optimization *J Chem Technol Biotechnol* 84: 1056–1062
24. Mazutti M, Bender JP, Treichel H, Luccio M (2006) Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme Microbial Technol* 39:56–5925.
23. Mazutti M, Ceni G, Luccio, M, Treichel H (2007) Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess Biosyst Eng* 30:297–30426.
24. Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31(3):426-42827.
25. Moscatto JA, Prudêncio-Ferreira SH, Hauly MCO (2004) Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. *Ciênc Tecnol Aliment* 24(4):634-64028.
26. Mutanda T, Wilheimi BS, Whiteley CG (2008) Response surface methodology: Synthesis of inulooligosaccharides with an endoinulinase from *Aspergillus niger* *Enz Microbial Technol* 43:362–368
27. Parekh S, Margaritis A (1985) Inulinase (β -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 22:446 – 448
28. Pessoni RAB, Figueiredo-Ribeiro RCL, Braga MR (1999) Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae). *J Appl Microbiol* 87:141-147
31. Poorna V, Kulkarni PR (1995) A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design *Bioresour Technol* 54(3):315-320.
32. Risso FVA, Mazutti MAH, Treichel EC, Maugeri F, Rodrigues MI (2012) Assessment of fructooligosaccharides production from sucrose in aqueous and aqueous-organic systems using immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, *Ciênc Tecnol Aliment* 32:245-24
33. Roberfroid MB (2005) Introducing inulin-type fructans. *Brit J Nutr* 93: S13-S25
34. Roberfroid M (2007) Inulin-type fructans: functional food ingredients *J Nutr* 137: 2493S-2502S
35. Rodrigues MI, lemma AF (2009) Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos. 2ed. Campinas: Casa do Pão Editora
36. Rosa CS, Oliveira VR, Viera VB, Gressler C, Viegan S (2009) Cake developed with Yacon flour. *Cienc Rural* 39(6)-1869-1872
37. Santana I; Cardoso MH (2008) Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais *Cienc Rural* 38(3): 898-905.
38. Seminario J, Valdemarra M, Manrique L (2003) El yacon: fundamentos para el aprovechamiento de um recurso promisorio. Centro Internacional de La papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, agencia suiza para El desarrollo y La cooperacion (COSUDE), Lima, Peru, p. 60
39. Seok-Hwan L, Lee H, Sok D, Choi E (2010) Recombinant Production of an Inulinase in a *Saccharomyces cerevisiae* gal80 Strain *J. Microbiol Biotechnol* 20(11), 1529–1533.

40. Sguarezi C, Longo C, Ceni G, Boni G, Silva F, Luccio M, Mazutti MA, Maugeri A, Rodrigues MI, Treichel H (2009) Inulinase production by agro-industrial residues: Optimization of pretreatment of substrates and production medium. *Food Bioprocess Technol* 2:409–414
41. Singh P, Gill P (2006) Production of inulinases: recent advances. *Food Technol Biotechnol* 44(2): 151-162
42. Skowronek M, Fiedurek J (2003) Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. *J Appl Microbiol* 95: 686-692
43. Suzuki H, Ozawa Y, Maeda H (1988) Studies of water-insoluble yeast invertase. *Agr Biol Chem* 30:807-812
44. Trivedi, S, Divecha J, Shah A (2012) Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates. *Carb Pol* 90:483– 490
45. Vandamme E J, Derycke D G (1983) Microbial inulinases: Fermentation process, properties, and applications. *Adv App Microbiol* 29: 139-176
46. Vilhena SMC, Câmara FLA, Kakihara ST (2000) O cultivo de yacon no Brasil. *Hortic Bras* 18(1):5-8
46. Wang G, Chi Z, Song B, Wang Z, Chi Z. (2012) High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. *Bioresour Technol* 124: 77–82.
48. Yu X, Guo N, Chi Z, Gong F, Sheng J, Chi Z (2009) Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *Biochem Eng J* 43: 266–271
49. Yuan WJ, Zhao, XQ, Ge XM, Bai FW (2008) Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *J Appl Microbiol* 105:2076–2083
50. Yuan BHN, Sun, J, Wang SA, Fu-li L (2012) Purification and characterization of a novel extracellular inulinase from a new yeast species *Candida kutaonensis* sp. nov. KRF1T. *Appl Microbiol Biotechnol* 96(6): 1517-26
51. Zhou QZK, Chen XD (2001) Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Bioch Eng J* 9: 33-40.