

**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**

**PRODUÇÃO DE INULINASE POR *Kluyveromyces marxianus*
NRRL Y 7571 UTILIZANDO XAROPE DE AGAVE (*Agave tequilana*)
E EXTRATO DE SISAL (*Agave sisalana*) COMO SUBSTRATOS**

LUANA PAULA DE AZEVEDO DE OLIVEIRA

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

MAIO - 2012

**PRODUÇÃO DE INULINASE POR *Kluyveromyces marxianus*
NRRL Y 7571 UTILIZANDO XAROPE DE AGAVE (*Agave tequilana*)
E EXTRATO DE SISAL (*Agave sisalana*) COMO SUBSTRATOS**

LUANA PAULA DE AZEVEDO DE OLIVEIRA

Bióloga

Universidade Estadual de Feira de Santana, 2006

Dissertação submetida ao colegiado do Curso 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: Marcia Luciana Cazetta

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MAIO - 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

O48 Oliveira, Luana Paula de Azevedo de.
Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 7571 utilizando xarope de agave (*Agave tequilana*) e extrato de sisal (*Agave sisalana*) como substratos / Luana Paula de Azevedo de Oliveira._ Cruz das Almas, BA, 2012.
103f.; il.

Orientadora: Márcia Luciana Cazetta.

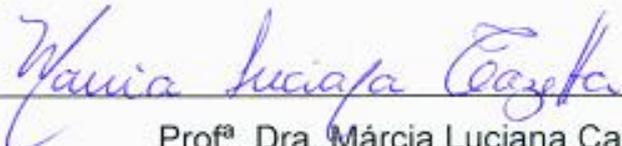
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

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

CDD: 574.193

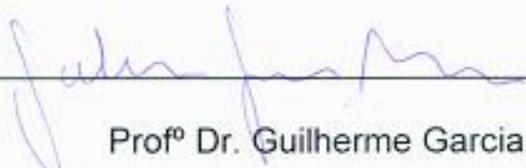
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
LUANA PAULA DE AZEVEDO DE OLIVEIRA**



Prof.ª. Dra. Márcia Luciana Cazetta

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB



Prof.º Dr. Guilherme Garcia da Silveira

Universidade Federal de Uberlândia – UFU



Prof.º Dr. Hélio Mitoshi Kamida

Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MAIO - 2012

Dedico

Ao meu marido Mario, por todo incentivo,
Aos meus pais e minha irmã pelo amor, orgulho e apoio sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus anjos da guarda, que me iluminam e protegem todos os dias, por guiar meus passos, me dar saúde, força, determinação, coragem, oportunidade e por ter colocado em minha vida pessoas tão generosas e especiais que me ajudaram a desenvolver este trabalho.

Aos meus pais e a minha irmã querida que apesar da distância estão sempre comigo em mente e coração, por todo amor, pela base sólida, dedicação, confiança, pelo orgulho, por serem quem são,...enfim por tudo, em toda a minha vida!

Ao meu marido Mario que virou marido no meio do Mestrado, mas que desde sempre foi o meu maior incentivador neste projeto! Obrigada por acreditar em mim, por estar lado a lado, sempre interessado em saber como estava tudo, pela compreensão, estímulo e por me acompanhar com o seu amor tranquilo e paciente, eu devo a coragem de encarar esse desafio a você.

Aos meus sogros D. Ana e Sr. Orlando pelo imenso apoio, dedicação, disponibilidade em ajudar e por sempre me acolherem tão bem.

A minha orientadorinha, Marcia Luciana Cazetta, por não medir esforços para o desenvolvimento deste trabalho, por estar sempre disponível com tanta atenção, por ser tão generosa, paciente e compreensível. Eu espalho para todo mundo que eu tive a maior sorte do mundo em tê-la como orientadora. Com ela eu adquiri não somente conhecimento, mas principalmente exemplo de dedicação, competência e muito talento, não tenho a menor dúvida de que ela se tornou a minha melhor referência de orientação, se algum dia eu for orientar alguém espero conseguir ser, pelo menos um pouco, do que ela foi pra mim. Muito obrigada por tudo!

Aos meus colaboradores e tanto! Carine Mascena que me ajudou muito lá no comecinho e Tiago Felipe que foi um anjo que apareceu no laboratório. Obrigada por ter me ajudado de forma tão comprometida, interessada e divertida. A sua colaboração foi muito valiosa.

Às meninas do Laboratório de Biotecnologia Microbiana-LABIOM, Jack, Mariza, Aline, Josi e Dani, por toda ajuda, por esclarecerem dúvidas, pelos empréstimos, disponibilidade...enfim por tooooooda colaboração!

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica, Juli, Thiara, Tiago, Daniel, Clemilton e ao profº André, pelo espaço, interesse, convivência agradável e momentos compartilhados.

As técnicas Lene (caichinhos de avelã), ViCtória, Carulina, Leucilene, Pat e ao técnico Ronald Ginger, meus colegas/amigos de trabalho, pelas palavras de incentivo, compreensão, ajuda, festa surpresa de aniversário (ahaaaa), pela torcida e expectativa sempre perguntando: e aí Luris como está, falta muito? Quando eu terminei eles ficaram contentes... e eu também!

Aos meus colegas de turma Adriane, Almir, Diogo, Djalma por entrarmos juntos nesse caminho.

Aos professores Guilherme Garcia Silveira e Hélio Mitoshi Kamida, por aceitarem o convite de integrarem a banca examinadora. Pelas correções, sugestões, considerações e palavras de incentivo que foram bastante importantes não só para a elaboração final deste trabalho, como também na continuidade da minha trajetória acadêmica.

A UFRB e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de crescimento e aprendizagem.

Muitíssimo Obrigada!

ÍNDICE

Páginas

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	01
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
1.1 Inulinase	03
1.2 Aplicações das inulinases	05
1.3 Produção de inulinases.....	06
1.3.1 Micro-organismos produtores	06
1.3.2 Produção de inulinase por <i>Kluyveromyces marxianus</i>	09
1.3.3 Substratos utilizados na produção de inulinases.....	10
1.3.4 <i>Agave tequilana</i> e <i>Agave sisalana</i>	13
1.3.5 Processos fermentativos para produção de inulinase.....	15
1.4 Planejamento experimental e otimização de processos	16

CAPÍTULO 1

OLIVEIRA, L. P. A. Produção de Inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 utilizado xarope de *Agave (Agave tequilana)* como substrato.

Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução	31
Material e Métodos	33
Resultados e Discussão	40

CAPÍTULO 2

OLIVEIRA, L. P. A. Produção de Inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 utilizado extrato de sisal (*Agave sisalana*) como substrato.

Resumo	56
--------------	----

Abstract	57
Introdução	58
Material e Métodos	60
Resultados e Discussão	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS	87

RESUMO

OLIVEIRA, L. P. A. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 7571 utilizando xarope de agave (*Agave tequilana*) e extrato de sisal (*Agave sisalana*) como substratos.

A inulinase é uma enzima utilizada na indústria alimentícia para a produção de xarope com alto teor de frutose e frutooligossacarídeos, através da hidrólise enzimática da inulina, podendo ser utilizada também na produção de bioetanol. Vários micro-organismos já foram descritos como bons produtores de inulinase, no entanto, as leveduras do gênero *Kluyveromyces* apresentam alguns dos melhores resultados. Esse trabalho teve como principal objetivo estudar a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 7571 utilizando xarope de Agave e extrato de sisal como fontes de carbono. Foram realizadas fermentações submersas em câmara agitadora orbital, sob agitação de 150 rpm, $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e pH 5,0 durante 96 horas em frascos Erlenmeyers. Os meios de cultivo de sais minerais foram suplementados com variadas concentrações das fontes de carbono e da fonte de nitrogênio (extrato de levedura), de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)², totalizando 44 ensaios para cada fonte de carbono testada. Utilizando o xarope de Agave, obteve-se condição ótima de produção enzimática (144,170 U/mL) após 96 horas de fermentação com concentrações 5% e 2,5% das fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Para o extrato de sisal a melhor condição de produção da inulinase (10,11U/mL) foi obtida com concentração da fonte de carbono de 45% e 2,0% da fonte de nitrogênio, após 96 horas de fermentação. Em ambos os substratos a enzima apresentou pH ótimo 4,0, termoestabilidade a 50°C e temperatura ótima de 60°C e 65°C , utilizando o xarope de agave e extrato de sisal, respectivamente. O extrato de sisal mostrou ser uma fonte de carbono bastante variável, no entanto, obteve-se valores consideráveis de atividades enzimáticas neste estudo, enquanto o xarope de agave indicou ser um substrato viável para produção de inulinase, utilizando a levedura *kluyveromyces marxianus* NRRL-Y757.

Palavras-chaves: inulina, levedura, Agave, fermentação submersa.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. P. A. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 7571 using agave syrup (*Agave tequilana*) and sisal extract (*Agave sisalana*) as substrates.

Inulinases are enzymes widely applied in the food industry for the production of syrup with high fructose content and fructooligosaccharides by enzymatic hydrolysis of inulin and can also be used to bio-ethanol production. Although several microorganisms have been described as good producers of inulinases, the yeasts have been showing some of the best results, especially those of genus *Kluyveromyces*. The aim of this work was to study the inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRLY-7571 using agave syrup (*Agave tequilana*) and sisal extract (*Agave sisalana*) as carbon sources. Fermentations were performed at submerged fermentation in orbital shaker at 150 rpm, 28±2°C and pH 5.0 for 96 hours in Erlenmeyer flasks. Culture medium of mineral salts were supplemented with varying concentrations of carbon sources and nitrogen sources (yeast extract), according to the Rotational Central Composite Design (RCCD) 2², resulting in 44 runs for each carbon source. With agave syrup at 5% and yeast extract at 2.5% was obtained optimum condition of enzyme production (144.17 U/mL), after 96 hours of fermentation. With sisal extract, the best condition to inulinase production (10.11 U/mL) was obtained in the concentration of 45% and 2.0% of yeast extract, after 96 hours. In both substrates the enzyme showed optimum pH at 4.0, thermostability at 50°C and optimum temperature of 60°C and 65°C, using agave syrup and sisal extract, respectively. The sisal extract proved to be a suitable substrate for the inulinase production, although has been a quite variable. A significant inulinase production was obtained with agave syrup, showed a good substrate for inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y757.

Keywords: inulin, yeast, *Agave*, submerged fermentation.

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de enzimas é um dos mais importantes setores da biotecnologia industrial, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por sua aplicação na substituição de processos químicos convencionais. Dentre as diferentes enzimas de interesse industrial, um grande número está relacionado ao setor alimentício, dentre as quais destacamos as inulinases.

As inulinases são enzimas que hidrolisam polímeros de frutose, como a inulina, que está presente como carboidrato de reserva em muitas plantas. O interesse por essa enzima surgiu quando essa capacidade de hidrólise foi descoberta e associada à produção de xarope com alto teor de frutose, (acima de 95%) em uma única etapa, processo mais vantajoso que o método convencional, a partir da hidrólise ácida do amido. Além do xarope de frutose (exo-inulinase) pode ser produzido também frutooligossacarídeos (endo-inulinase) (VANDAME E DERICK, 1983).

Tanto a frutose, quanto os frutooligossacarídeos, são utilizados na indústria alimentícia melhorando a qualidade dos alimentos em relação ao seu poder nutricional e funcionalidade. Recentemente, as inulinases vêm sendo estudadas também na obtenção de bioetanol, entre outros compostos (CHI et al., 2011). Além dessas aplicações, essa enzima possui a vantagem de ser termoestável e não específica, sendo capaz de hidrolizar também outros açúcares como sacarose, rafinose e estaquiose, mostrando uma versatilidade que a torna bastante atrativa para o setor industrial.

A inulinase pode ser produzida por vários micro-organismos, como fungos, bactérias e leveduras, sendo que as leveduras apresentam alguns dos melhores resultados, principalmente as do gênero *Kluyveromyces*. A produção de enzimas microbianas é realizada por meio de processos fermentativos devido à facilidade de produção em curto período de tempo, obtenção em qualquer época do ano e ampla diversidade de substratos.

Em relação ao substrato, as inulinases podem ser obtidas empregando inulina comercial, a qual é uma matéria-prima com um alto valor agregado, o que eleva os custos de produção. Dessa forma há uma forte tendência na busca de

novos substratos, inclusive resíduos agroindustriais, para a produção de inulinase, visando uma diminuição dos custos.

Nesse sentido, pesquisas envolvendo a utilização de substratos vegetais têm sido desenvolvidas. As plantas do gênero *Agave* são ricas em inulina, possuindo altas concentrações deste carboidrato, semelhantes às encontradas na chicória, dália e alcachofra de Jerusalém, comumente empregadas para a obtenção de inulina (GARCIA-AGUIRRE et al., 2009), podendo ser exploradas como substrato para a produção de inulinase. A espécie *Agave tequilana* é utilizada na produção de bebidas fermentadas e destiladas onde se destaca a tequila, enquanto a *Agave sisalana* é empregada na produção de fibras resistentes, no Nordeste brasileiro, especialmente na Bahia. Poucos estudos são realizados empregando a *Agave tequilana* na produção de enzimas e em relação ao extrato de sisal não havia conhecimento a respeito da sua utilização em processos fermentativos para a produção de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, ou de outras enzimas.

Com base nestes aspectos, o objetivo geral deste trabalho foi estudar a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando xarope de agave (*Agave tequilana*) e extrato de sisal (*Agave sisalana*) como substratos, além de observar aspectos como o crescimento celular e realizar a caracterização parcial dos extratos enzimáticos obtidos nas melhores condições de cultivo, determinando os seus perfis ótimos de pH, temperatura e termoestabilidade.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Inulinase

A inulina é um carboidrato de reserva presente nas raízes e tubérculos de plantas como alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*), chicória (*Cichorium intybus*), dália (*Dahlia pinnata*), yacon (*Polymnia sanchifolia*) e plantas do gênero *Agave*, entre outras (CHI, et al., 2011; MONTANÊZ-SOTO et al., 2011). Trata-se de um polímero de cadeia linear formado por 20 a 30 moléculas de frutose, unidas por ligações β -2,1 e uma unidade de glicose terminal, a qual é unida por ligação tipo α -1, 2 (PAULA, 2007; ASTOLFI, 2010) (Figura 01).

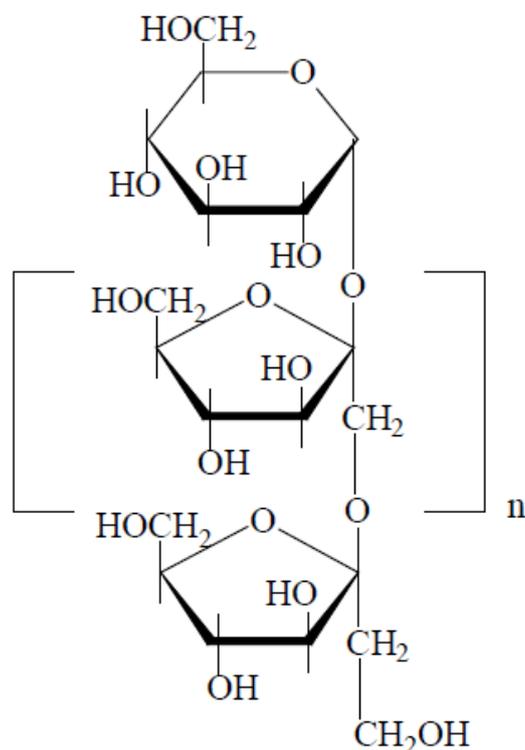


Figura 01- Estrutura química da inulina (VALADÃO, 2005).

A inulina é descrita como o principal substrato para enzimas denominadas inulinases. Estas enzimas são classificadas entre as hidrolases, que atuam nas ligações β -2,1 da inulina hidrolisando-a em frutose e glicose (Figura 02).

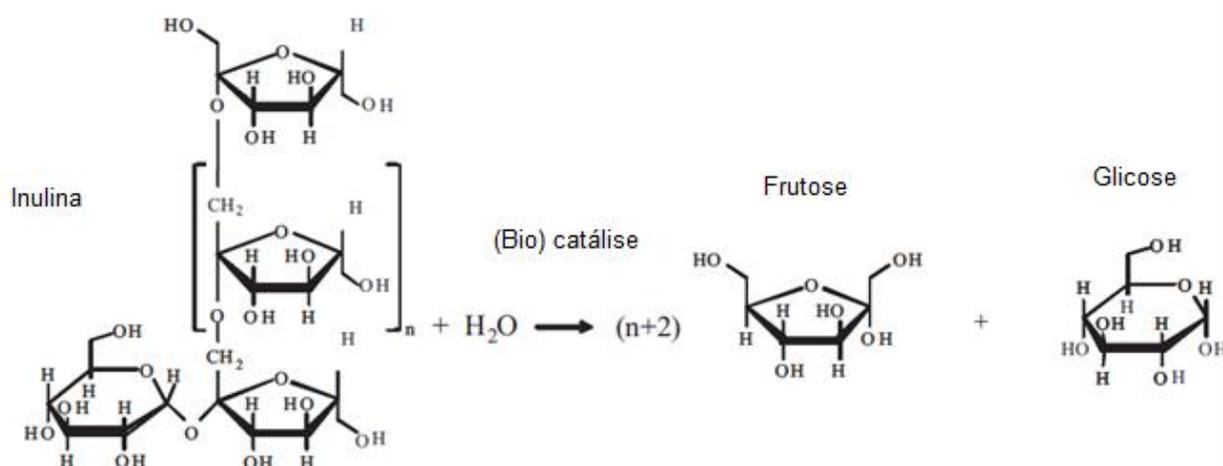


Figura 02- Hidrólise da inulina (LIMA et al. 2011).

As inulinas podem ser classificadas em endoinulinas ou exoinulinas. As endoinulinas (EC 3. 2. 1. 7) são específicas para a hidrólise da inulina e agem nas suas ligações internas, liberando inulooligossacarídeos (inulotriose, inulo-tetrose e inulo-pentose) como produtos principais da reação, enquanto as exoinulinas (EC 3. 2. 1. 80) clivam unidades de frutose a partir da extremidade não redutora da molécula (ZHANG et al 2010), liberando frutose. Essa última reação é típica de invertase, assim, inulinas atuam também em sacarose enquanto a invertase (β -kfrutofuranosidase, EC 3.2.1.26) não tem nenhuma atividade hidrolítica perceptível em inulina (GILL et al., 2003). A não especificidade das inulinas faz com que elas atuem não somente sobre a inulina e sacarose, mas também estaquiose e rafinose.

Devido ao sinergismo de ação dos dois tipos de inulinas, a frutose é obtida facilmente, porém é difícil determinar se as enzimas coexistem, bem como separar as duas enzimas completamente por métodos convencionais, já que elas possuem propriedades similares (JING, ZHENGYU e AUGUSTINE, 2003).

Quanto às características físico-químicas, as inulinas apresentam peso molecular acima de 50,0 kDa, pH ótimo entre 4,5-7,0 e temperatura ótima entre 30°C e 60°C. Enzimas purificadas são ativadas na presença de alguns íons (como Ca^{+2} , K^{+} , Na^{+}), enquanto outros íons metálicos (Mg^{+2} ou Ag^{+}) atuam como inibidores da atividade enzimática (BONCIU e BAHRIM, 2011).

1.2 Aplicações das inulinases

As características físico-químicas das inulinases, como estabilidade tanto em valores baixos de pH como em altas temperaturas, as tornam atrativas para a indústria, por proporcionarem menor risco de contaminação microbiana, além de serem comercialmente viáveis (MAKINO, 2004).

Sua maior aplicação está relacionada à produção de xarope com alto teor de frutose a partir da hidrólise enzimática da inulina. A frutose geralmente é aceita como um adoçante seguro, com índice de doçura um terço maior que a sacarose, com menor custo e tem propriedades funcionais que melhoram a cor, sabor e estabilidade do produto, sendo, portanto, amplamente utilizada em muitos alimentos, medicamentos e bebidas, em substituição da sacarose (GILL, MANHAS e SINGH, 2006; CHEN et al., 2009; DILIPKUMAR et al., 2010).

Além disso, a ingestão de frutose aumenta a absorção de ferro em crianças e de cálcio em mulheres pós-menopausa e por apresentar maior poder adoçante, pode ser utilizada em menores quantidades reduzindo o consumo de calorias, o que contribui para a diminuição da hiperglicemia, podendo ser mais tolerada por diabéticos e utilizada na dieta de pessoas obesas (VICENTE, 2000; ROCHA et al., 2006).

O xarope de frutose vem sendo empregado comercialmente em misturas para bolos, gelatinas e pudins dietéticos, balas, sobremesas geladas, suplementos alimentares, bebidas energéticas e no aumento da funcionalidade do amido, além de ser utilizada também na indústria farmacêutica (BUCK, 2001). O maior segmento do mercado é o de bebidas, como as esportivas com requisitos isotônicos e à base de cola, sendo utilizado também como coadjuvante na fermentação de vinho e licores. O segundo maior mercado para o xarope é a indústria panificadora, por ser ideal em produtos que necessitam do crescimento da levedura como em pães e bolos, uma vez que é diretamente fermentável pela levedura sem necessidade de inversão (BUCK, 2001).

O processo convencional para a obtenção de xaropes de frutose ocorre através da hidrólise ácida do amido (de milho ou batata), o qual envolve a ação da α -amilase, amiloglicosidase e glicose isomerase, resultando na produção de uma mistura constituída de oligossacarídeos (8%), frutose (42%) e glicose (50%). A

hidrólise enzimática da inulina, empregando-se a inulinase, ocorre através de uma única etapa enzimática e produz acima de 95% de frutose. Este é um processo mais vantajoso e, portanto, uma boa alternativa, considerando-se a qualidade do produto obtido, ao contrário do processo de hidrólise ácida que provoca propriedades indesejáveis no xarope como sabores e odores residuais e coloração escura (VANDAME e DERICK, 1983; VICENTE, 2000; SINGH e BHERMI, 2008).

A inulinase encontra aplicação também na produção de frutooligossacarídeos (FOS), através da hidrólise enzimática da inulina. Os frutooligossacarídeos têm atraído a atenção por tratar-se de prebióticos, substâncias que estimulam o aumento da população de bifidobactérias, as quais compõem a microbiota intestinal natural, que sintetizam antibióticos naturais e vitaminas importantes como as do complexo B (CHIEN, LEE e LIN et al., 2001; MENDES, 2006). Dessa forma, vêm sendo utilizados como suplemento em iogurtes, queijos, barras de cereais, sobremesas e outros, assumindo grande importância como ingredientes funcionais e melhorando a qualidade nutricional dos alimentos (SANGEETHA, RAMESH e PRAPULLA, 2005; SILVA, 2008).

Além dessas aplicações, as inulinases vêm sendo utilizadas também de outras formas como, por exemplo, na produção de etanol. A frutose e glicose, geradas através da hidrólise enzimática da molécula de inulina, pode ser facilmente convertida em etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, podem ser aplicadas na produção de proteínas unicelulares, ácido cítrico, ácido glicônico, pululana, acetona e butanol, sorbitol, manitol e outros produtos químicos que podem ser transformados por outros micro-organismos (SHENG et al. 2007; ZHANG et al., 2010; CHI et al. 2011).

1.3 Produção de inulinases

1.3.1 Micro-organismos produtores

A inulinase pode ser obtida a partir de tubérculos e raízes de plantas que contém inulina, no entanto, as quantidades obtidas são insuficientes para serem exploradas comercialmente (PESSONI, 2004). Os micro-organismos,

incluindo-se bactérias, fungos filamentosos e leveduras, são as melhores fontes para a produção comercial da enzima devido ao seu fácil cultivo, no qual pode haver indução das condições para se obter melhor produtividade (CHI et al., 2009).

A Tabela 01 resume os principais micro-organismos produtores de inulinase e as respectivas atividades enzimáticas alcançadas referentes a trabalhos publicados.

Tabela 01- Micro-organismos produtores de inulinase

Micro-organismos	Atividade máxima	Referências
Bactérias		
<i>Paenibacillus spp</i>	2,48g/L	Gern et al., 2001
<i>Streptomyces spp</i>	524 IU/L	Sharma et al. 2006
	89 U/gds	Dilipkumar et al. 2011
	42,36 U/ml	Zherebtsov et al., 2002
<i>Streptomyces sp. GNDU 1</i>	0,552 U/mL	Gill et al., 2003
<i>Xanthomonas campestris</i>	117,0 U/g	Ayyachamy et al., 2007
<i>X. campestris pv. Phaseoli KM 24</i>	21,865 U L/h	Naidoo et al., 2009
Fungos filamentosos		
<i>Aspergillus niger</i>	1,75g/L	Gern et al., 2001
	100 U/mL	Ge e Zhag, 2005
	52,5 IU/mL	Kango, 2008
	176 U/mL	Kumar et al., 2005
<i>Aspergillus ochraceus</i>	108 U/mL	Guimarães et al., 2007
<i>Aspergillus ficuum</i>	193,6U/gds	Chen et al., 2011
<i>Aspergillus parasiticus</i>	2,9U/ml	Ertan et al., 2003 a
<i>Geotrichum candidum</i>	45,65 IU/ml	Mughal et al., 2009
<i>Rhizoctonia solani</i>	1,792 U/ml	Ertan et al., 2003 b
Leveduras		
<i>Pichia guilliermondii</i>	39,56 U/mL	Gao et al., 2007
	61,5 U/mL	Chi et al., 2009
	130,38 U/mL	Yu et al., 2009
	60,1 U/mL	Gong et al., 2007
<i>Cryptococcus aureus</i>	52,37 U/mL	Gao et al., 2007
	85 U/mL	Chi et al., 2009
	436,2 U/gds	Chi et al., 2009

Tabela 01 (continuação)- Micro-organismos produtores de inulinase.

Micro-organismos	Atividade máxima	Referências
Leveduras		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	62,85 U/mL	Gao et al., 2007
	22,5 U/mg	Liu et al., 2010
<i>Debaryomyces hansenii</i>	52,53 U/mL	Gao et al., 2007
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	194,1 U/mL	Kalil et al., 2010
	127 U/mL	Kalil et al., 2001
	176 IU/mL	Silva-Santisteban et al., 2005
	208 IU/mL	Silva-Santisteban et al., 2009
	262,9 U/mg	Golunski et al., 2011
	1294 U/mL	Treichel et al., 2009
	18743 U/mL	Kushi et al., 2000
	50,2 IU/mL	Singh e Bhermi, 2008
	47.1 IU/mL	Singh et al., 2006
	250 U/gds	Mazutti et al., 2007
	47,2 U/mL	Mazutti et al., 2010
	1317 U/mL	Treichel et al., 2009
	1139 U/mL	Squarezi et al., 2009

Fonte: (BONCIU E BAHIRIM, 2011). Adaptado (ASTOLFI, 2010).
 U, IU –Atividade da inulinases expressa em unidade internacional.
 gds – Gramas por substrato seco.

As espécies bacterianas são utilizadas para a produção de inulinase, principalmente devido à sua termoestabilidade. Entretanto, dados sobre a produção de inulinases por cepas bacterianas são escassos e referem-se principalmente a endo-inulinases (BONCIU e BAHIRIM, 2011).

Gill et al. (2003) consideraram *Streptomyces sp.* GNDU 1 como um candidato potencial para produção enzimática de frutose a partir de inulina, ao obter 0,552 IU/mL de atividade após 24 horas de fermentação, na presença de 1% de inulina. Bactérias do gênero *Bacillus* também foram descritas como produtores de inulinase. Zhrebtsov, Shelamova e Abramova (2002) obtiveram 42,36 U/mL de atividade enzimática empregando sacarose como fonte de carbono. Outros gêneros também já foram estudados para a produção enzimática de inulinase, como *Xhantomonas sp.* e *Paenibacillus sp.* No entanto, de acordo

com Gill, Manhas e Singh (2006), a produção de inulinase por bactérias não é comparável à grande capacidade de leveduras e fungos filamentosos produzirem esta enzima em elevadas concentrações.

Entre os fungos filamentosos produtores de inulinase, *Aspergillus spp.* tem sido o favorito para a produção da enzima. Gern et al. (2001) observaram 16 cepas fúngicas relatadas como produtoras de inulinases e consideraram *Aspergillus niger* DSM 2466 como a melhor delas. Ge e Zhang (2005) utilizaram também *Aspergillus niger* e obtiveram atividade enzimática máxima de 100 U/mL na presença de sacarose como substrato. Kumar et al. (2005) obtiveram atividade máxima de 176 U/mL com meio de cultivo contendo 5% de inulina, utilizando uma cepa isolada do solo identificada como *A. niger*.

Entretanto, segundo Chi et al. (2009), as leveduras são os micro-organismos que melhor produzem inulinase sendo, portanto, os mais estudados para a produção da enzima. Devido à sua natureza unicelular, crescem mais rapidamente que os fungos filamentosos e são mais eficientes na realização de alterações físico-químicas no meio em que se encontram devido à sua melhor relação área/volume oferecendo, assim, vantagens em relação aos fungos filamentosos no processo de fermentação (SILVA, 2008). Entre esses micro-organismos, *Pichia sp*, *Cryptococcus aureus*, *Candida sp*, e *Kluyveromyces sp.* são os gêneros que possuem grande potencial para a produção comercial da enzima (GONG, SHENG e CHI, 2007; SHENG, CHI e GONG, 2008).

1.3.2 Produção de inulinases por *Kluyveromyces marxianus*

Entre as leveduras produtoras de inulinases as que fazem parte do gênero *Kluyveromyces* são as mais estudadas, sendo descritas como os micro-organismos mais promissores para a produção desta enzima (TREICHEL, 2001; 2004).

A espécie *K. marxianus* é classificada como hemiascomyceto, homotática e anaeróbia facultativa, sendo importante destacar que não consegue crescer sob condições estritamente anaeróbias (FONSECA et al. 2008; LANE e MORRISSEY, 2010). Possui grande potencial biotecnológico e é amplamente adotada pela indústria devido a características como taxa de crescimento rápida, termotolerância (com crescimento em temperaturas entre 25°C e 45°C), amplo

espectro de substratos (incluindo xilose e arabinose) e grande capacidade de converter os substratos em biomassa (FONSECA et al., 2008; MATSUZAKI et al. 2012).

Além disso, fazem parte do grupo GRAS (Generally Recognized as Safe) e QPS (Qualified Presumption of Safety) pelas agências reguladoras dos Estados Unidos e União Europeia, respectivamente, e são aceitas pelo FDA (Food and Drug administration). Isso significa que são reconhecidas como seguras e há poucas restrições na aplicação deste micro-organismo em compostos farmacêuticos e alimentícios, o que lhes confere grande potencial para aplicações biotecnológicas (LANE e MORRISSEY, 2010).

Diversas pesquisas têm sido realizadas utilizando *Kluyveromyces marxianus* para a produção de inulinase. Esses estudos geralmente avaliam a produção sob diferentes condições de cultivo, a pesquisa de substratos e a influência de suas concentrações, o efeitos dos parâmetros operacionais e a seleção de cepas promissoras (MAKINO, 2004; SILVA-SANTISTEBAN et al., 2005; 2009; CAZETTA et al., 2005, 2010; TREICHEL et al. 2004; 2009; CHEN et al., 2011, CHI et al., 2011).

Em um desses estudos, foi estudada a produção da inulinase utilizando-se diferentes linhagens de *Kluyveromyces*. Entre as que foram avaliadas, a melhor foi a *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571, com uma atividade máxima de 900 U/mL após 72 horas de fermentação, a qual representa uma excelente produção quando comparada com a produção de outras linhagens citadas na literatura (MAKINO, 2004)

1.3.3 Substratos utilizados para a produção de inulinase microbiana

A composição do meio de cultivo afeta sensivelmente a excreção enzimática realizada pelos micro-organismos. Uma grande variedade de substratos tem sido pesquisados como fonte de carbono para produção de inulinase, variando-se desde substratos definidos a resíduos agroindustriais, conforme pode ser observado na Tabela 02.

Tabela 02- Substratos utilizados na produção de inulinase.

Substratos	Micro-organismos	Referências
Substratos puros		
Inulina comercial	<i>Pichia guilliermondii</i> <i>K. lactis</i> ; <i>K. marxianus</i> spp. <i>Streptomyces</i> spp.	Yu et al., 2009 Guerrero et al., 2006 Sharma et al., 2006
Substratos Definidos		
Sacarose Frutose Glicose	<i>K. marxianus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>A. Ficum</i> <i>K. marxianus</i> ; <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i>	Kalil et al., 2001; Silva-Santisteban, et al., 2009 Guerrero et al., 2006 Silva-Santisteban et al., 2009
Inulina extraída de plantas (não comercial)		
Yacon	<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> <i>Streptomyces</i> spp. <i>A.niger</i>	Cazetta et al., 2005 Sharma et al., 2006 Kango, 2008
banana, alho, cebola, chicória, dália, dente de leão, Raízes de aspargos, alcachofra de Jerusalém	<i>K. marxianus</i> <i>Rhizoctonia solanis</i>	Singh et al., 2006 Singh e Bhermi, 2008
Resíduos agro-industriais		
farinha de mandioca, sabugo de milho	<i>Aspergillus ochraeus</i>	Guimarães et al., 2007
farelo de aveia, palha de arroz,	<i>Streptomyces</i> spp.	Dilipkumar et al., 2011
bagaço de cana, farelo de trigo,	<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 <i>Aspergillus ficuum</i> JNSP5-06	Mazutti et al., 2007; Bender et al., 2006; Treichel et al., 2009 Chen et al., 2011

Fonte: BONCIU E BARHIM, (2011). Adaptado (CAZETTA, 2005)

Entre os substratos definidos investigados para a produção de inulinase, a inulina e a sacarose tem sido os mais utilizadas (KALIL et al., 2001; CAZETTA et al. , 2010; SHARMA, SHARMA, KAINTH e GILL, 2006; SILVA-SANTISTEBAN, CONVERTI e MAUGERI 2009; YU et al., 2009), embora segundo Contiero (2004), outros substratos também tenham sido citados, tais como, amidalina, arabinose, celobiose, esculina, frutose, galactose, lactose, maltose, manitol, melesitose, metanol, rafinose, salicina e amido. No entanto, esperam-se maiores produções da enzima em cultivos com inulina (SILVA-SANTISTEBAN, 2006).

Comercialmente, a inulina é obtida dos tubérculos de dália (*Dahlia pinnata*), os quais possuem elevadas concentrações deste polissacarídeo. Porém, o custo elevado inviabiliza economicamente a utilização de meios de cultivo com inulina pura em escala industrial.

Assim, resíduos agro-industriais e extratos vegetais ricos em frutranas vêm sendo estudados e considerados uma boa fonte para a produção de inulinase.

A produção de inulinase empregando resíduos agro-industriais como substrato é uma boa alternativa para reduzir os custos de produção e minimizar os impactos ambientais causados pela disposição desses resíduos no meio (MAZUTTI et al., 2010) e, ultimamente, vem despertando grande interesse entre os pesquisadores.

A seleção desse tipo de substrato depende de vários fatores, como custo, disponibilidade e aumento na produção da enzima ou, pelo menos, que esta permaneça a mesma que a obtida através de um meio sintético (MAKINO, 2009). O sucesso dessa alternativa depende também da escolha de um micro-organismo adequado, que consiga crescer nesses substratos.

Farinha de mandioca, farinha de aveia, palha de arroz, bagaço de cana, farelo de trigo, glicose e sacarose foram utilizados por Guimarães et al. (2007) a fim de estabelecer a influência da fonte de carbono sobre a produção de inulinase por *Aspergillus ochraceus*. O maior nível de atividade da inulinase extracelular foi obtida quando o bagaço de cana foi utilizado como fonte de carbono, atingindo 108 U/mL.

Raízes e tubérculos de várias plantas ricas em inulina, como a alcachofra de Jerusalém (*Heliantus tuberosus*), chicória (*Cichorium intybus*), entre outras, têm sido utilizados como fonte de carbono para a produção da enzima. Pesquisas abordando extratos vegetais de outras plantas vêm sendo realizadas, no intuito de obter fontes alternativas de inulina que possam ser utilizadas como substratos para a produção de inulinase.

Cazetta et al. (2005), conseguiram produzir inulinase utilizando extrato de yacon (*Polymnia sanchifolia*) como substrato, por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* em meio líquido.

Sharma, Kainth e Gill (2006), investigando vários substratos para produção da enzima (cevada, centeio, banana, alho, inulina pura, trigo, chicória, cebola e dália), observaram que a atividade mais elevada foi atingida quando o

alho (*Allium sativum*), que tem a inulina como carboidrato de reserva, foi utilizado como fonte de carbono (524U/mL) por *Streptomyces sp.*

Kango (2008) observou a atividade da inulinase por *Aspergillus niger* NK-126 em diferentes substratos, obtendo uma produção máxima de 55 U/mL com o extrato vegetal da raiz de dente de leão (*Taraxacum officinale*). O extrato da raiz de *Asparagus officinalis* em pó foi utilizado como fonte de inulina por Singh e Bhermi (2008), produzindo atividade enzimática de 50,2 IU/mL por *K. maxianus* YS-1 e considerado, pelos autores, como uma fonte de inulina de baixo custo para a produção de inulinase.

1.3.4 Agave tequilana e Agave sisalana

Como abordado anteriormente, diversos vegetais como dália, chicória e alcachofra de Jerusalém, já foram utilizados como matérias primas eficazes na produção de frutose, devido ao seu elevado teor de fruto-oligossacarídeos ou de inulina. Outras alternativas potenciais são algumas plantas do gênero *Agave*, cuja seiva contém altas concentrações de inulina, comparáveis as da chicória, dália e alcachofra de Jerusalém (GARCIA-AGUIRRE et al., 2009).

O gênero *Agave* é formado por plantas monocotiledôneas pertencentes à família Agavaceae, considerado nativo do México, onde se encontram 272 das 310 espécies relatadas, com 135 espécies endêmicas (GARCIA, 2002; ESCAMILLA-TREVIÑO, 2012). Várias delas são economicamente importantes, incluindo a *Agave tequilana* Weber var. azul, cuja seiva contém grande quantidade de inulina e é a espécie utilizada na produção de tequila (CRUZ-GUEREIRO et al., 2006). Folhas e caule compõem a parte aérea da planta, as bases das folhas estão unidas ao caule formando a parte conhecida como cabeça ou pinha (IÑIGUEZ-COVARRUBIAS et al., 2001) rica em frutanos, sendo a parte utilizada na produção da bebida (LAMAS et al., 2004). Além da tequila há também a comercialização de xaropes de frutose a partir do extrato de *Agave* (PARTIDA et al., 1998).

Por outro lado, o *Agave sisalana* Perr. (sisal) é uma espécie de grande interesse econômico em regiões semi-áridas como no Nordeste do Brasil, devido a produção de fibras rígidas (BOTURA et al., 2011).

A produção do sisal é destinada principalmente à extração dessas fibras, que podem ser utilizadas na manufatura de cordas, fios, barbantes, tapetes, sacos e bolsas, entre outros. Também pode ser utilizada na fabricação de pasta celulósica, empregada na produção do papel Kraft e de outros tipos de papéis finos. Além dessas aplicações, a fibra de sisal pode ser empregada na indústria automotiva, de móveis e eletrodomésticos, na mistura com polipropileno e na construção civil (ALVES et al., 2005).

O Brasil é o maior produtor e exportador de fibras de sisal do mundo, sendo a Bahia o estado responsável por 95% da produção nacional (SANTOS, 2006) proveniente da região sisaleira (Figura 03).

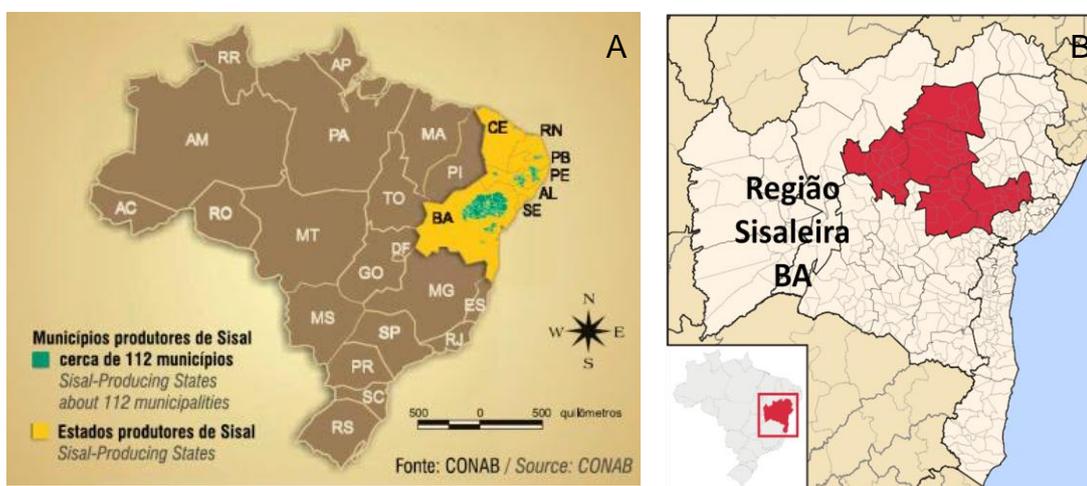


Figura 03- Mapas das regiões produtoras de sisal no Brasil. A) Estados produtores de sisal. B) Região produtora de sisal na Bahia.

Fonte: A: <http://apaeb.blogspot.com.br/2009/10/na-regiao-sisaleira-planta-do-sisal.html>.

B: <http://www.skyscrapercity.com/showthread.php?t=459170&page=5>

No setor sisaleiro nordestino, cerca de apenas 4% das folhas são aproveitadas para a retirada da fibra. O restante constitui os denominados resíduos do desfibramento, compostos pela mucilagem (15%), suco (80%) e bucha (1%). Isso constitui um grande desperdício, visto que vários destinos podem ser dados a esses resíduos (ALVES et al., 2005)

Dentre as possibilidades de uso desses subprodutos estão o emprego da mucilagem como complemento alimentar de bovinos e caprinos, da bucha como adubo orgânico e do suco para extração de substâncias que podem utilizadas como medicamento, bioinseticidas, sabonetes e pasta cicatrizante. No estudo realizado por Silva e Beltrão (1999) sobre *Agave sisalana*, foi mostrado que cada

litro de resíduo líquido contém aproximadamente 35-65 g de carboidratos fermentáveis.

Vários trabalhos foram desenvolvidos no sentido de se encontrar um destino para esse resíduo, entre eles, a sua utilização como adubo orgânico nas próprias plantações de sisal, bem como suplementação na ração animal (BANDEIRA e SILVA, 2006).

Outro foco de pesquisa foi a extração dos esteróides do suco do sisal, especialmente a hecogenina, uma sapogenina esteroidal, empregada na fabricação de corticosteróides (OASHI, 1999). Atualmente, algumas pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de estudar os resíduos do sisal como substrato para o desenvolvimento de processos fermentativos voltados para a produção de substâncias de interesse industrial, como enzimas e etanol de segunda geração. Essas pesquisas têm apresentado resultados promissores, mostrando que esse material, que é atualmente descartado, pode ser convertido em produtos de elevado valor agregado e resultar em novas fontes de renda para a população da região.

Entretanto, o extrato desta planta nunca foi estudado como substrato para processos fermentativos submersos e seu potencial, até o momento, permanecia desconhecido.

1.3.5. Processos fermentativos para a produção de inulinase

Vale ressaltar que, além do tipo de substrato empregado na produção de enzimas, os parâmetros operacionais do processo também devem ser controlados de forma a garantir tanto a manutenção das condições ótimas de cultivo do micro-organismo produtor, como também a preservação da atividade biológica da enzima (BON et al., 2008). Os principais parâmetros estudados para a produção de inulinase em processos fermentativos, utilizando diferentes micro-organismos, têm sido o pH, a temperatura e a composição do meio de cultura, principalmente, relacionados à fonte de carbono e nitrogênio (SILVA-SANTISTEBAN, 2006).

Os processos fermentativos para a produção de inulinase apresentam como principal vantagem a facilidade de produção que pode ser contínua durante o ano todo e possibilidade da utilização de substratos de baixo custo, entre outros

(TREICHEL, 2004). Esses processos podem ser conduzidos através de fermentação submersa (FSm) ou fermentação em estado sólido (FES).

Em linhas gerais, na fermentação em estado sólido o crescimento microbiano e a formação do produto ocorrem na superfície do substrato sólido na ausência de água livre e pode ser realizada sem agitação mecânica. Já na fermentação submersa, o micro-organismo produtor se desenvolve no interior do meio de cultivo líquido, sob agitação (BON et al., 2008). Tradicionalmente, a inulinase tem sido produzida por fermentação submersa (PANDEY et al., 1999; KALIL, et al., 2001; GILL et al., 2003; MAKINO et al., 2009) e é freqüentemente aplicada na maioria dos processos fermentativos industriais (BON et al., 2008).

Em comparação à fermentação em estado sólido, a fermentação submersa permite um sistema de cultivo homogêneo, com facilidade de controle das variáveis físico-químicas do processo e maior eficiência de adsorção e excreção de metabólitos secundários pela célula, reduzindo o tempo do processo e de separação do produto (BON et al., 2008), além de apresentar melhor controle dos parâmetros operacionais e padronização do processo (HOLKER e LENZ, 2005).

As fermentações submersas realizadas em pequena escala são facilmente operáveis e possuem baixo custo, e isso permite que se tenha uma maneira econômica de avaliar uma grande variedade de parâmetros, visando a otimização do processo (ROEPKE, 2007).

1.4 Planejamento experimental e otimização de processos

O planejamento experimental é uma ferramenta baseada nos fundamentos estatísticos, para alcançar as condições otimizadas de um processo produtivo (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Geralmente, a otimização de variáveis experimentais é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de apenas uma variável independente por vez, enquanto fixam-se outras em determinados níveis, até que todas as combinações sejam examinadas. Esse estudo univariável apresenta desvantagens como o tempo gasto para a otimização e a falta de avaliação acerca dos efeitos interativos entre as variáveis que afetam o processo em estudo (CUNICO, 2008). De acordo com BRASIL et al. (2007), estas desvantagens

resultam numa otimização ineficiente, impedindo o rápido estabelecimento das reais condições ótimas.

Dentre os métodos de planejamento experimental disponíveis na literatura, o planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que, em cada tentativa são analisadas todas as combinações possíveis entre os níveis de cada variável (PERALTA-ZAMORA, MORAIS e NAGATA, 2005).

De acordo com Neves e Schvartzman (2002), este tipo de planejamento normalmente é representado por 2^n , sendo que n representa o número de variáveis envolvidas e 2 o número de níveis escolhidos. O planejamento em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis, superior (+) e inferior (-), é o mais simples e mais utilizado dos fatoriais.

Dessa forma, se em um planejamento forem escolhidos 2 diferentes níveis para 3 fatores (2^3), o número de experimentos diferentes a serem realizados será 8, onde as variáveis estudadas serão combinadas em altas (+) e baixas concentrações (-), por exemplo. Dessa forma o efeito de um componente pode ser determinado com um número relativamente pequeno de experimentos (BON et al., 2008).

Diversas vantagens da utilização do planejamento fatorial podem ser destacadas como, por exemplo, a redução do número de ensaios e melhoramento da qualidade da informação; o estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos, a determinação da confiabilidade dos resultados e possibilidade de otimização de mais de uma resposta ao mesmo tempo, dentre outros (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma técnica que tem sido aplicada com sucesso na otimização dos mais variados processos, 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).

De acordo com Barros-Neto (1996), a metodologia de superfície de resposta é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou

quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

O planejamento experimental fatorial associado à técnica de RSM fornece informações seguras do processo, reduzindo soluções empíricas que envolvem técnicas de tentativa e erro (BOX et al., 1978). Usando essa técnica é possível estimar os efeitos principais das variáveis na resposta ou variável dependente. A tabela de análise de variância informa sobre o quanto o ajuste foi adequado, sendo possível propor o modelo probabilístico que correlaciona a resposta em função das variáveis estudadas, construindo a superfície de resposta para determinar a faixa ótima de operação (OLIVEIRA et al., 2004).

Essa metodologia tem sido aplicada na análise e otimização de processos como composição de meios de cultivo para crescimento microbiológico, condições de atividade enzimática e processos alimentícios. Kalil et al. (2001), utilizando a metodologia do planejamento fatorial e superfície de resposta, otimizou a produção da enzima inulinase de *K. marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045, sendo que a atividade inicial de 9,0 U/mL atingiu 127 U/mL com sacarose, utilizando esta ferramenta. TREICHEL (2001), realizou quatro planejamentos fatoriais sequenciais, sendo as variáveis independentes o melão, a água de maceração de milho (AMM) e o extrato de levedura, otimizando o meio de produção para a enzima inulinase. Com esta metodologia foi obtida uma atividade enzimática de 138U/mL, ultrapassando assim o valor atingido com o meio sintético (127U/mL).

Vale ressaltar que o planejamento fatorial não determina valores ótimos em uma única etapa, porém indica satisfatoriamente o caminho a ser tomado para que se possa atingir o objetivo proposto (NASCIMENTO, 2006).

REFERÊNCIAS

ALVES, O.M; SANTIAGO, E.G.; LIMA, A. R. M. – **Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste brasileiro**. Banco do Nordeste do Brasil, Fortaleza. 2005: Disponível em: <http://www.bnb.gov.br/projwebren/exec/livroPDF.aspx?cd_livro=11> acesso em: 20 jul. 2011.

ASTOLFI, V. **Produção de inulinase por fermentação em estado sólido usando estratégias de fermentação batelada e batelada alimentada em biorreator de leito fixo**. Erechim, 2010. 76fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – campus Erechim RS.

AYYACHAMY, M.; KHELAWAN, K.; PILLAY, D.; PERMAUL, K.; SINGH, S., Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation. **Letters in Applied Microbiology**,v.45, n.4, 2007.

BANDEIRA, D. A.; SILVA, O. R. R. F. Aproveitamento de resíduos. In: Andrade, W. (Ed.). **O sisal do Brasil**. Sindifibras; Brasília, DF. Apex, 2006. cap.5, p.56-61

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996. 299p

BENDER J. P.; MAZUTTI M. A.; OLIVEIRA D.; LUCCIO M.; TREICHEL, H. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using solid state fermentation, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 29-132, p. 951-958, 2006.

BON, E. P. S.; PEREIRA JUNIOR, N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P. ROSEIRO, J.C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para a produção de enzimas In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A. e COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 95-119, 2008.

BONCIU, C. N.; BAHRIM, G. Inulinases - a versatile tool for biotechnology. **Food biotechnology**, v. 9, p. 1-11, 2011.

BOTURA, M. B.; SILVA, G. D.; LIMA, H. G. et al. Veterinary Parasitology In vivo anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 104-110, 2011.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for Experimenters – An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. New York: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1978.

BRASIL, J. L.; VAGHETTI, J. C. P.; SANTOS J. R. A.; SIMON, N. M.; PAVAN, F. A.; DIAS, S. L. P.; LIMA, E. C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de bioadsorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como bioadsorvente. **Quimica Nova**, v.30, n.3, p.548-553, 2007.

BUCK, A. W. High Fructose Corn Syrup. In: NABORS, L. O.; GELARDI, R. C. **Alternative sweeteners**. 3. ed. revised. expanded. New York; Marcel Dekker Inc., p.391-411, 2001.

CAZETTA, M. L.; MARTINS, P. M. M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var . *bulgaricus*, **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 301-305, 2005.

CAZETTA, M. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Effects of Culture Conditions on the Production of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus* . **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 701-707, 2010.

CHEN, H. Q.; CHEN, X. M.; LI, Y.; WANG, J.; JIN, Z. Y.; XU, X. M.; ZHAO, J. W.; CHEN, T. X.; XIE, Z. J., Purification and characterization of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1206-1212, 2009.

CHEN, H.-QING; CHEN, X.-MING; CHEN, T.-XIANG; XU, X.-MING; JIN, Z.-YU. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 249-254, 2011.

CHI, Z.-MING; ZHANG, T.; CAO, T.-SHU; *et al.* Bioresource Technology Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4295-4303, 2011.

CHI. Z.; CHI, Z. & ZHANG, T.; LIU, G.; YUE, L. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. **Applied Microbiology**, v. 82, p. 211-220, 2009.

CHIEN, C.S.; LEE, W.C.; LIN, T.J.. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v, 29, p.252-257, 2001.

CONTIERO, J. Inulinases. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 381-398.

CRUZ-GUERRERO, A. E.; OLVERA, J. L., GARCÍA-GARIBAY, M.; GÓMEZ-RUIZ, L. Inulinase hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from

aguamiel (Agave sap) and pulque. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.115–117, 2006.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F. PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.9, n.1, p. 23-32, 2008.

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M. e RAJAMOHAN, N. Optimization of inulinase production using copra waste by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v.16, n.4, p.319–327, 2010.

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M. e RAJAMOHAN, N. Response surface methodology for the optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. **Environmental Engineering**, v. 6, n. 1, p. 85-95, 2011.

ERTAN F., AKTAC T.; KABOGLU C.; EKINCI F.; BAKAR E. Determination of optimum cultivation conditions on the production of inulinase from *Rhizoctonia solani*, **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.6, n.16, p.1386-1388, 2003a.

ERTAN F.; EKINCI F.; AKTAC, T. Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride*, **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 15, p.1332-1335, 2003b.

ESCAMILLA-TREVIÑO, L. L. Potential of Plants from the Genus Agave as Bioenergy Crops. **Journal Bio Energy Research**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2012.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology**, v. 79, p. 339-354, 2008.

GAO L.; CHI Z.; SHENG J.; WANG, L. J.; GONG, F. Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes, **Microbial Ecology**, v. 54, p.722-729, 2007.

GARCIA, M. A. Distribution of Agave (Agavaceae in Mexico). **Cactus and Succulente Journal**, v.4, p.177-188, 2002.

GARCIA-AGUIRRE, M.; SAENZ-ALVARO, V.; RODRÍGUEZ-SOTO, M. A.; VICENTE-MAGUEYAL, F. J. Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of agave fructo-oligosaccharides to obtain fructose-rich syrups. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10205-10210, 2009.

GE X. Y.; ZHANG W.G. Effects of octadecanoylsucrose derivatives on the production of inulinase by *Aspergillus niger* SL-09, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.1633-1638, 2005.

GERN, R. M. M.; FURLAN, S.A.; NINOW, J. L., JONAS, R. Screening for microorganisms that produce only endo-inulinase, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.55, p. 632-635, 2001.

GILL, P. K.; SHARMA, A. D.; HARCHAND, R. K.; SINGH, P. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 359-362, 2003.

GILL, P. K.; MANHAS, R. K. e SINGH, P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 894–902, 2006.

GOLUNSKI, S.; ASTOLFI, V.; CARNIEL, N.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*, **Separation and Purification Technology**, v.78, p. 261-265, 2011.

GONG, F.; SHENG, J.; CHI, Z.; LI, J. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.179-185, 2007.

GUERRERO, A. E. C.; OLVERA, J. L.; GARIBAY, M.G.; RUIZ, L. G. Inulinase hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from aguamiel (*Agave* sap) and pulque, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p.115-117, 2006.

GUIMARAES, L. H. S.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L.; JORGE, J. A. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources, **Enzyme and Microbial Technology**, v.42, p.52-57, 2007.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.301-306, 2005.

ĨNIGUEZ- COVARRUBIAS, T.; DÍAZ, D.; SANJUAN, H; ANZALDO, Y.; ROWELL, M. Utilization of by-products from the tequila industry. Part2: potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves, **Bioresource Technology**, v. 77, p. 101-108, 2001.

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

KALIL S.J.; SILVEIRA S.T.; FILHO F.M.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of different parameters for the purification of inulinase using an ion exchange fixed bed, **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.15, p. 676-679, 2010.

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

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

KUMAR G. P.; KUNAMNENI A.; PRABHAKAR T.; ELLAIAH, P. Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p.1359-1361, 2005.

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

LAMAS, R. F.; SANDOVAL, T.; OSUNA, R.; PRADO, Y. M.; GSCHAEDLE, R. Cocimiento y Molienda. Ciencia y tecnología Del tequila: Avances y Perspectivas. **Centro de Investigación e Asistencia em Tecnología Del Estado de Jalisco**. Guadalajara, México, 2004.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 2, n. 4, p.17-26.2010.

LIM, S. H.; RYU, J. M.; LEE, H.; JEON, J. H.; SOK, D. E.; CHOI, E.S. Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2109-2111, 2011.

LIMA, D. M.; FERNANDES, P.; NASCIMENTO, D. S. Fructose Syrup: A Biotechnology Asset. **Science**, v.49, n. 4, p. 424-434, 2011.

LIU, X.Y.; CHI, Z.; LIU, G. L.; WANG, F.; MADZAK, C.; CHI, Z. M. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surfaceengineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase, **Metabolic Engineering**, v.12, p. 469-476, 2010.

MAKINO, Y. **Seleção de linhagens de Kluyveromyces produtoras de inulinase visando a obtenção de frutooligossacarídeos: caracterização na enzima e otimização das etapas de produção e purificação**. Campinas, 2004. 178f. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

MAKINO, Y.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Inulinase bio-production using agroindustrial residues: screening of microorganisms and process parameters optimization, **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 84, p,1056–1062, 2009.

MATSUZAKI, C.; NAKAGAWA, A.; KOYANAGI, T.; TANAKA, K.; MINAMI, H. et al. *Kluyveromyces marxianus* based platform for direct ethanol fermentation and

recovery from cellulosic materials under air-ventilated conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.113, n.5, p. 604-7, 2012.

MAZUTTI, M. A.; 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, n. 5, p. 297-304, 2007.

MAZUTTI M. A.; SKROWONSKI A.; BONI G.; ZABOT G. L.; SILVA M. F., OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M.; FILHO F. M.; RODRIGUES M. I.; TREICHEL, H. Partial characterization of inulinases obtained by submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates: a comparative study, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.682-693, 2010.

MENDES, G. L., **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados**. Campinas, 2006, 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas.

MONTAÑEZ-SOTO, J.; VENEGAS-GONZÁLEZ, J.; VIVAR-VERA, M. Los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber AZUL. **Food Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 199-206, 2011.

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.

NAIDOO, K.; AYYACHAMY, M.; PERMAUL, K.; SINGH, S., Enhanced fructooligosaccharides and inulinase production by a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* KM 24 mutant. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 689 - 695, 2009.

NASCIMENTO R. P. **Otimização da produção de endoxilanases por *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 utilizando resíduos agro-industriais**. 2006 164f. Tese (Doutorado em Ciências- Microbiologia) Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, 2006.

NEVES, C. F. C.; SCHVARTZMAN, M. M. A. M. Variables search technique applied to gas separation. **Química Nova**, v.25, n 2, p.327-329, 2002.

OASHI, M.C.G. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba: aproveitamento do suco do sisal como fonte industrial de esteróides**. Santa Catarina, 1999. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção). Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: < www.eps.ufsc.br/teses99/oashi/cap6b.html > Acesso em: 15 set. 2010.

OLIVEIRA, R. A. D.; PARK, K. J.; CHIORATO, M. Optimization of inulin extraction from chicory roots. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.6, n.2, p.131-140, 2004.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, V. T., KRIEGER, N.; FONTANA, J. D. Recent Developments in Microbial Inulinases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 81, p. 35-52, 1999.

PARTIDA, V.; CAMACHO, A., MARTINEZ, A.J.. **Method of producing fructose syrup from agave plants**, U.S. Patent 5 846 333, 1998.

PAULA, F. C. **Imobilização da inulinase de *kluveromyces marxianus* var. *Bulgaricus* atcc 16045: caracterização e produção de açúcar invertido em biorreator** . Rio Claro, 2007. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"-Campus de Rio Claro SP.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.10, n.2, p.106-110, 2005

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

ROCHA, J. R.; CATANA, R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S.; FERNANDES, P., Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 95, p. 77-82, 2006.

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

ROEPCKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. 2007.133f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SANGHEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G., Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends Food Science Technology**, v. 16, p. 442-457, 2005

SANTOS, J.D., Produção e consumo. In: Andrade, W. (Ed.), **O sisal do Brasil**. Salvador, Sindifibras, 2006, p. 46–53.

SQUAREZI, C.; LONGO C.; CENI G.; BONI G.; SILVA M. F.; LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H. Inulinase production by agro-industrial residues: optimization of pretreatment of substrates and production medium, **Food BioprocessTechnology**, v.2, p. 409-414, 2009.

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

SHENG, J.; CHI, Z. M.; GONG, F.; LI, J., Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 21, p. 111-144, 2008.

SHENG J. Z.; CHI, L. J.; GAO L.; GONG, F. Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase, **Process Biochemistry**, v.42, p. 805–811, 2007.

SILVA, C. E. V. **Produção enzimática de frutoligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) Universidade de São Paulo -Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz.

SILVA, O. R. R., BELTRÃO, N. E. M. **O Agronegócio do Sisal no Brasil**. Brasília Embrapa-CNPQ, 1999.

SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; CONVERTI, A.; MAUGERI, F. F. Effects of carbon and nitrogen sources and oxygenation on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 249-261, 2009.

SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y. **Estudo dos parâmetros de engenharia de processo que afetam a fisiologia e a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045**. Campinas, 2006, 157f. Tese (doutorado em Engenharia de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

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

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

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.

TREICHEL H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES M. I. Use of a sequential strategy of experimental design to optimize the inulinases production in a batch bioreactor, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 895-900, 2009.

TREICHEL, H. **Estudo de meios industriais para produção de inulinase por**

Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus ATCC 1645. 2001. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados.** Campinas, 2004, 100f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

VALADÃO, R. C. **Estudo da fermentação semi-sólida de uma linhagem selecionada de *Aspergillus niger* na produção de inulinase.** Seropédica, 2005. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

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

VICENTE, A. A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica.** 2000. 224 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.

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.

ZHANG, T.; CHI, Z.; ZHAO, C. H.; CHI, Z. M.; GONG, F. Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp. W0. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8166-70, 2010.

ZHEREBTSOV N. A.; SHELAMOVA, S. A.; ABRAMOVA, I. N. Biosynthesis of inulinases by *Bacillus* bacteria, **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.38, n.6, p. 634-638, 2002.

Capítulo 1

**PRODUÇÃO DE INULINASE POR *Kluyveromyces marxianus*
NRRL Y 7571 UTILIZANDO XAROPE DE AGAVE (*Agave tequilana*)
COMO SUBSTRATO**

RESUMO

OLIVEIRA, L. P. A. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 utilizando xarope de Agave (*Agave tequilana*) como fonte de carbono.

Inulinases são enzimas (EC 3.2.1.7) que atuam nas ligações β -2,1 da inulina produzindo frutose. São aplicadas na produção de xaropes com alta concentração de frutose e frutooligossacarídeos. Podem ser obtidas através de micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras, entre as quais, o gênero *Kluyveromyces* tem sido considerado o mais promissor. Novos substratos vêm sendo pesquisados como alternativas para a produção de inulinase. Este trabalho teve como principal objetivo estudar a produção de inulinase utilizando xarope de agave (*Agave tequilana*) como fonte de carbono pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571. Foram realizadas fermentações submersas, sob agitação de 150 rpm, 28°C \pm 2°C e pH 5,0, durante 96 horas, em frascos Erlenmeyers, sendo retiradas amostras a cada 24 horas. Os meios de cultivo de sais minerais foram suplementados com variadas concentrações da fonte de carbono (xarope de agave) e da fonte de nitrogênio (extrato de levedura), de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2², totalizando 44 ensaios. A condição ótima de produção da inulinase (144,17 U/mL) foi obtida após 96 horas de fermentação, na concentração de 5% da fonte de carbono e 2,5% da fonte de nitrogênio. As análises estatísticas mostraram que, tanto a fonte de carbono como a fonte de nitrogênio, influenciaram a produção da enzima. A enzima foi caracterizada parcialmente e apresentou pH ótimo de 4,0, temperatura e termoestabilidade de 60°C e 50°C, respectivamente. Dessa forma, os resultados deste trabalho indicam o xarope de agave como um substrato viável para produção de inulinase, utilizando a levedura *kluyveromyces marxianus* NRRL-Y757.

Palavras chave: enzimas, levedura, fermentação submersa e otimização.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. P. A. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using syrup agave (*Agave tequilana*) as carbon source.

Inulinases are enzymes that act hydrolyzing linkages $\beta(2-1)$ from inulin, producing high fructose syrup. Besides, these enzymes are applied to fructooligosaccharides production, which presents functional and nutritional properties, especially like soluble fibers. Inulinases can be synthesized by several microorganisms such as bacteria, fungi and yeasts, and the genus *Kluyveromyces* has been considered the most promising. New substrates, like agroindustrial residues and vegetable extracts, have been studied as low cost alternative to inulin, an expansive raw material, for the inulinase production. This work was aimed to study the inulinase production using agave syrup as carbon source by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. The fermentations were carried out in submerged fermentations at 150 rpm in an orbital shaker containing 30mL culture medium, temperature $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ and pH 5.0. The inulinase activity was determined at 24, 48, 72 and 96 hours of fermentation. Culture medium of mineral salts were supplemented with defined concentrations of carbon source (agave syrup) and nitrogen source (yeast extract), according to the Rotational Central Composite Design (RCCD) 2^2 , resulting in 44 runs. The optimum condition of inulinase production (144.17 U/ mL) was obtained after 96 hours of fermentation, in the condition 5% of agave syrup and 2.5% of yeast extract. Statistical analysis showed that both carbon source as nitrogen source influenced the enzyme production. Partial characterization showed that optimum pH and temperature for enzyme activity were 4.0 and 60°C , respectively. The enzyme showed to be stable at 50°C during 5 hours. At 55°C and 60°C the activity quickly dropped. Thus, the present results indicated that agave syrup showed a good potential and can be an alternative substrate for inulinase production.

Key-words: enzymes, yeast, submerged fermentation and optimization.

INTRODUÇÃO

Inulinases são β -2,1-D-frutanofrutanohidrolases (EC 3.2.1.7) que atuam nas ligações β -2,1 da inulina, produzindo frutose (VANDAME e DERICKE, 1983). São descritos dois tipos de inulinases: as exoinulinases, que hidrolizam os terminais redutores da cadeia de inulina, e as endoinulinases, que hidrolizam as ligações internas do polímero. Essas enzimas encontram suas principais aplicações na produção de xaropes com alta concentração de frutose, por hidrólise enzimática da inulina, e na produção de frutooligossacarídeos, respectivamente, os quais podem ser utilizados como ingredientes funcionais em alimentos (MAZUTTI et al., 2010). Além disso, vem sendo pesquisada a aplicação das inulinases na produção de biocombustíveis, como etanol, a partir de substratos ricos em inulina (CHI et al., 2011; LIM et al., 2011).

As inulinases podem ser obtidas de tubérculos e raízes de plantas que armazenam inulina como carboidrato de reserva ou através de micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras. Entre os micro-organismos, as leveduras do gênero *Kluyveromyces* têm despertado grande interesse industrial devido às suas características fisiológicas e por pertencerem ao grupo GRAS ("Generally Recognized as Safe"), sendo aceitos pelo FDA ("Food and Drug Administration") dos Estados Unidos para produtos alimentícios.

Devido à facilidade de produção, diversas enzimas de interesse industrial são obtidas a partir de fermentações microbianas, suplantando a produção de origem vegetal. Isto se deve ao fato das enzimas necessitarem de um tempo curto de produção, serem obtidas em qualquer época do ano e utilizarem, normalmente, uma ampla gama de substratos (KALIL et al., 2001; MAKINO et al., 2002). Tradicionalmente, as enzimas de interesse industrial têm sido produzidas em cultura submersa, a qual permite maior controle do grau de aeração, pH e temperatura do meio, bem como o controle de outros fatores requeridos para o crescimento ótimo do micro-organismo (GILL et al., 2003; SHARMA, KAINTH e GILL, 2006; GONG et al., 2007; SQUAREZI et al., 2008).

Segundo Treichel (2004), a obtenção da inulinase no mercado exterior é realizada principalmente utilizando a inulina comercial como substrato, que apresenta um custo relativamente elevado. Diante disso, várias matérias-primas

vêm sendo pesquisadas como substratos alternativos para a produção de inulinase e, entre essas, os resíduos agro-industriais (TREICHEL et al., 2009; SGUAREZZI et al., 2009; CHEN et al., 2011), meios sintéticos (KUMAR et al., 2005; GUERRERO et al., 2006) e extratos de plantas que armazenam inulina (ERTAN et al., 2003, SHARMA et al., 2006; SINGH e BHERMI, 2008).

Entre as plantas que são industrialmente importantes devido ao seu teor de inulina, estão a chicória, alcachofra de Jerusalém e dália como as mais pesquisadas (ÁVILA-FERNANDEZ et al., 2007). Outra alternativa são as plantas do gênero *Agave*, originárias do México, e cujas seivas contém alto teor de inulina (GARCIA-AGUIRRE, 2009).

Frutanas presentes em *A. tequilana* têm grau de polimerização variando de 3 a 29 unidades de frutose e contêm principalmente ligações β -2,1 na sua cadeia linear, além de ligações β -2,6 nas ramificações (LOPEZ et al., 2003), podendo ser substrato para atuação das inulinases. Embora a inulina de *Agave* venha sendo tradicionalmente utilizada como matéria prima para a produção de bebidas fermentadas e destiladas, como a tequila, ocorre também a comercialização de xaropes ricos em frutose utilizando extratos de *Agave* (PARTIDA et al., 1998)

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 utilizando xarope de *Agave* (*Agave tequilana*) como fonte de carbono sob fermentação submersa, bem como, caracterizar a enzima quanto ao perfil ótimo de temperatura, pH e termoestabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Manutenção do micro-organismo

A levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571, adquirida na Fundação André Tosello - Coleção de Culturas Tropicais, foi mantida em meio líquido composto de extrato de levedura 0,3%; extrato de malte 0,3%; peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1% e glicerol 20 %, a -80°C.

2. Preparo do inóculo

Inicialmente, a levedura foi inoculada em placas de Petri contendo meio Ágar Extrato de Malte-Levedura (YMA) e incubada para crescimento em B.O.D durante 24 horas a 28°C, de forma a se obter cultura de células jovens para iniciar o processo fermentativo.

Em seguida, a cultura foi repicada em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de pré-inóculo composto de: sacarose 1,0%; extrato de levedura 0,5%; KH_2PO_4 0,5%; NH_4Cl 0,15%; KCl 0,12%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,07% e incubada a 28°C por 24 horas a 150 rpm. Para obtenção do inóculo, adicionou-se o conteúdo do pré-inóculo em frasco Erlenmeyer, com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL do mesmo meio, o qual foi incubado durante 24 horas a 28°C sob agitação de 150 rpm em câmara agitadora. Os meios foram previamente ajustados para pH 5,0 com ácido-ortofosfórico concentrado e esterilizados por 15 minutos a 121°C em autoclave.

3. Produção de Inulinase por Fermentação Submersa

Para a produção de inulinase, as fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura composto de xarope de agave e extrato de levedura, como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente, em diferentes concentrações, de acordo com o delineamento composto central rotacional (DCCR) 2². O meio foi suplementado com KH_2PO_4 0,5%; NH_4Cl 0,15%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,07%; KCl 0,12%. O pH foi ajustado para 5,0,

por meio da adição de ácido orto-fosfórico concentrado, e o meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

No meio de cultivo, preparado para as fermentações, foi adicionada uma concentração de inóculo equivalente a 10 % do volume do meio, ou seja, 3mL. A fermentação foi conduzida a $28\pm 2^\circ\text{C}$, pH 5,0 e 150 rpm em câmara agitadora, durante 96 horas. A cada 24 horas uma amostra foi retirada e o caldo fermentado foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação imediata da atividade enzimática e o sedimentado foi utilizado para quantificação do crescimento celular, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

O xarope de agave utilizado foi o Now Healthy Foods Certified Organic Light Agave Nectar (482g) fabricado pela Now Foods®. De acordo com o fabricante é um produto extraído da planta agave (*Agave tequilana* var. blue) 100% puro que não contém sal, amido, levedura, trigo, glúten, milho, soja, leite, ovos, mariscos ou conservantes. Segundo as informações nutricionais, em 21g (1colher de sopa) contém 70 calorias e 16,5g de carboidratos totais, 16g de açúcares, 0g de proteínas e não contém quantidades significativas de gorduras saturadas, gordura trans, colesterol, sódio, fibras, vitamina A, vitamina C, cálcio ou ferro.

4. Delineamento Composto Central Rotacional- DCCR

4.1. Primeiro Planejamento Experimental

As fermentações ocorreram em condições de cultivo variadas, onde foram estudadas diferentes concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio, a fim de se determinar as melhores condições de fermentação, de acordo com a matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , segundo Rodrigues e lemma (2009).

Os níveis estudados e a matriz do DCCR 2^2 , com os valores das variáveis estudadas, estão apresentados nas Tabelas 01 e 02, respectivamente.

Tabela 01- Valores utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 para produção de inulinase.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Extrato de Levedura (%)	0,3	0,5	1	1,5	1,7
Xarope de Agave (%)	3	5	10	15	17

Tabela 02- Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional, com valores reais e Codificados, para determinação da atividade enzimática.

Ensaio	Níveis		Extrato de Levedura (%)	Xarope de Agave (%)
	-1	1		
1	-1	-1	0,5	5
2	1	-1	1,5	5
3	-1	1	0,5	15
4	1	1	1,5	15
5	-1,41	0	0,3	10
6	1,41	0	1,7	10
7	0	-1,41	1	3
8	0	1,41	1	17
9	0	0	1	10
10	0	0	1	10
11	0	0	1	10

Os valores das variáveis escolhidas foram definidos com base na literatura especializada. Esse delineamento experimental resultou em 11 ensaios, que ocorreram durante 96 horas, sendo retirada uma amostra a cada 24 horas, totalizando 44 amostras. As análises estatísticas foram realizadas através do software STATISTICA 7.0® (StatSoft).

Após a análise das respostas obtidas no primeiro planejamento, foi realizado mais um planejamento completo (DCCR), com o intuito de otimizar as condições para a produção da inulinase.

4.2. Segundo Planejamento Experimental

Os valores das variáveis escolhidas foram definidos com base nos resultados do planejamento anterior e resultou em 11 ensaios. O tempo de fermentação foi fixado em 96 horas, pois foi o tempo onde se atingiu a maior produção da enzima. As Tabelas 03 e 04 descrevem os níveis estudados e a matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 para o segundo planejamento experimental.

Tabela 03- Valores utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 para produção de inulinase.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Extrato de Levedura (%)	2,0	2,2	2,5	2,8	2,9
Xarope de Agave (%)	3,6	4,0	5,0	6,0	6,4

Tabela 04- Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional, com valores reais e codificados, para determinação da atividade enzimática

Ensaio	Níveis		Extrato de Levedura (%)	Xarope de Agave (%)
	-1	1		
1	-1	-1	2,2	4
2	1	-1	2,8	4
3	-1	1	2,2	6
4	1	1	2,8	6
5	-1,41	0	2,0	5
6	1,41	0	2,9	5
7	0	-1,41	2,5	3,6
8	0	1,41	2,2	6,4
9	0	0	2,5	5
10	0	0	2,5	5
11	0	0	2,5	5

5. Crescimento celular

Para obtenção da biomassa, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm durante vinte minutos. Em seguida, o precipitado foi ressuspensado em água destilada e novamente centrifugado para lavagem das células. As células lavadas foram ressuspensas em água destilada no mesmo volume do extrato enzimático fermentado (30 mL) e o crescimento celular foi determinado por turbidimetria a 600 nm, utilizando água destilada para calibração. Os valores obtidos foram relacionados com o peso seco x absorvância, através de curva de calibração.

A massa seca, utilizada para a elaboração da curva de crescimento, foi obtida centrifugando 100 mL de caldo fermentativo com aproximadamente 10 ± 2 horas de crescimento a 10.000 rpm por 10 minutos. As células foram lavadas com água destilada, centrifugadas novamente e ressuspensas em 5 mL de água destilada. A partir disso, foram armazenadas em forminhas de alumínio previamente taradas e secas em estufa a 100°C durante 24 horas até peso constante. O peso seco das células foi determinado por diferença de massa e expresso em termos de massa seca de células (g) / 100 mL de suspensão.

A absorvância foi obtida centrifugando 100 mL de caldo fermentativo com aproximadamente 10 ± 2 horas de crescimento a 10.000 rpm por 10 minutos. Após lavagem e ressuspensão das células no mesmo volume do meio, o crescimento celular foi determinado por turbidimetria a 600 nm diluindo-se o caldo celular de modo que as leituras permanecessem no intervalo entre 0,2 a 0,8 de absorvância.

A curva foi elaborada relacionando o peso seco e a absorvância e os coeficientes da equação da reta padrão, foram utilizados para determinar a biomassa através da fórmula:

$$\text{Biomassa} = \text{ABS} - A/B \times \text{diluição}$$

Onde:

Abs= Absorvância obtida através da leitura a 600 nm da densidade celular dos caldos fermentados.

A e B = coeficientes da equação da reta padrão.

6. Ensaio Analíticos

6.1. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática do sobrenadante foi determinada de acordo com Suzuki et al. (1988), através da 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 da amostra enzimática convenientemente diluída. O meio reacional foi colocado em banho-maria a 40°C, sob agitação, em agitador magnético com aquecimento durante 15 minutos. Alíquotas de 1,0 mL foram retiradas nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 e 15 minutos e determinou-se a concentração de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalicílico-DNS (MILLER, 1959). A leitura das atividades foi feita 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%.

O cálculo da atividade enzimática (AE) foi realizado de acordo com a equação:

$$AE = \alpha \times \beta \times 10^3 / 180 \times \text{diluição} \times 10 \text{ (}\mu\text{mol/mL.min)}.$$

Onde:

α = coeficiente angular da reta padrão

β = coeficiente angular da reta da atividade enzimática

180×10^3 = peso Molecular da glicose em mg

10= volume final do meio reacional incubado

Os resultados estão apresentados em U/mL onde cada unidade (U) de atividade de inulinase é 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.

6.2. Determinação do perfil ótimo de temperatura

A temperatura ótima de atividade da inulinase foi obtida através da determinação da atividade enzimática nas seguintes temperaturas: 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C a 70°C. A atividade enzimática foi medida sob as mesmas condições descritas no item 6.1.

6.3. Determinação do perfil ótimo de pH

Para determinar o pH ótimo de atividade da inulinase, a mistura reacional foi incubada em banho-maria, com as faixas de pH variando de 2,0 a 10,0, utilizando como tampões: glicina-HCl 50mM (pH 2,0–3,0), citrato de sódio 50mM (pH 3,0-6,0), fosfato 50mM (pH 6,0-8,0), tris-HCl 50mM (pH 8,0-9,0) e glicina-NaOH (pH 9,0-10,0). Os tampões foram preparados de acordo com os procedimentos descritos por Colowick & Kaplan (1955).

6.4. Termoestabilidade

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada incubando-se o extrato enzimático bruto nas temperaturas de 50°C, 55°C e 60°C durante 5 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da análise dos extratos fermentados foi possível determinar a melhor condição para a produção da inulinase e de biomassa.

1. Fermentações

Primeiro Planejamento Experimental – DCCR1

A Tabela 05 apresenta a matriz do planejamento experimental e a resposta (atividade enzimática) após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação. Os valores obtidos experimentalmente variaram de 0,005 U/mL (experimento 8, após 24 horas) à 118,62 U/mL (experimento 2, após 96 horas), conforme a concentração dos meios de cultivo.

Tabela 05- Matriz do planejamento experimental completo, com valores codificados e reais das variáveis, (concentração da fonte de carbono e nitrogênio) e resposta (atividade enzimática) em 24, 48, 72 e 96 horas.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	Atividade Enzimática U/mL			
	% N	% C	% N	% C	24 hrs	48hrs	72hrs	96hrs
1	-1	-1	0,5	5	2,122	1,189	0,516	0,164
2	1	-1	1,5	5	16,207	57,990	67,239	118,62
3	-1	1	0,5	15	1,350	0,719	0,411	0,278
4	1	1	1,5	15	1,468	14,945	1,570	1,109
5	-1,41	0	0,3	10	0,176	0,102	0,587	0,079
6	1,41	0	1,7	10	5,050	9,072	12,478	0,099
7	0	-1,41	1	3	12,872	30,387	71,056	55,20
8	0	1,41	1	17	0,005	0,111	0,126	0,187
9	0	0	1	10	0,111	0,161	0,889	0,22
10	0	0	1	10	0,839	1,030	0,945	0,369
11	0	0	1	10	0,704	1,098	0,913	0,678

Os resultados mostraram que a máxima atividade enzimática foi obtida no ensaio 2 ao utilizar 5% e 1,5% das fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, após 96 horas de fermentação, resultando em uma produtividade de 1,23 U/ mL.h⁻¹. A segunda melhor atividade enzimática (71,05 U/mL) foi obtida após 72 horas de fermentação, no ensaio 7, contendo 3% da

fonte de carbono e 1% da fonte de nitrogênio. Nos demais ensaios as atividades enzimáticas permaneceram abaixo de 20U/mL, decaindo ao longo do tempo, como pode ser observado na Figura 01.

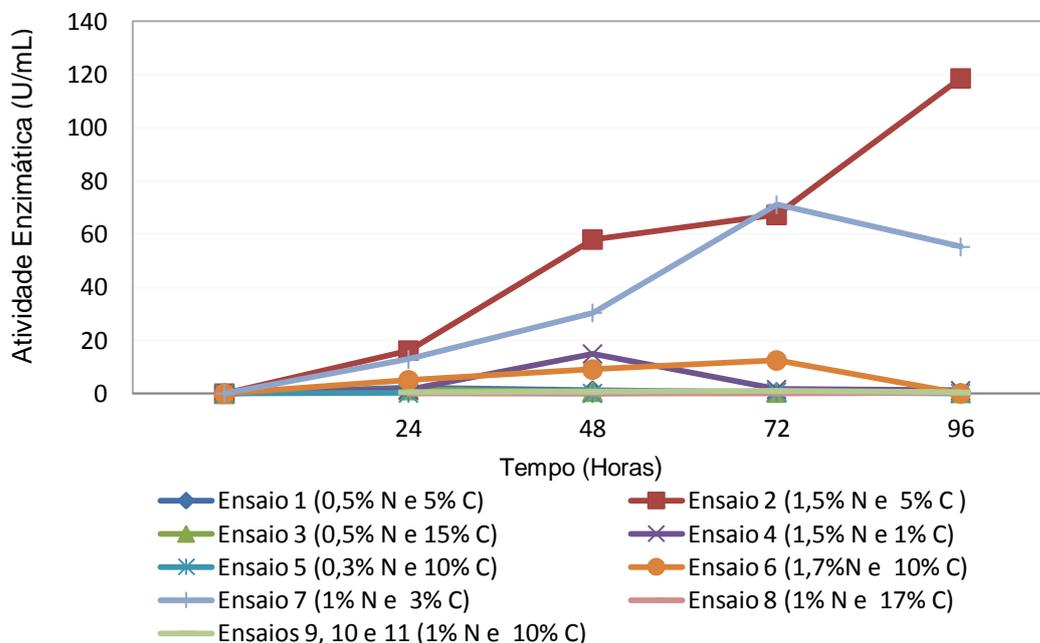


Figura 01- Cinética da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 em fermentação submersa, utilizando xarope de agave como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Pode-se observar que o aumento da concentração de xarope de agave acima de 5% resultou em efeito negativo sobre a produção enzimática. Comparando-se o ensaio 2 (5% fonte de carbono) com os demais, onde as concentrações foram superiores, observou-se a redução significativa da produção enzimática, independente da combinação com as concentrações da fonte de nitrogênio (ensaios 3, 4, 5, 6, 8 e 9).

A análise estatística dos resultados confirmou esta observação, pois através da análise de regressão e do p-valor, observou-se que os termos lineares do xarope de agave e a interação entre as variáveis apresentaram efeitos negativos e estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) de forma que, na faixa estudada, o aumento na concentração desses fatores no meio, acarretou uma redução na atividade enzimática.

Com relação à fonte de nitrogênio, o aumento da concentração dos níveis mais baixos para os mais altos (-1 para 1; -1,41 para +1,41) proporcionou o

aumento da produção enzimática em todos os ensaios. Entretanto, os resultados não foram estatisticamente significativos na faixa estudada, de 0,3% a 1,7%, mostrando que essa variável não interferiu individualmente na produção da inulinase.

A análise estatística dos resultados foi realizada com os valores obtidos após 96 horas de fermentação, por apresentar a melhor atividade enzimática. A Tabela 06 apresenta os coeficientes de regressão (os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q).

Tabela 06- Coeficientes de regressão para a resposta atividade enzimática (U/mL) após 96 horas de fermentação, utilizando xarope de agave e extrato de levedura como substratos.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p - valor
Média	0,359	12,856	0,028	0,9788
(1) Extrato de levedura (L)	14,959	7,884	1,897	0,1163
Extrato de levedura (Q)	3,906	9,408	0,415	0,6952
(2) Xarope de Agave (L)	-24,443	7,884	-3,100	0,0268
Xarope de Agave (Q)	17,791	9,408	1,891	0,1172
1(L) x 2 (L)	-29,406	11,134	-2,641	0,0459

Com esses resultados foi possível elaborar o modelo que relaciona a atividade de inulinase em função das variáveis, xarope de agave e extrato de levedura, onde foram incluídos todos os parâmetros estudados (Equação 01).

$$\text{Atividade enzimática} = 0,329 + 14,959 \cdot x_1 + 3,906 \cdot x_1^2 - 24,443 \cdot x_2 + 17,791 \cdot x_2^2 - 29,406 \cdot x_1 \cdot x_2$$

Equação 01

Conforme a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 07, o F calculado (11,9) foi cerca de 2,5 vezes maior que o F tabelado (4,35) sendo, portanto, significativo. O coeficiente de correlação (R^2) de 0,82 indica que o modelo proposto pode explicar 82% da variabilidade dos dados obtidos, sendo adequado para descrever os resultados através da superfície de resposta.

Tabela 07- ANOVA para atividade de inulinase após 96 horas de fermentação com xarope de agave e extrato de levedura.

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F calc	Pr > F
Regressão	11792,39	3	3930,7967	11,09	0,004
Resíduo	2479,2	7	354,17143		
Total	14271,59	10	4284,9681		

% da variação (R^2) = 82 %; $F_{3;7;0,05} = 4,35$

A partir do modelo obtido foi possível gerar a superfície de resposta e curvas de contorno para as variáveis estudadas, que tornam possível observar as concentrações dos substratos que resultam em maior valor de atividade (Figuras 02 A e B).

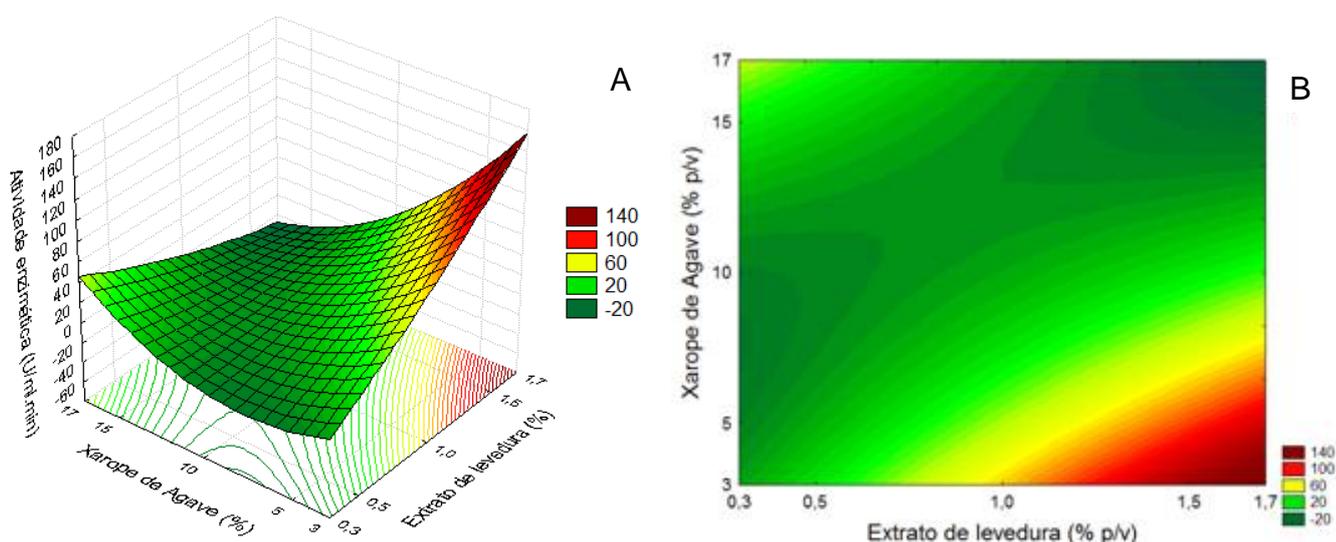


Figura 02- Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a atividade de inulinase em função das concentrações de carbono e nitrogênio por *K. marxianus* NRRL-Y 7571 em fermentação submersa após 96 horas, geradas de acordo com o primeiro planejamento.

A superfície de resposta e as curvas de contorno confirmam que, para a fonte de carbono, as concentrações entre 10% e 17% resultaram em produção enzimática com valores abaixo de 20 U/mL, indicando que essas concentrações não são adequadas para produção da enzima. Os gráficos apontam que, para a fonte de nitrogênio, os valores devem ser estabelecidos a partir de 1,5% de concentração, já que esta se mostrou significativa na interação das variáveis.

Diante disso, podemos observar que as concentrações utilizadas nos ensaios 2 (1,5% fonte de N e 5% fonte de C) e 7 (1% fonte de N e 3% fonte

de C) foram as que mais se aproximaram da região ótima para produção enzimática. Dessa forma, dentro do intervalo pré-estabelecido, as maiores produções foram encontradas nos níveis baixos da fonte de carbono (-1 e -1,41) e níveis altos da fonte de nitrogênio (+1 e +1,41), sendo aconselhável, para a otimização, reduzir a fonte de carbono e aumentar a fonte de nitrogênio, estabelecendo novas faixas de estudo a partir desses valores.

A possibilidade de utilizar o xarope de agave em concentrações menores é interessante, pois reduz os custos do processo, já que não é necessária uma concentração elevada do substrato para obter maior produção enzimática. Em vista disso, o próximo passo foi estudar novas concentrações das fontes avaliadas através de um novo planejamento fatorial, visando a otimização do processo.

Segundo planejamento experimental e otimização da produção de inulinase

As novas faixas de estudo foram estabelecidas levando-se em consideração as indicações da superfície de resposta e curvas de contorno obtidas no primeiro planejamento fatorial. Dessa forma, as concentrações da fonte de carbono foram reduzidas enquanto as concentrações da fonte de nitrogênio foram elevadas, resultando DCCR 2² descrito na Tabela 08.

Tabela 08- Matriz do planejamento fatorial, com valores codificados e reais das variáveis de estudo (concentração da fonte de carbono e nitrogênio) e as respostas (atividade enzimática) após 96 horas de fermentação.

Ensaio	Valores codificados		Valores decodificados		Atividade Enzimática U/mL
	% N	% C	% N	% C	96hrs
1	-1	-1	2,2	4	65,907
2	1	-1	2,8	4	71,065
3	-1	1	2,2	6	74,074
4	1	1	2,8	6	70,492
5	-1,41	0	2	5	103,417
6	1,41	0	2,9	5	73,644
7	0	-1,41	2,5	3,6	97,572
8	0	1,41	2,2	6,4	59,03
9	0	0	2,5	5	103,16
10	0	0	2,5	5	144,166
11	0	0	2,5	5	140,297

Conforme as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio empregadas no meio de cultivo, as atividades enzimáticas variaram de 59,03 U/mL a 144,166 U/mL. O valor máximo de atividade enzimática foi alcançado no ensaio 10, no qual a composição do meio foi de 5% da fonte de carbono e 2,5% da fonte de nitrogênio, sendo esta a condição dos pontos centrais.

A mudança das concentrações, de ambas variáveis, para os níveis abaixo ou acima dos valores do ponto central, resultou no decréscimo da atividade enzimática, mostrando que as concentrações estabelecidas nos pontos centrais foram as mais favoráveis para a produção máxima da enzima.

A Tabela 09 demonstra, através dos coeficientes de regressão, que tanto o xarope de agave ($p= 0,02$) quanto o extrato de levedura ($p= 0,04$), em seus termos quadráticos, afetaram a produção enzimática, apresentando efeito negativo, ou seja, variando as concentrações dos valores mínimos para os máximos, a produção enzimática decresce, como pode ser observado nos ensaios 5 e 6 para a fonte de nitrogênio e 7 e 8 para a fonte de carbono. Os termos lineares das variáveis e a interação entre as variáveis não exerceram influência sobre a atividade enzimática.

Tabela 09- Coeficientes de regressão para a atividade de inulinase utilizando xarope de agave e extrato de levedura como substratos, após 96 horas de fermentação.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p – valor
Média	129,258	11022	11	0,0001
(1) Extrato de levedura (L)	-5,065	7,206	-0,702	0,513
Extrato de levedura (Q)	-23,694	8,599	-2,755	0,04
(2) Xarope de Agave (L)	-5,861	7,206	-0,813	0,452
Xarope de Agave (Q)	-28,839	8,599	-3,353	0,02
1(L) x 2 (L)	-2,185	10,176	-0,214	0,838

O diagrama de Pareto (Figura 03) reforça essas observações, fornecendo o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis, xarope de Agave e extrato de levedura, possui sobre a atividade inulinolítica e estabelece quais desses efeitos encontram-se dentro do grau de confiança determinado para a análise estatística (95% ou $p \geq 0,05$).

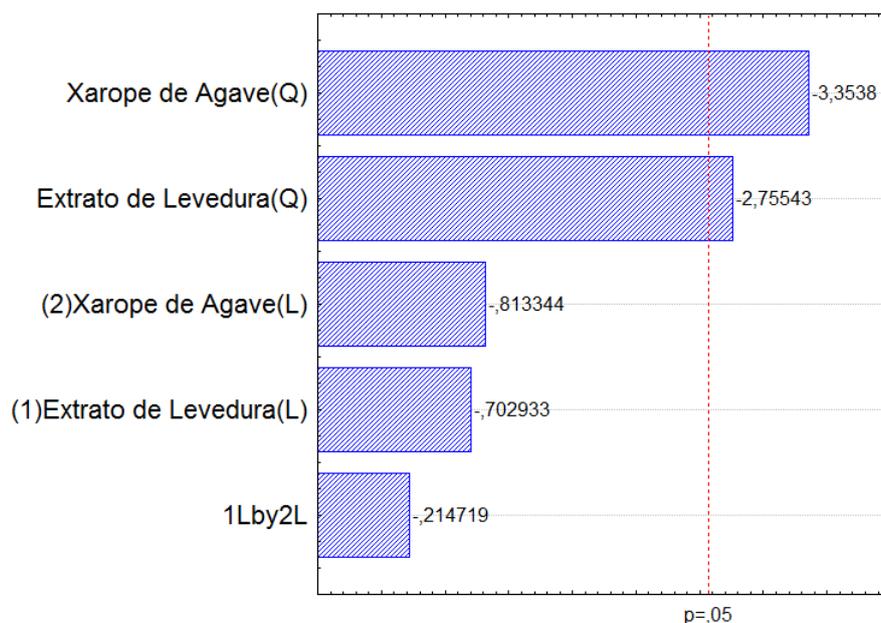


Figura 03- Diagrama de Pareto (efeitos estimados) para atividade inulinolítica produzida pela levedura *K. marxianus* NRRI-Y 7571 em fermentação submersa, mostrando as variáveis significativas com $p \geq 0,05$.

A Tabela 10 apresenta a análise da variância (ANOVA) que foi empregada para validar o modelo proposto para prever a atividade enzimática em função das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio, dentro das faixas estudadas. Vale ressaltar que os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionado à falta de ajuste e, dessa forma, os cálculos foram feitos com base no modelo reparametrizado.

Tabela 10- ANOVA para atividade de inulinase, após 96 horas de fermentação, com xarope de Agave e extrato de levedura.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calc	Pr > F
Regressão	6090,356	1	285,426	21,337	0,001
Resíduo	2568,84	9	6090,356		
Total	8659,196	10			

$$\% R^2 = 0,70 \quad F_{9;1;0,05} = 5,12$$

O valor calculado de F foi 21,337, o qual é, aproximadamente, 3 vezes maior que o valor tabelado (5,12), mostrando que o modelo é estatisticamente significativo. O coeficiente de determinação obtido ($R^2 = 0,70$) sugere que o modelo

gerado a partir dos dados da Tabela 10 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.

A equação 02 descreve a atividade enzimática prevista pelo modelo em função das variáveis estudadas. Deve-se observar que esse modelo reparametrizado contém apenas os termos estatisticamente significativos.

$$\text{Atividade enzimática} = 129,258 - 23,694 \cdot x_2 - 28,839 \cdot x_2^2$$

Equação 02

A Figura 04 apresenta a superfície de resposta e curvas de contorno construídas para a atividade enzimática. Nelas, observa-se que a atividade enzimática, em função das concentrações do xarope de Agave e extrato de levedura, foi otimizada, apresentando condição ótima para a produção os valores de 2,5% de extrato de levedura e 5% de xarope de agave.

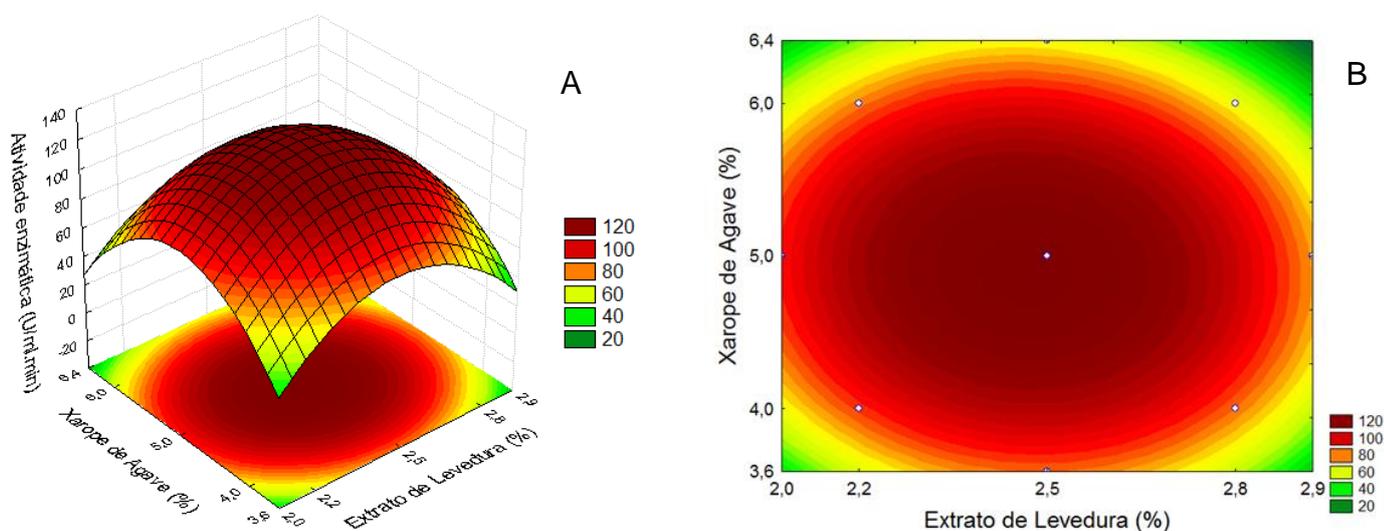


Figura 04- Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) otimizadas para a atividade de inulinase em função das concentrações de carbono e nitrogênio por *K. marxianus* NRRL-Y 7571, após 96 horas.

Entretanto, é possível verificar que as faixas de concentração das fontes de carbono e nitrogênio obtidas como ótimas foram amplas, o que possibilita variação ao redor do ótimo e, ainda assim, manter o processo na condição otimizada. Para a fonte de carbono, as concentrações ótimas estão entre 4,5 e

5,5% e para o extrato de levedura entre 2,3 e 2,7%. De acordo com Treichel et al. (2009), a análise das superfícies de resposta e as curvas de contorno têm a vantagem de mostrar uma faixa de concentrações para a produção máxima, ao invés de uma única concentração específica. Isto é muito importante, uma vez que permite uma maior variabilidade na quantidade da matéria-prima sem diminuir a produção, principalmente no que se refere a substratos complexos, nos quais uma considerável variação pode ocorrer na composição dos mesmos.

Comparando-se os planejamentos, pode se observar que, através da otimização das condições, a produção enzimática aumentou em 18% em relação ao valor máximo alcançado no primeiro planejamento e, além disso, houve um incremento nos valores das atividades enzimáticas de todos os ensaios.

Em comparação preliminar, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com a produção de inulinase obtida em outros trabalhos. Kalil et al. (2001) e Silva-Santisteban e Maugeri (2005), utilizando sacarose como fonte de carbono para produção de inulinase por *K. marxianus*, obtiveram atividade enzimática máxima de 127 U/mL e 176 U/mL, respectivamente.

Utilizando inulina como fonte de carbono, Singh, Sooch e Puri (2007) obtiveram 55,4 U/mL de inulinase cultivando-se *Kluyveromyces marxianus* YS-1.20. Enquanto Singh e Bhermi, (2008) estudando raízes de *Asparagus officinalis* (aspargo), como fonte de inulina para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* YS-1, alcançaram atividade máxima de 40,2 U/mL. Podemos observar que a produção enzimática obtida nesses estudos foi bastante abaixo da observada no presente trabalho.

Comparando-se com outros gêneros de fungos, valores similares ao encontrados neste estudo foram relatados por Kumar et al. (2005), com atividade máxima de 176 U/mL, produzida por *Aspergillus niger*, e 130,38 U/mL, produzida por *Pichia guilliermondii* (YU et al., 2009), ambos utilizando inulina comercial como fonte de carbono, um substrato significativamente mais caro do que o xarope de agave.

É possível observar que valores mais elevados e também abaixo dos que foram encontrados neste trabalho tem sido relatados. De acordo com Silva-Santisteban et al. (2009) e Chen et al., (2011), a produção da enzima pode variar bastante, pois a biossíntese de inulinase parece depender do tipo de fontes de

carbono e nitrogênio, das suas concentrações no meio mínimo, assim como do micro-organismo e cepas utilizados.

Observa-se também que, tanto no primeiro planejamento como no segundo, altas concentrações de carbono levaram à redução da atividade, o que pode estar relacionado ao efeito da repressão catabólica, na qual o acúmulo de carbono no meio reduz a velocidade de produção enzimática.

A inulinase é descrita como uma enzima que sofre repressão catabólica em concentrações elevadas de substrato (MENDES, 2006). Segundo Parekh e Margaritis (1985), a síntese da inulinase é controlada por repressão catabólica, sendo que as maiores produções de inulinase foram observadas no final da fase de crescimento, mostrando que, aparentemente, baixas concentrações da fonte de carbono foram o pré-requisito para formação da enzima.

Cazetta, Monti e Contiero (2010) observaram esse efeito ao estudar a influência da concentração inicial da sacarose na biomassa e na produção da inulinase pela *K. marxianus* var. *bulgaricus*, onde a atividade enzimática foi inibida na concentração de 20g/L de sacarose. O mesmo foi observado por Gong et al. (2007), com a concentração de extrato de levedura que, em elevadas concentrações no meio de cultivo, resultou em repressão da atividade enzimática. Jing, Zhengyu e Augustine (2003) também constataram que a maior concentração de substrato pode levar a repressão catabólica, conseqüentemente, diminuindo a atividade da enzima.

2. Produção de biomassa

A Figura 05 apresenta a relação entre a atividade enzimática e o crescimento celular em função das concentrações do xarope de agave e extrato de levedura utilizadas no segundo delineamento experimental.

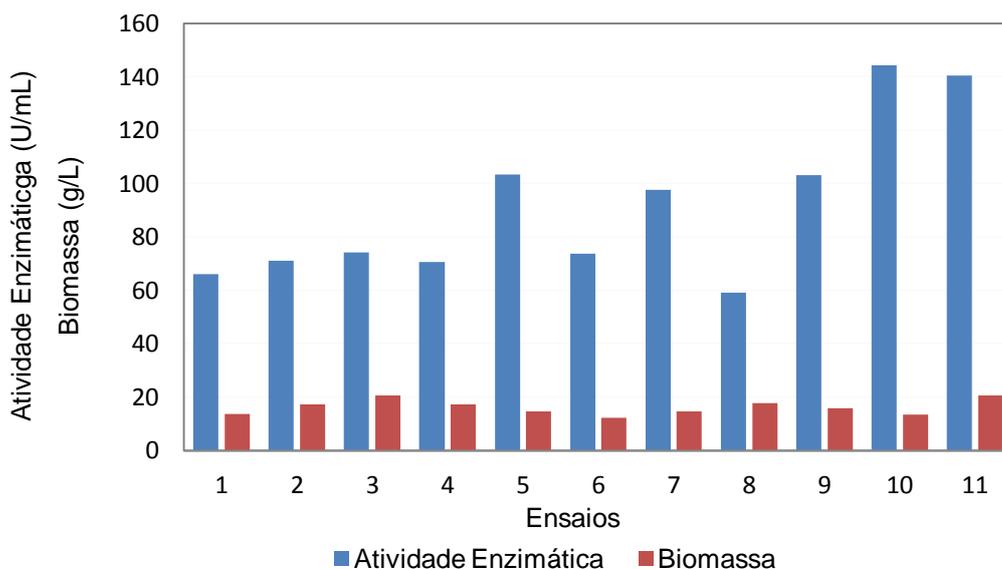


Figura 05- Efeito das concentrações dos substratos no crescimento celular e atividade enzimática de *K. marxianus* NRRL-Y 757 após 96 horas de fermentação.

Observa-se que o crescimento celular se manteve praticamente constante (aproximadamente 20g/L) em todos os ensaios, independente da concentração das fontes de carbono e nitrogênio empregadas, de forma que a variação das concentrações desses substratos não acarretou o aumento da produção de biomassa. Além disso, a produção enzimática também não foi acompanhada pelo crescimento celular.

A tabela 11 apresenta os coeficientes de regressão calculados ao nível de significância de 5%.

Tabela 11- Coeficientes de regressão para o crescimento celular utilizando xarope de agave e extrato de levedura, após 96 horas de fermentação.

Fatores	Coefficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p – valor
Média	16,60590	1,642334	10,11116	0,000162
(1) Extrato de levedura (L)	-0,39679	1,007231	-0,39394	0,709865
Extrato de levedura (Q)	-0,96663	1,201889	-0,80426	0,457764
(2) Extrato de sisal (L)	1,42442	1,007231	1,41420	0,216442
Extrato de sisal (Q)	0,38692	1,201889	0,32193	0,760531
1(L) x 2 (L)	-1,73775	1,422320	-1,22177	0,276249

A análise dos coeficientes de regressão aponta que o crescimento celular não foi influenciado por nenhuma das variáveis estudadas, o que confirma os

resultados observados. Além do que, de acordo com o coeficiente de determinação, a maior parte da variação ocorrida se deu ao acaso.

No que diz respeito à produção enzimática pode-se considerar que, dentro da faixa estudada, essa não está associada à produção de biomassa.

3. Caracterização parcial enzimática

A caracterização da inulinase baseou-se no estudo do extrato enzimático bruto obtido após 96 horas, sob a condição experimental ótima, com o objetivo de apresentar resultados referentes à temperatura ótima, termoestabilidade e pH ótimo.

Temperatura ótima e estabilidade térmica

Na Figura 06, podemos observar que a enzima apresentou melhores atividades na faixa de 45° a 60°C, sendo que a atividade máxima foi alcançada na temperatura de 60°C. Em temperaturas acima desse valor a enzima perdeu rapidamente atividade, provavelmente devido à ação desnaturante da temperatura sobre a estrutura da enzima, já que as enzimas, como qualquer outra proteína, sofrem desnaturação térmica, perdendo sua atividade parcial ou totalmente (ASTOLFI, 2010).

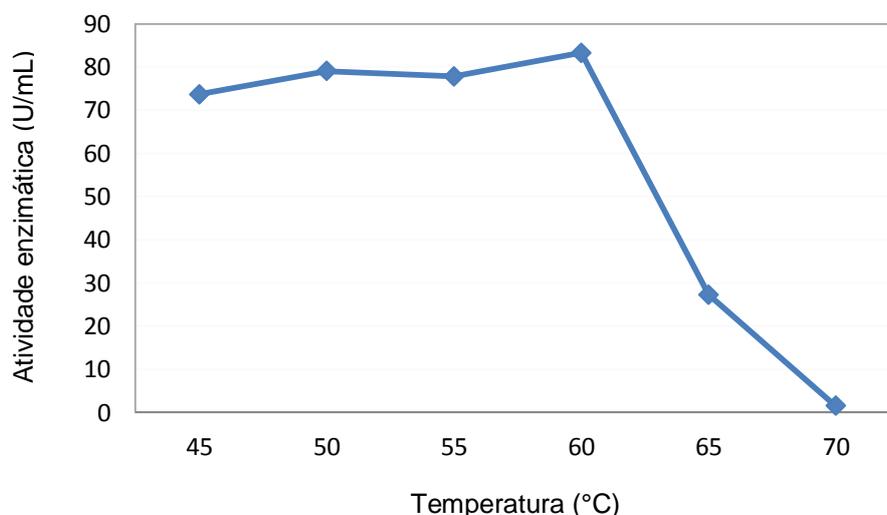


Figura 06- Efeito da temperatura na atividade da inulinase produzida pela levedura *K. marxianus* NRRL-Y 7571, utilizando xarope de agave e extrato de levedura em fermentação submersa, após 96 horas de fermentação.

Vários estudos têm descrito, como temperatura ótima de reação da inulinase, valores entre 50°C e 60°C, dependendo do micro-organismo e substratos utilizados (KUSHI et al., 2000; TREICHEL et al., 2009; RISSO et al., 2010).

Mazutti et al. (2009) realizaram um estudo comparativo da caracterização parcial do extrato enzimático bruto entre duas diferentes inulinases, obtidas por fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS), usando resíduo agroindustrial (melaço e milhocina) como substratos. Tanto o extrato bruto enzimático obtido por FS quanto por FES apresentaram temperatura ótima de 55°C.

Santos (2002), obteve atividade máxima a 63°C, com inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045, em fermentação submersa. Estudos realizados por Mazutti et al. (2007) mostraram que a inulinase produzida pela cepa *K. marxianus* apresentou atividade máxima a 60°C. A mesma temperatura foi obtida em inulinases produzidas por *Pichia guilliermondii* (GONG et al., 2007 e CHI et al., 2009), *Aspergillus ochraceus* (GUIMARAES et al., 2007) e *Streptomyces* spp. (SHARMA, KAINTH e GILL, 2006).

Em relação à estabilidade térmica da inulinase produzida, observou-se que a temperatura em que a enzima permaneceu por mais tempo estável foi a de 50°C, aproximadamente 4 horas. A 55°C e 60°C a atividade diminuiu a partir de 15 minutos de reação. A 60°C a atividade caiu drasticamente após 1 hora e perdeu quase completamente a atividade a partir de 2 horas, como pode ser observado na figura 07.

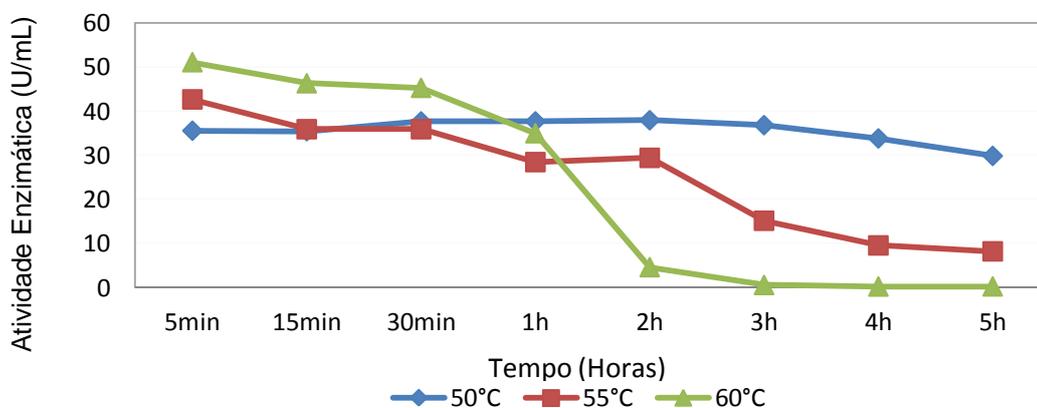


Figura 07- Estabilidade térmica da atividade inulinásica produzida pela levedura *K. marxianus* NRRL-Y 7571, utilizando xarope de agave e extrato de levedura em fermentação submersa, após 96 horas de fermentação.

Assim, embora a atividade máxima da enzima seja atingida a 60°C, esta não é uma boa temperatura de trabalho, pois a enzima perde rapidamente a atividade nestas condições.

A temperatura de 50°C mostrou-se mais adequada, pois, mesmo depois de 5 horas, ela manteve 84% da atividade. Mesmo sendo uma temperatura menor, ainda assim, é considerada boa para aplicações industriais.

Os valores ótimos de atividade e estabilidade reportados na literatura, em geral, situam-se na faixa entre 40°C e 60°C, demonstrando que a inulinase estudada de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 está dentro da faixa ótima de estabilidade relatada em outros trabalhos. Em estudo realizado por Treichel (2004), a inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-7571 mostrou maior estabilidade a 50°C, confirmando os resultados deste trabalho. Cazetta et al. (2005) e Mazutti et al. (2010), também obtiveram alta estabilidade de inulinase na temperatura de 50°C para inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus*. Por outro lado, a inulinase produzida por *Penicillium janczewskii* manteve-se estável a 35°C, em estudo realizado por Sharma, Kainth e Gill (2006).

De acordo com Maugeri (2002), a enzima está sujeita à desnaturação, geralmente irreversível, o que significa perda definitiva do poder catalisador. Esta desnaturação pode ser mais ou menos rápida, dependendo das condições do meio. Em relação à temperatura, enzimas são mais estáveis quanto mais baixa for a temperatura e, por isso, se aconselha estocá-las em baixas temperaturas. Conhecer as condições de estabilidade ótima é muito útil, não só para o armazenamento do produto, como também para minimizar perdas durante um processo.

Perfil de pH ótimo para a produção de inulinase

Em relação ao perfil ótimo de pH foi possível observar que a atividade se manteve elevada entre os valores de pH de 2,0 a 5,0 sendo que no pH 4,0, utilizando o tampão citrato de sódio, obteve-se atividade enzimática máxima. Os valores a partir de 5,0 resultaram no decréscimo da atividade sendo que em pH alcalinos (8,0 a 10,0) obteve-se as menores atividades (Figura 08).

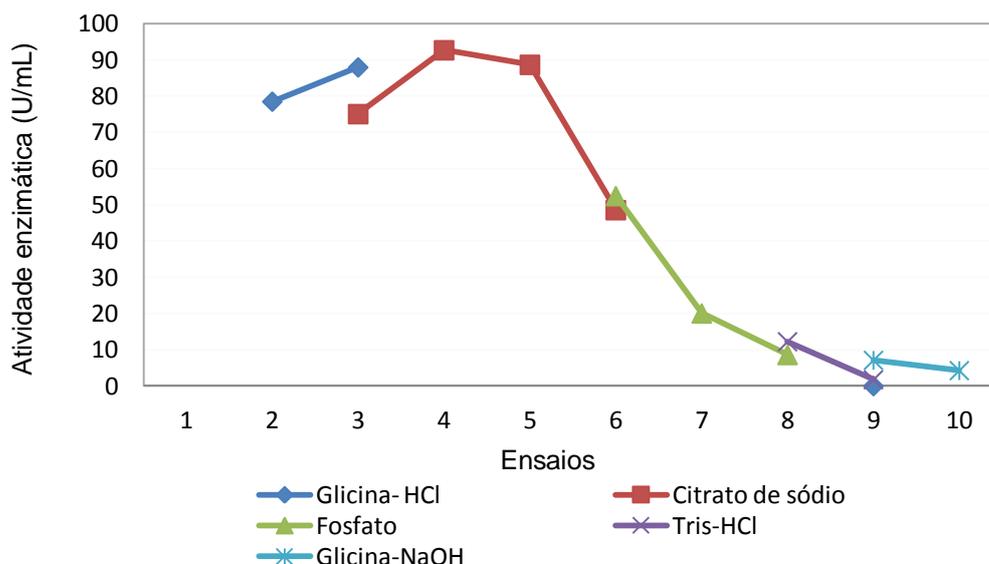


Figura 08- Efeito da variação de pH na atividade da inulinase produzida pela levedura *K. marxianus* NRRL-Y 7571, utilizando xarope de agave e extrato de levedura em fermentação submersa, após 96 horas de fermentação.

Segundo Vandamme & Derycke (1983), as inulinases de vários micro-organismos apresentam pH ótimo numa faixa de 3,5 a 6,0. Ettalibi e Baratti (2001) obtiveram atividade máxima em pH 4,7 para inulinases produzidas por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* e *Aspergillus ficum*. Mazutti et al., (2007) observaram maior atividade em pH 3,5 da inulinase produzida por *K.marxianus*, assim como Gao et al., (2007), utilizando *Pichia guilliermondii*

De acordo com Schneider (1998), é interessante ressaltar que, para fins industriais, é importante que a enzima apresente um baixo valor de pH ótimo, evitando desta forma a contaminação bacteriana, sendo também vantajoso que a enzima tenha capacidade de atuação em uma ampla faixa de pH, tornando o processo mais flexível.

O conhecimento de temperatura e influência do pH na atividade de enzima é importante para determinação de taxas de reação ótimas. Pode-se considerar, de acordo com os dados obtidos, que as características bioquímicas da enzima em estudo são adequadas para uso industrial. Segundo Vandamme e Derycke (1983), altas temperaturas (em torno de 50°C) e baixos valores de pH (em torno de 4,0), são condições operacionais de grande interesse industrial, uma vez que diminuem os riscos de contaminação microbiana, melhoram a solubilidade de alguns substratos e reduzem a formação indesejável de cor no preparo de xaropes.

Capítulo 2

**PRODUÇÃO DE INULINASE POR *Kluyveromyces marxianus*
NRRL Y 7571 UTILIZANDO EXTRATO DE SISAL (*Agave sisalana*)
COMO SUBSTRATO**

RESUMO

OLIVEIRA, L. P. A. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 utilizando Extrato de Sisal (*Agave sisalana*) como substrato.

Inulinases são enzimas que atuam nas ligações β -2,1 da inulina, produzindo frutose e glicose. São aplicadas na produção de xaropes com alta concentração de frutose, frutooligossacarídeos e biocombustíveis, como etanol. Podem ser produzidas por micro-organismos, entre os quais, as leveduras do gênero *Kluyveromyces marxianus* têm sido descritas como uma das melhores produtoras. Este trabalho teve como principal objetivo estudar a produção de inulinase, utilizando extrato de sisal como fonte de carbono pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571. Foram realizadas fermentações submersas, sob agitação de 150 rpm, $28\pm 2^\circ\text{C}$ e pH 5,0, durante 96 horas, em frascos Erlenmeyers, sendo retiradas amostras a cada 24 horas. Os meios de cultivo de sais minerais foram suplementados com variadas concentrações da fonte de carbono (extrato de sisal) e da fonte de nitrogênio (extrato de levedura), de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , totalizando 44 ensaios. A melhor condição de produção da inulinase (10,11U/mL) foi obtida após 96 horas de fermentação com concentração da fonte de carbono de 45% e 2,0% da fonte de nitrogênio. As análises estatísticas mostraram que, no primeiro delineamento experimental, os extratos de sisal e de levedura influenciaram a produção da enzima, enquanto, no segundo delineamento, somente o extrato de levedura mostrou-se relevante. No entanto, para a produção de biomassa as condições estudadas foram ótimas. Dessa forma, os resultados deste trabalho apontam que o extrato de sisal, por ser um substrato de composição complexa e bastante variável, pode ter inibido a produção de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y757. Porém, valores consideráveis de atividades enzimáticas foram obtidos neste estudo a partir da utilização do extrato de sisal como fonte de carbono.

Palavras-chaves: levedura, enzimas, extrato vegetal.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. P. A. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using sisal extract extract (*Agave sisalana*) as substrate.

Inulinases are enzymes that present a good potential applied in the food industry for production of high fructose syrup and fructooligosaccharides by enzymatic hydrolysis of inulin, besides the production of bio-ethanol. These enzymes can be produced by several microorganisms, however, the yeasts *Kluyveromyces marxianus* has been described as one of the best producers. The aim of this work was to study the inulinase production using sisal extract as carbon source by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Submerged fermentations in a conical flasks containing 30mL of culture medium was performed at 150 rpm, 28±2°C and pH 5.0, during 96 hours. The inulinase activity and biomass were determined each 24 hours. Culture medium of mineral salts were supplemented with varying concentrations of carbon source (sisal extract) and nitrogen source (yeast extract), according to the Rotational Central Composite Design (RCCD) 2², resulting in of 44 runs. The optimum condition for inulinase production (10.11 U/mL) was obtained after 96 hours of fermentation with sisal extract at 45% and yeast extract at 2.0%. Statistical analyzes showed that in the first design, both sisal extract and yeast extract influenced the enzyme production, while in the second design, only yeast extract proved relevant. The best condition for biomass occurred at 40% sisal extract and 1.5% yeast extract. The results shown that sisal extract is a complex substrate, which highly variable composition can be inhibited the inulinase production by the yeast *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y757. Nevertheless, significant enzyme production was obtained from the sisal extract as carbon source.

Keywords: yeast, enzymes, plant extracts.

INTRODUÇÃO

A inulina é um polímero de cadeia linear formado por moléculas de frutose, unidas por ligações β 2,1 e uma molécula de glicose terminal, que está presente como carboidrato de reserva nas raízes e tubérculos de plantas como alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*), chicória (*Cichorium intybus*), dália (*Dahlia pinnata*) e plantas do gênero *Agave*, entre outras (CHI, et al. 2011; MONTANÉZ-SOTO et al., 2011).

A inulina é hidrolisada por enzimas conhecidas como inulinases (EC 3.2.1.7) que atuam nas ligações β -2,1, produzindo frutose e glicose. Existem dois tipos de inulinases, as exoinulinases, que hidrolizam os terminais redutores da cadeia de inulina, e as endoinulinases, que hidrolizam as ligações internas do polímero (ZHANG et al., 2010; CHI et al., 2011).

Essas enzimas são aplicadas principalmente na produção de xaropes com alta concentração de frutose, por hidrólise enzimática da inulina, e na produção de frutooligossacarídeos, os quais podem ser utilizados como ingredientes funcionais em alimentos (MAZUTTI et al., 2010). Além disso, as inulinases vêm sendo aplicadas também na produção de biocombustíveis, como etanol, a partir de substratos ricos em inulina (CHI et al., 2011; LIM et al., 2011).

As inulinases podem ser extraídas de várias plantas que contêm inulina, porém o rendimento é baixo, o que eleva os custos da produção. A possibilidade de utilização de micro-organismos para a produção de enzimas representa uma boa alternativa para aumentar a produtividade (TREICHEL et al., 2009). Entre os micro-organismos produtores de inulinase, as leveduras do gênero *K. marxianus* estão entre os micro-organismos consideradas melhores produtores.

Aliado a isso, vem sendo empregados, como substratos para produção enzimática, partes de plantas que armazenam inulina, visando a redução significativa nos custos de produção, por serem abundantes e de baixo valor (KANGO et al., 2008). Trabalhos utilizando tubérculos e raízes de plantas que armazenam inulina, como substratos para a produção fermentativa de inulinase por micro-organismos, têm sido relatados, entre os quais estão o uso da alcachofra de Jerusalém, yacon, dália, alho, aspargo e outros (SINGH et al., 2008; SHARMA, KAINTH e GILL, 2006; CAZETTA et al., 2005; KANGO et al., 2008).

Plantas do gênero *Agave* são originárias do México e suas seivas contêm alto teor de inulina (GARCIA-AGUIRRE, 2009). O *Agave sisalana* (sisal) é uma planta monocotiledônea de grande interesse econômico em regiões com clima semi-árido, como o do nordeste brasileiro, devido à sua utilização na produção de fibras rígidas (ESCAMILLA-TREVIÑO, 2012).

O Brasil é o maior produtor e exportador de sisal do mundo, sendo o estado da Bahia responsável por 95% da produção nacional (SANTOS, 2006). De acordo com (ALVES et al., 2005), no setor sisaleiro nordestino, cerca de apenas 4% das folhas são aproveitadas para a retirada da fibra. O restante constitui os denominados resíduos do desfibramento, compostos pela mucilagem (15%), suco (80%) e bucha (1%).

O desenvolvimento de tecnologias destinadas a determinar aplicações para esse material vegetal remanescente tem sido o foco de pesquisas. Algumas inovações potenciais incluem o uso do material como um adubo orgânico, suplemento na alimentação de ruminantes e matéria-prima na produção de medicamentos (BANDEIRA e SILVA, 2006; DEBNATH et al., 2010). Entretanto, o extrato desta planta ainda não havia sido explorado como substrato para a produção de enzimas, ou outros compostos, por meio de processos fermentativos.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 utilizando extrato de sisal (*Agave sisalana*) como fonte de carbono em fermentação submersa, bem como, caracterizar a enzima produzida quanto ao perfil ótimo de temperatura, pH e termoestabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Manutenção do micro-organismo

A levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571, adquirida na Fundação André Tosello - Coleção de Culturas Tropicais foi mantida em meio líquido composto de extrato de levedura 0,3%; extrato de malte 0,3%; peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1% e glicerol 20 %, a -80°C.

2. Preparo do inóculo

Inicialmente a levedura foi inoculada em placas de Petri contendo meio Ágar Extrato de Malte-Levedura (YMA) e incubada para crescimento em B.O.D. durante 24 horas a 28°C, de forma a se obter cultura de células jovens para iniciar o processo fermentativo.

Em seguida, a cultura foi repicada em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de pré-inóculo, composto de: sacarose 1,0%; extrato de levedura 0,5%; KH_2PO_4 0,5%; NH_4Cl 0,15%; KCl 0,12%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,07% e incubada a 28°C por 24 horas a 150 rpm. Para obtenção do inóculo, adicionou-se o conteúdo do pré-inóculo em frasco Erlenmeyer com capacidade de 250 mL contendo 50 mL do mesmo meio, o qual foi incubado durante 24 horas a 28°C sob agitação de 150 rpm em câmara agitadora. Os meios foram previamente ajustados para pH 5,0 com ácido-ortofosfórico concentrado e autoclavados por 15 minutos a 121°C.

3. Preparo do extrato de sisal (*Agave sisalana*)

Fragmentos do caule do sisal (*Agave sisalana* Perrine) foram lavados com água destilada e triturados em liquidificador (200 g de tecido caulinar em 100 mL de água destilada) por cerca de três minutos, obtendo-se extrato aquoso com a concentração de 20% (p/v). O extrato foi filtrado em peneira plástica e depois a vácuo. O extrato filtrado foi armazenado em recipientes plásticos e mantido em refrigerador a -20°C, até a sua utilização.

4. Produção de Inulinase por Fermentação Submersa

Para a produção de inulinase, as fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura composto de extrato de sisal e extrato de levedura, como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente, em diferentes concentrações, de acordo com o delineamento composto central rotacional (DCCR) 2². O meio foi suplementado com KH_2PO_4 0,5%; NH_4Cl 0,15%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,07%; KCl 0,12%. O pH foi ajustado para 5,0 por meio da adição de ácido orto-fosfórico concentrado e o meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

No meio de cultivo, preparado para as fermentações, foi adicionada concentração de inóculo equivalente a 10 % do volume do meio, ou seja 3mL. A fermentação foi conduzida a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 5,0 e 150 rpm em câmara agitadora, durante 96 horas. A cada 24 horas uma amostra foi retirada e o caldo fermentado foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação imediata da atividade enzimática e o sedimento foi utilizado para quantificação do crescimento celular.

5. Delineamento Composto Central Rotacional- DCCR

Como não havia parâmetro a seguir com o extrato de sisal, inicialmente foram feitos ensaios preliminares em duplicatas para definir a partir de qual concentração deveria seguir o delineamento experimental. As concentrações estudadas foram 10, 20, 30, 40 e 50% (v/v) com 1% da fonte de nitrogênio (extrato de levedura) suplementadas em meio de sais minerais. As fermentações seguiram conforme descrito no item 4, durante 24 horas.

5.1. Primeiro Planejamento Experimental

As fermentações ocorreram em condições de cultivo variadas, onde foram estudadas diferentes concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio, a fim de se determinar as melhores condições de fermentação, de acordo com a matriz

do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , segundo Rodrigues e lemma (2009).

Os níveis estudados e a matriz do DCCR 2^2 , com os valores das variáveis estudadas, estão apresentados nas Tabelas 01 e 02, respectivamente.

Tabela 01- Valores utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 para produção de inulinase.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Extrato de Levedura (%)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Extrato de Sisal (%)	30	35	40	45	50

Tabela 02- Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional, com valores reais e codificados, para determinação da atividade enzimática.

Ensaio	Níveis		Extrato de Levedura (%)	Extrato de sisal (%)
1	-1	-1	1	35
2	1	-1	2	35
3	-1	1	1	45
4	1	1	2	45
5	-1,41	0	0,5	40
6	1,41	0	2,5	40
7	0	-1,41	1,5	30
8	0	1,41	1,5	50
9	0	0	1,5	40
10	0	0	1,5	40
11	0	0	1,5	40

Os valores das variáveis escolhidas foram definidos com base nos experimentos preliminares. Esse delineamento experimental resultou em 11 ensaios, que ocorreram durante 96 horas, sendo retirada uma amostra a cada 24 horas, totalizando 44 amostras.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software STATISTICA 7.0® (StatSoft).

Após a análise das respostas obtidas no primeiro planejamento, foi realizado mais um planejamento completo (DCCR), com o intuito de otimizar as condições para a produção da inulinase.

5.2. Segundo Planejamento Experimental

Os valores das variáveis escolhidas foram definidos com base nos resultados do planejamento anterior e resultaram em 11 ensaios. O tempo de fermentação foi fixado em 96 horas, pois foi o tempo onde se atingiu a maior produção da enzima. As Tabelas 3 e 4 descrevem os níveis estudados e a matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 para o segundo planejamento experimental.

Tabela 3- Valores utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 para produção de inulinase.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Extrato de Levedura (%)	0,3	0,5	1	1,5	1,7
Extrato de Sisal (%)	43	45	50	55	57

Tabela 4- Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional, com valores reais e codificados, para determinação da atividade enzimática.

Ensaio	Níveis		Extrato de Levedura (%)	Extrato de Sisal (%)
1	-1	-1	0,5	45
2	1	-1	1,5	45
3	-1	1	0,5	55
4	1	1	1,5	55
5	-1,41	0	0,3	50
6	1,41	0	1,7	50
7	0	-1,41	1	43
8	0	1,41	1	57
9	0	0	1	50
10	0	0	1	50
11	0	0	1	50
5	-1,41	0	0,3	50

6. Crescimento celular

Para obtenção da biomassa, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm durante vinte minutos. Em seguida, o precipitado foi ressuspensado em água destilada e novamente centrifugado para lavagem das células. As células lavadas foram ressuspensas em água destilada no mesmo volume do extrato enzimático fermentado (30 mL) e o crescimento celular foi determinado por turbidimetria a 600 nm, utilizando água destilada para calibração. Os valores obtidos foram relacionados com o peso seco x absorvância, através de curva de calibração.

A massa seca, utilizada para a elaboração da curva de crescimento, foi obtida centrifugando 100 mL de caldo fermentativo com aproximadamente 10 ± 2 horas de crescimento a 10.000 rpm por 10 minutos. As células foram lavadas com água destilada, centrifugadas novamente e ressuspensas em 5 mL de água destilada. A partir disso, foram armazenadas em forminhas de alumínio previamente taradas e secas em estufa a 100°C durante 24 horas até peso constante. O peso seco das células foi determinado por diferença de massa e expresso em termos de massa seca de células (g)/ 100 mL de suspensão.

A absorvância foi obtida centrifugando 100 mL de caldo fermentativo com aproximadamente 10 ± 2 horas de crescimento a 10.000 rpm por 10 minutos. Após lavagem e ressuspensão das células no mesmo volume do meio, o crescimento celular foi determinado por turbidimetria a 600 nm diluindo-se o caldo celular de modo que as leituras permanecessem no intervalo entre 0,2 a 0,8 de absorvância.

A curva foi elaborada relacionando o peso seco e a absorvância e os coeficientes da equação da reta padrão foram utilizados para determinar a biomassa através da fórmula:

$$\text{Biomassa} = \text{ABS} - A/B \times \text{diluição}$$

Onde:

Abs= Absorvância obtida através da leitura a 600 nm da densidade celular dos caldos fermentados.

A e B = coeficientes da equação da reta padrão.

7. Ensaio Analíticos

7.1. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática do sobrenadante foi determinada de acordo com Suzuki et al. (1988), através da 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 da amostra enzimática convenientemente diluída. O meio reacional foi colocado em banho-maria a 40°C, sob agitação, em agitador magnético com aquecimento, durante 15 minutos. Alíquotas de 1,0 mL foram retiradas nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 e 15 minutos e determinou-se a concentração de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalicílico-DNS (MILLER, 1959). A leitura das atividades foi feita 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%.

O cálculo da atividade enzimática (AE) foi realizado de acordo com a equação:

$$AE = \alpha \times \beta \times 10^3 / 180 \times \text{diluição} \times 10 \text{ (}\mu\text{mol/mL.min)}.$$

Onde:

α = coeficiente angular da reta padrão

β = coeficiente angular da reta da atividade enzimática

180×10^3 = peso Molecular da glicose em mg

10= volume final do meio reacional incubado

Os resultados estão apresentados em U/mL onde cada unidade (U) de atividade de inulinase é 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.

7.2. Determinação do perfil ótimo de temperatura

A temperatura ótima de atividade da inulinase foi obtida através da determinação da atividade enzimática em diferentes temperaturas, numa faixa de 45°C a 70°C. A atividade enzimática foi medida sob as mesmas condições descritas no item 7.1.

7.3. Determinação do perfil ótimo de pH

Para determinar o pH ótimo de atividade da inulinase, a mistura reacional foi incubada em banho-maria, com as faixas de pH variando de 2,0 a 10,0, utilizando como tampões: glicina-HCl 50mM (pH 2,0–3,0), citrato de sódio 50mM (pH 3,0-6,0), fosfato 50mM (pH 6,0-8,0), tris-HCl 50mM (pH 8,0-9,0) e glicina-NaOH (pH 9,0-10,0). Os tampões foram preparados de acordo com os procedimentos descritos por Colowick & Kaplan (1955).

7.4. Termoestabilidade

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada incubando-se o extrato enzimático bruto nas temperaturas de 50°C, 55°C e 60°C durante 5 horas, de acordo com a literatura específica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 01 apresenta os resultados dos ensaios preliminares realizados para definir as concentrações iniciais de extrato de sisal.

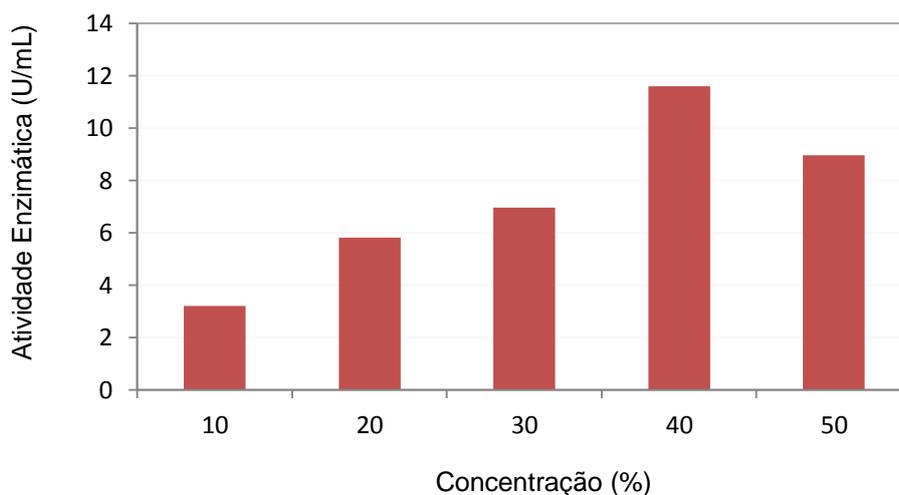


Figura 01- Valores obtidos de atividade enzimática em extrato de sisal.

Verificou-se que a maior atividade enzimática foi obtida com 40% do extrato de sisal no meio de cultivo. Com a concentração de 50% houve o decréscimo da atividade enzimática. Dessa forma a concentração de 40% foi escolhida para compor o ponto central do primeiro planejamento fatorial completo.

A seleção das concentrações adequadas do substrato é de fundamental importância para o sucesso da produção enzimática, pois a presença em excesso de algum componente do substrato pode afetar a produção enzimática, inibindo-a.

Através deste ensaio preliminar, pode-se observar a influência individual da concentração da fonte de carbono sobre a atividade enzimática, e ter uma noção, em relação aos níveis enzimáticos produzidos, com a utilização do extrato de sisal como fonte de carbono.

1. Fermentações

Primeiro Planejamento Experimental – DCCR 1

Os resultados apresentados na Tabela 05 mostram os valores das atividades enzimáticas obtidas durante 96 horas de fermentação em função das diferentes concentrações de extrato de sisal e extrato de levedura presentes nos meios de cultivo.

Tabela 05- Matriz do planejamento experimental completo, com valores codificados e reais das variáveis (concentração da fonte de carbono e nitrogênio) e resposta (atividade enzimática) em 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação.

Ensaio	X ₁ % N	X ₂ % C	X ₁ % N	X ₂ % C	Atividade Enzimática U/mL			
					24 hrs	48hrs	72hrs	96hrs
1	-1	-1	1	35	3,34	8,06	7,37	4,47
2	1	-1	2	35	4,37	5,90	5,50	4,15
3	-1	1	1	45	3,48	15,92	5,98	6,31
4	1	1	2	45	5,73	5,78	7,06	10,11
5	-1,41	0	0,5	40	3,72	4,55	5,20	4,08
6	1,41	0	2,5	40	3,87	6,10	8,28	5,59
7	0	-1,41	1,5	30	2,91	3,05	5,20	3,21
8	0	1,41	1,5	50	3,92	6,04	9,48	8,02
9	0	0	1,5	40	4,58	4,73	3,68	3,27
10	0	0	1,5	40	3,24	4,39	5,27	3,99
11	0	0	1,5	40	2,87	5,08	4,62	3,99

Entre as 44 amostras analisadas, a atividade enzimática variou de 2,87 U/mL a 15,92 U/mL. As maiores produções foram observadas no ensaio 3 (15,92 U/mL) e no ensaio 4 (10,11U/mL) após 48 e 96 horas de fermentação, com produtividades de 0,33 U/mL.h⁻¹ e 0,10 U/mL.h⁻¹, respectivamente.

Nestes ensaios a concentração do extrato de sisal foi a mesma (45%) enquanto que as concentrações do extrato de levedura foi de 1% no ensaio 3 e 2% no ensaio 4. Nos demais ensaios a atividade enzimática manteve-se abaixo de 10 U/mL (Figura 02).

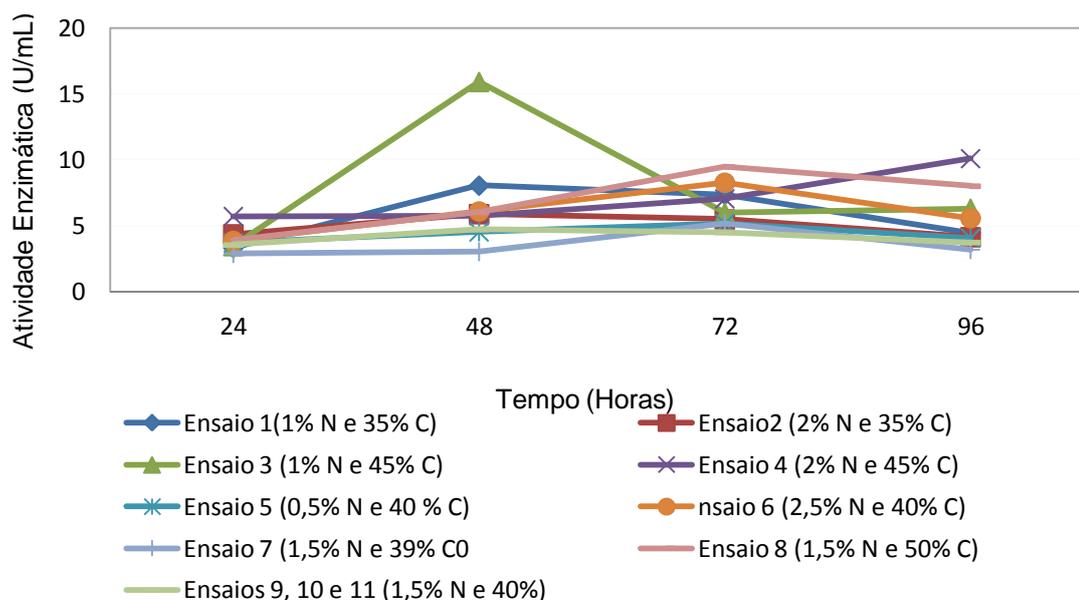


Figura 02- Cinética da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 em fermentação submersa, utilizando extrato de sisal como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Pode-se observar que também houve aumento da atividade enzimática comparando-se os ensaios em que se manteve a concentração de extrato de levedura em 1,5%, enquanto variou-se a concentração de extrato de sisal de 30% para 50% (ensaios 7 e 8).

No geral, ao variar as concentrações, tanto do extrato de sisal quanto do extrato de levedura, dos níveis mais baixos (-1,41) para os mais altos (1,41), ocorreu o incremento da atividade enzimática (ensaios 5, 6, 7, 8) em todos os tempos analisados.

A Tabela 06 representa os coeficientes de regressão calculados com base nos resultados obtidos em 48 horas de fermentação.

Tabela 06- Coeficientes de regressão para a atividade enzimática utilizando extrato de sisal e extrato de levedura, após 96 horas de fermentação.

Fatores	Coeficientes		Erro	
	de regressão	padrão	t(5)	p - valor
Média	4,71755	1,990510	2,37002	0,063951
(1) Extrato de levedura (L)	-1,26809	1,220765	-1,03876	0,346515
Extrato de levedura (Q)	1,30615	1,456690	0,89666	0,410991
(2) Extrato de Sisal (L)	1,49895	1,220765	1,22787	0,274140
Extrato de Sisal (Q)	0,91382	1,456690	0,62733	0,557976
1(L) x 2 (L)	-1,99500	1,723853	-1,15729	0,299432

Observa-se que, nesse tempo, nenhuma das variáveis estudadas foi considerada significativa e, além disso, o R^2 foi muito baixo (49%), menor do que o limite aceitável, o que indica que o modelo não explica a maior parte das variações ocorridas, não sendo confiável. Acredita-se, por experiências anteriores, que este resultado possa ter ocorrido devido a um erro experimental.

Entretanto, no tempo de 96 horas obteve-se a segunda melhor atividade enzimática e os resultados obtidos nas condições dos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11) foram mais uniformes. Assim, optou-se por realizar a análise estatística a partir desses dados.

Pode-se observar também, segundo a Tabela 07, que houve pouca variação entre os valores observados e os valores previstos pelo modelo o que reforça a maior homogeneidade do processo após 96 horas de fermentação.

Tabela 07- Resultados obtidos e previstos para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 em fermentação submersa, utilizando extrato de sisal como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio após 96 horas.

Ensaio	Valores Reais		Atividade inulinase (U/mL)	
	Extrato de levedura (%)	Extrato de sisal (%)	Observado	Previsto
1	1	35	4,474	4,251
2	2	35	4,145	3,590
3	1	45	6,311	5,843
4	2	45	10,112	9,312
5	0,5	40	4,081	4,360
6	2,5	40	5,590	6,340
7	1,5	30	3,206	3,547
8	1,5	50	8,015	8,703
9 (C)	1,5	40	3,273	3,749
10 (C)	1,5	40	3,993	3,749
11 (C)	1,5	40	3,993	3,749

A Tabela 08 apresenta os coeficientes de regressão calculados (os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q).

Tabela 08- Coeficientes de regressão para atividade de inulinase após 96 horas de fermentação.

Fatores	Coeficientes		t(5)	p - valor
	de regressão	Erro padrão		
Média	3,748920	0,431327	8,691605	0,000334
(1) Extrato de levedura (L)	0,702050	0,264529	2,653958	0,045211
Extrato de levedura (Q)	0,805246	0,315652	2,551053	0,051200
(2) Extrato de Sisal (L)	1,828526	0,264529	6,912374	0,000971
Extrato de Sisal (Q)	1,195065	0,315652	3,786017	0,012811
1 (L) x 2 (L)	1,032500	0,373544	2,764064	0,039643

De acordo com as análises estatísticas, realizadas a 5% de significância, todas as variáveis, incluindo a interação, foram significativas na faixa estudada, exceto o extrato de levedura em seu termo quadrático. O efeito das fontes de carbono e de nitrogênio sobre a produção enzimática foi positivo, de forma que o aumento em suas concentrações levou ao aumento nos valores das atividades, confirmando os resultados observados. Vale ressaltar ainda, que o extrato de sisal foi a variável que mais influenciou a produção enzimática, conforme pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 03).

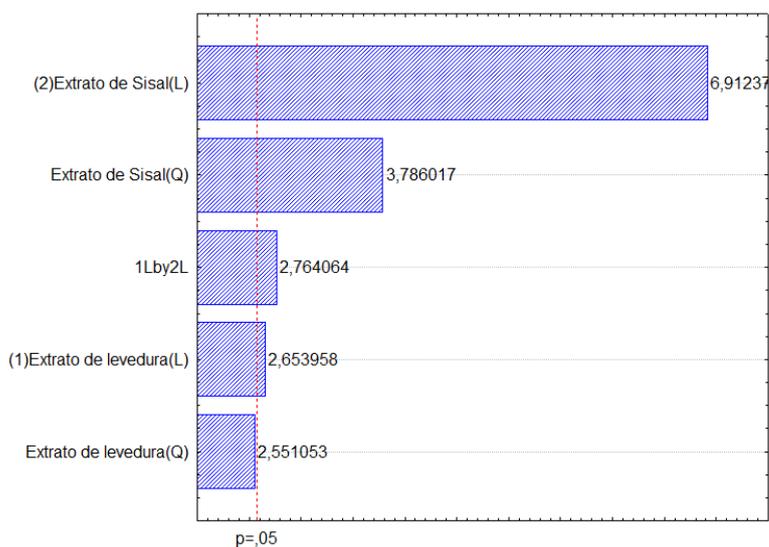


Figura 03- Diagrama de Pareto (efeitos estimados) para atividade da inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y, em fermentação submersa, mostrando as variáveis significativas com $p \geq 0,05$.

Com esses resultados foi possível elaborar o modelo codificado, que relaciona a atividade enzimática em função das concentrações de extrato de sisal

e extrato de levedura, no qual todos os parâmetros foram considerados (Equação 03).

$$\text{Atividade enzimática} = 3,74 + 0,70x_1 + 0,80x_1^2 + 1,82x_2 + 1,19x_2^2 + 1,03x_1 \cdot x_2$$

Equação 03

De acordo com a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 09, verifica-se que o F calculado (36,908) foi altamente significativo ($p < 0,0001$) sendo cerca de 8,4 vezes maior que o F tabelado (4,35). A porcentagem de variação explicada pelo modelo é de 94%, conforme o coeficiente de determinação obtido para atividade enzimática ($R^2 = 0,94$).

Tabela 09- ANOVA para atividade de inulinase após 96 horas de fermentação com extrato de sisal e extrato de levedura como substratos.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calc	Pr > F
Regressão	44,14301	3	14,714	36,908	0,0001
Resíduo	2,7907	7	0,3986		
Total	46,93371	10			

% variação explicada (R^2) = 94,05 $F_{3;7;0,05} = 4,35$

Esses resultados indicam que o modelo pode ser considerado adequado para descrever os resultados através da superfície de resposta e curvas de contorno apresentadas nas Figuras 04 A e B.

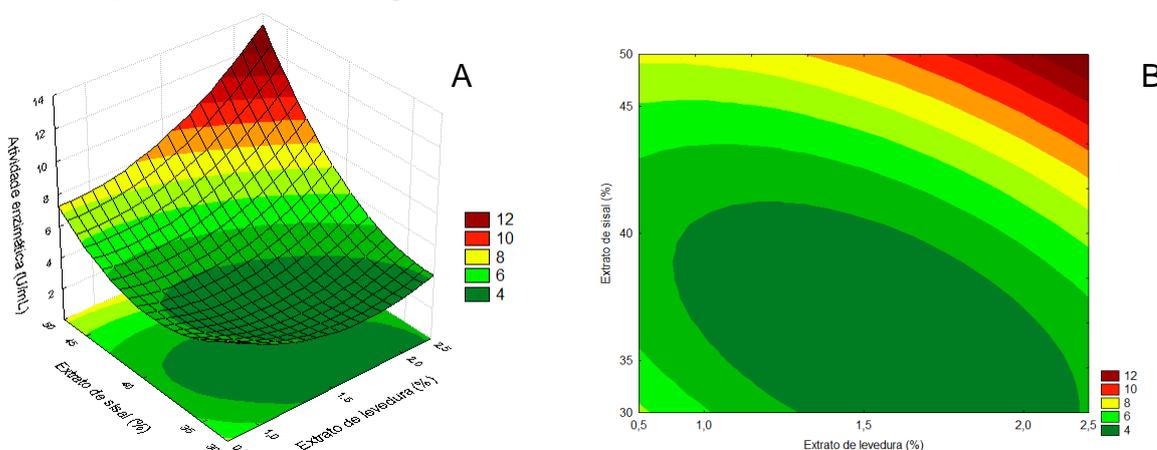


Figura 04- Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a atividade de inulinase em função das concentrações de carbono e nitrogênio por *K. marxianus* NRRL-Y 7571 em fermentação submersa após 96 horas, geradas de acordo com o primeiro planejamento fatorial.

Os gráficos confirmam que, dentro da faixa estudada, a melhor condição para a produção enzimática foi a combinação dos níveis altos (1) das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio avaliadas. Concentrações abaixo de 40% do extrato de sisal e de 2% de extrato de levedura, combinadas, mantêm a produção enzimática distante das condições ótimas de produção da inulinase.

Dessa forma, a superfície de resposta e as curvas de contorno indicam que o aumento das concentrações de extrato de sisal e de levedura pode incrementar a atividade enzimática. Um novo planejamento foi realizado visando elevar a produção da enzima.

2. Produção de biomassa

A Figura 07 apresenta o crescimento celular em função das concentrações do extrato de sisal e extrato de levedura utilizados no primeiro delineamento experimental, além de relacioná-los com a atividade enzimática.

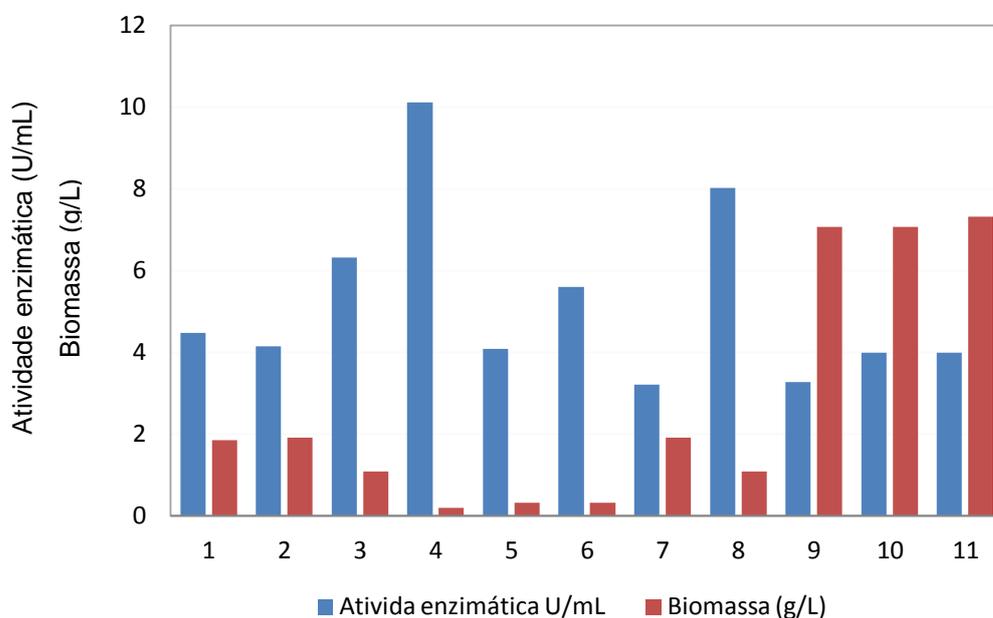


Figura 05- Efeito das concentrações dos substratos no crescimento celular e atividade enzimática de *K.marxianus* NRRL-Y 757 após 96 horas de fermentação.

Observa-se que o crescimento celular foi maior (aproximadamente 7g/L) nos ensaios onde a atividade enzimática foi menor (ensaios 9, 10 e 11), com

concentrações de 40% e 1,5% de extrato de sisal e extrato de levedura, respectivamente. Já nos ensaios 3, 4, 6 e 8, nos quais obteve-se os maiores valores de atividades enzimáticas e as concentrações do extrato de sisal eram maiores (45 e 50%), o crescimento celular foi mínimo (menos de 1g/L). Esses resultados são confirmados pelas análises estatísticas, através dos coeficientes de regressão calculados ao nível de significância de 5%, e apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- Coeficientes de regressão para o crescimento celular utilizando extrato de sisal e extrato de levedura, após 96 horas de fermentação.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p – valor
Média	7,14179	0,206968	34,5067	0,000000
(1) Extrato de levedura (L)	-0,10406	0,126932	-0,8198	0,449626
Extrato de levedura (Q)	-3,33829	0,151463	-22,0403	0,000004
(2) Extrato de sisal (L)	-0,45463	0,126932	-3,5817	0,015847
Extrato de sisal (Q)	-2,74476	0,151463	-18,1217	0,000009
1(L) x 2 (L)	-0,23750	0,179242	-1,3250	0,242484

De acordo com esses valores, a produção de biomassa foi afetada de forma negativa pelo extrato de levedura em seus termos quadráticos e pelo extrato de sisal, de forma que, o aumento nos valores dessas variáveis conduziu ao decréscimo da produção de biomassa. A interação das variáveis não causou nenhum efeito na produção celular.

Na análise de variância (Tabela 11) o F calculado foi bastante significativo e aproximadamente 70 vezes maior que o F tabelado (4,35). Além disso, o coeficiente de determinação de 0,99 indica que 99% das variações ocorridas podem ser explicadas pelo modelo, o qual, diante da qualidade desses resultados, ajusta se muito bem aos dados experimentais.

Tabela 11- ANOVA para o crescimento celular após 96 horas de fermentação com extrato de sisal e extrato de levedura como substratos, DCCR 1.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calc	P< valor
Regressão	83,610	3	27,870	303,6	0,0002
Resíduo	0,642	7	0,0917		
Total	84,253	10			

% variação explicada (R^2)= 99,23 $F_{3;7;0,05}= 4,35$

A equação 04 descreve a produção de biomassa prevista pelo modelo em função das variáveis codificadas.

$$\text{Biomassa} = 7,141 - 0,104x_1 - 3,338x_1^2 - 0,454x_2 - 2,744x_2^2 - 0,237x_1x_2$$

Equação 04

As superfícies de resposta e curvas de contorno, geradas pelo modelo, estão apresentadas nas Figuras 06 A e B.

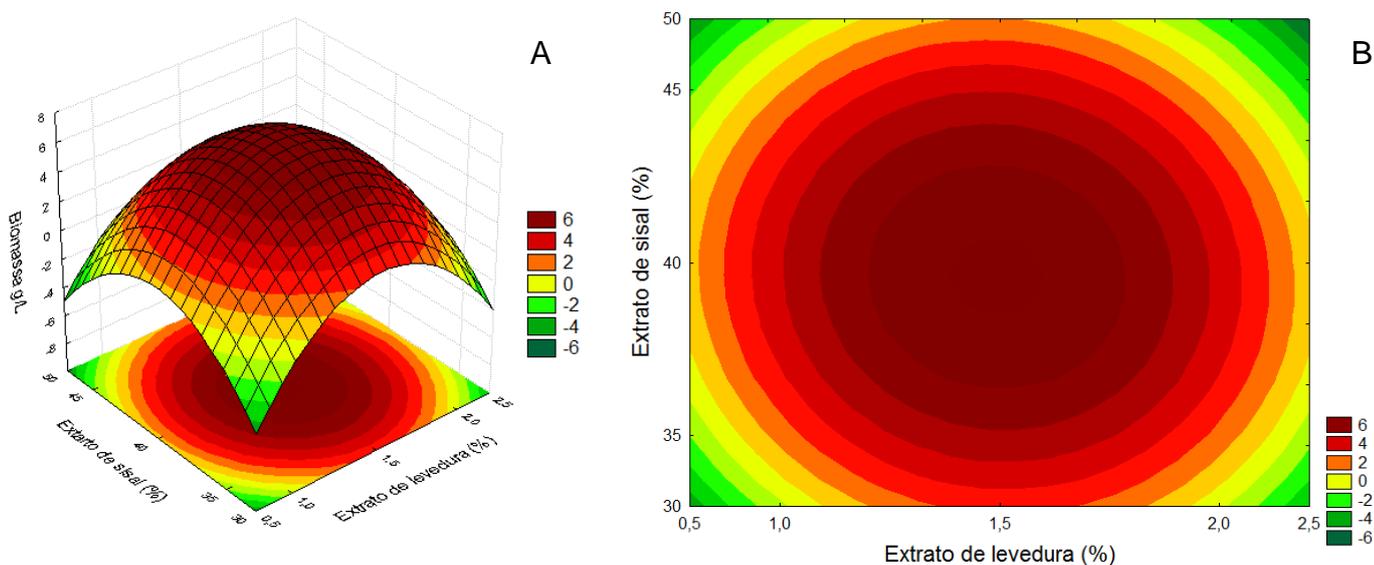


Figura 06- Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a produção de biomassa em função das concentrações de carbono e nitrogênio por *K. marxianus* NRRL-Y 7571, em fermentação submersa, após 96 horas, geradas de acordo com o primeiro planejamento fatorial

As figuras 06 (A e B) mostram que as condições ótimas para produção celular ocorreram nas concentrações de 40% de extrato de sisal e 1,5% de extrato de levedura. É possível verificar que, para o extrato de levedura, a faixa ótima está entre 1,25% a 1,75% e para o extrato de sisal está entre 37,5% a 42,5%. Utilizando-se concentrações que permaneçam entre esses valores, é possível manter a produção celular otimizada.

De acordo com Bon et al. (2008), a biossíntese da enzima pode ser associada ao crescimento, quando a taxa de formação de produto é proporcional ao aumento da biomassa, ou não associada ao crescimento celular e, neste caso, a formação de produto é independente do crescimento celular ou varia de forma complexa.

Dessa forma, pode-se considerar que, neste estudo, menores concentrações dos substratos estudados favoreceram o crescimento celular, enquanto reduziram a atividade enzimática, mostrando que, com este substrato, a produção da enzima de interesse não está associada ao crescimento, dentro da faixa estudada neste trabalho.

Segundo Planejamento Fatorial – DCCR 2

Neste planejamento, as atividades enzimáticas variaram de aproximadamente 3,6 a, no máximo, 6,9 U/mL, conforme as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio empregadas no meio de cultivo, fermentado durante 96 horas.

O valor máximo de atividade enzimática (6,89 U/mL) foi alcançado no ensaio 4, no qual a concentração do meio foi de 55% do extrato de sisal e 1,5% do extrato de levedura, como pode ser observado na Tabela 12. Dessa forma, esta faixa de concentração dos substratos não foi adequada para otimizar o processo, sendo obtidas produções de inulinase menores do que no delineamento anterior.

Tabela 12- Matriz do planejamento fatorial, valores codificados e originais das variáveis de estudo (concentração da fonte de carbono e nitrogênio) e as respostas em termos de atividade enzimática após 96 horas de fermentação.

Ensaio	X ₁		X ₂		Atividade enzimática U/mL
	% N	% C	% N	% C	96hrs
1	-1	-1	0,5	45	3,599
2	1	-1	1,5	45	6,258
3	-1	1	0,5	55	4,762
4	1	1	1,5	55	6,891
5	-1,41	0	0,3	50	5,587
6	1,41	0	1,7	50	6,848
7	0	-1,41	1	43	4,986
8	0	1,41	1	57	6,232
9	0	0	1	50	4,960
10	0	0	1	50	4,344
11	0	0	1	50	4,160

Entretanto, a análise dos resultados pode nos indicar o caminho para aumentar a produção da enzima. Observou-se que maiores atividades enzimáticas foram obtidas nas condições em que se utilizou altas concentrações (1 e 1,41) do extrato de sisal e do extrato de levedura, como pode ser visto, por exemplo, nos ensaios 4, 6 e 8.

O efeito do aumento das concentrações pode ser avaliado também comparando-se os ensaios 1, 2, 3 e 4, nos quais, mantendo-se a concentração do extrato de sisal e elevando-se a concentração do extrato de levedura, a atividade aumentou. O mesmo ocorreu quando se manteve fixa a concentração de extrato de levedura e elevou-se a concentração de extrato de sisal, sugerindo que o aumento nas concentrações de ambas as fontes incrementou a atividade enzimática.

No entanto a análise estatística não confirmou esses dados. De acordo com os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 13, apenas o extrato de levedura foi significativo, causando efeito positivo no acréscimo da produção enzimática ao elevar a sua concentração no meio de cultivo, enquanto o extrato de sisal, e a interação entre as variáveis, não interferiram na produção. Isto sugere que, para otimizar o processo, necessitamos aumentar apenas a concentração da fonte de nitrogênio.

Tabela 13- Coeficientes de regressão para a atividade de inulinase utilizando extrato de sisal e extrato de levedura como substratos, após 96 horas de fermentação de regressão para resposta atividade de inulinase (96horas de produção).

Fatores	Coeficientes		Erro	
	de regressão	padrão	t(5)	p - valor
Média	4,490159	0,370697	12,11274	0,000068
(1) Extrato de levedura (L)	0,823200	0,227346	3,62092	0,015205
Extrato de levedura (Q)	0,731961	0,271283	2,69815	0,042879
(2) Extrato de sisal (L)	0,445433	0,227346	1,95927	0,107388
Extrato de sisal (Q)	0,425890	0,271283	1,56991	0,177231
1(L) x 2 (L)	-0,132500	0,321037	-0,41272	0,696909

Essas observações são reforçadas pelo diagrama de Pareto (Figura 07), que estabelece o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis possui sobre a atividade enzimática, evidenciando que somente o extrato de levedura

linear encontra-se dentro do grau de confiança determinado para a análise estatística (95% ou $p \geq 0,05$).

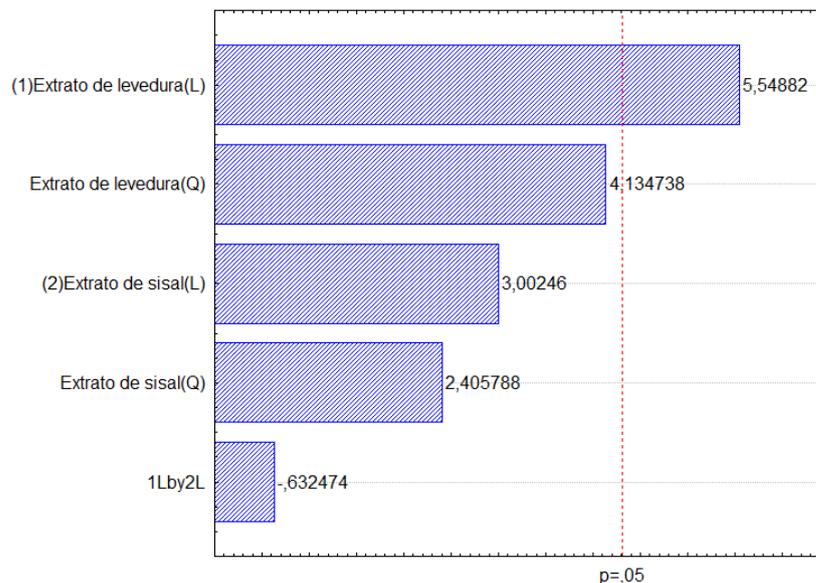


Figura 07- Diagrama de Pareto (efeitos estimados) para atividade da inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y, em fermentação submersa, mostrando as variáveis significativas com $p \geq 0,05$.

A análise da variância, apresentada na Tabela 14, foi utilizada para avaliar a significância do modelo codificado, que relaciona a atividade enzimática em função das variáveis independentes.

Tabela 14- ANOVA para atividade de inulinase após 96 horas de fermentação com extrato de sisal e extrato de levedura como substratos.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calc	P< valor
Regressão	10,33591	3	3,445	11,7	0,004
Resíduo	2,061	7	0,294		
Total	12,397	10			

% variação explicada (R^2)= 83,37 $F_{3;7;0,05}= 4,35$

O valor F calculado (11,7) foi maior que o F tabelado (4,35), mostrando que o modelo gerado é estatisticamente significativo para o nível de 95% de confiança. O coeficiente de determinação igual a 0,83 estabelece que 83% das variações podem ser explicadas pelo modelo, o que significa que este pode ser utilizado para verificar as tendências de produção da inulinase, utilizando-se os

substratos selecionados. Apesar de somente o extrato de levedura ser significativo, no intuito de manter a porcentagem das variações explicadas pelo modelo, todos os parâmetros foram adicionados ao modelo codificado apresentado na equação 05:

$$\text{Atividade enzimática} = 4,49 + 0,82x_1 + 0,73x_1^2 + 0,44x_2 + 0,42x_2^2 - 0,13x_1 \cdot x_2$$

Equação 05

Como o modelo é estatisticamente válido, a partir desses resultados foi possível obter as superfícies de resposta e curvas de contorno para analisar melhor as condições em que foram utilizadas as fontes de carbono e nitrogênio para produção de inulinase (Figuras 08 A e B) e planejar os próximos experimentos, visando o aumento da produção da enzima.

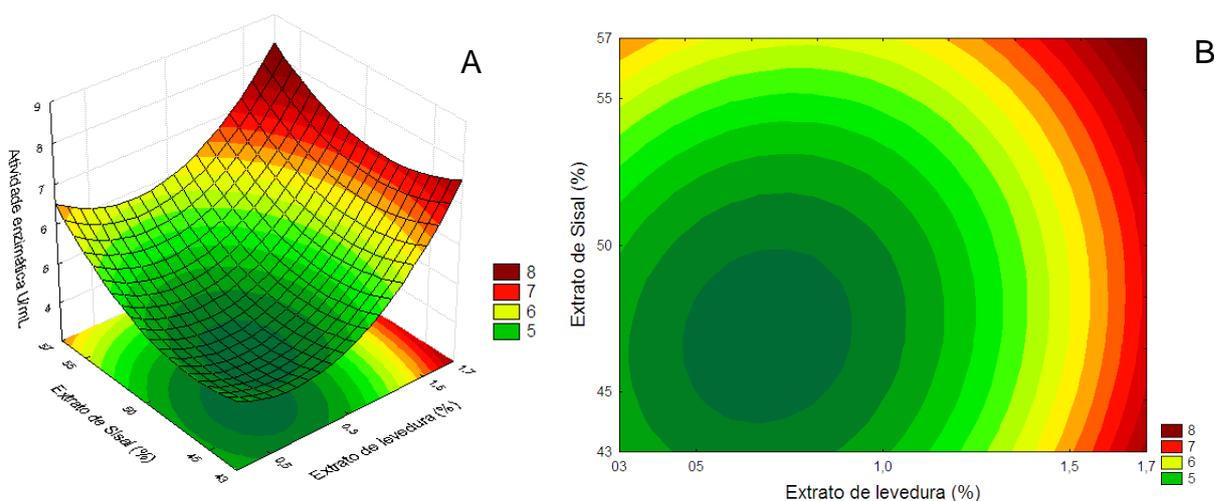


Figura 08- Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a atividade de inulinase em função das concentrações de carbono e nitrogênio por *K. marxianus* NRRL-Y 7571 em fermentação submersa após 96 horas, geradas de acordo com o segundo planejamento fatorial.

É possível concluir, através da superfície de resposta e curvas de contorno, que concentrações de extrato de sisal acima de 50%, combinadas com concentrações de extrato de levedura a partir de 1,5%, resultaram em maiores valores da atividade enzimática. Entre as condições estudadas, a que se aproximou mais desses valores foram as concentrações de 55% e 1,7% de extrato de sisal e de levedura, respectivamente, atingindo aproximadamente

6,9U/mL, valor próximo do previsto para a região ótima, que é de 8U/mL, nas concentrações estudadas. Assim, novos estudos deverão ser realizados com uma concentração maior de extrato de levedura, para verificar se será possível elevar os níveis de atividade enzimática.

Neste estudo o extrato de sisal mostrou-se um substrato muito variável, interferindo bastante na produção enzimática. Acredita-se que essa variação possa estar relacionada à complexidade desse substrato. Resíduos agroindustriais possuem composições complexas e assim podem mostrar um efeito negativo no sistema global, devido a um incremento na concentração de alguns constituintes que inibem a produção enzimática (MENDES, 2006; TREICHEL et al., 2009). O extrato de sisal contém sapogeninas esteroidais e saponinas (OASHI, 1999; PIZARRO et al., 1999), as quais podem estar relacionadas à queda da produção da enzima em altas concentrações do extrato vegetal. Além disso, deve-se levar em consideração a influência das variações sazonais e diferenças das características do solo de cultivo que são fatores que podem influenciar na composição do extrato.

No entanto, vale destacar que os valores das atividades enzimáticas, obtidos neste estudo, foram superiores aos encontrados por outros autores. Sharma, Kainth e Gill (2006) compararam a produção de inulinase, por *Streptomyces sp.*, utilizando inulina comercial com extrato de diversos vegetais que armazenam inulina como substrato e obtiveram os seguintes resultados: banana 0,283U/mL; cevada 0,244 U/mL; cebola 0,300 U/mL; centeio 0,313 U/mL; trigo 0,320 U/mL; chicória 0,328U/mL; sendo estes comparáveis ao valor obtido com inulina comercial (0,321U/mL) e o alho (0,524U/mL), o qual produziu, a maior atividade enzimática.

Cazetta et al. (2005) produziram inulinase por *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* utilizando extrato de yacon (*Polymnia sanchifolia*) como substrato, alcançando 4,1U/mL de atividade enzimática, nas concentrações de 30% e 40% (v/v) havendo, acima dessas concentrações (50%), decréscimo de 14% na atividade enzimática.

Gill et al. (2003) estudaram a produção de inulinase extracelular por *Streptomyces GNDU 1*, produzindo níveis de enzima em torno de 0,552 UI/mL, utilizando como substratos inulina e extrato de levedura. Dessa forma, pode-se

perceber que nestes trabalhos, os valores obtidos foram abaixo dos observados no presente estudo, até mesmo quando inulina pura foi a fonte de carbono.

3. Caracterização parcial enzimática

A caracterização da inulinase foi realizada utilizando o extrato enzimático bruto obtido após 96 horas, sob a melhor condição experimental, com o objetivo de se determinar o pH ótimo, temperatura ótima e termoestabilidade.

Perfil ótimo de pH

A atividade enzimática se manteve elevada entre os valores de pH de 2,0 a 4,0 sendo que neste último, utilizando o tampão citrato de sódio, obteve-se atividade enzimática máxima. A partir desse valor a atividade caiu acentuadamente com valores aproximando-se de zero em pHs entre 8,0 a 10,0 (Figura 09).

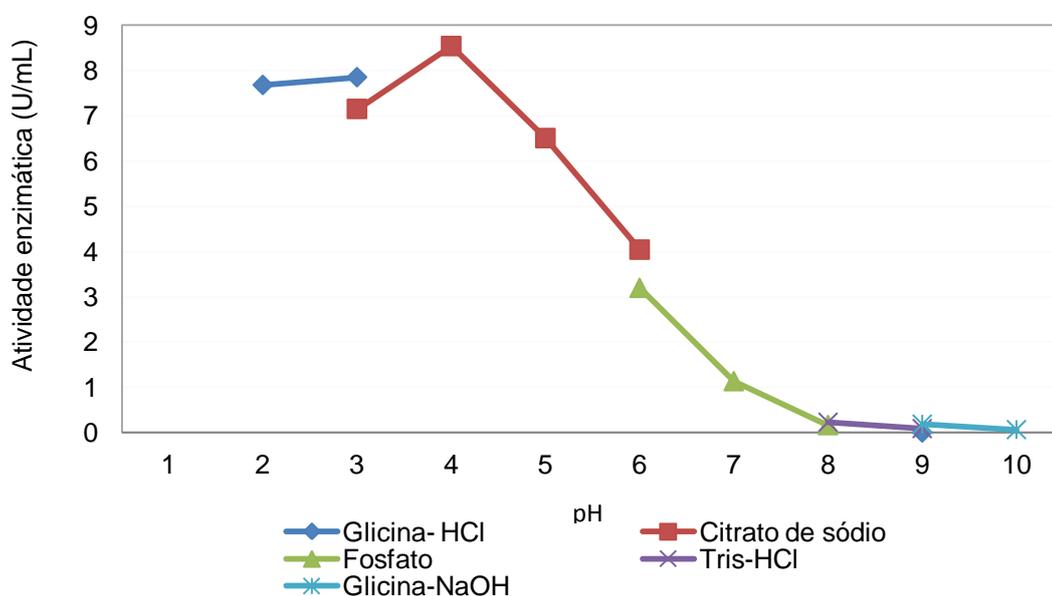


Figura 09- Efeito da variação de pH na atividade da inulinase produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571, utilizando extrato de sisal e extrato de levedura em fermentação submersa, após 96 horas de fermentação.

Perfil de temperatura e estabilidade térmica

A enzima produzida apresentou melhores atividades na faixa entre 45° a 65°C, sendo que a atividade máxima foi alcançada na temperatura de 65°C. A 70°C, provavelmente, a enzima sofreu desnaturação perdendo bruscamente a atividade enzimática como pode ser observado na Figura 10.

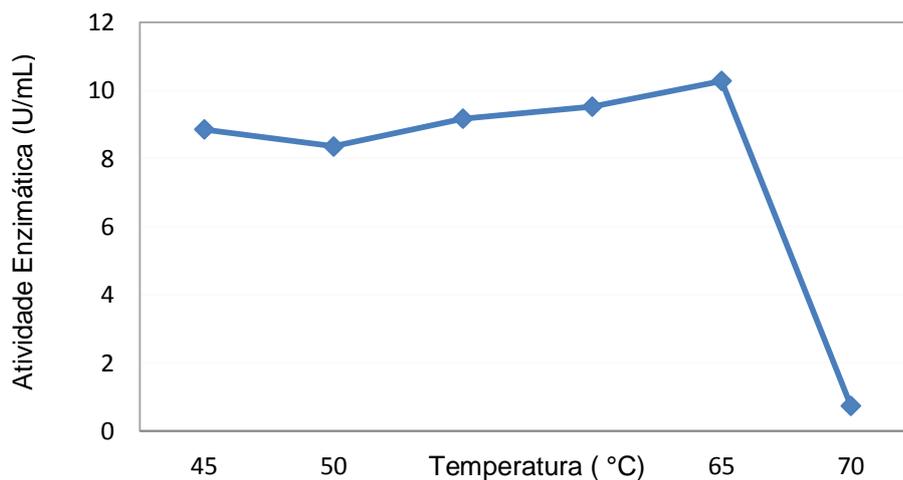


Figura 10- Efeito da temperatura na atividade da inulinase produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571, utilizando extrato de sisal e extrato de levedura em fermentação submersa, após 96 horas de fermentação.

Quanto à estabilidade térmica, pode-se observar na Figura 11, que a enzima manteve-se pouco estável nas três temperaturas avaliadas, sendo que este efeito foi melhor observado a 50°C, durante apenas 30 minutos. A enzima foi reduzindo a estabilidade à medida que se aumentava a temperatura, sendo que na temperatura de 60°C a enzima manteve-se estável por menos tempo, decaindo acentuadamente em pouco mais de 15 minutos, com valores próximos de zero após uma hora de incubação, apesar de 65°C ser a temperatura ótima de reação.

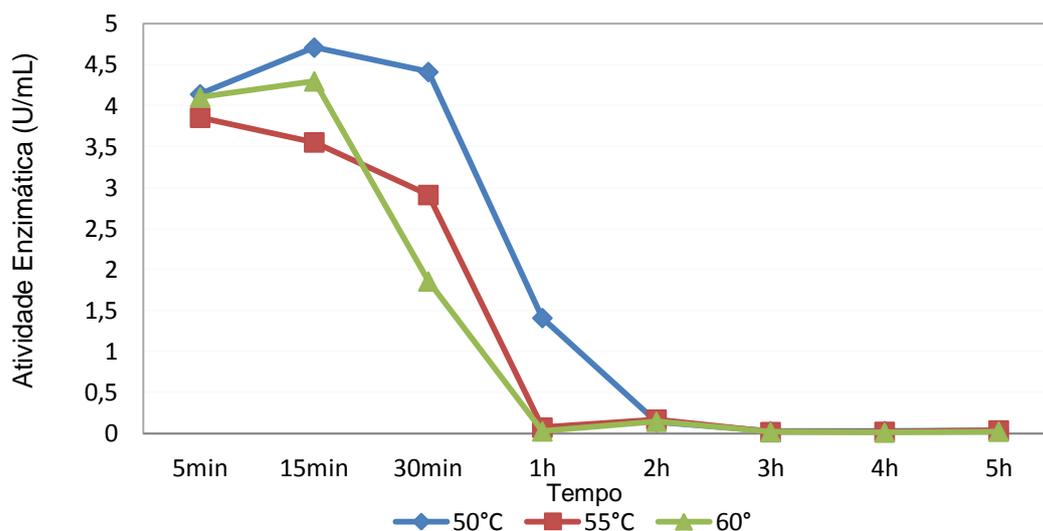


Figura 11- Estabilidade térmica da atividade inulinásica produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571, utilizando Xarope de agave e extrato de levedura em fermentação submersa, após 96 horas de fermentação.

A caracterização da enzima é essencial tanto para o estabelecimento das condições de trabalho e aplicações, como para a determinação da temperatura e pH ótimos e de estabilidade, em que se determinam valores ótimos de reação.

As características parciais da enzima estudada variam entre as espécies produtoras e os substratos utilizados, porém resultados em torno dos que foram obtidos neste estudo são encontrados na literatura. Santos (2002) realizou estudos para caracterizar a enzima inulinase produzida por *K. marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045 verificando que, com relação ao pH, em tampão acetato de sódio 0,1M, a enzima apresentou maior atividade em uma faixa de valores de pH ente 4,4 a 4,8. Nos estudos do efeito da temperatura, obteve as máximas atividades a 63°C e em relação à estabilidade térmica, a melhor temperatura para a atividade foi 50°C.

Gill et al. (2003), avaliando a produção de inulinase extracelular por *Streptomyces* GNDU 1, observou temperatura e pH ótimos de 60°C e 5,5, respectivamente. Treichel (2004) observou, dentro da faixa estudada para a inulinase obtida de NRRL-Y 7571, que a temperatura de maior estabilidade foi 50°C, enquanto a faixa ótima de pH ficou entre 4,4 e 4,8.

Kushi et al. (2000) e Ettalibi e Baratti (2001) obtiveram atividade máxima em pH 4,7 para enzimas obtidas a partir de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* e *Aspergillus ficum*. Astolfi (2010) caracterizou parcialmente a inulinase

obtida de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-757, que apresentou temperatura ótima de 55°C e um pH ótimo de 4,5.

Sabe-se que altas temperaturas (em torno de 50°C) e baixos valores de pH (em torno de 4,0), são condições operacionais de grande interesse industrial (VANDAMME e DERYCKE (1983). Em processos industriais, o tempo é um fator importante e o estudo de termoestabilidade enzimática, em diferentes tempos de incubação, é fundamental para determinar o quanto, e por quanto tempo, a preparação enzimática pode suportar as condições aplicadas à indústria de interesse, sendo que temperaturas elevadas com maior estabilidade são as mais desejadas nesses processos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho propôs-se estudar a produção da enzima inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 utilizando xarope de agave (*Agave tequilana*) e extrato de sisal (*Agave sisalana*) como substratos, avaliando como resposta a atividade enzimática, o crescimento celular, além de realizar a caracterização enzimática.

Entre as duas fontes de carbono estudadas, o xarope de agave apresentou-se com bom potencial para aplicação na produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 em fermentação submersa. Utilizando este substrato, a produção enzimática foi otimizada, atingindo o valor de 144,170 U/mL, com apenas 5% de xarope de agave no meio de cultivo.

Na literatura podemos encontrar valores otimizados maiores que esse, porém deve-se levar em consideração que, nesses estudos, outros parâmetros além da concentração da fonte de carbono e nitrogênio, foram investigados assim como, foram desenvolvidos em condições diferentes das que foram adotadas neste estudo, como por exemplo, o uso de reatores, substratos pré-tratados, entre outros. Dessa forma, sugere-se que valores mais elevados possam ser obtidos envolvendo outras variáveis de estudo como agitação, aeração, inóculo, pH e temperatura, bem como, a combinação com outras fontes de nitrogênio, parâmetros estes, que poderão ser investigados em estudos futuros.

Em relação ao extrato de sisal, a atividade máxima alcançada foi de 10,11U/mL, em 96 horas de fermentação submersa, nas concentrações de 45% de extrato de sisal e 2% de extrato de levedura no meio de cultivo. O substrato apresentou muitas variações, não sendo possível obter a sua otimização. No entanto, há uma tendência de aumento de produção, associada ao aumento das concentrações estudadas. Dessa forma, outros estudos complementares se fazem necessários para o ajuste das concentrações utilizadas no processo fermentativo, acreditando ser possível a otimização da produção enzimática.

Em ambos os substratos as enzimas produzidas foram parcialmente caracterizadas, apresentando características desejáveis em enzimas de aplicações industriais como, pH ótimo baixo (4,0), temperaturas ótimas elevadas (60°C e 65°C) e estabilidade térmica em temperaturas ao redor de 50°C,

características estas que são adequadas para evitar contaminações em processos industriais.

Por fim, considera-se que o estudo foi relevante ao explorar novos substratos e obter valores consideráveis de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 em fermentações submersas. Sugere-se que novos estudos sejam desenvolvidos no intuito de explorar outros parâmetros operacionais. A combinação dos resultados obtidos neste trabalho (otimização da produção enzimática, avaliação do pH, temperatura e estabilidade térmica) pode fornecer orientações úteis no desenvolvimento desses estudos, como também, na investigação de novos substratos para a produção de inulinase.

REFERÊNCIAS

ALVES, O.M; SANTIAGO, E.G.; LIMA, A. R. M. – **Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste brasileiro**. Banco do Nordeste do Brasil, Fortaleza. 2005. Disponível em: <http://www.bnb.gov.br/projwebren/exec/livroPDF.aspx?cd_livro=11> acesso em: 20 jul. 2011.

ASTOLFI, V. **Produção de inulinase por fermentação em estado sólido usando estratégias de fermentação batelada e batelada alimentada em biorreator de leito fixo**. Erechim, 2010. 76fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – campus Erechim RS.

ÁVILA-FERNANDEZ. A; OLVERA-CARRANZA, C.; RUDIÑO-PINERA, E., CASSAB, G. I., NIETO-SOTELO, J., LÓPEZ-MUNGUÍÍA A. Molecular characterization of sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Agave tequilana* Weber var . azul . **Plant Science** v. 173, p. 478-486, 2007.

AYYACHAMY, M.; KHELAWAN, K.; PILLAY, D.; PERMAUL, K.; SINGH, S., Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, 2007.ISSN 0266-8254. doi:10.1111/j.1472-765X, 2007.

BANDEIRA, D.A., SILVA, O.R.R.F.. Aproveitamento de resíduos. In: Andrade, W. (Ed.). **O sisal do Brasil**. Sindifibras; Brasília, DF. Apex, 2006. cap.5, p.56-61

BON, E. P. S.; PEREIRA JUNIOR, N.; GOTTSCHALK, L. M. F. SÁ-PEREIRA, P. ROSEIRO, J.C. FERRARA, M. A. Bioprocessos para a produção de enzimas In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A. & COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 95-119, 2008.

CAZETTA, M. L.; MARTINS, P. M. M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 301-305, 2005.

CAZETTA, M. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Effects of Culture Conditions on the Production of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus* . **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 701-707, 2010.

CHEN, H.-QING; CHEN, X.-MING; CHEN, T.-XIANG; XU, X.-MING; JIN, Z.-YU. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 249-254, 2011.

CHI, Z.-MING; ZHANG, T.; CAO, T.-SHU; *et al.* Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4295-4303, 2011.

CHI, Z.; CHI, Z.; ZHANG, T.; LIU, G.; YUE, L. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. **Applied Microbiology**, p. 211-220, 2009.

COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (eds.). Section I. General Preparative Procedures. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 138-146, 1995.

DEBNATH, M.; PANDEY, M.; SHARMA, R.; THAKUR, G.S.; LAL, P. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: a unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.43, p.177–187, 2010.

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

ERTAN F.; AKTAC T.; KABOGLU C.; EKINCI F.; BAKAR E. Determination of optimum cultivation conditions on the production of inulinase from *Rhizoctonia solani*, **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.6, n.16, p.1386-1388, 2003a.

ERTAN F.; EKINCI F.; AKTAC, T. Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride*, **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 15, p.1332-1335, 2003b.

ESCAMILLA-TREVIÑO, L. L. Potential of Plants from the Genus *Agave* as Bioenergy Crops. **Journal Bio Energy Research**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2012.

GAO L.; CHI Z.; SHENG J.; WANG, L. J.; GONG, F. Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes, **Microbial Ecology**, v. 54, p.722-729, 2007.

GARCIA-AGUIRRE, M.; SAENZ-ALVARO, V.; RODRIGUEZ-SOTO, M.A.; VICENTE-MAGUEYAL, F. J. Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of agave fructo-oligosaccharides to obtain fructose-rich syrups. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10205-10210, 2009.

GILL, P. K.; SHARMA, A. D.; HARCHAND, R. K.; SINGH, P. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 359-362, 2003.

GONG, F.; SHENG, J.; CHI, Z.; LI, J. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.179-185, 2007.

GUERRERO, A. E. C.; OLVERA, J. L.; GARIBAY, M.G.; RUIZ, L. G. Inulinase hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from aguamiel (*Agave* sap) and pulque, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p.115-117, 2006.

GUIMARAES, L. H. S.; TEREZI, H. F.; POLIZELI, M. L.; JORGE, J. A. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources, **Enzyme and Microbial Technology**, v.42, p.52-57, 2007.

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

KALIL S. J.; SILVEIRA S. T.; FILHO F. M.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of different parameters for the purification of inulinase using an ion exchange fixed bed, **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.15, p. 676-679, 2010.

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

KUMAR G. P.; KUNAMNENI A.; PRABHAKAR T.; ELLAIAH, P. Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p.1359-1361, 2005.

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

LIM, S. H.; RYU, J. M.; LEE, H.; JEON, J. H.; SOK, D. E.; CHOI, E.S. Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2109-2111, 2011.

LOPEZ, M.G.; MANCILLA-MARGALLI, N. A.; MENDOZA-DIAZ, G.; Molecular Structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 7835–7840, 2003.

MAUGERI, F. **Apostila de Engenharia Bioquímica**. FEA – UNICAMP, 2002.

MAKINO, Y. TREICHEL, H.; SCANAVINI, H. F. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Otimização de meio industrial para produção de inulinase por *Kluyveromyces* **Anais do 14º Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 25-28 de outubro, Natal – RN, 2002.

MAZUTTI, M. A.; 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.; CORAZZA, M. L.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; CORAZZA, F.C.; TREICHEL, H. Inulinase production in a batch bioreactor using agroindustrial residues as the substrate: experimental data and modeling. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p.85–95, 2009.

MAZUTTI M. A.; SKROWONSKI A.; BONI G.; ZABOT G. L.; SILVA M. F., OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M.; FILHO F. M.; RODRIGUES M. I.; TREICHEL, H. Partial characterization of inulinases obtained by submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates: a comparative study, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.682-693, 2010.

MENDES, G. L., **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados**. Campinas, 2006, 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONTAÑEZ-SOTO, J.; VENEGAS-GONZÁLEZ, J.; VIVAR-VERA, M. Los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber AZUL. **Food Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 199-206, 2011.

OASHI, M. C. G. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba: aproveitamento do suco do sisal como fonte industrial de esteróides**. Santa Catarina, 1999. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção). Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: < www.eps.ufsc.br/teses99/oashi/cap6b.html > Acesso em: 15 set. 2010.

PARTIDA, V.; CAMACHO, A., MARTINEZ, A.J. **Method of producing fructose syrup from agave plants**, U.S. Patent 5 846 333, 1998.

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

PIZARRO, A. P. B.; OLIVEIRA-FILHO, A. M.; PARENTE, J. P.; MELO, M. T. V.; SANTOS, C. E.; LIMA, P. R. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 23-29, 1999.

RISSO, F. V. A.; MAZUTTI, M. A.; COSTA, F.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F. ; RODRIGUES, M. I. Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic solutions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.27, n. 04, p. 507 - 516, 2010.

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

ROEPCKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. 2007.133f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SANTOS, J. D. Produção e consumo. In: Andrade, W. (Ed.), **O sisal do Brasil**. Salvador, Sindifibras, 2006, p. 46–53.

SANTOS, A. M. P. **Produção de Oligossacarídeos por Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus***. Campinas, 2002. 91p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SCHNEIDER, A. L. S. **Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907**. Florianópolis, 1998. 137p. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

SGUAREZI, C.; LONGO C.; CENI G.; BONI G.; SILVA M. F.; LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; 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.

SGUAREZI, C.; LONGO C.; CENI G.; BONI G.; SILVA M. F.; LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H. Inulinase production by agroindustrial residues: acid pretreatment of substrates and optimization of production, **Food Bioprocess Technology**, v.2 n. 18, p. 409–414, 2008.

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

SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; CONVERTI, A.; MAUGERI, F. F. Effects of carbon and nitrogen sources and oxygenation on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 249-261, 2009.

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

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

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

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

TREICHEL H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES M. I. Use of a sequential strategy of experimental design to optimize the inulinases production in a batch bioreactor, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 895-900, 2009.

TREICHEL, H., **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados.** Campinas, 2004, 100f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

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

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.

ZHANG, T.; CHI, Z.; ZHAO, C. H.; CHI, Z. M.; GONG, F. Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp. W0. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8166-70, 2010.