



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

SÍLVIO FRANCISCO DA SILVA

**PRODUÇÃO DE INULINASE POR *Aspergillus alabamensis* UTILIZANDO
MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO**

Recife
2023

SÍLVIO FRANCISCO DA SILVA

**PRODUÇÃO DE INULINASE POR *Aspergillus alabamensis* UTILIZANDO
MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos. Área de concentração: Micologia Aplicada.

Orientador (a): Profa. Keila Aparecida Moreira

Coorientador (a): Profa. Cristina Maria de Souza Motta

Recife

2023

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Silva, Sílvia Francisco da .
Produção de inulinase por *Aspergillus alabamensis* utilizando meio de cultura alternativo. / Sílvia Francisco da Silva. – 2023.

41 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Keila Aparecida Moreira.
Coorientadora: Cristina Maria de Souza Motta.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências.

1. Inulina. 2. Fungos. 3. Enzima. 4. Yacon. 5. Alcachofra de Jerusalém I. Moreira, Keila Aparecida (Orient.). II. Motta, Cristina Maria de Souza (Coorient.). III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-060

SÍLVIO FRANCISCO DA SILVA

**PRODUÇÃO DE INULINASE POR *Aspergillus alabamensis* UTILIZANDO
MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos. Área de concentração: Micologia Aplicada.

Aprovado em: 27/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira (Orientadora)
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco - UFAPE

Dra. Polyanna Nunes Herculano (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. JOSÉ ERICK GALINDO GOMES, OUTRA (Examinador Externo)
Universidade Federal Do Agreste de Pernambuco - UFAPE

RESUMO

As inulinases são enzimas que hidrolisam a inulina, tendo como subproduto final frutooligossacarídeos (FOS), frutose e um pouco de glicose. A indústria alimentícia utiliza-se dos xaropes de frutose como adoçante no preparo de seus alimentos, tornando um produto amplamente utilizado por apresentar características benéficas à saúde. A frutose obtida pela ação da inulinase sobre a inulina, produz quantidades significativas, com uma única reação enzimática. O presente trabalho avaliou isolados de *Aspergillus alabamensis*, como produtor da enzima inulinase, tendo como substrato a batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) ricas em inulina. Foram avaliados 20 isolados de *A. alabamensis*, procedentes da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Para a seleção do melhor substrato para a produção enzimática, foi utilizado um meio alternativo acrescidos de 15g dos tubérculos que foram triturados em liquidificador, e utilizando o método da fermentação submersa. Os fungos foram reativados em meio ágar extrato de malte (MEA) e transferidos para o meio alternativo numa concentração de esporos a $2,0 \times 10^6$. O processo de fermentação foi realizado por 96 h de forma constante, sob agitação constante a 200 rpm, a 28 °C. Após o período de fermentação, a biomassa microbiana foi separada por filtração para posterior secagem a 105 °C por 24 h e o líquido, denominado de extrato enzimático bruto, centrifugado e armazenado em freezer na temperatura de -20, para a quantificação e caracterização bioquímica da inulinase (pH, temperatura e íons). Foram selecionados os cinco maiores produtores de inulinase para quantificação de atividade. O pH ótimo para todos os isolados foi pH 4,8, apresentando estabilidade em uma faixa de pH entre 4,0 e 5,6 após 180 min. A temperatura ótima da inulinase de todos os isolados foi de 90 °C, permanecendo estável entre 80 e 90 °C durante 180 min. O íon Mn^{2+} , foi capaz de aumentar a atividade enzimática da inulinase produzida por todos os isolados selecionados. Dessa forma, a inulinase produzida por *Aspergillus alabamensis*, apresenta potencial para sua utilização em diferentes processos industriais.

Palavras-chave: inulina; fungos; enzima; yacon; alcachofra de Jerusalém

ABSTRACT

Inulinases are enzymes that hydrolyze inulin, with the final byproduct being fructooligosaccharides (FOS), fructose and a little glucose. The food industry uses fructose syrups as a sweetener in the preparation of their foods, making it a widely used product as it has beneficial health characteristics. Fructose obtained by the action of inulinase on inulin produces significant quantities, with a single enzymatic reaction. The present work evaluated isolates of *Aspergillus alabamensis*, as a producer of the inulinase enzyme, using yacon potato (*Smallanthus sonchifolius*) and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) rich in inulin as substrate. 20 isolates of *A. alabamensis* were evaluated, coming from the URM Micoteca at the Federal University of Pernambuco – UFPE. To select the best substrate for enzyme production, an alternative medium was used plus 15g of tubers that were crushed in a blender and using the submerged fermentation method. The fungi were reactivated on malt extract agar (MEA) and transferred to the alternative medium at a spore concentration of 2.0×10^6 . The fermentation process was carried out for 96 h in a constant manner, under constant stirring at 200 rpm, at 28 °C. After the fermentation period, the microbial biomass was separated by filtration for subsequent drying at 105 °C for 24 h and the liquid, called crude enzyme extract, was centrifuged and stored in a freezer at a temperature of -20, for the quantification and biochemical characterization of inulinase (pH, temperature and ions). The five largest inulinase producers were selected for activity quantification. The optimum pH for all isolates was pH 4.8, showing stability in a pH range between 4.0 and 5.6 after 180 min. The optimum temperature for inulinase in all isolates was 90 °C, remaining stable between 80 and 90 °C for 180 min. The Mn^{2+} ion was able to increase the enzymatic activity of inulinase produced by all selected isolates. Therefore, inulinase produced by *Aspergillus alabamensis* has potential for use in different industrial processes.

Keywords: inulin; fungi; enzyme, yacon; Jerusalem artichoke

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da inulina.....	13
Figura 2 - Estrutura cristalina da exo-inulinase.....	14
Figura 3 - Mecanismo de ação das inulinases.....	15
Figura 4 - Efeito do pH na atividade específica da inulinase de isolados de <i>Aspergillus alabamensis</i>	25
Figuras 5 – 9 - Efeito do pH na atividade específica da inulinase de <i>Aspergillus alabamensis</i> em diferentes tempos de incubação.....	26 – 27
Figura 10 - Efeito da temperatura na atividade da inulinase de <i>Aspergillus alabamensis</i> URM 4199.....	28
Figuras 11 – 15 - Efeito da temperatura na atividade específica da inulinase de <i>Aspergillus alabamensis</i> em diferentes tempos de incubação.....	39 - 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de <i>Aspergillus alabamensis</i> procedentes da Micoteca URM/UFPE.....	20
Tabela 2 - Produção de inulinase por <i>Aspergillus alabamensis</i> procedentes da Micoteca URM/UFPE.....	24
Tabela 3 - Efeito de diferentes íons metálicos na atividade enzimática da inulinase produzida por isolados de <i>Aspergillus alabamensis</i>	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. alabamensis</i>	<i>Aspergillus alabamensis</i>
AF	Alimento Funcional
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
BDA	Ágar batata dextrose
BSA	Albumina de soro bovino
DNSA	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EB	Extrato bruto
FAS	Fibra alimentar solúvel
FOS	Frutooligossacarídeos
M	Molar
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
PE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
TGI	Trato gastrointestinal
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
µL	Microlitro
µm	micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Inulina.....	12
2.2 Inulinase.....	13
2.3 <i>Aspergillus alabamensis</i>	16
2.4 Substratos vegetais utilizados para a produção de inulinases.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Isolados de <i>Aspergillus alabamensis</i>	19
3.2 Preparo de Inóculo.....	21
3.3 Preparo do meio de cultura alternativo.....	21
3.4 Crescimento fúngico e produção de inulinase extracelular.....	21
3.5 Determinação de biomassa.....	21
3.6 Atividade enzimática da inulinase.....	21
3.7 Efeito do pH e da temperatura.....	22
3.8 Determinação de proteína total.....	22
3.9 Efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Efeito do pH na atividade da inulinase.....	25
4.2 Efeito da temperatura na atividade da inulinase.....	27
4.3 Efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática da inulinase.....	31
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS.....	34 - 41

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são definidas como biocatalisadores, que desempenham um papel crucial na aceleração de diversas reações e processos metabólicos (THAPA *et al.*, 2019). Estas moléculas têm se tornado fatores importantes no desenvolvimento de diferentes bioprocessos industriais devido às características como o baixo consumo de energia, por serem ecologicamente viáveis, pela alta eficiência e especificidade de substrato (LIU *et al.*, 2013; THAPA *et al.*, 2019). A produção de enzimas a partir de microrganismos possui extensa aplicação na indústria alimentícia, buscando a melhoria do processo de produção e outros componentes relacionados como: sabor, aroma, cor, textura, aparência, vida de prateleira e valor nutritivo (SRIVASTAVA, 2019).

Microrganismos de relevância industrial como *Aspergillus oryzae*, *Bacillus licheniformis*, *Candida cylindracea* e *Trichoderma reesei* são conhecidos por serem produtores de proteases, lipases e celulasas (WEISS, 2020). A indústria de enzimas microbianas representa aproximadamente 90% do mercado de biocatalisadores (TERESITA, 2019). Diante do aumento crescente e da alta aplicabilidade de enzimas na indústria, tornam-se necessário estudos a respeito dos fatores que influenciem na produção de enzimas, sendo o avanço da tecnologia enzimática de extrema importância para o desenvolvimento de processos biotecnológicos (SINGHANIA *et al.*, 2015).

As inulinases pertencem a um grupo de enzimas que atuam na produção de frutose com grande importância industrial. Essas enzimas termoestáveis têm ampla aplicação na indústria na produção de soros de frutose e na síntese de frutooligosacarídeos. Além disso, essas enzimas também podem ser empregadas na produção de biocombustíveis. (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

No âmbito industrial da produção de inulinases sintetizadas por microrganismos, algumas empresas são encontradas, podendo-se citar a empresa irlandesa Megazyme, a qual produz endo-inulinase e exo-inulinase ultrapura, a partir de cepas recombinantes de *Aspergillus niger*, com os nomes comerciais de E-Endoian e E-Exoian. Essas enzimas estão disponíveis separadamente para aplicações de pesquisa, mas também estão disponíveis incorporadas aos kits analíticos Fructan e Fructan HK. A exo-inulinase de *A. niger* é também comercializada pela Sigma-Aldrich (EUA) com o nome comercial Fructozyme (SINGH *et al.*, 2017). Muitos microrganismos produzem exo-inulinase ou endo-

inulinase, mas algumas espécies microbianas são conhecidas por produzir ambas as formas de inulinase (SINGH *et al.*, 2010).

O presente estudo objetivou a produção de exo-inulinase por meio de fermentação submersa de *Aspergillus alabamensis*, utilizando alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) e batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) como substratos alternativos e de baixo custo.

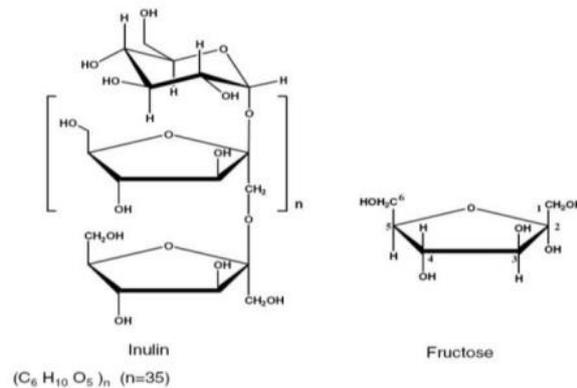
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inulina

A inulina é um polissacarídeo complexo formado por unidades de frutose, amplamente utilizado na indústria alimentícia como aditivo. É um polímero formado por cadeias repetitivas da fração frutossil, unidas por ligações β -2,1 em porções de terminação glucosil (Figura 1), sendo um polissacarídeo solúvel em água muito utilizado na indústria, assim como o amido. As primeiras estimativas de sua massa molecular forneceram valores da ordem de 5.000g/mol (LÓPEZ CASTREJÓN *et al.*, 2020).

Para a produção da maioria das enzimas, se faz necessário um indutor potente, utilizado como fonte de carbono para que ocorra a biossíntese enzimática. A inulina se destaca como uma fonte ideal para a produção de inulinase, embora já tenham sido descritos outros substratos para produção dessa enzima, como glicose, frutose, lactose, etc. Esse polímero está presente em uma quantidade considerável em bulbos, tubérculos e raízes tuberosas de muitas plantas como *Asparagus officinalis* (Shatwaar), *Cichorium intybus* (Chicória), *Dahlia pinnata* (Dahlia), *Espargos racemosus* (Shatavari), *Helianthus tuberosus* (Alcachofra de Jerusalém), *Hordeum vulgare* (Cevada) e *Taraxacum officinale* (Dente de Leão), (SINGH *et al.*, 2010).

Figura 1. Estrutura química da inulina



Fonte: VANDEPUTTE *et al.* (2017)

Além de desempenhar funções de armazenamento de energia, a inulina nas plantas apresenta um papel essencial na tolerância ao estresse abiótico, e sua função osmorreguladora pode proteger as plantas das tensões da seca, do sal do ambiente e do frio (APOLINÁRIO *et al.*, 2014). Nesse contexto, os materiais vegetais ricos em inulina podem ser utilizados como fontes potentes para vários bioprocessos (ONILUDE; FADAUNSI; GARUBA, 2012). As matérias-primas inulinadas têm sido extensivamente utilizadas para a produção de inulinases, inulooligossacarídeos, biocombustíveis, ácidos orgânicos, óleo, proteínas de célula, manitol, sorbitol, 2,3-butanodiol e pululano, sendo utilizada principalmente na síntese de xarope de alta frutose, inulinases, frutooligossacarídeos e biocombustíveis (SINGH *et al.*, 2019).

2.2 Inulinase

As inulinases (Figura 2) são uma classe de enzimas que hidrolisam a ligação β -2,1 glicosídica para produzir frutose, inulooligossacáridos e glicose. As inulinases são produzidas por fungos, bactérias, leveduras e actinomicetos (NEAGU; BAHRIM, 2011).

Figura 2 . Estrutura cristalina da exo-inulinase



Fonte: Estrutura disponível na base de dados RCSB PDB (*Protein Data Bank*)

<https://www.rcsb.org/3d-view/6J0T/1>

A inulinase é uma enzima presente em alguns organismos como plantas, fungos e bactérias (CHI, Zhenming et al. 2009), e a cada dia o seu uso em processos industriais vêm ganhando espaço pois apresenta uma vasta aplicabilidade neste setor. Por se tratar de uma enzima hidrolítica: que quebra as ligações químicas através da adição de uma molécula de água, os microrganismos utilizam-se dessa enzima para degradar substratos que contenham polissacarídeos ou outro tipo de carboidratos para o seu crescimento.

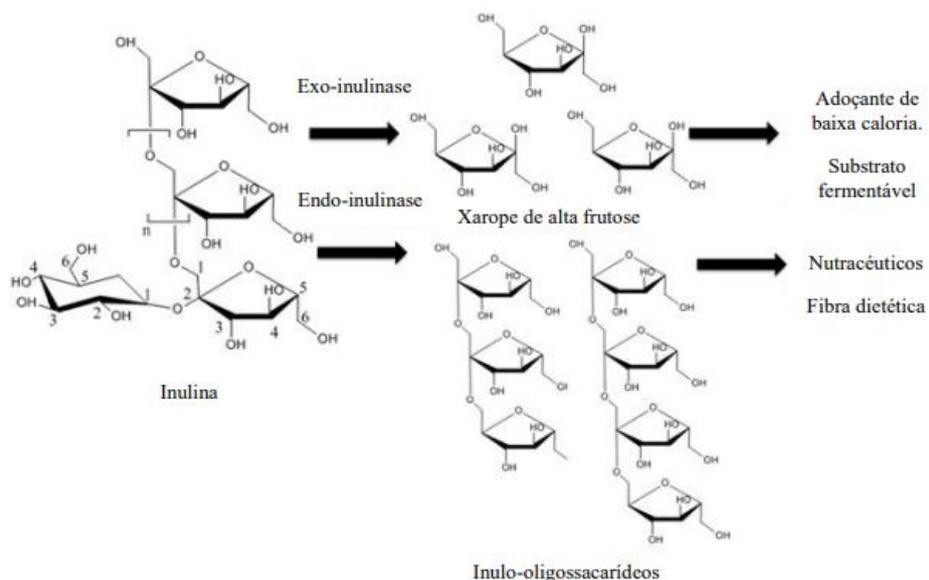
Dentre os grupos produtores de inulinase, destacam-se os fungos, pois apresentam inúmeras características desejáveis, como o cultivo em substratos de baixo custo e estabilidade enzimática em alta temperatura e baixo pH. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais utilizados para a produção de enzimas, com destaque para a inulinase (SINGH; CHAUHAN, 2017).

A enzima inulinase é empregada em vários processos, como na produção de frutose pela hidrólise enzimática da inulina, na obtenção de fruto-oligossacarídeos (FOS) e na síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose (GOLUNSKI, 2014). As

inulinases são divididas em dois grandes grupos: as exo-inulinases e as endo-inulinases (Figura 3). As exo-inulinases produzem xaropes com alta concentração de frutose com conteúdo de D-frutose acima de 95%, agindo na unidade de frutose terminal da inulina. Enquanto, as endo-inulinases hidrolisam as ligações glicosídicas β -2,1 internas da inulina para produzir xaropes de oligofrutose (SINGH *et al.*, 2017). As inulinases são enzimas versáteis pertencentes ao grupo de glicosídeo hidrolases (GH) família que consiste em endo-inulinase (EC 3.2.1.7), frutano β -(2,1)-fructosidase (EC 3.2.1.153), exo-inulinase (EC 3.2.1.80), 1,2- β -frutano 1^F-frutosiltransferase (EC 2.4.1.100) e sacarose 1^F-frutosiltransferase (EC 2.4.1.99) (SINGH *et al.*, 2020).

Exo-inulinases, produzidas por microrganismos, podem remover os resíduos terminais de frutose do final não redutor da molécula de inulina em somente um passo, produzindo glicose e frutose, que podem ser fermentadas facilmente em etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Algumas linhagens de leveduras podem realizar simultaneamente a hidrólise e a fermentação da inulina, como *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces spp.*, o que pode facilitar ainda mais o processo caso um grande rendimento seja alcançado (CHI *et al.*, 2011). Estes oligofrutanos apresentam larga aplicação em diversos tipos de alimentos como preparações de frutas, doces, sobremesas de leite, iogurte, queijo fresco, bolos, biscoitos, chocolates, sorvetes e molhos (KAUR & GUPTA, 2002).

Figura 3. Mecanismo de ação das inulinases



Fonte: JIANG *et al.* (2017).

As inulinases de fungos filamentosos são usadas para melhorar o processo de hidrólise da inulina na indústria de alimentos para produção de álcool, acetona e butanol (LIU *et al.*, 2010; ABU EL-SOUOD *et al.*, 2014).

Tradicionalmente, a inulinase é produzida por fermentação submersa ou líquida (SELVAKUMAR; PANDEY, 1999; KALIL *et al.*, 2001; GILL *et al.*, 2003). Contudo, essa produção se vê afetada pela composição do meio, custos das matérias-primas, tipo de microrganismo utilizado para a fermentação e as condições de incubação (LIU *et al.*, 2005; XIONG *et al.*, 2007). Portanto, para compensar o custo de produção da inulina, diversos materiais vegetais como alcachofra, chicória, yacon, resíduos industriais, entre outros, são empregados no enriquecimento do meio (CAZETTA *et al.*, 2005; CONTADO, 2009; CHAND *et al.*, 2012; CHESINI *et al.*, 2013). Após a seleção do processo de fermentação, a formulação do meio para a produção de inulinase é uma questão crucial para atingir o ideal crescimento microbiano e a produção aprimorada da enzima (SINGH *et al.*, 2018).

O mercado global de enzimas foi avaliado em US \$ 7,1 bilhões em 2017 e deverá chegar a US\$ 10,5 bilhões em 2024, com uma taxa de crescimento anual de 5,7% de 2018 a 2024. Sendo que, a Europa foi responsável por 1/3 de produção global de enzimas em 2017 e no mesmo ano, estimou-se que cerca de 70% da quota de mercado de enzimas era produzida por microrganismos (PAPADAKI *et al.*, 2020; RIGO *et al.*, 2021).

2.3 *Aspergillus alabamensis*

Os fungos compreendem organismos extremamente diversificados com características comuns aos vegetais e outras aos animais, o que tornou sua posição polêmica entre os seres vivos durante um longo período (GOMES, 2022), passando a ter o seu próprio reino. Por estar presente em quase todo o planeta, os fungos ainda não foram estudados e descritos por completo, aproximadamente 99.000 espécies de fungos estão descritas (KIRK *et al.*, 2008), o que representa apenas 6,6% das 1.500.000 espécies estimadas no mundo (HAWKSWORTH, 2001). Devido ao seu potencial de produzir compostos enzimáticos, hoje os fungos são utilizados como importantes fontes na produção de enzimas de interesse industrial e na biotransformação (MENDOZA *et al.*, 2022).

Cepas de fungos estão emergindo como potentes candidatos à produção de inulinase, pois possuem inúmeras características desejáveis, como seu cultivo, que ocorre em substratos de baixo custo, além das enzimas fúngicas apresentarem maior estabilidade em alta temperatura e baixo pH. Dessa forma, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., são os gêneros mais comuns usados para a produção de inulinase (SINGH; CHAUHAN, 2016).

Aspergillus alabamensis foi descoberto por Balajee e colaboradores em 2009, enquanto investigavam linhagens de *Aspergillus terreus* em um estudo de sequência multilocus (MLST) de três genes codificadores de proteínas: enolase (enoA), β -tubulin (benA) e calmodulin (calM) (BALAJEE *et al.*, 2009). *Aspergillus alabamensis* é uma espécie críptica identificada apenas pelo sequenciamento multilocus. Tem um padrão de suscetibilidade idêntico ao *A. terreus* com concentrações inibitórias mínimas elevadas para anfotericina B (BALAJEE, S.A. *et al.*, 2009). Embora *A. alabamensis* tenha sido encontrado morfologicamente semelhante ao *Aspergillus terreus* por estudos morfológicos, os dois diferem significativamente nas vias metabólicas ativas (BALAJEE *et al.*, 2009). Os pesquisadores escolheram a espécie epíteto "*alabamense*" para refletir sua origem geográfica de cepas que compreendem o novo clado com 11 dos 14 isolados originários de espécimes obtidos da Universidade do Alabama em Birmingham nos Estados Unidos (BALAJEE *et al.*, 2009). Os outros três isolados foram derivados de isolados de solo coletados na Argentina e na Flórida.

Aspergillus alabamensis produz colônias de crescimento lento que são brancas lanosas, tornando-se marrom-amarela para canela-marrom em cores com o início da esporulação assexuada. Os conidióforos são incolores e lisos com cabeças conidiais densamente colunares de 30 a 50 μm de diâmetro e 150-500 μm de comprimento. As vesículas são subglobosa e com diâmetro de 10-16 μm . A metula anexada às vesículas está estreitamente embalada, medindo de 5,5 a 7,5 μm de comprimento por 1,5-2,0 μm de largura. Fiálides anexados aos ápices da metula têm 5,0-7,0 μm de comprimento por 2,0-2,5 μm de largura. O conídio decorrente das pontas das fiálides são ligeiramente elípticas e de paredes lisas atingindo um diâmetro de 1,8-2,4 μm (BALAJEE *et al.*, 2009).

Enquanto *Aspergillus alabamensis* podem crescer entre 25-50 °C, sua temperatura de crescimento ideal é de 37 °C (BURROUGH *et al.*, 2012). *A. alabamensis* pode crescer *in vitro* em uma gama de meios de crescimento, incluindo ágar de floco de batata, ágar folha de cravo (BURROUGH *et al.*, 2012), ágar Czapek levedura autolisada, e ágar extrato de malte. Esta espécie é capaz de utilizar glicose e sacarose como fontes de carbono (BALAJEE *et al.*, 2009).

2.4 Substratos vegetais utilizados para a produção de inulinases

A batata yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob] é oriunda das montanhas dos Andes, localizada na região sul da América do Sul, e faz parte da família botânica Asteraceae. A yacon é uma espécie herbácea perene, com altura variando de 1,5 a 3,0 m e apresenta um sistema radicular formado por 4 a 20 tubérculos, onde armazena 3 a 10% de inulina e frutooligossacarídeos (FOS) (CAZETTA *et al.*, 2005). A yacon foi introduzida no Brasil em meados dos anos 90 (SALVADOR *et al.*, 2012) após ter seu consumo fortemente negligenciado nos anos 80, podendo ser consumida crua (*in natura*) em saladas ou como fruta, além de ser conhecida como potencial “planta medicinal” (SALES *et al.*, 2010).

As raízes da batata yacon são compostas principalmente por carboidratos de baixo teor energético e fibras insolúveis, tais como FOS e inulina. Na literatura, essas raízes são frequentemente mencionadas como fontes prebióticas, podendo ser consumidas na forma desidratada ou utilizadas como matéria-prima para a criação de produtos que promovem a saúde, como geleias, xaropes, farinhas e, especialmente, alimentos direcionados a pessoas com diabetes (MARQUES *et al.*, 2020). Essa raiz tuberosa é considerada um alimento funcional (AF) devido a sua composição nutricional, rica em componentes bioativos, como as fibras alimentares solúveis (FAS) que possuem ação probiótica, estimulando de forma seletiva o crescimento e a atividade de bactérias intestinais com participação dos FOS e da inulina, devido, a sua baixa digestibilidade no trato gastrointestinal (TGI) superior, (YAN *et al.*, 2019).

A alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.) é originária da América do Norte, e acredita-se que seja uma das mais antigas culturas cultivadas no hemisfério Norte. A primeira menção relatada na história sobre o cultivo da alcachofra de Jerusalém foi descrita pelo explorador francês Samuel de Champlain, quando o mesmo relatou o uso da planta por índios norte-americanos (KAYS *et al.*,

2008). Morfologicamente, as plantas de alcachofra de Jerusalém possuem sistema radicular fibroso, constituído por raízes adventícias, onde as mesmas são formadas secundariamente através da degeneração da raiz primária e que não se originam a partir da radícula do embrião (ALLA NA *et al.*, 2014) . Os tubérculos representam os principais propágulos reprodutivos e principal órgão de reserva. Esses tubérculos são do tipo caulinar hipógeo, onde o órgão vegetal encontra-se no solo e apresenta crescimento subterrâneo (KAYS *et al.*, 2008).

Culturas de *Helianthus tuberosus* possuem alto valor econômico, associado a seu principal carboidrato de reserva, a inulina. Sendo assim, essa planta apresenta-se como matéria prima para a obtenção de inulina, oligofrutanos, frutose e etanol (BHAGIA S. *et al.*, 2017). A essa planta, estima-se uma concentração de carboidrato/inulina de 16 – 20% em seus tubérculos (SOUZA, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados de *Aspergillus alabamensis*

Vinte isolados de *Aspergillus alabamensis* foram disponibilizados pela Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife-PE. Os Isolados utilizados no presente trabalho estavam preservados sob o método de óleo mineral e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Isolados de *Aspergillus alabamensis* procedentes da Micoteca URM/UFPE.

Registro URM	Espécie	Procedência	Ano de estoque
1876	<i>A. alabamensis</i>	Solo	1963
3858	<i>A. alabamensis</i>	Solo/ Açude meio sul	1998
4128	<i>A. alabamensis</i>	Rizosfera de girassol com 75 dias de cultivo	1999
4199	<i>A. alabamensis</i>	Rizosfera de girassol com 50 dias de cultivo	1999
4347	<i>A. alabamensis</i>	Solo	2001
4362	<i>A. alabamensis</i>	Solo	2001
4658	<i>A. alabamensis</i>	Solo	2003
5061	<i>A. alabamensis</i>	Solo	2005
5093	<i>A. alabamensis</i>	Solo	2005
5219	<i>A. alabamensis</i>	Solo	2006
5222	<i>A. alabamensis</i>	Solo	2006
5251	<i>A. alabamensis</i>	Rizosfera de <i>Croton</i> sp. (Euphorbiaceae)	2006
5254	<i>A. alabamensis</i>	Rizosfera de <i>Cereus</i> sp. (Cactaceae)	2006
5255	<i>A. alabamensis</i>	Rizosfera de <i>Croton</i> sp. (Euphorbiaceae)	2006
5270	<i>A. alabamensis</i>	Rizosfera de <i>Mimosa</i> sp. (Euphorbiaceae)	2006
5579	<i>A. alabamensis</i>	Sedimento do manguezal (Rio Pirapama)	2007
5864	<i>A. alabamensis</i>	Torta de mamona industrial	2008
5961	<i>A. alabamensis</i>	Solo de Caatinga	2009
7000	<i>A. alabamensis</i>	Solo de área de caatinga do PARNA Catimbau	2013
7211	<i>A. alabamensis</i>	Solo cultivado contaminado pelo agrotóxico clorpirifós	2015

3.2 Preparo do inóculo

Os isolados de *A. alabamensis* foram crescidos em ágar batata dextrose e incubados a 30 °C por 72 h. Os esporos foram suspensos em solução salina estéril a 0,85% (p/v) contendo Tween 80 a 0,01% (p/v) para obter $2,0 \times 10^6$ esporos/mL. Para todos os experimentos, foram utilizados 0,5 mL desta suspensão.

3.3 Preparo do meio de cultura alternativo

Para a produção do meio de cultura foram utilizados tubérculos de batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e de alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.) como substrato. A utilização dessas plantas, se deu, por apresentarem a inulina como carboidrato de reserva presente nos tubérculos. O meio alternativo utilizado para produção de inulinase foi preparado de acordo com Ongen-Baysal *et al.*, 1994, com modificação pela incorporação dos tubérculos citados: NH_4NO_3 : 2,3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 3,7 g, KH_2PO_4 : 1,0 g, MgSO_4 : 0,5 g, extrato de levedura: 1,5 g, alcachofra de Jerusalém e batata yacon 15 g em 1000 mL de água destilada.

3.4 Crescimento fúngico e produção de inulinase extracelular

Os inóculos dos *A. alabamensis* foram adicionados a 50 mL do meio de cultura alternativo, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL e incubados a 28 °C, 200 rpm por 96 h. Após a fermentação, a biomassa micelial foi separada por filtração, e o líquido filtrado denominado extrato bruto (EB) foi estocado em freezer a -20 °C, para posterior determinação de proteínas totais, atividade da inulinase e caracterização enzimática de todos os isolados (temperatura, pH e íons).

3.5 Determinação de biomassa

A biomassa micelial de *A. alabamensis* foi obtida por filtração (papel Whatman nº 1) do meio fermentado. A biomassa foi determinada após lavagem da massa micelial com água destilada, seca a 105 °C por 24h e em seguida pesados, subtraindo o peso do papel.

3.6 Atividade enzimática da inulinase

O ensaio enzimático foi realizado de acordo com Kochhar *et al.* (1999). Alíquotas de 40 µL do EB foram adicionadas a 160 µL da solução de inulina para uma concentração final de 1% (p / v) em 0,1 M de tampão acetato de sódio (pH

4,8) e incubadas a 37 °C por 5 min. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico-DNSA (MILLER, 1959), sendo os açúcares redutores formados em termos de frutose. As misturas reacionais foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão utilizando frutose como açúcar numa concentração de 1µg a 5µg, para o controle, foi utilizado 40 µL de água destilada e 2 mL de DNSA.

3.7 Efeito do pH e da temperatura

Foram utilizados diferentes tampões, para analisar a influência do pH na atividade enzimática. O efeito do pH na atividade da inulinase foi investigado incubando o EB com soluções de inulina (1% p / v) preparadas em tampão acetato de sódio 0,1 M variando o pH de 3,6 a 5,6 a 37 °C. Para a análise de estabilidade, foram utilizados 40 µL do EB e 2 mL dos tampões com pH de 3,6; 4,0; 4,4; 4,8; 5,0; 5,4 mantendo a temperatura já descrita acima (SOUZA-MOTTA *et al.*, 2005).

Foram utilizadas diferentes temperaturas para investigar a influência na atividade enzimática. O estudo de temperatura foi realizado submetendo o EB a uma solução de inulina a 1% (p/v) em tampão 0,1M acetato de sódio pH 4,8, numa escala de temperatura que variou de 10 em 10 °C, que foi de 30 °C a 100 °C e para a análise de estabilidade, foram utilizados 2 mL do extrato e 2 mL da solução acetato de sódio 0,1M, pH 4,8 variando a temperatura de 40 °C a 90 °C (SOUZA-MOTTA *et al.*, 2005).

3.8 Determinação de proteína total

A determinação de proteínas, foi realizada utilizando o método baseado na absorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, determinada de acordo com Bradford (1976), que utiliza a albumina de soro bovino (BSA) como padrão de proteína. Foi utilizado 1,5 mL do reagente de Bradford e 50 µL do extrato enzimático, deixado por 5 min em temperatura ambiente e, em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Uma curva padrão com BSA na concentração 0,05µg a 1µg.

3.9 Efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática

Foram analisados os efeitos de diferentes íons na atividade enzimática da inulinase, com base em Nelson e Cox (2011): Na⁺Cl⁻, Mg²⁺SO₄²⁻, Ca²⁺2Cl⁻, K⁺Cl⁻,

$Zn^{2+}SO_4^{2-}$, $Fe^{2+}SO_4^{2-}$, $Ni^{2+}SO_4^{2-}$, $Mn^{2+}SO_4^{2-}$. Para realizar a atividade da enzima, foi utilizado 30 μ L do EB com 30 μ L da solução de cada íon numa concentração de 10 mM, acrescido de 1,0 g de inulina, incubou-se a mistura a 37 °C por 10 min no escuro, em seguida a reação foi interrompida com a adição 2 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA). Em seguida as soluções foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. Também foi realizado o teste controle, onde se utilizou 30 μ L do EB e 1,0 g de inulina, incubou-se a mistura a 37 °C por 10 min, em seguida a reação foi interrompida com a adição 2 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA), para ter uma comparação da ação dos íons.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relevância das enzimas em diversos processos e setores, como na indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica, cosmética entre outras é um grande motivo pelo qual se trabalhou a produção enzimática desses isolados fúngicos. Na Tabela 2, observa-se a produção da inulinase pelos isolados de *A. alabamensis*. Com base nos resultados obtidos, foram selecionados os isolados URM 4199, URM 4362, URM 4658, URM 5579, URM 7211, para as demais determinações analíticas, por apresentarem maiores valores de produção enzimática.

Tabela 2. Produção de inulinase por *Aspergillus alabamensis* procedentes da Micoteca URM/UFPE.

Registro URM	Inulinase (U/mL)
1876	0,697
3858	0,625
4128	0,793
4199	0,852
4347	0,727
4362	0,818
4658	0,809
5061	0,721
5093	0,600
5219	0,673
5222	0,736
5251	0,625
5254	0,770
5255	0,753
5270	0,455
5579	0,796
5864	0,711
5961	0,779
7000	0,605
7211	0,908

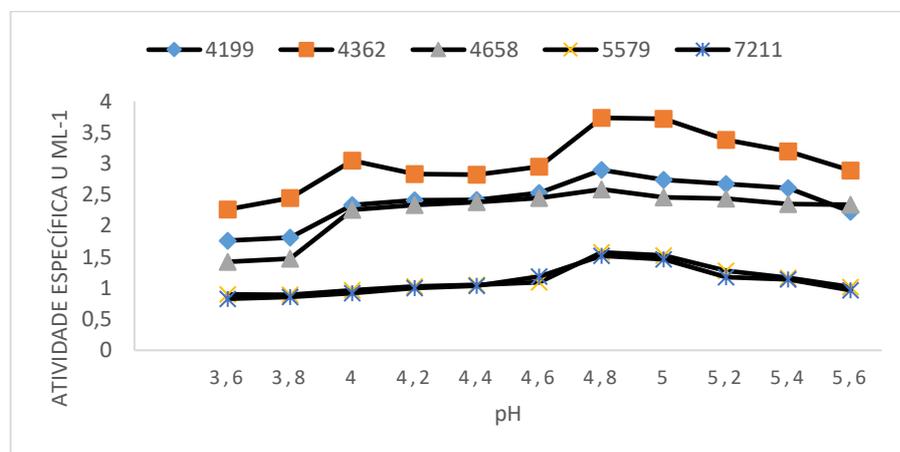
O gênero *Aspergillus* é relevante em relação a produção de metabólitos secundários, apresenta alta taxa de crescimento e grande termotolerância, que favorece a produção de bioprodutos com alto valor agregado (GOPINATH et al., 2013; MALDONATO, MACEDO, RODRIGUES, 2014; ZEN et al., 2014), diante disso, as inulinases microbianas são uma importante classe na indústria de enzimas que hidrolisam inulina para produzir frutose (SINGH e LOTEY, 2010 apud ABU EL-SOUOD et al., 2014), portanto, inulinases de fungos filamentosos são usadas para melhorar o processo de hidrólise da inulina usado na indústria de alimentos para produção de álcool, acetona e butanol (LIU et al., 2010 apud ABU EL-SOUOD et al., 2014).

4.1 Efeito do pH na atividade da inulinase

O pH é uma análise importante quando se trabalha com enzima, uma vez que, alterando o pH do meio, pode influenciar de forma significativa a atividade enzimática.

Os resultados da atividade enzimática do extrato obtido da fermentação submersa, com diferentes variações de pH são mostrados na Figura 4. A melhor atividade enzimática foi obtida em um pH de 4,8, sendo o pH de 3,6 o de menor atividade, para todas as amostras analisadas. Em um estudo utilizando a espécie *Aspergillus ficuum*, a inulinase produzida pela cepa apresentou estabilidade em pH 6-8 (CHEN *et al.*, 2009). Grauba e colaboradores (2020), afirmam que a inulinase produzida a partir de *Aspergillus tamaris* -U4 era estável em pH 5,0 a 6,0. De acordo com Gisele e colaboradores (2021), diferentes microrganismos e fontes de inulinase podem resultar em variações do pH ótimo da enzima. Assim, a presente pesquisa determinou que o *A. alabamensis* tem como pH ótimo, o pH de 4,8.

Figura 4. Efeito do pH na atividade relativa da inulinase de isolados de *Aspergillus alabamensis*.



Nas figuras de 2 a 6, é apresentada a estabilidade da enzima ao pH, para as cepas selecionadas, em tempo 0, 60, 120, e 180 min. Partindo do pH ótimo 4,8 pode-se observar que a enzima tende a manter a estabilidade, mesmo em diferentes condições de pH e tempo, sendo assim, a inulinase possui condições físico-químicas que a torna atrativa como por exemplo, sua estabilidade em valores de pH baixo 4-6 (MAKINO, 2004). Com exceção dos isolados URM 4658 e URM 5579 que tiveram suas estabilidades atrativas em pH 6,0 e pH 3,0 no tempo de 180 min, todas as outras mantiveram sua estabilidade entorno do pH 4,8 no tempo de 180 min. Logo, a

inulinase conseguiu hidrolisar a inulina presente no meio ácido, mantendo assim sua estabilidade mesmo no tempo de 180 min.

Figura 5. Efeito do pH na atividade específica da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 4199 em diferentes tempos de incubação.

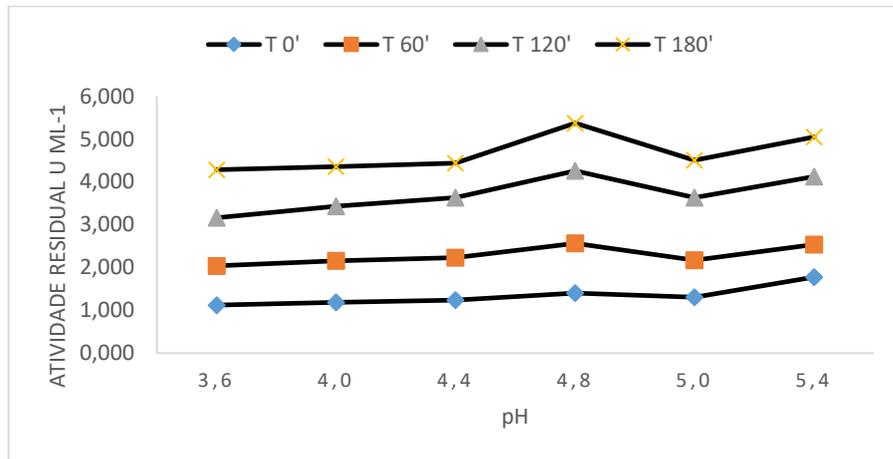


Figura 6. Efeito do pH na atividade específica da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 4362 em diferentes tempos de incubação.

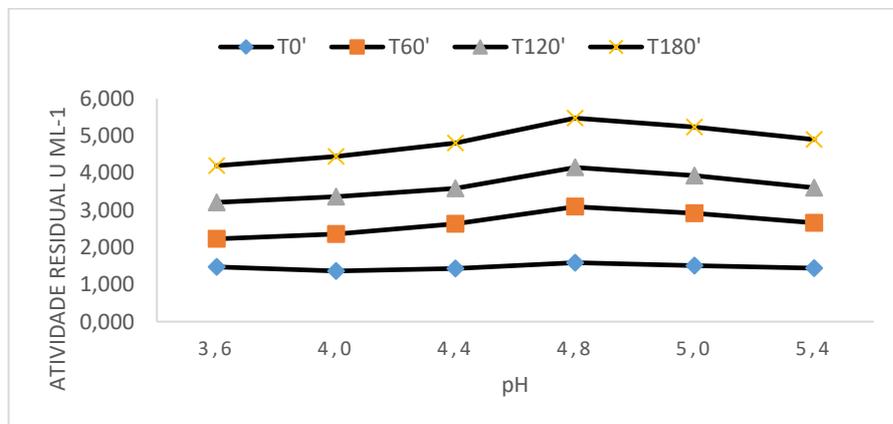


Figura 7. Efeito do pH na atividade específica da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 4658 em diferentes tempos de incubação.

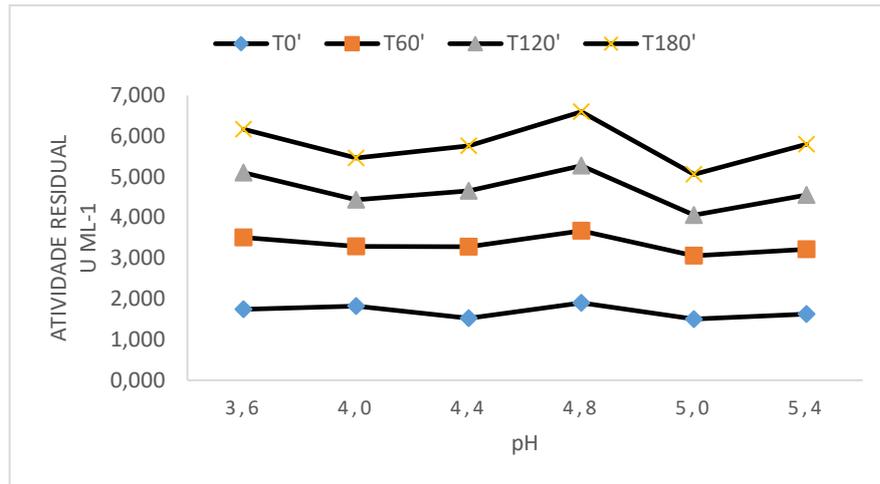


Figura 8. Efeito do pH na atividade específica da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 5579 em diferentes tempos de incubação.

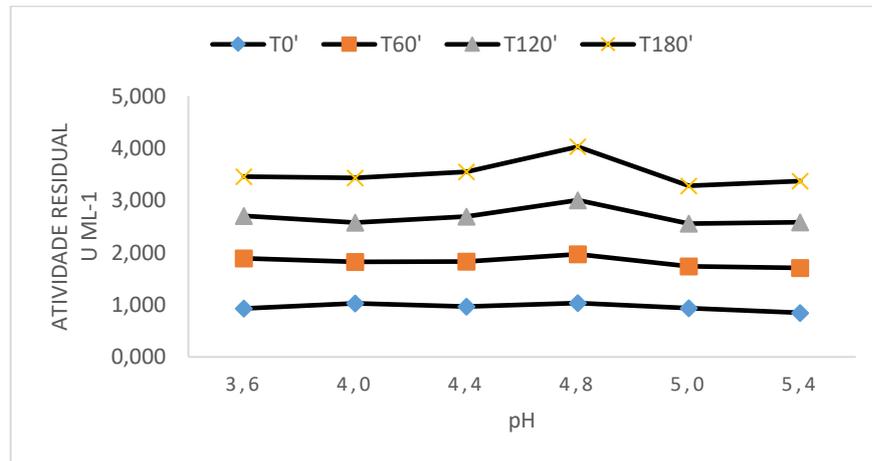
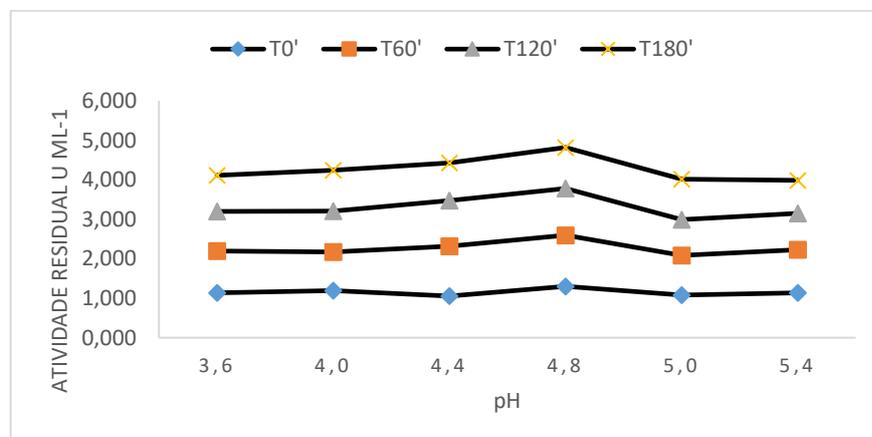


Figura 9. Efeito do pH na atividade específica da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 7211 em diferentes tempos de incubação.



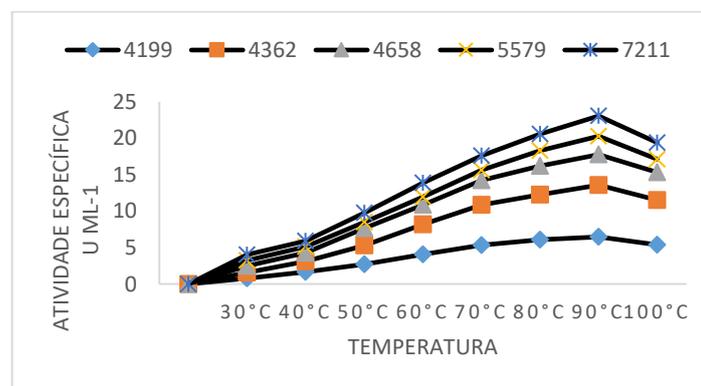
4.2 Efeito da temperatura na atividade da inulinase

A temperatura é um ponto muito importante a ser analisado, quando se trabalha com enzima, pois cada enzima apresenta uma faixa de temperatura ótima para o seu desempenho.

As inulinases produzidas pelos isolados de *Aspergillus alabamensis*, se mostraram como enzima de melhor desempenho em faixa de temperatura que variam 60 °C de 90 °C, como demonstrado na Figura 10. Quando analisada a faixa de temperatura de outras inulinases produzidas por outros fungos, pode-se observar diferenças enquanto a sua faixa de temperatura, em contraste com os resultados obtidos no presente trabalho. Na literatura, mostrando que inulinases de *Kluyveromyces marxianus* são estáveis em uma faixa de temperatura de 40 e 60 °C, independentemente do meio de crescimento (CAZETTA *et al.*, 2005; MAZUTTI *et al.*, 2010).

A temperatura ótima da enzima exo-inulinase produzida a partir de *Aspergillus tamarii* -U4 de 60 °C (GARUBA *et al.*, 2020), é a mesma relatada para as inulinases de *Aspergillus fumigatus* (RAWAT *et al.*, 2021), *Aspergillus niger* (GERMEC *et al.*, 2005) e *Aspergillus tubingensis* (TRIVEDI *et al.*, 2012). Também foi relatado que a atividade máxima da exo-inulinase produzida a partir de *Aspergillus niger* CH-A-2010, foi a 50 °C (HUITRO'N *et al.*, 2013). Já no experimento de Sharma *et al.* (2006), a temperatura ótima da inulinase de *Rhizopus microsporus* foi de 70 °C.

Figura 10. Efeito da temperatura na atividade da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 4199.



A atividade inulinásica com temperatura ótima superior a 50 °C, é um fator extremamente importante para a produção comercial de frutooligossacarídeos e frutose a partir da inulina, pois altas temperaturas garantem a solubilidade adequada da inulina e previnem a contaminação microbiana. Da mesma forma, uma alta

termoestabilidade também reduz o custo de produção de algumas enzimas usadas industrialmente, porque quantidades menores de enzima são necessárias para obter o produto desejado (VANDAME, *et al.*, 1983).

A estabilidade da enzima produzida por isolados de *A. allabamensis* em diferentes temperaturas e tempos de incubação pode ser observada nas figuras de 11 a 15. Ao analisarmos os dados, podemos perceber que a enzima teve como menor ponto de estabilidade a temperatura de 40 °C em tempo zero, o que se repetiu em todas os isolados analisados, na medida em que a temperatura foi aumentando, a enzima se mostrou com a sua atividade máxima de produção de inulinase entre 80 – 90 °C. Outros microrganismos como *Kluyveromyces* spp. produzem inulinases com atividade máxima entre 50 e 55 °C (MAZUTTI *et al.*, 2010), e *Aspergillus niger* que produzem inulinases com temperaturas ótimas entre 30 e 40 °C (KANGO, 2008).

Figura 11. Efeito da temperatura na atividade específica da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 4199 em diferentes tempos de incubação.

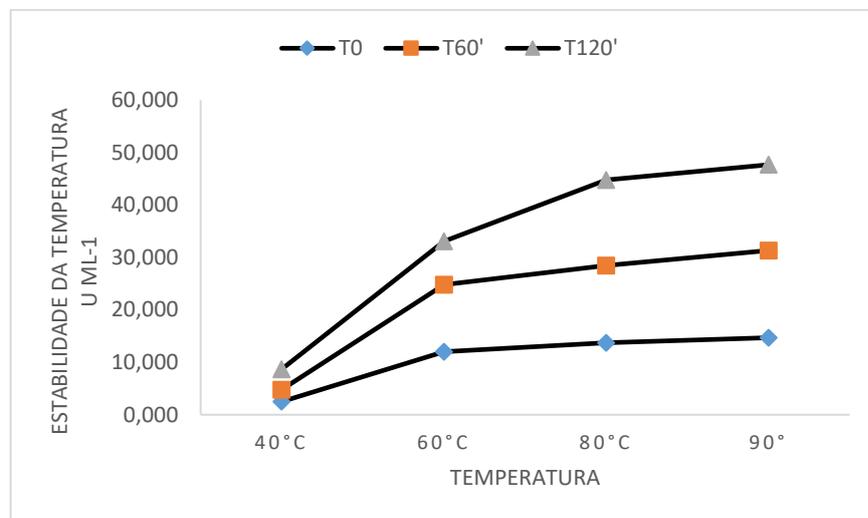


Figura 12. Efeito da temperatura na atividade específica da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 4362 em diferentes tempos de incubação.

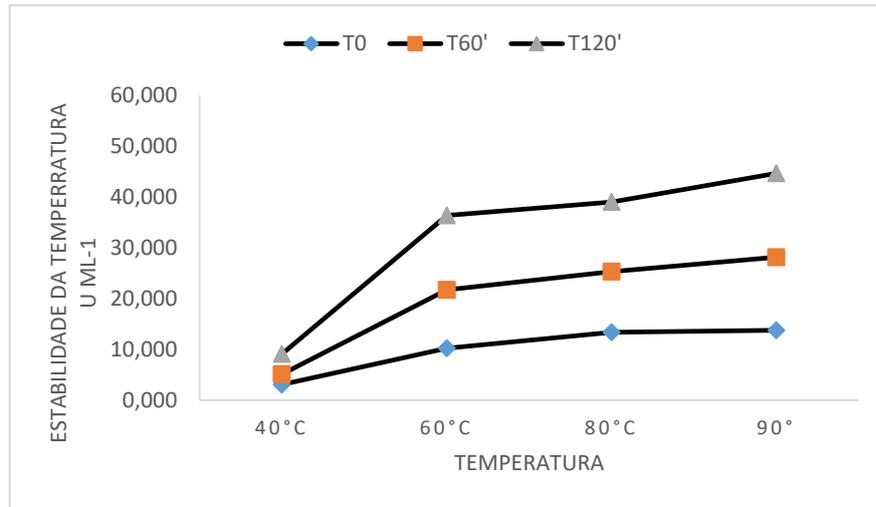


Figura 13. Efeito da temperatura na atividade específica da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 4658 em diferentes tempos de incubação.

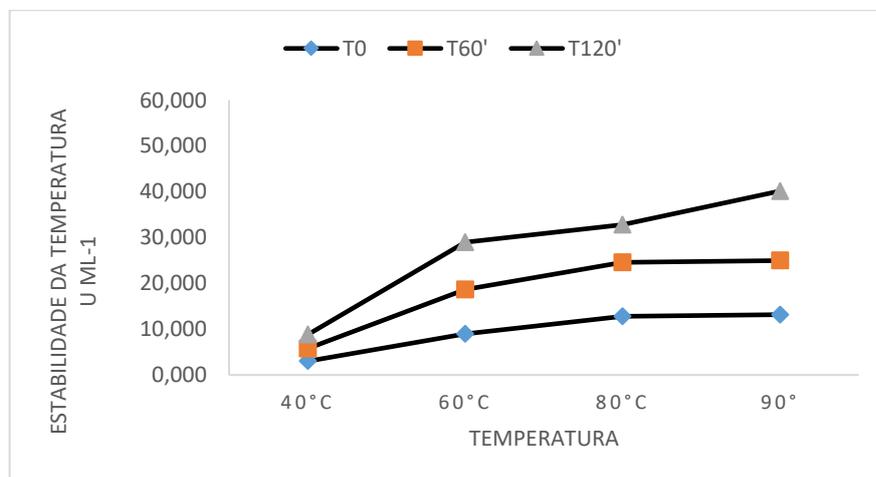


Figura 14. Efeito da temperatura na atividade específica da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 5579 em diferentes tempos de incubação.

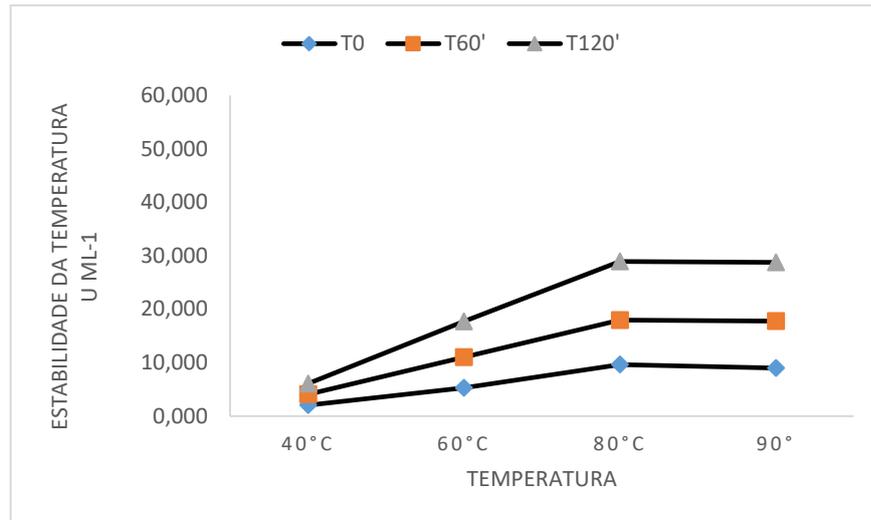
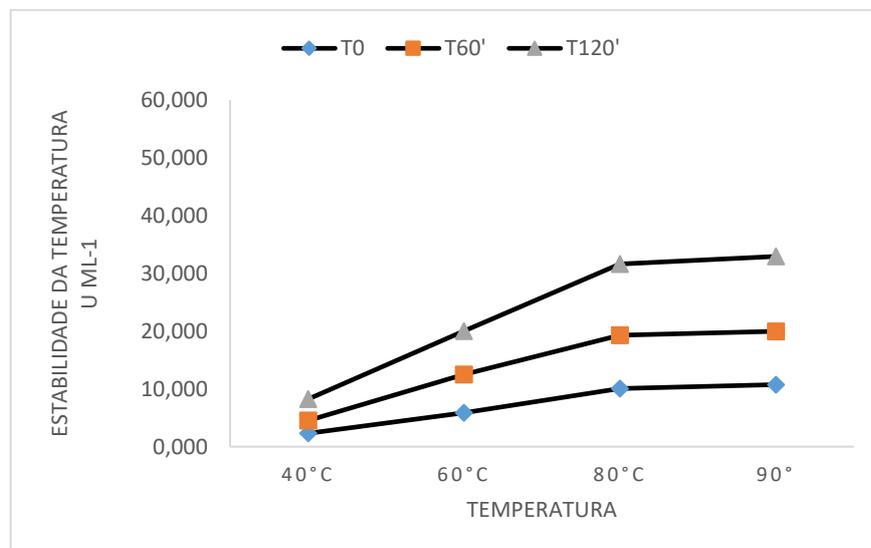


Figura 15. Efeito da temperatura na atividade específica da inulinase de *Aspergillus alabamensis* URM 7211 em diferentes tempos de incubação.



4.3 Efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática da inulinase

A presença de diferentes íons em uma combinação entre enzima-substrato pode ter efeitos tanto positivos como negativos na eficácia dessa ligação. Esses íons têm a capacidade de atuar como inibidores ou ativadores da ligação, resultando em uma diminuição ou aumento na atividade enzimática. Além disso, alguns íons podem causar desnaturação da enzima, afetando sua estrutura espacial. Entretanto, pode ocorrer o aumento da atividade enzimática na presença de determinados íons, pois este pode agir como indutor da enzima agindo como uma espécie de cofator que auxilia na ligação com o substrato, o que aumenta a atividade enzimática (NELSON; COX, 2011). Portanto, é extremamente importante saber quais íons podem alterar a atividade enzimática. Assim, foram analisados a influência de alguns íons metálicos, na forma de sais, sendo que as atividades residuais podem ser observadas na tabela 3.

Ao avaliar a atividade enzimática de *A. alabamensis* URM 5579, pode-se notar que 99% dos íons reduziram a atividade da inulinase em comparação ao controle. Por outro lado, ao analisar *A. alabamensis* URM 4362, os íons tiveram um papel importante, influenciando positivamente a atividade enzimática em comparação ao controle.

Destaca-se entre os íons testados o íon Mn^{2+} ($MnSO_4$), que majoritariamente aumentou a atividade enzimática em todos os isolados testados, podendo ser um íon de grande importância para a produção da inulinase, e isso também foi observado por Larissa (2018) em seu estudo com *Aspergillus thermomutatus*, no qual a maior ativação enzimática foi obtida com a adição de $MnSO_4$. Robson (2010), também avaliou o efeito de íons metálicos em seu experimento de caracterização enzimática e constatou um aumento significativo na atividade da inulinase ao utilizar o $MnSO_4$, assim como Rodríguez (2005).

Portanto, no presente trabalho, esse o íon Mn^{2+} ($MnSO_4$) foi um cofator importante que apresentou efeito positivo sobre a atividade da inulinase.

Tabela 3. Efeito de diferentes íons metálicos na atividade enzimática da inulinase produzida por isolados de *Aspergillus alabamensis*.

Atividade enzimática de <i>Aspergillus alabamensis</i>					
Íons	4199	4362	4658	5579	7211
Controle	4,710	1,870	3,200	4,930	3,600

NaC	5,900	6,300	5,300	3,200	3,600
MgSO ₄	5,900	6,200	5,300	2,900	3,600
CaCl ₂	5,500	6,300	4,900	2,700	3,500
KCL	5,700	6,500	5,000	3,000	3,000
ZnSO ₄	6,100	5,900	4,700	3,100	3,500
FeSO ₄	6,200	6,700	5,900	3,00	3,600
NiSO ₄	6,090	5,780	5,250	3,080	3,960
MnSO₄	7,440	8,710	7,800	5,300	6,440

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos através do presente trabalho puderam demonstrar que a inulina presente nos tubérculos das plantas utilizadas foi essencial para o crescimento de *Aspergillus alabamensis* no meio de cultura alternativo, sendo capaz de induzir a produção de inulinases. Logo, é possível perceber que isolados de *Aspergillus alabamensis* são capazes de produzir inulinase, na presença do meio de cultura alternativo contendo tubérculos de batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e de alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.).

Esse estudo também traz pontos importantes, como a estabilidade da enzima em pH e temperatura e sensibilidade aos íons, relevantes para a indústria que almeja trabalhar com essa enzima. A inulinase apresenta um pH ótimo de 4,8 e uma temperatura ótima de 90°C antes de sua desnaturação. Também se observa um aumento na atividade enzimática na presença de MnSO₄, sendo um ponto a ser analisado no futuro para melhorar a produção da inulinase pelo *A. alabamensis*. Este é o primeiro estudo que relata a produção de inulinase pela espécie *Aspergillus alabamensis*, sendo considerado como uma nova fonte promissora na produção da enzima.

REFERÊNCIAS

- ABU EL-SOUOD, S. M. *et al.* Partial purification of extracellular exo-inulinase from *Ulocladium atrum*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, Tanta, Egito, v. 12, 15-20 p, Jun. 2014.
- Alla NA, Domokos-Szabolcsy É, El-Ramady H, Hodossi S, Fári M, Ragab M, Taha H. Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.): A review of in vivo and in vitro propagation. *International Journal of Horticultural Science* 2014;20(3-4):131-136.
- APOLINÁRIO, A. C. *et al.* Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 368–378, 30 jan. 2014.
- Balajee SA, Baddley JW, Peterson SW, *et al.* *Aspergillus alabamensis*, a new clinically relevant species in the section Terrei. *Eukaryot Cell*. 2009;8:713–22.
- Bhagia S, Akinosho H, Ferreira J, Ragauskas A. Biofuel production from Jerusalem artichoke tuber inulins: a review. *Biofuel Research Journal*, Saint John 2017;4(2):587-599.
- BROWN, C. M; DULLOO, A. G; YEPURI, G.; MONTANI, J.P. Fructose ingestion acutely elevates blood pressure in healthy young humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*,v. 294, n. 1, p. 730–737, 2008.
- Burrough E, Deitz K, Kinyon J, Andreasen C, Frana T, Sutton D, Thompson E, Fu J, Wickes B, Hostetter J. Disseminated aspergillosis in a dog due to *Aspergillus alabamensis*. *Med Mycol Case*. 2012 Mar 1;1(1):1-4.
- 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.
- CHAND, S.; JAIN, P.C.; KANGO, N. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.1, n. 1, p.62-69, 2012.
- Chen, H.Q.; Chen, X.M.; Li, Y.; Wang, J.; Jin, Z.Y. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Food Chem.* **2009**, 115, 1206–1212.
- CHESINI M, NEILA LP, DE LA PARRA DF, ROJAS NL, ESQUIVEL JCC, CAVALITTO SF, GHIRINGHELLI PD, HOURS RA. *Aspergillus kawachii* produces an inulinase in cultures with yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as substrate. *Electron J Biotechnol*, v. 16, n. 3, p. 1-13, 2013.
- CHI, Z.; CHI, Z.; ZHANG, T.; LIU, G.; YUE, L. **Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, p. 211–220, 2009.

CHI, Z.; ZHANG, T.; CAO, T.; LIU, X.; CUI, W.; ZHAO, C. **Biotechnological potential of inulin for bioprocesses**. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4295–4303, 2011.

CONTADO, E. W. F. Obtenção, caracterização e utilização dos frutanos de tubérculos do Yacon (*Smallanthus sonchifolia*). Lavras, 2009. 162 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica– Universidade Federal de Lavras.

CORONA-GONZÁLEZ. Optimización de la producción de inulinases por *Saccharomyces* sp. a partir de agave tequilana weber variedad azul. *e-Gnosis*, v.3, n. 8, p. 1-10, 2005.

Das D, Ramananda BM, Selvaraj R. Review of inulinase production using solid-state fermentation. *Ann Microbiol.* 2019;69:201–9.

Das D, Selvaraj R, Bhat MR (2019a) Optimization of inulinase production by a newly isolated strain *Aspergillus flavus* var *flavus* by solid state fermentation of *Saccharum arundinaceum*. ***Biocatalysis and Agricultural Biotechnology***. 22:101363.

de Araujo Ribeiro GC, Fernandes P, Silva DAA, Brandão HN, de Assis SA. Inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa*: imobilização e aplicação na produção de frutooligossacarídeos. *Alimentos Sci Biotechnol.* 2021 jun 16;30(7):959-969. DOI: 10.1007/s10068-021-00931-x. PMID: 34395027; PMCID: PMC8302711.

DE PAULA, F.C.; CAZETTA, M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Food Chemistry*, v.111, n. 1, p.691-695, 2008.

Farias, Robson de Almeida. Estudo da produção de enzima lignolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora*. 2010.

FRANCK, A.; LEENHEER, L. Inulin. In: STEINBÜCHEL, A. (Ed.); RHEE, S. K.(Ed.) **Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry**. Wiley-VCH, 2005. p.281-322.

Garuba, E.O.; Onilude, A.A. Exo-Inulinase Production by a catabolite repression-resistant mutant Thermophilic *Aspergillus tamaris* -U4 in solid state fermentation. *Biotechnol. J. Inter.* **2020**, 24, 21–31.

GE, Y.; ZHOU, H.; KONG, W.; TONG, Y.; WANG, S.; LI, W. Immobilization of glucose isomerase and its application in continuous production of high fructose syrup. *Appl. Biochem. Biotech.*, v. 69, n. 1, p. 203-215, 1998.

Germec, M.; Turhan, I. Evaluation of carbon sources for the production of inulinase by *Aspergillus niger* A42 and its characterization. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2019**, 42, 1993–2005.

Germec M, Gürler HN, Ozcan A, Erkan SB, Karahalil E, Turhan I (2020) Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase. ***Bioprocess and biosystems engineering*** 43(2):217–232.

GILL, P. K.; SHARMA, A. D.; HARCHAND, R. K.; SINGH, P. Effect of média supplements and culture conditions on inulinase production by an Actinomycete strain. *Bioresource Technology*, v.87, n. 1, p.359–362, 2003.

Golunski, S. M. **Estratégias de purificação de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRLY-7571**. Erechim: URI, Set. 2014.

Gomes, B. S. . (2022). Análise do processo de ensino e aprendizagem sobre os fungos em livros didáticos do Ensino Médio. *Scientific Electronic Archives*, 15(5).

GOPINATH, S.B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed research international*, India, v.2013, 2013.

HAVEL, P.J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/ carbohydrate metabolism. *Nutr Rev*, v.63, n. 1, p. 133– 157,2005.

Hawksworth D.L. 2001. The Magnitude of Fungal Diversity: The 1.5 Million Species Estimate Revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432.

Huitrón, C.; Pérez, R.; Gutiérrez, L.; Lappe, P.; Petrosyan, P.; Villegas, J.; Aguilar, C.; Rocha-Zavaleta, L.; Blancas, A. Bioconversion of Agave tequilana fructans by exo-inulinases from indigenous *Aspergillus niger* CH-A-2010 enhances ethanol production from raw Agave tequilana juice. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 123–132.

JIANG, L. *et al.* Fermentative hydrogen production from Jerusalem artichoke by *Clostridium tyrobutyricum* expressing exo-inulinase gene. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 7940, 11 ago. 2017.

JOHNSON, R.J.; SEGAL, M.S.; SAUTIN, Y.; NAKAGAWA, T.; FEIG, D.I.; KANG, D.H.; GERSCH, M.S.; BENNER, S.; SANCHEZ-LOZADA, L.G. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*; v.86, n. 1, p. 899–906, 2007.

KALIL, S. J.; SUZAN, R.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.94, n.1, p.257–264, 2001.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. **Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition.** *Journal of Biosciences*, v. 27, p. 703–714, 2002.

KAYS, S. J, NOTTINGHAM, S. F. 2008. Biology and chemistry of the Jerusalem Artichoke: *Helianthus tuberosus* L. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; 2008. p. 498.

Kirk P.M.; Cannon P.F.; David J.C.; Stalpers J.A. (eds.) 2008. *Dictionary of the Fungi*, 11th ed. Wallingford: CABI Publishing.

Kochhar, A., Gupta, A. K. and Kaur, N. (1999), Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *J. Sci. Food Agri.*, 79, 594-554.

LIU, Y.; LIU, Q.; TAY, J. Initial conditions-dependent growth kinetics in microbial batch culture. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 1, p.155-160, 2005.

Liu, X.-Y., Chi, Z., Liu, G.-L., Wang, F., Madzak, C., Chi, Z.-M., 2010. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. *Metabol. Eng.* 12, 469–476.

LIU, L. *et al.* How to achieve high-level expression of microbial enzymes: Strategies and perspectives. *Bioengineered*, v. 4, n. 4, p. 212–223, 2013,

López Castrejón, M.L., Bengoechea, G., López Collado, S. & Aguilar, J.M. (2020). Propiedades reológicas y microestructurales de geles prebióticos de inulina. *AFINIDAD*, LXXVII (591), 175-181.

MADRIGAL, L. AND SANGRONIS, E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, v.57, n. 1, p.387-396, 2007.

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. 2004. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MALDONATO, R. R.; MACEDO, G. A.; RODRIGUES, M. I. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By-Products. *International Journal of Applied Science and Technology*, v.4, n.1, 108-115p, 2014.

Marques, C., Wojeicchowski, J. P., Cardoso, T., Mafra, M. R., Mitterer-Dalto´e, M. L., & Masson, M. L. (2020). Lactobionic acid as a suitable food preservative for yacon juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64(May), Article 102400. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102400>

Mazutti, M. A., Skrowonski, A., Boni, G., Zobot, G. L., Silva, M. F., Oliveora, D., ... Treichel, H. (2010). Partial characterization of inulinases obtained by submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates: a comparative study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(3), 682-693.

Mendoza AYG, Silva VV, Lima RA, Lima JPS. Potencialidades biotecnológicas dos fungos da amazônia brasileira: uma revisão sistemática. *Diversitas Journal*, v.7, n.4, p.2535-2551 2022.

Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.

NELSON, D; COX, M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Editora: Omega. 5ª Ed. 2011.

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

- OLIVEIRA, L. P. DE A. DE *et al.* Agave syrup as a substrate for inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 38, n. 3, p. 283, 8 dez. 2016.
- ONILUDE, A. A.; FADAUNSI, I. F.; GARUBA, E. O. Inulinase production by *Saccharomyces* sp. in solid-state fermentation using wheat bran as substrate. *Annals of Microbiology*, v. 62, n. 2, p. 843–848, jun. 2012.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, V.T.; KRIEGER, N.; JOSE, D. Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 81, n.1, p. 35–52, 1999.
- PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, N. K.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. T. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acidenzymes production process. *Bioresource Technology*, v. 309, 123317, 2020.
- Rawat, H.K.; Soni, H.; Suryawanshi, R.K.; Choukade, R.; Prajapati, B.P.; Kango, N. Exo-inulinase production from *Aspergillus fumigatus* NFCCI 2426: Purification, characterization, and immobilization for continuous fructose production. *J. Food Sci.* **2021**.
- RICCA, E.; CALABRÓ, V.; CURCIO, S.; DORIO, G. The State of the Art in the Production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Crit Rev Biotechnol*, v. 27, n. 1, p.129-145, 2007.
- RIGO D, GAYESKI L, TRES G, CAMERA F, ZENI J, VALDUGA E, CANSIAN R, BACKES G. Produção microbiológica de enzimas: Uma revisão. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021.
- 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.
- R.S. Singh, Taranjeet Singh, Muhammad Hassan, John F. Kennedy, Updates on inulinases: Structural aspects and biotechnological applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 164, 2020.
- SALES, R. L. COSTA, N. M. B. Yacon: Aspectos Nutricionais, Tecnológicos e Funcionais. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. Alimentos Funcionais-Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos. 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Rubio, 2010. p. 229-242
- SALVADOR, A.C.; DANTAS, M. I. S.; VASCONCELOS, C. M.; VANETTI, M.C.D.; RIBEIRO, S.M.R.; NERY-ENES, B.; NELSON, J. D.; MARTINO, H.S.D. Desarrollo de jalea de yacon de reducido valor calórico: caracterización físico-química, microbiológica y sensorial. *Revista Chilena de Nutrition*, v. 39, n. 3, 2012.
- SEGAL, M.S; GOLLUB, E.; JOHNSON R.J. Is the fructose index more relevant with regards to cardiovascular disease than the glycemic index? *Eur J Nutr*; v.46, n. 1, p.406–417, 2007.

- SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. Proc. Biochem., v. 34, n. 1, p. 851-855, 1999.
- Sharma, A. D., Kainth, S., and Gill, P. K.: Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. J. Food Eng., 77, 486e491 (2006).
- SILVA, A. T. C. R. ; MARTINEZ, K. C. L. ; BRITO, A. B. N. ; GIULIETTI, M. Separation of glucose and fructose by freezing crystallization. Crystal Research and Technology. v. 45, n. 1989, p. 1032-1034, 2010.
- SINGHANIA, R. R. *et al.* Industrial Enzymes. In: Industrial Biorefineries & White Biotechnology, p. 473-497, 2015.
- Singh, R.S., Lotey, S., 2010. Enhance exoinulinase production from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using response surface methodology. Braz. Arch. Biol. Technol. 53,1005–1013.
- Singh, R.S., Singh, R.P., 2010. Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. Food Technol. Biotechnol. 48, 435–450.
- Singh, R.S., 2011. Enzymatic preparation of high fructose syrup from inulin. In: Panesar, P.S., Sharma, H.K., Sarkar, B.S. (Eds.), Bioprocessing of Foods. Asiatech Publishing Inc, New Delhi, India, pp. 77–98.
- Singh, R.S., Singh, R.P., Kennedy, J.F., 2016a. Endoinulinase production by a new endoinulinase producer *Aspergillus tritici* BGPUP6 using a low cost substrate. Int. J. Biol. Macromole. 92, 1113–1122.
- Singh, R.S., Singh, R.P., 2017. Inulinases. In: Pandey, A., Negi, S., Soccol, C.R. (Eds.), Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier Inc, Cambridge, US, pp. 423– 446.
- Singh, R.S., Chauhan, K., 2016. Production, purification, characterization and applications of fungal inulinases. Curr. Biotechnol. 5. <http://dx.doi.org/10.2174/2211550105666160512142330>, (E-pub ahead of print).
- Singh, R.S., Chauhan, K., Singh, R.P., 2017a. Enzymatic approaches for the synthesis of high fructose syrup. In: Gahlawat, S.K., Salar, R.K., Siwach, P., Duhan, J.S., Kumar, S., Kaur, P. (Eds.), Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments. Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore, pp. 189–211.
- SINGH, R. S.; SINGH, T.; LARROCHE, C. Biotechnological applications of inulin-rich feedstocks. Bioresource Technology, v. 273, p. 641–653, 1 fev. 2019.
- SOUZA, Raphael. Extração e quantificação de inulina a partir da raiz de chicória / Raphael de Souza. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2011.
- SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVALCANTI, M. A. Q. ; MOREIRA, K. A. ; LIMA FILHO, J. L. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production.

Brazilian Archives of Biology and Technology , Curitiba-PR, v. 48, n.3, p. 343-350, 2005.

SRIVASTAVA, N. Production of Food-Processing Enzymes from Recombinant Microorganisms. Enzymes in Food Biotechnology. Department of Biotechnology, CETIILM, 2019.

STANHOPE, K.L.; HAVEL, P.J. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* v.19, n. 1, p. 16–24, 2008.

STANHOPE, K.L.; SCHWARZ, J.M.; KEIM, N.L.; GRIFFEN, S.C.; BREMER A.A.; GRAHAM, J.L.; HATCHER, B.; COX, C.L.; DYACHENKO, A.; ZHANG, W. Consuming fructosesweetened, not glicose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest.* v.119, n.1, p. 1322–1334, 2009.

TEFF KL, ELLIOTT SS, TSCHOP M, KIEFFER TJ, RADER D, HEIMAN M, TOWNSEND RR, KEIM NL, D'ALESSIO D, HAVEL PJ. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab*, v.89, n. 1, p. 2963–2972, 2004.

Todero, Larissa Midiane. T637p Produção de B-D-frutofuranosidase pelo fungo *Aspergillus thermomutatus* objetivando a produção de frutooligossacarídeos (FOS) 2018.

TERESITA, M. Enzimas de Interés Biotecnológico. In: CÁTEDRA DE BIOTECNOLOGÍA, 2019. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/89649/Apunte_de_c%C3%A1tedra.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 18/08/2022.

THAPA, S. *et al.* Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. *Molecular Biotechnology*, v. 61, n. 8, p. 579–601, 2019.

THRESHER, J. S.; PODOLIN, D. A.; WEI, Y. R. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glicose tolerance. *American Journal of Physiology*, v. 4, p. 1334-1340, Oct. 2000.

Trivedi, S.; Divecha, J.; Shah, A. Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 90, 483–490.

Vandame, E. J. and Derycke, D. G.: Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications, *Adv. Appl. Microbiol.*, 29, 139e176 (1983).

Vandeputte, D., Falony, G., D'hoel, K., Vieira-Silva, S. & Raes, J. Water activity does not shape the microbiota in the human colon. *Gut* **66**, 1865–1866 (2017).

VRANESIC, D. KURTANJEK, SANTOS A. M. P. Optimisation of Inulinase Production by *Kluyveromyces bulgaricus*. *Food Technol. Biotechnol.*, v.40, n.1, p. 67-73, 2002.

XIONG, CH.; JINHUA, W.; DONGSHENG, L. Optimization of solid.state médium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surfasse methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v.34, n.1, p.179– 184, 2007.

ZHAO, C.H., ZHANG, T., LI, M., CHI, Z.M. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Process. Biochem.* v.45, n.1, p.1121– 1126, 2010.

Weiss, R.; Eischer, A.; Tadic, T.; Gritsch, S. M.; Ortner, M.; Prall, K.; Neunteufel, E.; F. Putz, R. F.; Guebitz, G. M.; Nyanhongo, G. S. (2020). Valorisation of slaughter house and deinking paper waste streams for the production of enzyme by *Trichoderma reesei*. *Journal of Cleaner Production*,v. 275, 122882.

YAN, M. R.; Welch, R.; Rush, E. C.; Xiang, X.; Wang, X. A Sustainable Wholesome Foodstuff; Health Effects and Potential Dietotherapy Applications of Yacon. *Nutrients*, v. 11, n. 11, p. 2632, 2019.