UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Tese

Produção e imobilização covalente da inulinase obtida a partir de microrganismos isolados de frutos nativos da região Amazônica (Colômbia)

Marcela Vega Ferreira

Pelotas, 2022

Marcela Vega Ferreira

Produção e imobilização covalente da inulinase obtida a partir de microrganismos isolados de frutos nativos da região Amazônica (Colômbia)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor (a) em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação: Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi, Prof. Dr. Julian Paul Martinez Galán, Profa. Dra. Victoria Mesa e Dra. Luz Mila Murcia Montaño.

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F384p Ferreira, Marcela Vega

Produção e imobilização covalente da inulinase obtida a partir de microrganismos isolados de frutos nativos da região Amazônica (Colômbia) / Marcela Vega Ferreira ; César Valmor Rombaldi, orientador. — Pelotas, 2022.

274 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Araçá-boi. 2. *Aspergillus niger*. 3. Imobilização. 4. Inulinase. 5. Yacon. I. Rombaldi, César Valmor, orient. II. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Marcela Vega Ferreira

Produção e imobilização covalente da inulinase obtida a partir de microrganismos isolados de frutos nativos da região Amazônica (Colômbia)

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 16/02/2022

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. César Valmor Rombaldi

Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Escola Nationale Superieure Agronomique de Toulouse (França)

.....

Profª. Drª. Angela Maria Fiorentini

Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade federal de Santa Catarina (Brasil)

.....

Profª. Drª. Juliana Cristina Bassan

Doutora em Alimentos e Nutriçao pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Brasil)

.....

Profª. Drª. Victoria Mesa

Doutora em Biologia Funcional e Molecular pela Universidade de Oviedo, Departamento de Microbiologia (Espanha)

.....

Profª. Drª. Violeta Diez Beltran

Doutora em Infecção, Inmunidade e Inflamação pela University of Leicester (Inglaterra)

À minha família, especialmente meus sobrinhos

que me ensinaram que a palavra convence, mas o exemplo arrasta.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, primeiramente pelo don da vida. Por seu amor inestimável, por ser minha força, minha esperança e a luz de cada dia...”Deus eu posso te ver/sentir no inverno, sempre tão fiel, por isso te entrego todo o meu ser”.

A nossa senhora de Guadalupe, que fez o milagre em mim.

A meus amados pais Francisa e José que são minha inspiração, minha razão de viver.

A meus irmãos e sobrinhos que iluminam minha vida e enchem meu coração de esperança.

A minha valiosa família Vega e Ferreira pela força inabalável.

A Mauri, por estar “Bem a tempo” no *start* com a palavra inulinase, apoio incondicional na aventura final de este sonho e sobretudo por me ensinar a confiar nos tempos/caminhos de Deus.

A minha preciosa alma gêmea, que me mostrou que não há coincidências nos planos de Deus, apenas propósitos.

Ao Prof. Dr. Cesar Valmore Rombaldi, que me permitiu crescer e desenvolver meu próprio entendimento da Ciência, pelo apoio nos momentos difíceis e pelas palavras que acalmaram meu coração: “Primeiro o mais importante e relevante, depois o restante”.

Ao Prof. Dr. Julián Martínez e família pela sua amizade, hospitalidade, orientações e apoio sem igual e sempre igual para a realizaçao de este sonho.

A Profa. Dra. Lucia Atehortúa e sua equipe por me acolher no seu laboratório de Biotecnologia, suas palavras e por facilitar este aprendizado.

A minha querida Vick pela sua amizade, orientações, tempo e conhecimentos, que mudaram meu olhar da biologia molecular. Meu respeito e admiração pela sua dedicação...Me inspiras.

A Luz Mila Murcia, por confiar, acreditar e apoiar este processo no Laboratorio de Saude Pública do Amazonas.

A meus marcapassos de doutorado: Paty, Nataly, Magdis, Diana, K Samara, Matias, Ana Rosa, Felipe, Jhonja e Juan...Sem dúvida suas presenças são um presente de Deus.

Ao vovô de casa...Julinho que me ensinou o don de esperar, perseverar e acreditar.

A meus amigos, que confirmam que quem tem um amigo, tem um tesouro. E eu tenho a honra de ter o cofre da nação.

A meus queridos Brasileros: Tariani, Bianca, Vanessa, Julia, Carla, Neyde, Mateus, Julio, André, Gabriel e Mauricio que foram minha companhia, força e guia.

A meus queridos Colombianos em Brasil: Vivi, Caro, Vero, Cesar, Joao e Johan, a família que Deus me deu.

À família Gaviria-Hernandéz, minha família paisa que abriu as portas da sua casa e coração para fazer minha vida mais leve em Medellín.

A todas aquelas pessoas que com uma palavra, um gesto, um pensamento, uma ligação, um whatsapp...manifestaram seu carinho carregado de boas energias que alegraram e fizeram a diferença no meu dia.

Ao Governo do Amazonas, Laboratorio de Saude Pública Estadual, pelo financiamento do projeto nas primeiras fases e qualidade do recurso humano que enriqueceram meu processo de aprendizagem.

À Universidade de Antioquia (SIU) pela oportunidade de interactuar e aprender interdisciplinariamente com tantos grupos de pesquisa (Alimentação e Nutrição Humana, Biotecnología, Catálisis Ambiental, Ciencia dos Materiais, Genetica Molecular, Genética, Regeneração e Câncer, Gastrohepatologia e PECET).

As meninas do Laboratorio de Nutrição, Angie, Caro, Naty, Kari, Diana, Juli, Evelin, meu muito obrigada pelo carinho, companhia, trabalho e dedicação.

Aos meus inestimáveis apoios da SIU: Don Luis, Angie, Belfran, Camila, Melissa, Diana, Julio, Camilo, Alex, Brandon, Omer, Enderson y Carlos M.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPEL pela oportunidade de fazer parte da sua história, especialmente a coordenadora Elessandra por seu carinho, gentileza e oportuna ajuda.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e, porém, investir no meu crescimento acadêmico e pessoal.

Uma vida profundamente gratificante vem quando você se compromete de todo coração a usar seus melhores talentos para um propósito que mude a vida dos outros. É viver para algo mais do que para si mesmo, é a verdadeira razão de viver.
“Alegram-se na esperança, sejam pacientes nas dificuldades, perseverem na oração”.

Romanos 12:12

Resumo

FERREIRA, Marcela Vega. **Produção e imobilização covalente da inulinase obtida a partir de microrganismos isolados de frutos nativos da região Amazônica (Colômbia)**. 2022. Orientador: Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. 2022. 271f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

As inulinases são β-frutosidases inespecíficas que hidrolisam a inulina em frutooligossacarídeos (FOS), frutose e um pouco de glicose. Os xaropes de frutose são amplamente utilizados como adoçantes na indústria de alimentos. A frutose é obtida da inulina por uma simples reação enzimática com inulinases que produzem 95% de frutose. O presente trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar inulinases a partir de fungos filamentosos e leveduras isolados e identificados de polpa de frutos da região Amazônica como: Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), Araçá-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*) e Cubiu (*Solanum sessiliflorum*). A pesquisa foi organizada em três capítulos. O Capítulo I aborda uma visão geral de todos os microrganismos identificados fenotipicamante pelo método API com potencial para produzir inulinase por fermentação submersa usando inulina (Yacon) como fonte de carbono e diferentes tempos. A partir dessa avaliação foram escolhidos seis morfotipos (1, 3, 5, 10, 17 e 21) e o tempo 48 horas como a melhor condição para produção da enzima. O Capítulo II descreve os métodos de extração de DNA e RNA para a identificação molecular que foi realizado com os seis morfotipos selecionados e a transcriptômica do morfotipo No.3 escolhido por sua característica de status GRAS (seguro). Os microrganismos foram identificados em gênero e espécie usando a região ITS e 18S do DNAr pelo método SANGER e comparando as sequências *in sílico* com outras depositadas na NBCI, usando o programa BLAST. A expressão dos genes de inulinase foram avaliados a partir de RNA pela tecnologia de nova geração RNAseq Solexa/Illumina e análises de bioinformática. O Capítulo III descreve a produção de inulinases apartir do morfotipo No.3 identificado como *Aspergillus niger*, usando meios de cultura contendo diferentes fontes de carbono (M1, M2, M3 e M6), parcialmente purificadas com resina DEAE Sephacel equilibrada com NaCl 0,25M, imobilizadas em grafeno oxidado (GO), caracterizadas bioquimicamente e com avaliação em armazenamento a 6 ºC. Na eletroforese SDS-PAGE uma banda de proteína com peso molecular em torno de 97 kDa foi observado. Os melhores resultados foram obtidos usando o meio de cultura M2 contendo inulina para produzir a enzima extracelular, um pH 4,5 e temperatura de 70 ºC, K_m igual a 5,2 $mg.mL^{-1}$ e V_{max} de 40 $U.mg^{-1}$ para enzima imobilizada, com um rendimento acima de 80%, sete ciclos de resuso e estabilidade de 34% após 30 dias de armazenamento em refrigeração (6 ºC).

Palavras-chave: Araçá-boi. *Aspergillus niger.* DNA. Electroforese. Expressão. Extração. Grafeno oxidado. Imobilização. Inulina. Inulinase. ITS. Meio de cultura. Produção. Purificação. RNA. Sequenciamento. 18S. Transcriptômica. Yacon.

Abstract

FERREIRA, Marcela Vega. **Production and covalent immobilization of inulinase obtained from microorganisms isolated from fruits native to the Amazon region (Colombia)**. 2022. Advisor: Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. 2022. 271f. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology) – Postgraduate Program in Food Science and Technology. School of Agronomy Eliseu Maciel. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Inulinases are nonspecific β-fructosidases that hydrolyze inulin into fructooligosaccharides (FOS), fructose and a little glucose. Fructose syrups are widely used as sweeteners in the food industry. Fructose is obtained from inulin by a simple enzymatic reaction with inulinases that produce 95% fructose. The present work aimed to produce and characterize inulinases from filamentous fungi and yeasts isolated and identified from the pulp of fruits from the Amazon region, such as: Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), Araçá-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*) and Cubiu (*Solanum sessiliflorum*). The research was organized into three chapters. Chapter I provides an overview of all microorganisms phenotypically identified by the API method with the potential to produce inulinase by submerged fermentation using inulin (Yacon) as a carbon source and at different times. From this evaluation, six morphotypes were chosen (1, 3, 5, 10, 17 and 21) and the time 48 hours as the best condition for enzyme production. Chapter II describes the DNA and RNA extraction methods for molecular identification that were performed with the six selected morphotypes and the transcriptomics of morphotype No.3 chosen for its GRAS (safe) status characteristic. The microorganisms were identified in genus and species using the ITS and 18S region of the rDNA by the SANGER method and comparing the *in silico* sequences with others deposited at NBCI, using the BLAST program. The expression of inulinase genes were evaluated from RNA by next-generation RNAseq Solexa/Illumina technology and bioinformatics analyses. Chapter III describes the production of inulinases from morphotype No. 3 identified as Aspergillus niger, using culture media containing different carbon sources (M1, M2, M3 and M6), partially purified with DEAE Sephacel resin equilibrated with 0.25M NaCl, immobilized in oxidized graphene (GO), biochemically characterized and evaluated in storage at 6 ºC. In SDS-PAGE electrophoresis a protein band with molecular weight around 97 kDa was observed. The best results were obtained using the M2 culture medium containing inulin to produce the extracellular enzyme, a pH of 4.5 and a temperature of 70 ºC, K_m equal to 5.2 mg.mL^{-1} and V_{max} of 40 U.mg-1 for immobilized enzyme, with a yield above 80%, seven cycles of reuse and stability of 34% after 30 days of refrigerated storage (6 ºC).

Keywords: *Aspergillus niger*. DNA. Expression. Electrophoresis. Extraction. Oxidized graphene. immobilization. Inulin. inulinase. ITS Culture medium. Production. Purification. RNA. sequencing. 18th transcriptomics. Yacon.

Lista de figuras

Figura 1 - Formas tautoméricas da frutose 28
Figura 2 - Consumo xarope de frutose em bebidas (HFCS) vs obesidade..... 33
Figura 3 - Estutura básica frutanos. A. Levano. B. Inulina..... 36
Figura 4 - Aspecto geral tubérculo de yacon..... 38
Figura 5 - Estrutura cristalina de endoinulinase de *Aspergillus ficuum*..... 39
Figura 6 - Molecula de grafeno (a) fórmula estrutural do grafeno (b) grafeno oxidado..... 47
Figura 7 - Fruto cupuaçu..... 50
Figura 8 - Fruto Araçá boi..... 52
Figura 9 - Fruto cubiu (*solanum sessiliflorum*)..... 54
Figura 1.1 - Colônias de fungos e leveduras identificadas em ágar BDA a partir da polpa de cupuaçu..... 70
Figura 1.2 - Colônias de fungos e leveduras identificadas em ágar BDA a partir da polpa de Araçá boi..... 72
Figura 1.3 - Colônias de fungos e leveduras identificadas em ágar BDA a partir da polpa de cubiu..... 72
Figura 1.4 - Colônias de fungos e leveduras identificadas em ágar BDA a partir de bagaço de yacon..... 74
Figura 1.5 - Diagrama de caixa atividade enzimatica tratamento 1..... 78
Figura 1.6 - Diagrama de caixa atividade específica tratamento 1..... 79
Figura 1.7 - Diagrama de caixa atividade enzimatica tratamento 2..... 85
Figura 1.8 - Diagrama de caixa atividade específica tratamento 2..... 86
Figura 1.9 - Diagrama de caixa atividade enzimatica tratamento luzes LED..... 90
Figura 1.10-Diagrama de caixa atividade específica tratamento luzes led..... 91
Figura 1.11-Formação de halo de degradação de inulina..... 94
figura 2.1 - Visão geral do sequenciamento.....110
Figura 2.2 - Eletroforese em gel de agarose 2%.....123
Figura 2.3 - Avaliação da qualidade do sequenciamento de bibliotecas.....131
Figura 2.4 - Distribuição de dados em términos de transcritos anotados (blast2go software).....132
Figura 2.5 - Gráfico de caixa e bigode representando valores de expressão normalizados para cada amostra.....133
Figura 2.6 - Figura de vulcão representando transcritos regulados positiva e negativamente.....134
Figura 2.7- Diagrama de Venn.....13

Figura 2.8 - Gráfico de bolhas de enriquecimento da via KEGG de DEGs..... 136
Figura 3.1 - Diagrama de caixa atividade enzimática e específica da inulinase usando diferentes concentração de inulina em tampão fosfato e Mcllvaine.....156
Figura 3.2 - Diagrama de caixa efeito da interação do tipo de meio de cultura e *shaker* na atividade enzimatica e específica (IE).....158
Figura 3.3 - Diagrama de caixa efeito da interação do tipo de meio de cultura e tampão na atividade enzimatica e específica (IE).....159
Figura 3.5 - Diagrama de caixa da atividade enzimatica e específica da II.....165
Figura 3.6 - Diagrama de caixa atividade enzimatica e específica IE e II.....168
Figura 3.7 - Purificação parcial da inulinase.....171
Figura 3.8 - Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) da inulinase.....174
Figura 3.9 - Imobilização inulinase em grafeno oxidado.....176
Figura 3.10 - Hidrólise da inulina pela inulinase imobilizada em grafeno oxidado.179
Figura 3.11 - pH ótimo inulinase livre e imobilizada em grafeno oxidado.....181
Figura 3.12 - Temperatura ótima inulinase livre e imobilizada em grafeno oxidado.....183
Figura 2.13 - Determinação do Km da inulinase livre e imobilizada..... 185
Figura 3.14 - Avaliação da estabilidade a 6 ºc da inulinase extraceluar livre e imobilizada de *A. Niger* (morfotipo no. 3).....188

Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação dos produtos à base de frutose..... 30
Tabela 2 - Fontes de inulina.....37
Tabela 3 - Produtos obtidos a partir de inulinase de diferentes microrganismo. 41
Tabela 4 - Expresão da inulinase em microrganismos e atividade enzimática.. 43
Tabela 5 - Análise bromatológico da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).....51
Tabela 6 - Composición quimica de polpa de Araçá-boi (*Eugenia stipitata mcvaugh*)…… 53
Tabela 7 - Composição química de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) em 100 g de polpa..... 54
Tabela 1.1 - Leveduras isoladas em polpa fresca de cupuaçu e controle, identificados pelo sistema API 20C AUX..... 69
Tabela 1.2 - Leveduras e fungos isolados de Araçá-boi com identificação através do sistema API20C AUX..... 71
Tabela 1.3 - Leveduras e fungos isolados de cubiu identificadas através do sistema API20C AUX..... 73
Tabela 1.4 - Leveduras isoladas de bagaço de yacon e identificadas através do sistema API20C AUX..... 75
Tabela 1.5 - Tratamento 1: efeito do tempo de fermentação e temperatura de hidrólise na produção de inulinase (atividade enzimatica) a temperatura 20ºC; pH 4,5 e 100 rpm.....80
Tabela 1.6 - Tratamento 1: efeito do tempo de fermentação e temperatura de hidrólise na produção de inulinase (atividade específica) a temperatura 20ºC; pH 4,5 e 100 rpm.....82
Tabela 1.7 - Tratamento 2: efeito do tempo de fermentação e temperatura de hidrólise na produção de inulinase (atividade enzimatica) a temperatura 30ºC; pH 4,5 e 100 rpm.....87
Tabela 1.8 - Tratamento 2: efeito do tempo de fermentação e temperatura de hidrólise na produção de inulinase (atividade específica) a temperatura 30ºC; pH 4,5 e 100 rpm.....88
Tabela 1.9 - Avaliação da influência de cor de luzes LED na produção de inulinase (atividade enzimática) a temperatura 20ºC; pH 4,5 e 100 rpm.....92
Tabela 1.10 - Avaliação da influência de cor de luzes LED na produção de inulinase (atividade específica) a temperatura 20ºC; pH 4,5 e 100 rpm.....93
Tabela 2.1 - Pre-tratamento e tratamento para obter DNA total.....106
Tabela 2.2 - Valores de pureza para o material genético..... 107
Tabela 2.3 - Extração de dna quantificadas em nanodrop (Kit Zymo).....115

Tabela 2.4 - Extração de dna quantificadas em nanodrop (Kit Quiagen)..... 117
Tabela 2.5 - Extração de dna quantificadas em nanodrop (Método Trizol)..... 118
Tabela 2.6 - Concentração de dna quantificadas em nanodrop (Speedvac)..... 119
Tabela 2.7 - Extração de rna quantificadas em nanodrop (Método Trizol)..... 121
Tabela 2.8 - Amostras de DNA selecionadas para identificação molecular..... 124
Tabela 2.9 - Comparação da identificação fenotipica e genotípica dos isolados de polpa de frutos do amazonas..... 125
Tabela 2.10 - Amostras de rna selecionadas para análise de transcriptômica 129
Tabela 2.11 - Dados brutos e resultados da análise..... 129
Tabela 2.12 - Estatísticas de dados brutos (máximo de 20 amostras)..... 130
Tabela 2.13 - Número de transcritos identificados nas bibliotecas..... 132
Tabela 2.14 - Genes encontrados na via metabólica de carboidratos..... 137
Tabela 3.1 - Meios de cultura usados para produção de inulinasa..... 148
Tabela 3.2 - Efeito da concentração de substrato (inulina) e tampão na atividade enzimática e específica..... 157
Tabela 3.3 - Efeito da intereção das variáveis: meio de cultura, tampão, *shaker* e tempo de hidrólise na atividade enzimática da IE..... 161
Tabela 3.4 - Efeito da intereção das variáveis: meio de cultura, tampão, *shaker* e tempo de hidrólise na atividade específica da IE..... 162
Tabela 3.5 - Influência do meio de cultura na atividade enzimática e específica da inulinase intracelular (II)..... 166
Tabela 3.6 - Comparação da atividade enzimática e específica da II e IE..... 168
Tabela 3.7 - Métodos de concentração da enzima inulinase produzida por *Aspergillus niger* (morfotipo no. 3) e controle..... 169
Tabela 3.8 - Purificação parcial da enzima inulinase produzida por *Aspergillus niger* (morfotipo no. 3) e controle..... 172
Tabela 3.9 - Análise comparativa com outros autores do processo de purificação da inulinase no gênero *Aspergillus*..... 173
Tabela 3.10 - Análise comparativa de SDS-PAGE de inulinases de vários microrganismos..... 175
Tabela 3.11 - Teste de dessorção de inulinase do go em gradiente de sal..... 177
tabela 3.12 - Caracterização bioquímica da II, IE e controle (livre e imobilizada) e comparados com trabalhos do gênero *Aspergillus*..... 186
Tabela 1.11 - Média e desvio padrão das atividades enzimáticas obtidas no tratamento 1..... 257
Tabela 1.12 - Média e desvio padrão das atividades específicas obtidas no tratamento 1..... 258
Tabela 1.13 - Análise de variância do tratamento 1 para teor de açúcar redutor e proteína usando o software R..... 259

Tabela 1.14 - Média e desvio padrão das atividades enzimáticas obtidas no tratamento 2..... 260
Tabela 1.15 - Média e desvio padrão das atividades específicas obtidas no tratamento 2..... 261
Tabela 1.16 - Análise de variância do tratamento 2 para teor de açúcar redutor e proteína usando o software R..... 262
Tabela 1.17 - Média e desvio padrão da influência de luzes LED para teor de açúcar redutor usando o software R..... 263
Tabela 1.18 - Média e desvio padrão da influência de luzes LED para atividade específica usando o software R..... 263
Tabela 1.19 - Análise de variância da influência de luzes LED para teor de açúcar redutor e proteína usando o software R..... 264
Tabela 3.13 - Média e desvio padrão da concentração de substrato e tampão para teor de açúcar redutor usando o software R..... 264
Tabela 3.14 - Média e desvio padrão da concentração de substrato e tampão para atividade específica usando o software R.....264
Tabela 3.15 - Análise de variância da concentração de substrato e tampão para teor de açúcar redutor e proteína usando o software R..... 265
Tabela 3.16 - Média e desvio padrão da IE para teor de açúcar redutor usando o software R..... 266
Tabela 3.17- Média e desvio padrão da IE para atividade específica usando o software R..... 267
Tabela 3.18 - Análise de variância da IE para teor de açúcar redutor e proteína usando o software R..... 268
Tabela 3.19 - Média e desvio padrão da II para teor de açúcar redutor usando o software R..... 268
Tabela 3.20 - Média e desvio padrão da II para atividade específica usando o software R..... 268
Tabela 3.21 - Análise de variância II para teor de açúcar redutor e proteína usando o software R..... 269
Tabela 3.22 - Média e desvio padrão da IE e II para teor de açúcar redutor usando o software R..... 269
Tabela 3.23 - Média e desvio padrão da IE e II para atividade específica usando o software R..... 269
Tabela 3.24 - Análise de variância da IE e II para teor de açúcar redutor e proteína usando o software R..... 270

Lista de abreviaturas e siglas

A	Absorbância
%AR	Percentagem de Atividade Relativa
ANOVA	Análise De Variâcia
AR	Açúcares Redutores
ARE	Atividade Recuperada
ATP	Adenosina Trifosfato
BDA	Ágar batata dextrose
BSA	Soro Albumina Bovina
ºC	Graus Celsius
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DEAE	Resina Dietilaminoetil
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribossomal
DNS	3,5 Ácido Dinitro Salicílico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DPP	*Diabetes Prevention Program*
DPS	*Finnish Diabetes Prevention Study*
EB	Extrato Bruto Enzimático
EE	Extrato Enzimático
EP	Extrato purificado
FDA	*Food and Drug Administration*
FOS	Frutooligossacarídeos
FP	Fator De Purificação
FW	Forward
g	Grama
$g.L^{-1}$	Grama por litro
$g.mL^{-1}$	Grama por mililitro
GO	Grafeno Oxidado
GP	Grau De Polimerização

GRAS	*Generally Recognized As Safe*
h	Horas
HFCS	*High Fructose Corn Syrup*
ITS	*Internal Transcribed Spacer*
K_M	Constante de Michaelis Menten
L	Litros
Log	Logarítmo em base dez
M	Molar
mg	miligrama
min	Minutos
mL	mililitros
mM	Milimolar
$ng.\mu L^{-1}$	Nanogramos por mililitro
pb	Pares de bases
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
pH	Potencial de hidrogênio
RI	Rendimento de imobilização
RNA	Ácido Ribonucleico
RP	Percentagem de Recuperação ou Rendimento da Enzima
rpm	Revoluções por minuto
RV	*Reverse*
s	Segundos
TBE	Tris-Borato EDTA
TRIS	Tris (Hidroximetil) aminometano
SM	Síndrome Metabólica
U	Unidade de Atividade
UCM	União Covalente Multipontual
UV	Ultravioleta
µL	Microlitro
µM	Micromol
V_{max}	Velocidade máxima

Sumário

1 Introdução..... 22
1.1 Problema e justificativa..... 26
1.2 Hipótese..... 27
1.3 Objetivo geral.....27
1.3.1 Objetivos específicos..... 28
2 Revisão bibliográfica..... 28
2.1 Frutose..... 28
2.1.1 Xarope de frutose..... 30
2.2 Síndrome metabólica..... 32
2.2.1 Diabete mellitus..... 34
2.3 Frutanos..... 34
2.3.1 Inulina..... 36
2.4 Inulinase..... 38
2.4.1 Propriedades da proteína..... 39
2.4.2 Microrganismos produtores..... 40
2.4.3 Identificação de microrganismos produtores..... 41
2.4.4 Produção e extração.....42
2.4.5 Purificação da inulinase.....44
2.4.6 Imobilização.....44
2.4.7 Aplicações das inulinases.....48
2.5 Frutos do amazonas..... 49
2.5.1 Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).....49
2.5.2 Araçá-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*).....51
2.5.3 Cubiu (*Solanum sessiliflorum*)..... 53
Capítulo 1.....55
Identificação fenotipica de fungos e leveduras isoladas de frutos nativos da região Amazônica e avaliação da produção de inulinase em meio líquido.....55
Resumo.....56
Abstract…….57
1. Introdução..... 58
2. Materiais e métodos.....63
2.1 Triagem de microrganismo produtores de inulinase..... 63
2.1.1 Isolado do microrganismo..... 63
2.1.2 Purificação do microrganismo..... 64
2.1.3 Identificação das leveduras..... 64
2.2 Produção de inulinase por fermentação submersa 65

2.2.1 Extração da inulinase..... 65
2.2.2 Atividade da inulinase por dosagem de açúcar redutor..... 66
2.2.3 Determinação de proteínas totais..... 66
2.3 Análise da formação de halo de degradação de inulina..... 66
2.4 Análise estatística..... 67
3. Resultados e discussão..... 67
3.1 Identificação da levedura..... 67
3.2 Produção de inulinase por fermentação submersa 76
3.2.1 Tratamento 1..... 76
3.2.2 Tratamento 2 84
3.2.3 Teste de avaliação de influência de cor de luzes led na produção de inulinase.....89
3.3 Formação de halo de degradação de inulina..... 94
4 Conclusões..... 96
Capítulo 2..... 97
Identificação genotípica de microrganismos isolados de frutos da região amazônica com potencial para produção de inulinases..... 97
Resumo..... 98
1. Introdução..... 100
2. Materiais e métodos.....105
2.1 Microrganismo..... 106
2.2 Extração do material genético..... 106
2.2.1 DNA total.....106
2.2.2 RNA total.....107
2.2.3 Teste de quantidade, qualidade e integridade do material genético.....107
2.3 Identificação molecular (amplificação e sequênciamento de regiões ribossomais (18S e ITS).....108
2.3.1 Seleção da amostra.....108
2.3.2 Amplificação e sequênciamiento da amostra.....109
2.3.3 Alinhamento das sequências com BLAST..... 109
2.4 Transcriptômica (NGS): expressão gênica diferencial..... 110
2.4.1 Sequenciamento..... 110
2.4.2 Análises bioinformático..... 111
3. Resultados e discussão.....115
3.1 Extração do material genético.....115
3.1.1 Quantificação e pureza do DNA e RNA.....115
3.1.2 Gel de integridade.....122

3.2 Identificação molecular (Amplificação e sequênciamento de regiões ribossomais 18S e ITS)..... 123
3.2.1 Seleção das amostras de DNA..... 123
3.2.2 Alinhamento das sequências com BLAST..... 124
3.3 Transcriptômica (NGS): expressão gênica diferencial..... 128
3.3.1 Seleção das amostras de RNA..... 128
3.3.2 Sequenciamento do RNA..... 129
3.3.3 Análise bioinformática..... 130
4. Conclusões..... 140
Capítulo 3..... 141
Produção, purificação, imobilização e caracterização de inulinase produzida por *Aspergillus niger* isolado de Araçá-boi (*Eugenia stipitata mcvaugh*) 141
Resumo..... 142
Abstract..... 143
1. Introdução..... 144
2. Materiais e métodos..... 147
2.1 Microrganismo..... 147
2.2 Enzima..... 147
2.3 Estudo de variáveis para otimizar a produção de inulinase..... 148
2.3.1 Meios de cultura..... 148
2.3.2 Concentração de substrato (inulina) e tampão..... 149
2.3.3 Inulinase extracelular (IE)..... 149
2.3.4 Inulinase intracelular (II)..... 149
2.3.5 Estudo comparativo entre a inulinase extracelular (IE) e intracelualar (II) 150
2.4 Métodos de concentração da enzima..... 150
2.5 Purificação parcial da enzima inulinase..... 150
2.5.1 Teste do gradiente de sal..... 151
2.5.2 Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)..... 151
2.6 Imobilização da inulinase..... 152
2.6.1 Análise de atividade..... 152
2.6.2 Rendimento de imobilização (RI)..... 153
2.6.3 Atividade recuperada (AR)..... 153
2.6.4 Reuso dos derivados..... 153
2.7 Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada..... 153
2.7.1 Determinação do pH ótimo (Enzima livre e imobilizada)..... 154
2.7.2 Determinação da temperatura ótima (Enzima livre e imobilizada)..... 154
2.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos (enzima livre e imobilizada)..... 154

2.8 Influência do armazenamento na atividade da inulinase livre e imobilizada154
2.9 Análise estatística.....154
3. Resultados e discussão.....155
3.1 Estudo de variáveis para otimizar a produção de inulinase.....155
3.1.1 Concentração de substrato (inulina) e tampão.....155
3.1.2 Inulinase extracelualar (IE).....157
3.1.3 Inulinase intracelualar (II).....164
3.1.4 Estudo comparativo entre a inulinase extracelular (IE) e intracelualar (II)167
3.2 Métodos de concentração da enzima..... 169
3.3 Purificação parcial da enzima inulinase..... 170
3.3.1 Teste do gradiente de sal.....170
3.3.2 Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).....173
3.4 Imobilização da inulinase..... 175
3.4.1 Reuso dos derivados.....178
3.5 Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada.....180
3.5.1 Determinação do ph ótimo (enzima livre e imobilizada).....180
3.5.2 Determinação da temperatura ótima (enzima livre e imobilizada).....182
3.5.3 Determinação dos parâmetros cinéticos (enzima livre e imobilizada).....184
3.6 Influência do armazenamento na atividade da inulinase livre e imobilizada187
4 Conclusões.....189
Considerações finais.....190
Referências bibliográficas..... 192
Apêndice – A.....245
Apêndice – B..... 253
Apêndice – C..... 256
Apêndice – D..... 271

1 Introdução

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., 2019; RIGO et al., 2021).

A procura de microrganismos em diferentes ambientes tem chamado à atenção de diversas áreas, nas últimas décadas devido ao potencial de encontrar novas enzimas de interesse para o ser humano (MAIORANO et al., 2008). Nesse sentido, alguns estudos demonstram a possibilidade da utilização de frutas e seus resíduos como fonte de extração de enzimas de interesse comercial, obtidas diretamente da polpa ou através de microrganismos nativos, como é o caso de invertase e inulinase produzida por fungos e leveduras (MANZONI e CAVAZZONI, 1992; SANTOS et al., 1996; LOPES, et al., 2014, FERREIRA, et al., 2016).

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, valor nutritivo, etc. (SRIVASTAVA, 2019; RIGO et al., 2021).

Assim, inulinases produzidas por leveduras, fungos filamentosos e bactérias têm sido extensivamente estudados nos últimos anos. As espécies mais utilizadas são *Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces marxianus* e *Aspergillus niger* (GUPTA et al., 1994; ÖNGEN-BAYSAL et al., 1994; HENSING et al., 1995; PANDEY et al., 1999; CHI et al., 2009; NEAGU et al., 2011; TREICHEL et al., 2012; SINGH et al., 2018; ILGIN et al., 2020).

As exo-inulinase (EC 3.2.1.8) ou β-D-(2-1)-frutano-frutohidrolases são específicas para hidrólise da inulina e quebram as ligações entre as unidades de frutose que estão localizadas distante das extremidades da rede do polímero, permitindo a produção de oligossacarídeos. As endo-inulinases (EC 3.2.1.7) ou β-D-frutano-frutanohidrolases agem de forma aleatória sobre o acoplamento interno na molécula de inulina, liberando inulo-triose, inulo-tetraose e inulo-pentose como produtos principais (ETTALIBI e BARATTI, 2001; OHTA et al., 2002; CHI et al., 2009). As inulinases foram inicialmente purificadas a partir de plantas, mas as

quantidades obtidas eram insuficientes para serem exploradas comercialmente. Daí o interesse pelo estudo para produzi-las, purificá-las e caracterizá-las a partir de cultivos microbianos em meios sintéticos (PESSOA e VITOLO, 1998).

A inulina e seus análogos são polímeros de frutose encontrado como carboidrato de reserva em mais de 36.000 plantas pertencentes a 10 famílias (RICCA et al., 2007; CONTADO, 2009; CHI et al., 2011), e armazenada tanto na parte aérea como subterrânea do vegetal. A parte subterrânea é a mais utilizada para produção industrial. A inulina é composta por moléculas de frutose ligadas por ligações β(2-1) e no final da cadeia apresenta uma molécula de glicose ligada à frutose por (1-2) como sacarose (BAUMGARTNER et al., 2000). Ocorre naturalmente em uma variedade de plantas, como dália, dente-de-leão, chicória, alcachofra de Jerusalém, yacon, etc., disponíveis em grandes quantidades (PARK e YUN, 2001; KAUR e GUPTA, 2002; LEROY et al., 2010).

A inulina pode ser hidrolisada de duas maneiras, ou seja, por: hidrólise química ou enzimática (inulinases). A hidrólise completa da inulina por exo-inulinases produz um concentrado de frutose com cerca de 95% de pureza em uma única etapa enzimática, reduzindo os custos de produção e evitando a presença de subprodutos não desejados (LAFUENTE-CASTAÑEDA et al., 2012).

Por isso, a inulina tem recebido recentemente bastante atenção por representar uma matéria-prima renovável, barata e abundante para produção de frutose, etanol, biodiesel, acido cítrico e fruto-oligossacarídeos (FOS) entre outros produtos químicos (CHI et al., 2009; CHI et al., 2011; ZHAO et al., 2010).

Os FOS ganharam grande interesse devido às suas propriedades como açúcares de baixa caloria que atuam como fatores estimulantes da microbiota intestinal, são adoçantes não cariogênicos que ajudam diminuir o colesterol e os lipídios no soro sanguíneo (PARK e YUN, 2001; VRANESIC et al., 2002; CORONA-GONZÁLEZ, et al., 2005).

A frutose é um monossacarídeo com ampla distribuição na natureza e possui um poder adoçante de 1,5 a 2 vezes maior que a sacarose (RICCA, et al., 2007). Sua utilização na indústria de alimentos e bebidas vem crescendo de forma acentuada, pois esse açúcar não apresenta problemas de cristalização como a sacarose (GE, et al., 1998; SILVA, 2010). Também, pode ser utilizada na produção de etanol, acetona, butanol, ácido glucónico, sorbitol e frutooligossacáridos (PANDEY et al. 1999; LIU et al. 2010; CHI et al. 2011).

Comercialmente, a frutose é produzida a partir do amido de milho, precisando pelo menos três etapas enzimáticas: ɑ-amilase (EC 3.2.1.1), glucoamilase (EC 3.2.1.3) e glicose isomerase (EC 5.3.1.18), assim como, de várias etapas de separação, purificação, conversão, descoloração e concentração. Desta forma obtêm-se xaropes com uma concentração de frutose aproximadamente de 45% (GONG, et al., 2007; CHAND, et al., 2012). Este xarope é conhecido como HFCS por sua sigla em inglês (*High Fructose Corn Syrup*) (GUPTA e KAUR, 1997; KAUR e GUPTA, 2002; PARKER et al., 2010).

Diversos estudos têm associado a ingestão de frutose (HFCS), como um fator de risco potencial para síndrome metabólica (HAVEL, 2005; JOHNSON, et al., 2007; SEGAL et al., 2007; PALMER et al., 2008). A esta síndrome é atribuído sintomas como resistência à insulina, hipertrigliceridemia pós-prandial, acúmulo de gordura e pressão arterial elevada (TEFF, et al., 2004; BROWN et al., 2008; STANHOPE e HAVEL, 2008; STANHOPE et al., 2009).

A diabetes mellitus em decorrência da síndrome metabólica, encontra-se entre as dez principais causas de morte no planeta. É uma doença crônica não transmissível caracterizada pela hiperglicemia e intolerância a glicose, devido à deficiência de insulina ou pela diminuição da eficácia da ação desse hormônio, ou uma combinação de ambos. A hiperglicemia crônica da diabetes esta associada á disfunção e dano de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. A dieta tem um papel importante na etiologia e prevenção da doença (OMS, 2008; ROJAS et al., 2012; RODRIGUEZ et al., 2015; RODRIGUEZ e LLANES, 2020).

Nesse contexto, o uso da frutose na dieta em comparação com a glicose e sacarose, produz um efeito glicêmico reduzido, podendo ser usada como adoçante em alimentos de pacientes com diabetes (DE PAULA, et al., 2008). Thresher et al. (2000) refere à frutose como um nutriente mediador da resistência à insulina, induzida pela sacarose e intolerância à glicose. Além disso, está tomando importância por incrementar a absorção de ferro e cálcio no organismo e estimular o crescimento de bactérias gram-positivas, anaeróbicas, conhecidas como bifidobactérias, ampliamnte distribuídas no intestino delgado e grosso (ROCHA, et al., 2006; MADRIGAL e SANGRONIS, 2007).

Em função disso, tanto para fins industriais como de Saúde Pública, a inulinase tem abordado diversas pesquisas no mundo para sua produção, extração, purificação, imobilização e caracterização.

Parte do estudo da produção da enzima requer identificar e/ou avaliar microrganismos com potencial para melhorar sua atividade catalítica e características bioquímicas. Assim, a identificação desses microrganismos pode ser realizada através de métodos fenotípicos ou genotipicos (RATON, 2004; CHEN et al., 2010; LÓPEZ et al., 2013; BERROUET et al., 2014; FERREIRA et al., 2016; CORREA-DELGADO et al., 2020, MELLADO, 2020).

Tradicionalmente, a inulinase é produzida por fermentação submersa ou líquida (SELVAKUMAR e PANDEY, 1999; KALIL et al., 2001; GILL et al., 2003). Esta 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 da inulina grau reagente, 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 fermentação, dependendo da sua aplicação, são necessárias operações de purificação da enzima, que devem ser incluídas no custo final do produto, o qual pode representar até 80% do valor da produção (GALAEV e MATTIASSON, 2001; GHOSH et al., 2003; MORAES et al., 2009). A maior parte dos estudos envolvendo purificação de inulinase utilizam processos cromatográficos (ZHANG et al., 2004; ISHIHARA e YAMAMOTO, 2005; SHARMA et al., 2007; ZHANG et al., 2009).

Posterior à purificação, uma maneira de fazer mais estável e rentável o processamento mediante enzimas, é a sua imobilização. A imobilização consiste em reter ou ligar enzimas ou sistemas enzimáticos em uma região definida do espaço, normalmente um suporte. Nesse processo é importante preservar a atividade catalítica, de modo a permitir seu uso de maneira repetida e contínua, assim como melhorar a estabilidade operacional. A literatura apresenta diversos trabalhos orientados à otimização da inulinase imobilizada, sendo os suportes mais destacados: gelatina tratada com glutaraldeído, quitosana, alginato, sabugo de milho, bagaço de cana, entre outros (BARRANCO-FLORIDO, et al., 2001; DE PAULA et al., 2008, TRITEK et al., 2015; TRIVEDI, et al., 2015).

A presente proposta de trabalho de tese visa identificar e avaliar a capacidade de microrganismos isolados de frutos nativos da região Amazônica, na Colômbia, para utilizar a inulina como fonte de carbono no seu crescimento e seu potencial para produzir a enzima inulinase, posteriormente, purificar-la, imobilizá-la e caracterizá-la bioquímicamente.

1.1 Problema e justificativa

As doenças cardiovasculares constituem as principais causas de morte no mundo. Em 2016 causaram 17,6 milhões de mortes, sendo o 45% associado a doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Estima-se que este número alcance valores de 25 milhões para o ano 2030 (GBD, 2016).

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil constituem a maior causa de morbimortalidade da população, sendo responsável por 76% das mortes em 2017 no país (IHME, 2017).

Na Colômbia, segundo estimativas do Ministério da Saúde e Proteção Social, 76% da morbidade é causada por DCNT (MSPS, 2013).

A coexistência de múltiplos fatores de risco cardiovascular e diabetes tipo 2 em um mesmo indivíduo, foi denominada como Síndrome Metabólica (SM) (OMS, 1999).

A Síndrome Metabólica caracteriza-se por alterações metabólicas complexas e tem sido amplamente estudada no mundo por suas repercussões negativas à saúde dos indivíduos (NEERGAARD et al., 2016; NETO et al., 2017). Esta síndrome envolve a agregação de condições tais como hipertensão arterial, obesidade abdominal, dislipidemias e alteração no metabolismo da glicose (MÁRQUEZ-SANDOVAL; OLIVEIRA et al., 2020).

Levando em consideração as estatísticas e o alto efeito das doenças cardiovasculares na saúde pública, durante o último século vários esforços foram feitos para identificar sua causa raiz (BOLÍVAR-MEJÍA, 2019).

Assim, encontra-se que diversos estudos (DONNELLY, et al., 2005; SÁNCEHEZ-LOZADA et al., 2010; KLURFELD et al.,2013; CARAVALLO et al., 2019) têm associado o consumo de frutose produzida industrialmente a partir do milho, conhecido como HFCS (High fructose corn syrup) por sua sigla em inglês, um dos precursores da síndrome metabólica, já que durante a obtenção do xarope são formados compostos indesejáveis como os hidroximetilfurfural (BRAY et al., 2004;

SARTORIO et al., 2007; OUYANG, et al., 2008, LEBLANC, et al., 2009; SHAPLA et al., 2018; FRIZZERA et al., 2020).

Porém, considerando a alta demanda de frutose na indústria de alimentos e farmacêutica é preciso buscar novas alternativas para produzi-la. Dentro das possibilidades está produzir a frutose a partir da hidrólise de inulina usando inulinases comerciais o as obtidas a partir de microrganismos.

Assim, entre a ampla variedade de microrganismos ainda não explorados em frutos nativos da região Amazônica, na Colômbia, pode-se encontrar produtores de inulinase, a qual tenha maior eficiência catalítica, termo resistência ou estabilidade geral, em decorrência da adaptação dos microrganismos produtores da enzima a altas temperaturas e umidade característica desse ecossistema, que as usadas atualmente e que possam ser utilizadas para produzir frutose com fins industriais na elaboração de produtos orientados para diabéticos. É nesse contexto que, nessa Tese, com toda base experimental analítica realizada na Colômbia, com recursos públicos desse País, buscou-se isolar, identificar e cultivar microrganismos prospectados em alguns frutos, com potencial para produção de inulinase, bem como realizar o processo de purificação, imobilização e caracterização bioquímica da enzima.

1.2 Hipótese

Em frutos nativos do Amazonas coletados na Colômbia podem ser encontrados microrganismos com capacidade de utilizar inulina como fonte de carbono para seu crescimento e sejam produtores de inulinases. Considerando que essa etapa inicial da pesquisa, de caráter majoritariamente qualitativo, emitiu-se a hipótese de que seria possível se produzir frutose por via enzimática (inulinase) usando condições otimizadas de fermentação, purificação e imobilização.

1.3 Objetivo geral

Produzir e imobilizar covalentemente a enzima inulinase obtida por ferementação submersa utilizando microrganismos isolados de frutos nativos da região Amazônica Colombiana.

1.3.1 Objetivos específicos

- Identificar fenotipicamente e genotipicamente microrganismos, com potencial para produção de inulinase a partir de frutos nativos da região Amazônica.
- Cultivar os microrganismos usando yacon como fonte de carbono indutor de inulinase.
- Purificar parcialmente a inulinase usando cromatografia de intercâmbio iônico DEAE-Sephacel.
- Aplicar o suporte inorgânico (Grafeno oxidado) para imobilização covalente da enzima inulinase parcialmente purificada.
- Caracterizar bioquimicamente a enzima parcialmente purificada livre e imobilizada.

2 Revisão bibliografica

2.1 Frutose

A frutose ($C_6H_{12}O_6$), também chamada açúcar da fruta, é uma cetohexose considerada o açúcar mais doce encontrado na natureza em forma livre a partir de frutas, mel e vegetais e em forma polimerizada no polissacarídeo inulina. É um monossacarídeo muito usado em alimentos. Quando pura, é branca, higroscópica, cristalina e na forma sólida é bastante solúvel em água e insolúvel em álcoois (NELSON et al., 2000; DE PAULA et al., 2008). Em solução aquosa, a forma tautomérica predominante é a beta-D-frutopiranose (73% a 20 °C), seguida da forma beta-D-frutofuranose (20%) (Figura 1) (FENNEMA, 1993).

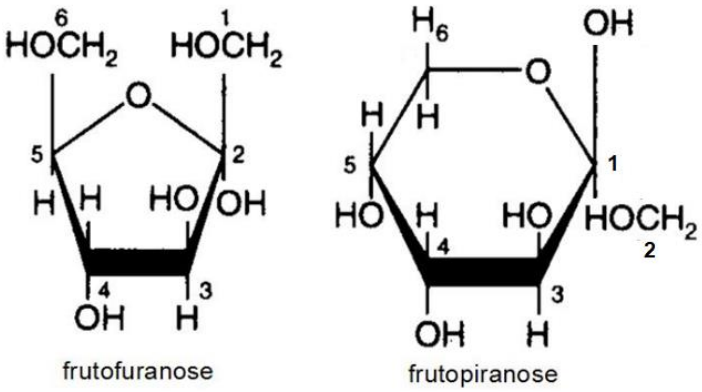


Figura 1 - Formas tautoméricas da frutose
Fonte: FENNEMA, 1993

Seu poder adoçante é cerca de 1,3 -1,8 vezes mais que a de outros açúcares, possui capacidade edulcorante 30% maior que a sacarose, 2,5 vezes maior que a glicose e 2 vezes mais solúvel que a glicose, com isso, pode ser utilizada em menor quantidade, diminuindo o poder calórico do alimento (LORENÇO, 2004; CERQUEIRA, 2012).

A frutose é transportada pela veia para o fígado, onde é absorvida pelas células hepáticas. Apenas pequenas quantidades entram na circulação sistêmica, no sangue em concentrações de 0,01 $mmol.L^{-1}$ em comparação com a glicose, com valores de 5,5 $mmol.L^{-1}$. Também pode ser metabolizado pelos enterócitos, células epiteliais intestinais responsáveis pela absorção de nutrientes e pela secreção de água e cloro para o lúmen intestinal (MILLO e WERMAN et al., 2000; SÁNCHEZ-LOZADA et al., 2010; CARAVALLO et al., 2019). Seu índice glicêmico apresenta um valor de 20 em comparação com a glicose com um valor de 100 (HERNÁNDEZ et al., 2013; MARTÍNEZ-GAMBOA et al., 2013).

O uso da frutose na alimentação humana, em comparação à glicose e à sacarose, resulta em efeito glicêmico reduzido até 33% podendo ser usada como adoçante em dietas de pacientes com diabetes e/ou obesidade (PESSONI et al, 2004, BARREIROS et al., 2005; DE PAULA, 2008). A frutose por não requerer a insulina em seu processo metabólico como a glicose, possibilita o seu uso em dietas para diabéticos, pois sua ingestão causa menor variação nos níveis de glicose, insulina, glucagon e hormônios (THRESHER et al., 2000; MILLO e WERMAN, 2000; KAUR e GUPTA, 2002). Outros autores como Parker *et al*., (2010) descrevem benefícios no metabolismo fisiológico dos seres humanos que utilizam a frutose, pois esta aumenta a absorsão de ferro no organismo, ao formar um complexo ferro-frutose que é mais bem absorvido que ferro inorgânico.

Na indústria a frutose é usada em alimentos e bebidas para incrementar o sabor, desenvolvimento de cor, diminuição do ponto de congelamento e prevenir a cristalização (ASHOKKUMAR et al., 2001; SILVA et al., 2010).

A obtenção de frutose é feita através de processos que envolvem hidrólise de sacarose, de amido de milho ou mandioca ou através da hidrólise da inulina, em que a frutose é o produto principal (PANDEY et al., 1999; SINGH e GILL, 2006; CHI et al., 2009).

2.1.1 Xarope de frutose

A frutose obtida a partir da hidrólise química e enzimática do amido de milho é a mais utilizada mundialmente e conhecida como xarope com alto teor de frutose, também denominado HFCS por sua sigla em inglês (*High Fructose Corn Syrup*) (GUPTA e KAUR, 1997; KAUR e GUPTA, 2002; PARKER et al., 2010).

A indústria produz três categorias de xarope de frutose (Tabela 1). O primeiro é o xarope HFCS-90 (90% de frutose e 10% glicose). Esta categoria é destinada à indústria de alimento e serve principalmente como mistura para obtenção da segunda categoria, a HFCS-42 (42% frutose e glicose 58%), esta categoria tem uma ligeira doçura e não mascara o sabor natural dos alimentos. Assim, é amplamente utilizada em frutas em conserva, molhos, sopas, condimentos, produtos de panificação, e muitos outros alimentos processados. Também é muito usada pelas indústrias de laticínios em iogurtes, leites aromatizados, sorvetes e outras sobremesas congeladas. A terceira categoria é a HFCS-55 (55% de frutose e 45% de glicose), devido a seu maior teor de frutose, HFCS-55 é mais doce que sacarose e, portanto, amplamente utilizada como adoçante em refrigerantes e sucos (PARKER et al., 2010).

Tabela 1 – Classificação dos produtos à base de frutose e poder edulcorante com relação a sacarose.

Propridades	Estado Físico	Descriçao Química	% Frutose	% Água	Poder Edulcorante
Frutose cristalina	Cristalino	Cetohexose	99,5	0,2	130-180
HFCS 42%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	29,8	29	90-95
HFCS 55%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	42,4	23	95-100
HFCS 90%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	69,3	23	100-106
Frutose líquida	Líquido	Frutose e água	77	23	110-120

Fonte: LORENÇO, 2004.

A frutose tem valor econômico aproximadamente três vezes maior que a sacarose, e o consumo mundial na forma de xaropes de alta concentração de frutose, aumentou de 10,2 milhões de toneladas em 1995 para 13,6 milhões de toneladas em 2000. Nos EUA, quatro empresas (Archer Daniels Midland, a Cargill, Staley Manufacturing Co, CPC Internacional) controlam 85% dos 2,6 bilhões de dólares gerados pelos xaropes (CERQUEIRA, 2012).

Para a obtenção do xarope de frutose de milho, a primeira etapa consiste na adição de soda cáustica e/ou ácido clorídrico, além de alta temperatura e a utilização da primeira enzima, a α-amilase, para obtenção de dextrinas e oligossacarídeos. Posteriormente é adicionada ao meio uma segunda enzima, a amiloglicosidase que hidrolisa as dextrinas e oligossacarídeos em glicose. O produto destas duas enzimas é o xarope de glicose também chamado de xarope de milho. A terceira enzima a ser utilizada para finalizar o processo de obtenção de frutose é a enzima glicose-isomerase. Essa enzima é relativamente cara, converte glicose em frutose após um processo de isomerização para posterior obtenção de xarope de glicose e frutose. Na sequência varias etapas de separação, purificação, conversão, descoloração e concentração, produzindo-se xaropes com 42 até 90% de frutose (GONG, et al., 2007; PARKER et al., 2010; CHAND, et al., 2012).

Por outro lado, o processo de hidrólise ácida provoca propriedades indesejáveis no xarope obtido, como sabores e odores residuais, coloração escura, devido à caramelização de açúcares, e reação de Maillard com proteínas. A utilização de minerais ácidos e subseqüente neutralização dos mesmos interferem nas etapas posteriores de purificação do produto (VERACHTERT e DE MOT, 1990, TOMOTANI e VITOLO, 2010).

A frutose também pode ser obtida por hidrólise ácida de inulina, mas a frutose é facilmente degradada a pH baixo e o processo dá origem à coloração do hidrolisado de inulina e à formação de subprodutos sob a forma de anidridos de difrutose (HERNÁNDEZ-URIBE et al, 2008).

Uma maneira mais fácil, direta e mais rápida poderia ser a hidrólise enzimática de Inulina. A conversão deste polímero ocorre a partir de uma única etapa, empregando-se a enzima inulinase de fontes microbianas com rendimentos de até 95% de frutose. A hidrólise realizada pela inulinase tornou-se uma boa alternativa, considerando-se a qualidade do produto obtido. Contudo, a falta de produção em larga escala de inulina acaba por limitar a produção de xaropes com alto teor de frutose a partir deste polímero. A mais promissora fonte de inulina é a Alcachofra de Jerusalém (*Heliantus tuberosus*) e, apesar das técnicas de plantio e colheita bem definidas, a escala de produção é muito baixa em comparação a outras fontes de açúcar, como a cana-de-açúcar e o milho (VICENTE, 2000).

2.2 Síndrome metabólica

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são uma das maiores causas de mortalidade no mundo, sendo responsáveis por cerca de 63% das 57 milhoes de mortes ocorridas em 2008. Entre as DCNT de maior relevância encontram-se as doenças cardiovasculares e o diabetes mellitus tipo 2 (WHO, 2010; KUSCHNIR et al, 2016; GÓMEZ et al., 2019).

A síndrome metabólica (SM) conhecida como “Quarteto Mortal” ou “Sindrome X” (REAVEN, 1988; HAFFNER et al., 1992; SALAROLI, et al., 2007; BOPP e BARBIERO, 2009; SILVA-JÚNIOR et al., 2018), é um agrupamento de fatores de risco associados à DCNT. Os principais fatores componentes são dislipidemia, hipertensão, disglicemia e obesidade (BARRERA et al., 2008; ALBERTI et al., 2009; BOLÍVAR-MEJÍA et al., 2010; SÁNCHEZ et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020).

Estima-se que entre 20-25% da população mundial tem síndrome metabólica (IDF, 2010). No Brasil, em um estudo realizado por Moreira *et al.,* (2014) com 1369 individuos adultos, a prevalência estimada da Sindrome Metabolica foi de 22,7%.

A predisposição genética, a alimentação inadequada e a inatividade física estão entre os principais fatores que contribuem para o surgimento da SM, cuja prevenção é um desafio mundial contemporâneo, com importante repercussão para a saúde (BOUCHARD, 1995; LIESE et al., 1998; LAKKA et al., 2003; SÁNCHEZ et al., 2011).

Em estudos realizados por vários autores, mostraram que a ingestão de frutose (HFCS) e/ou bebidas açucaradas são catalogadas como um fator de risco potencial para síndrome metabólica e diabetes, ao realizar experimentos com animais, fornecendo dietas com xarope de frutose (HFCS) e controles com quantidades iguais de glicose (HAVEL, 2005; JOHNSON, et al., 2007; SEGAL et al., 2007; PALMER et al., 2008).

Por outro lado, estudos em seres humanos também mostraram que doses de frutose (HFCS) podem resultar em resistência à insulina, hipertrigliceridemia pós-prandial, acúmulo de gordura e pressão arterial elevada (TEFF, et al., 2004; BROWN et al., 2008; STANHOPE e HAVEL, 2008; STANHOPE et al., 2009).

Swarbrick *et al.,* (2008) mostraram que o consumo prolongado de frutose pode aumentar a glicose de jejum, triglicérideos pós-prandiais (TGA) e apolipoproteína-β em mulheres com sobrepeso.

O consumo de frutose em longo prazo também foi associado à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) que é outra manifestação da síndrome metabólica (SARTORIO et al., 2007; OUYANG, et al., 2008), com apresentação de níveis mais altos de frutoquinase mRNA. A característica distintiva da patogênese da DHGNA, tanto histológica quanto metabólica, é o acúmulo de triglicerídeos no fígado (DONNELLY, et al., 2005; STANHOPE e HAVEL, 2008; SÁNCEHEZ-LOZADA et al., 2010).

O mecanismo pelo qual a frutose provoca síndrome metabólica é devido ao seu metabolismo único que facilita a síntese de TGA e ácido úrico (HAVEL, 2005; NAKAGAWA et al., 2006). Este mecanismo foi demonstrado ao incubar células endoteliais humanas, células tubulares renais e hepatócitos com as concentrações de frutose, as quais induziram a sobre-expressão e o aumento da atividade da frutoquinase, redução do ATP intracelular e aumento dos níveis intracelulares de ácido úrico (GLUSHAKOVA, et al., 2008; OUYANG, et al., 2008).

Outros autores como Bray *et al*., (2004) e Klurfeld *et al*., (2013) associaram a SM como uma potencial relação entre consumo de HFCS e a prevalência de obesidade nos Estados Unidos entre 1970 e 2000, conforme ilustrado na figura 2.

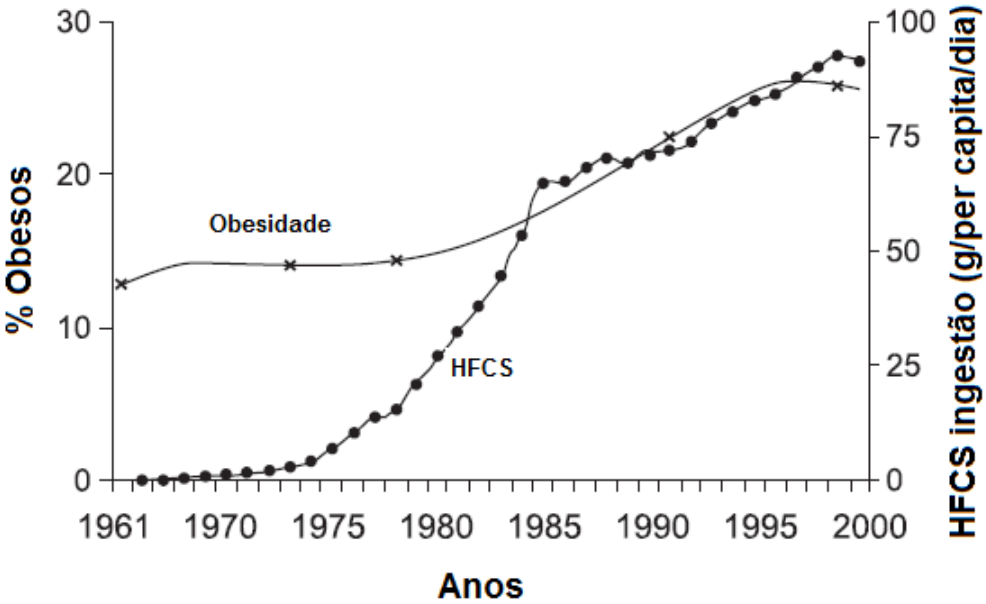


Figura 2 - Consumo xarope de frutose em bebidas (HFCS) vs obesidade.
Fonte: Adaptado de Bray et al., (2004)

2.2.1 Diabete mellitus

A diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia e intolerância à glicose, seja por deficiência de insulina ou perda da eficácia da ação da insulina, ou em combinação de ambos. A hiperglicemia crônica da diabetes está associada à disfunção e comprometimento de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (OMS, 2008; ROJAS et al., 2012; RODRÍGUEZ e GOUARNALUSES, 2014; RODRÍGUEZ e LLANES, 2020).

Alguns processos patológicos estão envolvidos no aumento da diabetes, estes, incluem a destruição autoimune de células β do pâncreas com a consequente deficiência da ação da insulina (ADA, 2006; COSMA et al., 2012; GUTIÉRREZ-RODELO et al., 2017; BOLÍVAR-MEJÍA et al, 2019).

Sua natureza crônica, a gravidade das complicações e os meios necessários para controlá-la tornam o DM uma doença muito onerosa não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, mas também para o sistema de saúde (WHO, 2002), além dos custos intangíveis (p. ex., dor, ansiedade, inconveniência e perda de qualidade de vida).

O Finnish Diabetes Prevention Study (DPS) mostrou que mudanças de estilo de vida, em 7 anos, diminuíram a incidência de DM em 43% (LINDSTRON, et al., 2006). Os resultados do Diabetes Prevention Program (DPP) mostraram redução de 34% em 10 anos de acompanhamento na incidência de casos de DM mediante o estímulo a uma dieta saudável e à prática de atividades físicas (KNOWLER, et al., 2009). Em um estudo longitudinal com 84.941 enfermeiras e seguimento de 16 anos, o controle de fatores de risco modificáveis, como dieta habitual, atividade física, tabagismo e excesso de peso, associou-se à redução de 91% na incidência de DM e de 88% nos casos com história familiar de DM (HU, et al., 2001).

Tendo-se a má alimentação como causa relacionada à DM, se faz necessário o desenvolvimento de alimentos que proporcionem uma melhor qualidade de vida e segurança ao consumidor (BRASIL, 1998, ARAÚJO, et al., 2001).

2.3 Frutanos

Os frutanos são depois do amido e da sacarose, os carboidratos de maior ocorrência entre plantas (HENDRY e WALLECE, 1993). São polímeros lineares ou ramificados de frutose originados a partir da sacarose, unidos por ligações β (2→1) e

β (2→6) (CAPITO, 2001). Esses polímeros de D-frutose carregam um resíduo de D-glicose na extremidade da cadeia, unido por uma ligação do tipo α-1,2 como na sacarose (POLLOCK et al., 1996; DE ROOVER et al., 2000). Embora a sacarose seja sintetizada no citoplasma, os frutanos são armazenados e sintetizados no vacúolo pela ação de frutosiltranferases (VIJN e SMEEKENS, 1999).

Adicionalmente ao papel de composto de reserva, os frutanos estão envolvidos na proteção das plantas em situações de seca, salinidade ou baixa temperatura. Por serem compostos altamente solúveis, podem promover o ajuste osmótico em situações ambientais adversas pela variação no grau de polimerização de suas moléculas (PILONS-SMITS et al., 1999; KONSTANTINOVA et al., 2002; RITSEMA e SMEEKENS, 2003). Alguns autores propuseram que em situações de estresse os frutanos podem prevenir danos à membrana, mantendo sua integridade e o funcionamento celular (DEMEL et al., 1998; VEREYKEN et al., 2001; HINCHA et al., 2002).

Hendry e Wallece (1993) referiram que dentre as espécies que armazenam frutanos, encontram-se muitas de importância econômica como cereais (cevada, trigo, aveia e centeio), vegetais (alcachofra, aspargos, chicória, yacon, cebola) ornamentais (dália e tulipa) e gramíneas forrageiras (Lolium e Festuca)

Os frutanos (Figura 3) podem ser classificados como (CONTADO, 2009):

- Frutanos tipo inulina, baseado em 1-cetose, com ligação β-2-1, entre os resíduos de frutose com grau de polimerização (GP) médio de 20-60. Aproximadamente 35 resíduos de frutose na família Asteracea (*Helianthus tuberosus, Dalia* sp*., Chicorium* sp*., e Smallanthus sonchifolia* (Yacon).

- Frutanos tipo levano, baseado em 6-cetose, com ligações β-2-6, entre resíduos de frutose com GP médio de 25 e são encontrados em monocotiledôneas, principalmente em gramíneas (*Triticum* sp. (trigo); *Hordeon* sp. (cevada).

- Frutanos com ligações mistas, dois tipos β-2-1 e β-2-6 e cadeia ramificada com glicose na extremidade da cadeia e são encontradas em Liliaceas (*Allium*, *Aspargus* e bulbos de tulipa).

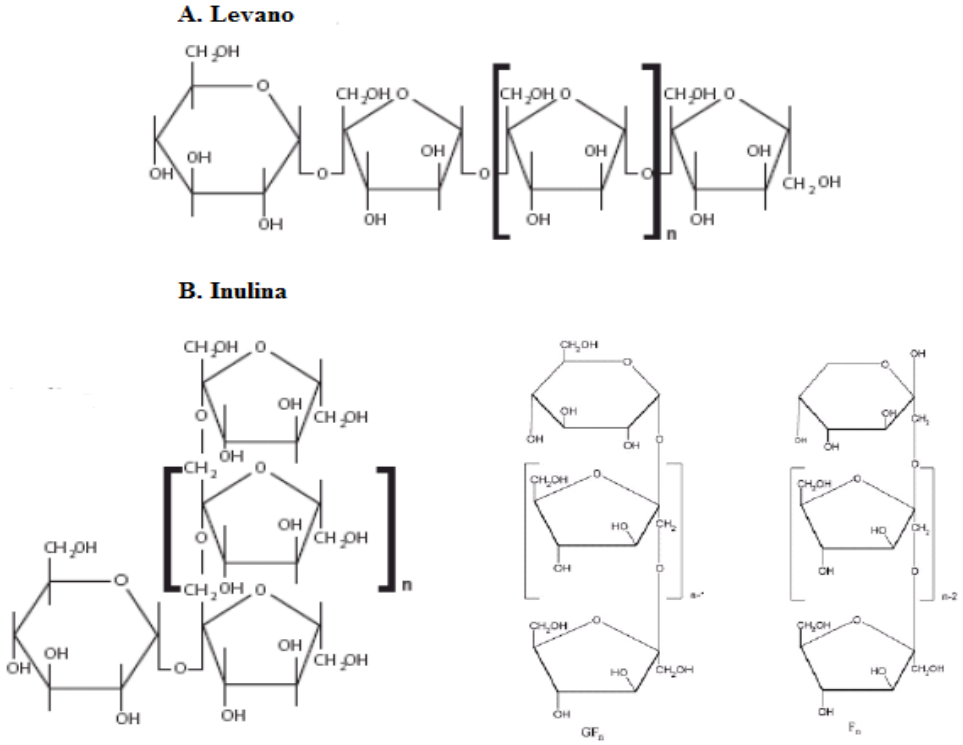


Figura 3 - Estutura básica frutanos. A. Levano. B. Inulina
Fonte: LÓPEZ, et al., 2003.

2.3.1 Inulina

Na natureza, a inulina é uma mistura de polissacarídeos compostos de 20-30 cadeias de unidades de frutose (ligadas por β- (2,1)-D-fructosil-frutose) de vários comprimentos com uma molécula de glicose no final de cada cadeia de frutose (BAUMGARTNER et al., 2000; PORTES et al., 2005; CHI et al., 2011).

A inulina está presente como um hidrato de carbono de reserva nas raízes e tubérculos de plantas tais como alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus)* e chicória (*Cichorium intybus),* embora também se possa obter da raiz de dália (*Dahlia* spp), cebola (*Allium cepa* L), alho poró (*Allium porro* L), alho (*Allium sativum*) espargos (*Asparragus officinalis*) e yacon (*Smallanthus sonchifolius*) entre outros (Tabela 2) (KAUR e GUPTA, 2002; LEROY et al., 2010). Os materiais secos dos tubérculos contêm mais de 50% de inulina (PANDEY et al., 1999; CHI et al., 2011; CONTADO et al., 2015).

Tais fontes de inulina têm recebido bastante atenção por representar uma matéria-prima renovável, barata e abundante para produção de xarope de frutose, etanol, biodiesel, acido cítrico e fruto-oligossacarídeos (FOS) entre outros produtos químicos (CHI et al., 2009; CHI et al., 2011; ZHAO et al., 2010).

Tabela 2 - Fontes de Inulina

Plantas	Parte comestível	% Inulina	% FOS
Banana	Fruta	0,3-0,7	0,3-0,7
Centeio	Cereal	0,5-1	0,5-1
Cevada	Cereal	0,5-1,5	0,5-1,5
Trigo	Cereal	1-4	1-4
Cebola	Bulbo	1-8	2-6
Espargos	Bulbo	2-3	-
Alcachofra	Folhas	3-10	1
Alho-porró	Bulbo	3-10	2-5
Yacon	Raíz	3-19	-
Alho	Bulbo	9-16	3-6
Dente-de- leão	Folhas	12-15	-
Chicória	Raiz	15-20	5-10
Alcachofra-de-jerusalém	Tubérculo	16-20	10-15
Agave tequilana	Folhas	20-24	-

Fonte: Adaptado de SIRISANSANEEYAKUL et al., 2007

Nos últimos anos, a alcachofra de Jerusalém foi considerada uma das mais importantes fontes de inulina para produção de frutose na indústria, pois, acumula cerca de 50-70 g / kg de seu peso em frutano do tipo inulina com rendimento 5,4 ton/ha (LI e CHAN-HALBRENDT, 2009).

A inulina e os inulooligossacarideos têm amplas aplicações em vários tipos de alimentos como confeitaria, preparações de frutas, sobremesas de leite, iogurte e queijo fresco, chocolate, sorvete e molhos (CABEZAS et al., 2002, KAUR e GUPTA, 2002).

2.3.1.1 Yacon

O yacon (*Smallantus sonchifolia*) da família Asteracea, é um tubérculo perene originária da América do Sul. É cultivado como uma cultura de raiz nos Andes da Colômbia, ao noroeste da Argentina em altitudes entre 1000 e 3500m (ZARDINI, 1991). É um vegetal considerado alimento funcional, que armazena em seus tubérculos grandes quantidades de carboidratos, principalmente frutanos, apresentando um sabor adocicado quando consumido *in natura.* Cerca 60-70% dos frutanos são do tipo inulina (ITAYA et al., 2002; CHESINI, et al., 2013), com grau de polimerização (GP) máximo de 12 unidades de frutose (CAZETTA et al., 2005; CAMPOS et al., 2012; CONTADO et al., 2015).

A esse tubérculo de yacon (Figura 4) são atribuídos muitos efeitos benéficos para o homem, pois os frutanos não são digeridos pelo trato gastrointestinal superior, estimulando o crecimento de bifidobactérias intestinais (efeito prebiótico),

além de possuir propriedades antidiabética, hipocolesterolêmica, antioxidantes e antimicrobiana (FONSECA, 2003; OJANSIVU et al., 2011).

No Brasil, a espécie foi introduzida em 1991 no Estado de São Paulo, na região de Capão Bonito, pela colônia Japonesa, que utiliza seus tubérculos *in natura* ou desidratados, assim como suas folhas na forma de chá, para o tratamento contra diabetes e altas taxas de colesterol no sangue (KAKIHARA et al., 1996).

Figura 4 - Aspecto geral tubérculo de yacon
Fonte: CONTADO, 2009.

2.4 Inulinase

As inulinases são enzimas que degradam ligações ß-2,1 de cadeias de ß-frutanas através de um processo de endo ou exo-degradação (CHI, et al., 2009; KANGO e JAIN, 2012; CHESINI, et al., 2013).

Hidrolisa a sacarose, inulina e levanas, enquanto a invertase hidrolisa principalmente a sacarose (LORENÇO, 2004).

São obtidas de tubérculos e raízes de plantas, como alcachofra de Jerusalém, chicória e yacon (KAUR e GUPTA, 2002; CAMPOS et al., 2012; CASTANO, 2013; RAMOS, 2014; JARILLOS, 2016; LARA-FIALLOS, et al., 2017) ou através de microrganismos, em uma grande variedade de fungos (XIAO et al., 1989; NAKAMURA et al. 1997, BASTON e NEAGU, 2013; SINGH et al., 2018), leveduras (HENSING et al., 1994; SIRISANSANEEYAKUL et al., 2007; GARUBA e ONILUDE, 2012) e bactérias (GERN et al., 2001; DILIPKUMAR et al., 2013; ARUNA e AMITA, 2014).

As inulinases microbianas são classificadas de acordo com seu modo de ação. As exo-inulinases (β-D-frutopiranosídeo EC 3.2.1.80) são específicas para a

hidrólise de inulina, e quebram as ligações entre as unidades de frutose que estão localizadas longe das extremidades da rede de polímero, para a produção de oligossacarídeos. Podem hidolisar completamente a inulina, produzindo concentrado de frutose com cerca de 95% de pureza, em uma única etapa enzimática (ASTOLFI, 2010; PESSONI, et al., 2004).

As endo-inulinases (β-D-frutanofrutanohidrolase; EC 3.2.1.7) (Figura 5) agem de forma randômica sobre o acoplamento interno na molécula de inulina, liberando inulo-triose, inulo-tetraose e inulopentaose como produtos principais (ETTALIBI E BARATTI, 2001; OHTA et al., 2002; JING et al., 2003; CHI et al., 2009).

Figura 5 - Estrutura cristalina de endoinulinase de *Aspergillus ficuum*.
Fonte: POUYEZ et al., 2012

O uso de inulinases obtidas a partir de microrganismos tem sido proposto como a abordagem mais promissora para a obtenção de frutose e fruto-oligossacarídeos a partir de inulina por apresentar vantagens quando comparada a hidrólise ácida da inulina, na qual ocorre a formação de anidridos difrutose, que, apesar de não terem capacidade edulcorante, causam cores indesejáveis ao produto final, tornando-se um método inadequado para a produção de frutose (ASTOLFI, 2010; TREICHEL, 2004).

2.4.1 Propriedades físico-químicas da inulinase

A enzima inulinase possui condições físico-químicas que a torna atrativa para a indústria, como, por exemplo, sua estabilidade em valores de pH baixo (4-6) e altas temperaturas (50-70 ºC), proporcionando menor risco de contaminação microbiana (MAKINO, 2004; TORRES, 2001 TREICHEL, 2004).

As condições de temperatura de atuação da enzima inulinase são diferentes conforme o substrato utilizado. Quando a sacarose é utilizada a temperatura ótima

(cerca de 70 ºC) é superior àquela quando se utiliza inulina (50 a 55 ºC) como substrato. Valores reportados de pH ótimo estão principalmente entre 4,5 e 5,5. Quanto à estabilidade, a enzima perde atividade rapidamente acima de 60 ºC (SCHNEIDER et al., 2004).

Os valores encontrados na literatura para definir o peso molecular da inulinase diferem entre si. No trabalho de GUPTA et al. (1994a), o peso molecular da inulinase de *K. marxianus* foi estimado em aproximadamente, 250 kDa. As inulinases de *F.oxysporum e A. niger* têm peso molecular na faixa de 300 a 325 kDa (GUPTA et al., 1988; Gupta et al., 1990; GUPTA et al., 1994b). No entanto, Azhari et al. (1989) reportaram peso molecular de 81 kDa para exo-inulinase de *Aspergillus sp*, enquanto que Ettalibi e Baratti (1987) encontraram, para exo-inulinase de *A. ficuum*, um peso molecular na faixa de 74 a 76 kDa.

Hensing et al. (1993), estudando a produção de inulinase por *K. marxianus*, concluíram que a enzima secretada para o meio de cultura é um dímero, consistindo em duas subunidades (165kDa/87kDa), enquanto que a enzima retida na parede (intracelular) é um tetrâmero (335kDa/87kDa). Neste caso, tanto a inulinase secretada para o meio de cultivo como a inulinase retida na parede celular têm sub-unidades idênticas, consistindo em um polipeptídeo que contém 26-37% do seu peso molecular como carboidrato. As duas formas de inulinase, intra e extracelular, diferem apenas no grau de oligomerização. A retenção da glicoproteína no espaço periplasmático da parede da levedura é então ocasionada pela permeabilidade da camada mais extrema da parede celular. A oligomerização de proteínas pode então desempenhar um papel importante na retenção da enzima na parede celular. Por isso, acredita-se que ocorra um sinergismo entre a ação das endo e exo-inulinases, sendo a frutose obtida mais facilmente do que quando empregados outros métodos. No entanto, não é possível determinar se as enzimas coexistem, assim como não é possível separar as duas enzimas completamente por métodos convencionais, uma vez que elas possuem propriedades similares (ASTOLFI, 2010; TREICHEL, 2004).

2.4.2 Microrganismos produtores de inulinase

A inulinase pode ser obtida a partir de vários microrganismos e apresenta características diversas pelo tipo de cultivo e rendimentos (CHI, et al. 2009). Alguns microrganismos que podem ser citados como exemplos de produtores de inulinase são: *K. marxianus var. fragilis, K. marxianus var. bulgaricus, F. oxysporum, A. niger*

(SANTOS, et al., 2007; GONG et al., 2007; SHENG et al., 2008). Entre os microrganismos produtores, as leveduras, principalmente do gênero *Kluyveromyces*, foram as que apresentaram uma melhor produtividade e despertado grande interesse por serem microrganismos calssificados como *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*) e serem aceitos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (LANE e MORRISSEY, 2010). Outras espécies como *Penicillium spp, Bacillus* spp*., Clostridium* spp*., Pseudomonas* spp*., Arthrobacter* spp*., Staphylococcus* spp*., Xanthomonas* spp*., Cryptococcus* spp*., Pichia* spp*., Sporotrichum* spp*.,* e *Candida* spp. (GAO et al., 2007a, b) também são produtores de inulinase (Tabela 3).

Tabela 3 - Produtos obtidos a partir de inulinase de diferentes microrganismos.

Produto	Substrato	Microrganismo	Refêrencia
Etanol	Inulina de chicória e dália	*A. niger* 817 e *S. cerevisiae* 1200	Ohta et al. (1993)
Xarope frutose	Inulina pura da dália	Inulinase produzida e imobilizada a partir de *A. niger* mutante 817	Nakamura et al. (1995)
Xarope frutose	Tubérculos de alcachofra	Inulinase imobilizada a partir de *Kluyveromyces sp.*Y-85	Wei et al. (1999)
Xarope frutose	Inulina	Inulinases de *A. niger* TISTR 3570 e *C. guilliermondii* TISTR 5844	Sirisansaneeyakul (2007)
Inulooligosacarídeos	Inulina	Endo-inulinase de *A. niger*	Mutanda et al. (2008)
Ácido cítrico	Inulina	Inulinase recombinante de *Y. lipolytica* SWJ-1b e *K. marxianus* CBS 6556	Liu et al. (2010)
Acido lático	Extrato de alcachofra de Jerusalém	Inulinases de *A. niger* SL-09 e *Lactobacillus sp*. G-02	Ge et al. (2009)
Manitol	Hidrólise de inulina	L. intermedius B-3693	Saha (2006)

Adaptado de CHI et al., 2011.

2.4.3 Identificação de microrganismos produtores de inulinase

A identificação tradicional de microrganismos tem sido realizada por meio de métodos fenotípicos para avaliar características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e culturais, mas os resultados não são muito confiáveis. No entanto, métodos fenotípicos podem ser usados como triagem no processo de identificação de microrganismos como e o caso do API20C AUX, um método simples, baseado na capacidade assimilativa de substratos que tem sido amplamente usado para identificar leveduras (SILVA e CANDIDO, 2005; CHEN et al., 2010, FERREIRA et al., 2016).

Na atualidade numerosas técnicas genotípicas, como marcadores moleculares, sequenciamento de DNA e amplificação por PCR (*Polymerase Chain*

Reaction) de regiões ITS de ADNr, entre outras, tornaram-se o principal caminho para identificar corretamente microrganismos. A região ITS é uma sequência de particular importância para a classificação de fungos, possui áreas altamente conservadas e áreas de alta variabilidade (CHI et al., 2009; LIU et al., 2013).

A PCR baseia-se na capacidade da enzima polimerase termoresistente de replicar sequências específicas de ácido desoxirribonucléico (DNA) ou de ácido ribonucleico (RNA) a partir de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita réplica (*primers*), que flanqueiam a sequência que se deseja amplificar. Por meio de variações alternadas e cíclicas de temperatura processadas automaticamente em um equipamento chamado termociclador, é realizada a desnaturação, o anelamento e a extensão da fita complementar a fita molde, uma determinada sequência é amplificada, ciclo após ciclo, em progressão geométrica, o que torna possível sua visualização em gel de eletroforese na forma de uma banda (NEWTON, GRAHAM, 1997; FERREIRA, 2001). Referente à expressão de inulinase em microrganismos foi confirmado que a inulinase (EC 3.2.1.7) é um membro da família dos glicosídeos hidrolase 32 (GH32), que catalisa a hidrólise da inulina. O local ativo do GH32 está presente dentro do módulo β-hélice. A inulinase é caracterizada pela presença de pelo menos seis motivos altamente conservados. Nas exo-inulinases, as sequências de aminoácidos conservados 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são WMNDPNGL, RDP, ECP, SVEVF, FS e Q, respectivamente. Enquanto que na endo-inulinase, as sequências de aminoácidos conservados 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são WMNEPNGL, RDP, EVP, SVEVF, FT e Q, respectivamente (CHI et al., 2009; LIU et al., 2013).

2.4.4 Produção e extração

A inulina é o substrato mais utilizado como fonte de carbono para a produção de inulinase. Porém, devido ao custo deste polímero, a utilização de meios de cultivo com inulina pura não é economicamente viável em escala industrial. Dessa forma, extratos de algumas plantas ricas em inulina, como a Alcachofra de Jerusalém, Agave ou yacon, têm sido utilizados na produção da enzima (CAZETTA et al., 2005; CONTADO, 2009; CHAND et al., 2012; CHESINI et al., 2013).

Tradicionalmente, a inulinase é produzida por fermentação submersa. Dentro das vantagens desta fermentação encontra-se: a água é altamente disponível e é o componente majoritário do meio; o meio de cultura flui livremente; tem grande

profundidade média; o meio é composto de nutrientes provenientes de várias fontes; não há gradientes de concentração de nutrientes, mas há uma uniformidade na sua distribuição no meio; asséptico; os fungos crescem formando *pellets*; o meio é composto de duas fases: uma líquida e um gás; o oxigênio disponível é que é dissolvido na fase líquida; requer uma pequena quantidade de inóculo para iniciar o cultivo; o produto final obtido é diluído no meio e requer estágios posteriores de extração e concentração (SELVAKUMAR e PANDEY, 1999; KALIL et al., 2001; GILL et al., 2003; SKOWRONEK et al., 2004; SIRISANSANEEYAKUL et al., 2007; GOOSEN et al., 2008; KANGO et al., 2008; CHESINI et al., 2013; DINARVAND et al., 2017; PRANGVISET et al., 2018; ILGIN et al., 2020). No entanto, a produção de inulinase por fermentação em estado sólido (FES) também e estudada devido a que as condições de cultura são mais semelhantes ao habitat natural dos microrganismos, de modo que estes são capazes de crescer e excretarem grandes quantidades de enzimas. Além disso, esses processos são de interesse para os países com abundância de biomassa e resíduos agroindustrial, uma vez que estes podem ser utilizados como matérias-primas baratas (CASTILHO et al., 2000; BENDER et al., 2006; CHEN et al., 2007; MAZUTTI et al., 2006).

A Tabela 4 apresenta um resumo dos principais microrganismos produtores de inulinases, os princípios de fermentações empregados e a produção máxima alcançada em cada trabalho.

Tabela 4 - Expresão da inulinase em microrganismos e atividade enzimática

Inulinase	**Produtores**	**Tipo de fermentação**	**Atividade Inulinase**	**Km/Vmax**	**Refêrencia**
Exo-	*C. aureus G7a*	Sólida	420.9±1.3 U/g	20.06 mg/mL e 0.0085 mg/min	Sheng et al. 2008
Exo-	*P. guilliermondii*	Líquida	61.5±0.4 U/mL	21.1 mg/mL e 0.1 mg/min	Gong et al. 2007
Exo-	*P. guilliermondii Mutante M-30*	Sólida	455.9±1.2 U/g	-	Guo et al. 2008
Exo-	*K. marxianus YS-1*	Líquida	55.4 U/mL	11.9 e 3.92 mM	Singh et al. 2007
Exo-	*K. marxianus NRRL Y-7571*	Sólida	391.9 U/g	-	Bender et al. 2006
Exo-	*Kluyveromyces sp S120*	Sólida	409.8 U/g	-	Chen et al. 2007
Exo-	*A. niger NK-126*	Líquida	55 U/mL	-	Kango 2008
Exo-	*Staphylococcus sp*	Sólida	107.6 U/g	-	Selvakumar and Pandey 1999

Adaptado de CHI et al., 2009.

2.4.5 Purificação da inulinase

A maior parte dos estudos publicados envolvendo purificação de inulinase utilizam processos cromatográficos (ZHANG et al., 2004; SHARMA et al., 2007; ZHANG et al., 2009). No entanto, este processo é difícil de ser escalonado e possui um alto custo. Para minimizar estes custos, a otimização de metodologias rápidas e eficazes para o processo de purificação são de grande importância (ISHIHARA e YAMAMOTO, 2005; MORAES e KALIL, 2009, GOLUNSKI, 2016).

Entre as técnicas que podem ser aplicadas na purificação de enzimas, de modo a maximizar a pureza sem acarretar maiores prejuízos no rendimento, destacam-se a precipitação com sais e solventes orgânicos, o emprego de sistema aquoso bifásico (SAB), membranas de afinidade e o uso de nanopartículas magnéticas.

Os processos de precipitação com sais, como o sulfato de amônio, e solventes são bastante utilizados em operações de concentração e pré-purificação de proteínas (ZHANG et al., 2004; CORTEZ e PESSOA Jr, 1999).

A diálise e uma técnica comum e econômica baseada na difusão. Neste procedimento uma membrana semipermeável permite o movimento de moléculas baseado no tamanho, permitindo a separação (AMORÓS, et al., 2013; SANTOS, et al., 2021).

2.4.6 Imobilização

Enzimas são catalisadores eficazes, entretanto apresentam algumas desvantagens em sua utilização industrial, visto que são relativamente instáveis a fatores químicos, físicos ou biológicos e dificilmente recuperados ao final do processo. Uma maneira de torná-las mais ativas e estáveis é a imobilização (GIRELLI e MATTEI, 2005; VITOLO, 2001).

A imobilização consiste na confinação da enzima em uma fase (matriz ou suporte), com retenção da atividade catalítica (DALLA-VECCHIA et al., 2004; GUISAN, 2006; CARDOSO et al., 2009; GARCIA-GALAN et al., 2011).

As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas em relação às enzimas na sua forma livre, conforme Pradella (2001), Carvalho *et al.* (2006) e Santos (2010) são: (1) possibilidade de aproveitar a atividade catalítica por um maior período de tempo e aplicar em processos contínuos; (2) facilidade em separar o catalisador do produto da reação, já que a enzima imobilizada não é solúvel no meio

da reação; (3) redução do volume de reação, alta concentração enzimática em menor volume de reator; (4) alteração, em alguns casos, das propriedades catalíticas da enzima em relação a sua forma solúvel, como, por exemplo, aumento da estabilidade ao pH e à temperatura, e redução dos efeitos de inibição pelo substrato e produto que são removidos continuamente do biorreator.

Dentre as desvantagens que a imobilização pode apresentar, destacam-se a possibilidade de diminuição da atividade da enzima, devido à difusão e transferência de massa (mobilidade restringida na ligação ao suporte), limitação do acesso do substrato ao sítio ativo, causada pela presença do suporte sólido, acúmulo de produto próximo ao sítio ativo, fator que pode alterar a cinética da reação (velocidade) e pH no microambiente da enzima (VIEIRA, 2009).

As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição química, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo, entre outras (DATTA et al., 2013; CAVALCANTE, 2014).

Quanto à composição química, os suportes são classificados em inorgânicos (minerais e fabricados) e orgânicos (naturais e sintéticos). Também podem ser classificados conforme sua morfologia como materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel (VITOLO, 2001; GUISAN, 2006; VIEIRA, 2009).

Os suportes inorgânicos (areia, bentonita, sílica, vidro, metais, óxidos, cerâmina, zeolita, grafeno oxidado, entre outros) são mais utilizados por ser estáveis a degradações por microrganismos, física, química e térmica, resistência mecânica e estabilidade estrutural, o que evita a compactação em processos contínuos e possibilitam a regeneração do suporte para reutilização (CASTRO et al., 1999; DATTA et al., 2013; JESIONOWSKI et al., 2014)

Dentro dos suportes orgânicos podem-se destacar: agarose, celulose, alginatos, colágeno, albumina, poliestireno, entre outros. No entanto, suportes alternativos obtidos de resíduos também são utilizados na imobilização de enzimas, como, por exemplo, casca de ovo de galinha, sabugo de milho, bagaço de cana de açúcar, entre outros (NIGHOJKAR et al, 1995; DE PAULA et al., 2008; SANTOS, 2010)

A imobilização pode ser realizada através de método reversível (adsorção, ligação iônica, ligações metálicas, ligação disulfeto) e irreversível (ligação covalente,

aprisionamento ou inclusão, entrecruzamento) (DALLA-VECCHIA et al., 2004; ADRIANO et al., 2008; ANSARI e HUSAIN, 2012; ARAGON, 2013).

A imobilização covalente multipontual promove uma rigidez na estrutura terciária da enzima, que pode ser traduzido em estabilização estrutural do catalisador (FERNANDEZ, et al., 1998; COWAN, et al., 2011; PESSELA, et al. 2012). Um sistema “adequado” de imobilização requer uma série de características para facilitar a união covalente multipontual (UCM) entre a enzima e o suporte (RODRIGUES, et al., 2008). Estas características referem-se à natureza do suporte, aos grupos reativos dos mesmos e as condições de imobilização (pH, temperatura, disponibilidade de grupos reativos) (ADRIANO, et al., 2008; ANSARI e HUSAIN, 2012).

Vários autores têm avaliado sistemas com inulinase imobilizada (GUPTA et al., 1992; NAKAMURA et al., 1995; WENLING, YUN et al., 1997; HUIYING e SHIYUAN, 1999; YUN et al., 2000; ETTALIBI e BARATTI, 2001; GILL et al., 2006; ROCHA et al., 2006; DE PAULA et al., 2008; NGUYEN et al.,2011; TIVEDI et al., 2015; TRITEK, et al., 2015), ou de células imobilizadas com atividade inulinolítica (BARRANCO-FLORIDO et al., 2001; YUN et al., 1999). A utilização de um método de imobilização simples, eficiente e de baixo custo seria a solução para um experimento em larga escala (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000; SCHIMID et al., 2001).

2.4.6.1 Grafeno oxidado

O recente aumento do interesse nos materiais da família do carbono abriu novos caminhos para a produção de matrizes de novos nanomateriais funcionais. Entre eles, o grafeno, um material bidimensional composto por várias folhas planas de átomos de carbono ligados por sp2, tem atraído muita atenção das comunidades científicas devido às suas propriedades térmicas, químicas, físicas, mecânicas e elétricas únicas (PHAN et al., 2011; SAMUE et al., 2020) e fonte barata (grafite).

Desde que foi descoberto em 2004, o grafeno tem emergido como um candidato promissor para a geração de novos materiais híbridos com suas excelentes propriedades para uma ampla variedade de aplicações potenciais em suporte de catalisador, componentes eletrônicos, sensor químico, baterias de íon de lítio (DOS SANTOS, 2012, SHAMAILA et al., 2016) Entre as estratégias conhecidas para a preparação de materiais híbridos à base de grafeno, a transformação química

de grafite puro em óxido de grafite (GO), que pode ser facilmente esfoliado em meio aquoso para produzir dispersões estáveis de principalmente folhas de camada única de GOS é a mais versátil e de método eficaz. Além disso, a presença de grupos contendo oxigênio covalentemente ligados, incluindo hidroxila, grupos epóxi no plano basal e grupos carboxílicos na borda da superfície de GOS fornece uma alça para a modificação química do grafeno (ROYVARAN, et al., 2016). Esses grupos funcionais oxigenados no GO concedem-lhe propriedades hidrofílica, o que o torna prontamente dispersível em água e muitos outros solventes (PATEL, 2016).

A estrutura precisa do GO ainda é desconhecida, pois o conteúdo dos grupos funcionais contendo oxigênio depende do grau de oxidação e do tempo de reação que afetam significativamente a estrutura do GO. Como o grafite tem natureza higroscópica e composição não estequiométrica, sua estrutura ainda está em discussão. Após longos esforços teóricos e experimentais, vários modelos foram propostos para um entendimento considerável da estrutura do grafite (Figura 6) (ADEEL, et al., 2018)

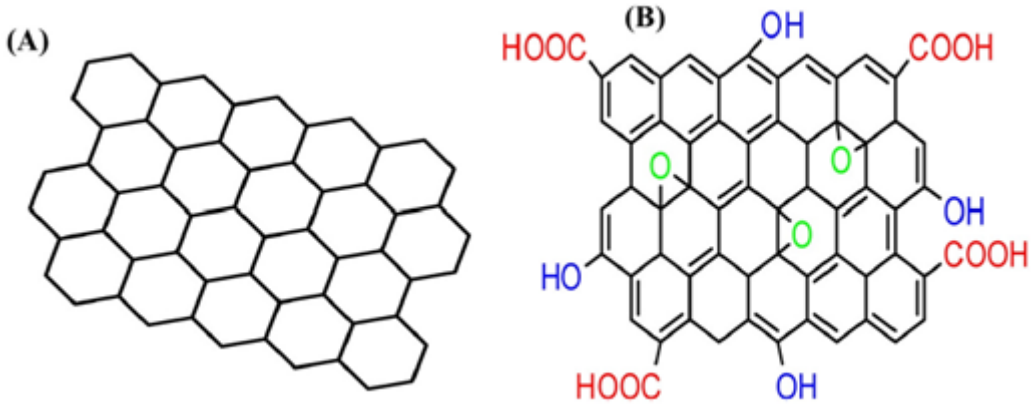


Figura 6 - Molécula de grafeno (a) fórmula estrutural do grafeno (b) grafeno oxidado
Fonte: ADEEL, et al., 2018

A produção de GO baseia-se principalmente na oxidação do grafeno utilizando um excesso de permanganato de sódio juntamente com nitrato de sódio e ácido sulfúrico concentrado, o que não é uma metodologia verde. Portanto, o uso de tecnologias mais verdes para produzir GO é altamente desejável (CARCELLER et al, 2019).

A primeira e mais evidente diferença entre o grafeno e o GO, é a condutividade: o grafeno na sua forma cristalina possui altíssima condutividade, enquanto o oxidado é um isolante. Essa característica se deve aos “defeitos”

introduzidos na rede carbônica da oxidação, como ligações de ácidos carboxílicos, cetonas, hidroxilas, e epóxidos na estrutura do material. Essas modificações químicas, por exemplo, poderiam ser aproveitadas para uso como um potencial suporte para interagir quimicamente com as proteínas. Também possui uma enorme área superficial, o que o converte num material desejável para imobilização de enzimas (LIU et al., 2014; MA et al., 2012; HERMANOVÁ et al., 2015; MARTINEZ, 2016).

2.4.7 Aplicações das inulinases

A maior aplicação de inulinases está relacionada à produção de xarope com alto teor de frutose. A indústria utiliza grande quantidade de polissacarídeos naturais e novas fontes têm sido procuradas com o intuito de suprir a demanda. Assim, a utilização das inulinases apresenta-se como uma alternativa para obtenção de frutose com alto teor adoçante (CONTIERO, 2004).

A dificuldade de se encontrar um adoçante sintético, sem restrições médicas, transformou a frutose, um monossacarídeo natural, em uma alternativa viável, devido a um considerável número de vantagens em relação a outros adoçantes. Ao apresentar maior poder adoçante, a frutose pode ser utilizada em menores quantidades, reduzindo o consumo de calorias, contribuindo para a diminuição da hiperglicemia, sendo assim, mais tolerada por diabéticos. Devido a seu elevado poder higroscópico, é atrativa na produção de produtos de confeitaria, também sendo utilizada na indústria de sorvetes, para evitar a textura granular provocada pela cristalização da sacarose (VICENTE, 2000). Além disso, a frutose é adicionada em muitos adoçantes sintéticos, como a sacarina, com o objetivo de mascarar o sabor residual amargo provocado por esta substância (DE PAULA et al., 2008)

Outra importante aplicação de inulinases é na produção de frutooligassacarídeos (FOS), como estudado por Santos (2007). Os frutooligossacarídeos são polímeros de frutose, açúcares não convencionais, não metabolizados pelo organismo humano e não calóricos, e constituem uma classe de açúcares conhecidos como funcionais (prebióticos), pelos benefícios fisiológicos da sua inclusão na dieta, uma vez que promovem seletivamente o crescimento de probióticos como *Acidophillus* e *Bifidus*. Essa característica faz com com que os FOS promovam uma série de benefícios à saúde humana, desde a redução de

colesterol sérico até o auxílio na prevenção de alguns tipos de câncer (PASSOS e PARK, 2003; MAUGERI e HERNALSTEENS, 2007).

2.5 Frutos do Amazonas

A região amazônica Colombiana, ou Amazonía, é uma das seis regiões naturais da Colômbia. Localiza-se no sul do país, fazendo fronteira ao norte com as regiões andina e Orinoquía, ao leste com a Venezuela, ao sudeste com o Brasil, ao sul com o Peru e ao sudoeste com o Equador. A região e caracterizada por precipitação constante ao longo do ano, temperaturas médias acima de 28°C e umidade relativa acima de 80%. A precipitação é superior a 3.000 mm por ano, atingindo valores próximos a 5.500 mm/ano (RANGEL e BETANCOUR, 2018).

Estudos de prospecção de microrganismos de frutos nativos foram apresentados por Feoli *et al.* (1997) ao isolarem e caracterizarem microrganismos com atividade pectinolitica a partir de *Mangifera indica*; Uribe (2007) a partir da caracterização fisiológica de leveduras da amora-preta; Buitrago e Escobar (2009) identificaram leveduras em frutos de groselha-do-cabo; Trujillo *et al.* (2015) isolaram bolores e leveduras no fruto jambo; Ferreira *et al*. 2016 usando pêssego conseguiram identicar diferentes gêneros de leveduras e Ramírez-Hernández *et al.* (2020) ao isolarem e caracterizarem fungos filamentosos em manga *in natura* e processado.

Espécies comestíveis exóticas como o Araçá (*Eugenia stipitata Mc Vaugh*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), cubiu variedades amazônicas (*Solanum* sp.) e nativas de abacaxi (*Ananas comosus*) da Amazônia, ganharam relevância nas últimas décadas e hoje colonizam novos nichos produtivos no nível da Amazônia, constituindo uma importante alternativa produtiva para a região, incluindo todos os países que compartilham esse bioma e, porém, um alvo de estudo para identificcao de espécies com potencial biotecnológico (SINCHI, 2004).

2.5.1 Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)

O cupuaçu também conhecido como cupu, cupuassu ou cupu-do-mato, pertence à família Sterculiacea, cuja espécie é *Theobroma grandiflorum schum*. É uma fruta típica da Amazônia, sendo cultivada em países como Colômbia, Equador, Perú e Brasil. O Estado do Pará (Brasil) foi o primeiro a cultivá-la de maneira planejada no início da década de 80. Entretanto, observa-se também o cultivo de

espécies isoladas nos estados de São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro (BASTOS et al., 2002, GONÇALVES, 2014; CARVALHO et al., 2018).

O fruto (Figura 7) é do tipo drupáceo, de forma variada, extremidades arredondadas e peso situando entre 0,5 e 4,0kg, sendo em média 1,5kg. É constituído de casca (epicarpo mais mesocarpo), endocarpo (polpa que envolve as sementes) e sementes. O epicarpo é rígido e lenhoso e com epiderme de coloração verde, a qual é recoberta por camada pulverulenta que se desprende facilmente com o manuseio. O endocarpo é carnoso, com aroma pronunciado e está fortemente aderido às sementes por fibras (CALZAVARA et al., 1984; BEJARANO e DAZA, 2006; GONÇALVES, 2014).

Figura 7 - Fruto cupuaçu
Fonte: Dick Culber, 2013.

O cupuaçu é uma fruta ácida, de sabor exótico e agradável, rica em compostos voláteis, fenólicos, pectinas e sais minerais (ROGEZ et al. 2004; LIMA et al., 2010; SOLTERO et al., 2011; GALEANO et al., 2012). Apresenta alto teor de pectina, comparável ao da maçã, sendo um diferencial positivo da fruta, considerando que tal fibra dietética solúvel pode promover, conforme demonstrado em estudos (Tabela 5), redução dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos e humanos (FIETZ e SALGADO, 1999; BASTOS et al., 2002).

A importância econômica do cupuaçu está associada principalmente à sua polpa e sementes, usados para consumo *in natura* e para fins industriais. A polpa, de aroma e sabor muito apreciados, é utilizada para sucos, refrescos, sorvetes, doces, compotas, licores, iogurtes, concentrados, polpas desidratadas e aromatizantes (VELHO et al., 1990; QUAS et al., 2007). O cupuaçu, por apresentar alto teor de pectina e por ser naturalmente ácido, favorece a fabricação de néctar, doce e geleias (CAVALCANTE, 1991; LOPES 2000; COHEN et al., 2004). As sementes são usadas na fabricação de chocolate conhecido como cupulate (EMBRAPA, 1990, LANNES, et al., 2002; LANNES, et al., 2003; REBOUÇAS et al., 2020).

Tabela 5 - Análise bromatológico da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)

Composição Físico-química	**Valores**	**Fonte**	**Composição Físico-química**	**Valores**	**Fonte**
Cor	Branco ou branco amarelado		Mn	0,21 ± 0,048	
Sabor	Levemente ácido		Cu	0,258 ± 0,059	Rogez *et al*. (2004)
Aroma	Próprio, característico	Brasil (2000)	Zn	0,532 ± 0,024	
Sólidos solúveis em ºBrix, a 20 ºC	Mínimo de 9 ºBrix		Fe	0,432 ± 0,042	
Ácido ascórbico	Mínimo de 0,18g/100g		P	15,73 ± 0,48	
Acidez ácido cítrico	Mínimo de 1,5g/ 100 g		Mg	13,07 ±1,94	
pH	3,2 - 3,6		K	34,27 ± 4,27	
Acidez titulável (%)	2,0 - 2,15		Ca	5,57 ± 0,85	
Umidade (%)	84,9 - 89,0		Na	2,56 ± 0,20	
Açúcares redutores (%)	2,8 - 3,0	Oliveira (1997)	Aminoácidos (mg. %N)	21.90	
Açúcares não-redutores (%)	4,0 - 5,8		Vitamina C (% . mg)	23.12	SINCHI, 2001
Amido (%)	0,96		Pectina (%)	0.39	
Gordura (%)	0,48 - 2,35		Voláteis (%)	89,00	
Proteína (%)	0,53 - 1,92		Fibra (% bs)	18.70	

2.5.2 Araçá-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*)

O Araçázeiro-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*) é uma fruta da Amazônia Ocidental cultivada em pequena escala no Peru, Bolívia, Equador, Brasil e Colômbia, sendo adaptada ao clima tropical úmido (CHÁVES e CLEMENT, 1984; SACRAMENTO et al., 2008). Essa frutífera é um arbusto que alcança até três

metros de altura e igual diâmetro de copa (FALCÄO et al., 2000; SANTOS et al., 2017).

Os frutos (Figura 8) é uma baga globosa, com o peso variando entre 30 e 800 g, apresenta formato arredondado ou achatado, diâmetro longitudinal de 5 a 10 cm e transversal de 5 a 12 cm, casca fina de coloração amarela, polpa ácida de coloração amarelo-clara, com 4 a 10 sementes de 0,5 a 1,0 cm de comprimento. A polpa é suculenta e bastante ácida, portanto, não serve para consumo ao natural, sendo utilizada para a preparação de sucos, sorvetes e geleias para a produção de néctar, sendo bastante útil na mistura com polpa de frutas de baixa acidez (ROGEZ et al., 2004; SINCHI, 2006; FRANZON et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2013).

Figura 8 - Fruto Araçá boi. 1) Verde 2) Verde-maduro 3) Mduro-verde 4) Maduro ¾ 5) Maduro 6) Sobre maduro.
Fonte: SINCHI 2006.

Sua importância econômica está relacionada ao alto teor de vitamina A, B e C, proteínas, carboidratos, fibras, sais minerais e compostos aromáticos (GENTIL e CLEMENT, 1996; SINCHI 2006; PINO e QUIJANO, 2007; SACRAMENTO et al., 2008; NERI-NUMA et al., 2013) como refêrenciado na tabela 6.

Tabela 6 - Análise bromatológico da polpa de Araçá-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*)

Caracteristicas	Valores	Fonte
pH	2,28-2,88	Sacramento *et al.* (2008)
Aidez em ácido cítrico g/100 g	2,19-2,38	
Sólidos solúveis em ºBrix a 20 ºC	5,54	
Sólidos solúveis totais g/100 g	11,66	
Açúcares solúveis totais g/100 g	4,82	
Açúcares redutores em glicose g/100 g	1,05	
Açúcares não redutores em sacarose g/100 g	0,16	
Resíduo mineral fixo g/100 g	0,43	
Ácido ascórbico mg/100 g	0,53	
Cinzas %bs	2,03	SINCHI, 2006
Proteínas %bs	12,67	
Fibra %bs	11,29	

bs: base seca

2.5.3 Cubiu (*Solanum sessiliflorum*)

O cubiu (*Solanum sessiliflorum*), pertencente à família Solanaceae, é uma hortaliça-fruto bastante difundida entre os povos indígenas e tradicionais da região Amazônica. É originário da região do alto Orinoco da bacia Amazônica, podendo ser encontrado em toda a Amazônia brasileira, peruana, equatoriana, colombiana e venezuelana (SILVA-FILHO 1998; SINCHI, 2011; ACIOLI et al., 2014).), tanto em condições subespontâneas como em forma cultivada (SILVA-FILHO et al. 1997).

Os frutos (Figura 9) são de morfologia variável, podem ser bagas macias com brilho, colorido, seco brilhantemente colorido, suave esverdeado, amarelo-esverdeado ou duro seco envolto por um cálice. Caracterizam-se pelo sabor levemente adocicado e pela presença de glicoalcalóides (NATURAL-HISTORY-MUSEUM, 2009).

Na alimentação o fruto pode ser consumido *in natura* ou processado na forma de sucos, doces, geleias, compotas e, na culinária, é utilizado em pratos à base de peixe, carne, frango e misturado com saladas (FILHO, 2005; SINCHI, 2011).

É uma importante fonte de fibra alimentar, macro e micronutrientes, pectina, vitaminas, compostos fenólicos, compostos voláteis (YUYAMA et al. 2002; PIRES et al. 2006; CARDONA et al., 2011; MASCATO et al., 2015). Segundo Silva-Filho (1998), o cubiu é considerado um importante recurso genético da Amazônia, com

potencial para uso na agroindústria e em programas de segurança alimentar para populações da região Amazônica (Tabela 7).

Figura 9 - fruto cubiu (*Solanum sessiliflorum*)
Fonte: Propia

Tabela 7 - Análise bromatológico de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) em 100 g de polpa.

Caracteristicas	Valores	Caracteristicas	Valores
Proteina (g)	0,9	Caroteno (mg)	0,2
Lipídios (g)	1,4	Tiamina (mg)	0,3
Fibra (g)	0,4	Riboflavina (mg)	0,1
Açúcares totais (%)	4,6	Cálcio (mg)	16
Açúcares redutores (%)	3,9	Magnésio (mg)	23,7
Açúcares não redutores (%)	1,8	Fósforo (mg)	30
Sólidos solúveis em (ºBrix) %	8	Potássio (mg)	385,4
Ácido cítrico (%)	0,8	Sódio (mg)	371
Ácido ascórbico (mg)	13,9	Cobre (mg)	329
Fenóis (mg)	14,4	Ferro (mg)	324
Taninos (mg)	14,2	Zinco (mg)	157
Niacina (mg)	2,5	Manganês (mg)	97

Fonte: Mascato *et al.,* 2015

É reconhecido por seu sabor refrescante e pelas propriedades medicinais da planta, que pode ter uso tópico para curar queimaduras e remover alguns parasitas até sua ingestão para diminuir níveis de glicose, colesterol e ácido úrico no sangue (FILHO et al., 1999; YUYAMA et al., 2005; YUYAMA et al., 2007).

CAPÍTULO 1

Identificação fenotípica de fungos filamentosos e leveduras isoladas de frutos nativos da região amazônica (Colômbia) e avaliação da produção de inulinase em fermentação submersa

Resumo

As inulinases apresentam uma variedade de aplicações, como a produção de xarope de frutose, frutooligossacarídeos e bioetanol. A versatilidade industrial apresentada por estas enzimas impulsiona a descoberta de novas fontes para sua obtenção. Neste estudo, 17 microoorganismos foram isolados a partir da polpa de frutos nativos da região Amazônica, na Colômbia: Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), Araçá-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*) e Cubiu (*Solanum sessiliflorum*). As amostras dos frutos passaram por uma triagem de crescimento em um meio contendo ágar batata dextrose (BDA) e extrato de yacon (*Polymnia sanchifolia*) 2.5% v/v como fonte de carbono, e incubadas a 28 °C por 5 dias. O primeiro objetivo foi classificar e isolar os microoganismos com crescimento em BDA por cor, forma e tamanho das colônias. Posteriormente, os isolados foram submetidos à identificação fenotípica por um método de assimilação de açúcares conhecido comercialmente como API 20C AUX. O segundo objetivo foi avaliar a produção de inulinase pelos microrganismos com identificação superior a 80% de similaridade, através do método API 20C AUX. Para isso usou-se um meio de cultura composto: inulina pura (0,8%); KH_2PO_4 (0.5%); NH_4Cl (0,15%); KCl (0,12%); $MgSO_4.7H_2O$ (0,07%) e base nitrogenada de levedura-YNB (0,3%). A fermentação foi submersa e ocorreu em pH 4,5; 100 rpm; temperaturas de 20 e 30 °C e tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Após os tempos de fermentação, o extrato enzimático foi obtido usando filtração à vácuo. A atividade foi acompanhada por incremento na absorbância a 540 nm, usando método colorimétrico resultante da reação de oxidorredução entre frutose-DNS. Para todos os ensaios usou-se como controle a cepa padrão do fungo *Aspergillus niger* ATCC 16888. Dos 17 microrganismos avaliados, 6 caracterizados (identificados com os números 1, 3, 5, 10, 17 e 21) com produção acima de 0,1 $U.mL^{-1}$ de inulinase foram selecionados. Finalmente, concluiu-se que os parâmetros de fermentação para uma melhor produção de inulinase são pH 4,5; 100 rpm; 30 °C e 48 horas de fermentação, com destaque no isolado No. 3.

Palavras-chaves: *Aspergillus niger. API. Candida guillermondii. Cryptococcus laurentii.* Inulinase. *Trichosporon mucoides.*

Abstract

Inulinases have a variety of applications, such as the production of fructose syrup, fructooligosaccharides and bioethanol. The industrial versatility presented by these enzymes drives the discovery of new sources to obtain them. In this study, 17 microorganisms were isolated from the pulp of fruits native to the Amazon region, Colombia: Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), Araçá-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*) and Cubiu (*Solanum sessiliflorum*). The fruit samples underwent growth screening in a medium containing potato dextrose agar (PDA) and yacon extract (*Polymnia sanchifolia*) 2.5% v/v as carbon source, and incubated at 28 °C for 5 days. The first objective was to classify and isolate the microorganisms growing on PDA by colony color, shape and size. Subsequently, the isolates were submitted to phenotypic identification by a method of sugar assimilation commercially known as API 20C AUX. The second objective was to evaluate the production of inulinase by microorganisms with identification greater than 80% of similarity, using the API 20C AUX method. For this purpose, a compound culture medium was used: pure inulin (0.8%); KH_2PO4 (0.5%); NH_4Cl (0.15%); KCl (0.12%); $MgSO_4.7H_2O$ (0.07%) and yeast nitrogen base-YNB (0.3%). Fermentation was submerged and took place at pH 4.5; 100 rpm; temperatures of 20 and 30 °C and times of 24, 48, 72, 96 and 120 hours. After the fermentation times, the enzyme extract was obtained using vacuum filtration. The activity was followed by an increase in absorbance at 540 nm, using a colorimetric method resulting from the oxidoreduction reaction between fructose-DNS. For all assays, the standard strain of the fungus *Aspergillus niger* ATCC 16888 was used as control. Of the 17 microorganisms evaluated, 6 were characterized (identified with numbers 1, 3, 5, 10, 17 and 21) with production above 0.1 U.mL-1 of inulinase were selected. Finally, it was concluded that the fermentation parameters for a better production of inulinase are pH 4.5; 100 rpm; 30 °C and 48 hours of fermentation, with emphasis on isolate No. 3.

Keywords: *Aspergillus niger. API. Candida guillermondii. Cryptococcus laurentii. Inulinase.Trichosporon mucoides*.

1. Introdução

Os fungos (bolores e leveduras) são microrganismos eucarióticos provenientes do solo e/ou do ar, resistentes a condições adversas, como pH ácido, baixa atividade de água e temperatura ótima na faixa de 25 a 28 °C (PEREIRA et al., 2011).

Bolores, é o nome comum dado a certos fungos multicelulares, filamentosos, heterotróficos, com parede celular contendo quitina e α-glucano desprovidos de clorofila, que apresentam raízes falsas chamadas hifas, que quando agrupadas formam o micélio, que cresce superficialmente nos alimentos formando manchas brancas, coloridas, escurecidas ou esfumaçadas, assumindo assim uma aparência de algodão ou feltro. Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem nos esporos (reprodução sexuada) ou conídios (reprodução assexuada) (SALAZAR e RUA, 2012). A principal fonte de carbono é a glicose, o nitrogênio é muito importante para biossíntese de proteínas sob a forma inorgânica (nitrato) ou orgânica (amônia). O potássio e o magnésio estão relacionados na ativação de enzimas. O ferro para síntese de citocromos e de certos pigmentos (REYES-OCAMPO et al., 2013). Os fungos são considerados cosmopolitas, pois estão presentes em qualquer parte do planeta. Sendo amplamente distribuídos pela natureza, encontrando-os na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e industriais. Os bolores e leveduras de interesse na indústria de alimentos e farmacêutica são do gênero: *Mucor, Aspergillus*, *Penicillium, Candida, Zygosaccharomyces* (VILLENA, et al., 2003; URIBE, 2007; BUITRAGO e ESCOBAR, 2009; TRUJILLO et al., 2015; FERREIRA et al., 2016).

O gênero *Aspergillus* compreende cerca de 150 espécies, são fungos filamentosos, hialinos, ubíquos e se reproduzem assexuadamente por conídios. As colônias da espécie *Aspergillus niger* geralmente têm crescimento rápido e exuberante em ágar batata dextrose (BDA), inicialmente são brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro. A colônia é composta por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio com farta produção de conídios (VEGA, 2002). *Aspergillus* apresenta algumas vantagens para a produção industrial de enzimas: tem um alto nível de produção, tem boas propriedades de cultivo, o que possibilita a produção em larga escala, seus produtos

são geralmente reconhecidos como *status* de seguro (em inglês *GRAS- Generally recognized as safe*), o que permite sua aplicação na indústria de alimentos para os humanos e animais (DE VRIES e VISSER, 2001).

As leveduras são fungos unicelulares, podem formar pseudohifas, que consistem em cadeias simples de células esféricas, elipsoidais ou cilíndricas. Reproduzem-se na maioria das vezes por gemulação multilateral, onde a nova gêmula é formada na porção lateral da célula-mãe (PRETORIUS, 2000; CHOUDHARY e JOHRI, 2009). São ligeiramente maiores do que as bactérias, com tamanhos entre 3 e 8 µm de diâmetro. As leveduras não têm forma definida, podem ser vistas em uma forma ovoide, esférica, triangular, cilíndrica, piriforme ou micelial. Porém, as mais comuns são ovais e esbranquiçadas, podendo também apresentar tons amarelos, cremosos, pretos ou rosa. Sua fonte alimentar básica são carboidratos simples, como glicose e frutose ou dissacarídeos, tais como sacarose e maltose; estão classificadas dentro do grupo das zimases (FRAZIER, 2008; GARCÍA, 2010). Estão presentes em frutas, flores, solo e em ambientes que proporcionem as condições necessárias para seu crescimento. Em polpas e concentrados de frutas, as leveduras mais frequentemente isoladas são do gênero *Saccharomyces, Pichia, Cryptococcus, Kluyveromyces e Candida* (SANCHO et al., 2000). Dentro dos gêneros destacados comercialmente encontram-se: *Saccharomyces, Zygosaccharomyces, Candida, Trichosporon, Cryptococcus*, entre outros.

Saccharomyces é o gênero de leveduras mais conhecido e utilizado na indústria de alimentos. A espécie *S. cerevisiae* var. elipsoideus é o mais eficiente na transformação de açúcares em etanol e, portanto, o mais utilizado na produção de bebidas. *S. lactis* e *S. fragilis* são utilizados no processamento de produtos lácteos devido ao seu poder fermentativo na lactose. *S. carlsbergensis* é outra espécie de levedura usada na fabricação de cerveja (FRAZIER, 2008).

Zygosaccharomyces é o gênero de leveduras que participam da fermentação de certos vinhos e molhos de soja. Sua principal característica é a capacidade de se desenvolver sob condições osmofílicas, como *Z. nussbaumeri* (FRAZIER, 2008).

Candida é o gênero de levedura que forma filmes em alimentos e altera aqueles muito ácidos ou salgados. *C. guillermondii*, *Pichia guillermondii* ou *Meyerozyma guilliermondii* é uma levedura ascomiceta amplamente distribuída na

forma natural no meio ambiente e também faz parte do ser humano na pele e microbiota da mucosa. Representa um organismo modelo para superprodução de riboflavina (RF, vitamina B2), bioconversão de xilose em xilitol. Além disso, é uma fonte promissora de enzimas, por exemplo, inulinase, bem como biocombustível, aromas e como fungicida no controle biológico pós-colheita (PAPON, et al., 2013).

Trichosporon é o gênero de leveduras de crescimento rápido. Suas colônias aparecem como uma série de nodulações de cor lisas e peludas esbranquiçadas, amarelado-esbranquiçadas ou verde creme. *T. mucoides* é capaz de fermentar glicose em baixas concentrações (FRAZIER, 2008).

Cryptococcus, e em particular a espécie *C. laurentii*, é não fermentativa, com capacidade de desenvolvimento em elevadas concentrações de ácido e sal. Esta levedura apresenta cor esbranquiçada, verde, vermelha ou laranja e pode ser encontrada em vegetais e solos, peixes marinhos, camarão e carne de gado crua moída (PEREIRA et al., 2011).

A identificação de novos bolores e leveduras isolados é fundamental e de interesse tanto para aplicações biotecnológicas como clínica. Tradicionalmente, os fungos e leveduras são classificados e identificados por meio de métodos fenotípicos para avaliar características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Entre os critérios morfológicos encontra-se tipo de reprodução (vegetativa, sexuda, esporulada), morfologia celular e aspecto de colônias. Entre os critérios fisiológicos e bioquímicos, a fermentação e assimilação de açúcares, o poder fermentativo e a assimilação de nitratos (RATON, 2004).

No mercado, são comercializados painéis manuais e automatizados para identificação de leveduras, através da capacidade assimilativa em substratos bioquímicos e enzimático os quais são de realização e interpretação fáceis, além de oferecer o resultado em tempo menor (SILVA e CANDIDO, 2005).

O sistema API 20C AUX é um desses métodos comerciais bioquímicos, consistindo em 19 testes de assimilação de substrato revelado pela presença de turbidez, e tem sido amplamente utilizado para identificação de leveduras (CÓRDOBA et al., 2004; SILVA e CANDIDO, 2005; CARVALHO 2010; CHEN et al., 2010; OCHIUZZI et al., 2014; FERREIRA et al., 2016; ROBLEDO-LEAL et al., 2016; CORREA-DELGADO et al., 2020). O kit tem a desvantagem de poder fornecer identificações errôneas devido à falta de experiência do analista do laboratório na interpretação dos resultados e, com alguma frequência, esses sistemas não são

capazes de diferenciar espécies com perfis bioquímicos semelhantes e há a limitação do tempo de inclusão de espécies emergentes em suas bases de dados (ZULUAGA et al., 2018).

Por tanto, isolar e identificar novos microrganismos visando obtenção de enzimas para aplicação biotecnológica têm sido bastante estudadas, incluído as inulinases classificadas como exo-inulinases (β-D-frutanofrutohidrolase; EC 3.2.1.80) e endo-inulinases (2,1- β-D-frutanofrutohidrolase; EC 3.2.1.7). As exo-inulinases catalisam a remoção do resíduo terminal de frutose a partir do final não redutor da molécula de inulina, enquanto as endo-inulinases hidrolisam as ligações internas na inulina para produzir inulotriose, inulotetraose e inulopentose como os principais produtos (CHI et al., 2009). O termo inulinases é aplicado a enzimas que hidrolisam a inulina, liberando assim monômeros de frutose e glicose e oferece perspectivas interessantes para a produção de xaropes de frutose pura, como uma alternativa ao xarope de alta frutose feito produzido a partir do amido de milho que está sendo associado como precursor da síndrome metabólica (TEFF, et al., 2004; HAVEL, 2005; NAKAGAWA et al., 2006, JOHNSON, et al., 2007; PALMER et al., 2008; STANHOPE et al., 2009; SÁNCEHEZ-LOZADA et al., 2010; KLURFELD et al., 2013; SHAPLA et al., 2018; FRIZZERA et al., 2020). Outra aplicação das inulinases obtidas de leveduras é a fermentação direta da inulina em etanol, através de um processo de sacarificação e fermentação simultânea. A ação de endo-inulinases a partir da molécula de inulina produz frutoligossacarídeos. Os frutoligossacarídeos são componentes dos alimentos prebióticos, muito populares devido às suas propriedades bifidogênicas (estímulo ao crescimento de bifidobactérias) e de promoção da saúde (CHI et al., 2009). 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 e GUPTA, 2002). Oligossacarídeos de inulina têm estruturas químicas semelhantes aos frutoligossacarídeos obtidos a partir de sacarose. Além disso, são considerados como uma fibra dietética solúvel (CHI et al., 2011b).

Entre os microrganismos produtores de inulinase, aqueles que relatam melhor atividade enzimática são cepas de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp. e cepas de leveduras pertencentes a *Kluyveromyces* sp. (PANDEY, 1999; CHI et al., 2009; TREICHEL et al., 2012; SINGH e CHAUHAN, 2018).

A inulina está presente como um hidrato de carbono de reserva nas raízes e tubérculos de plantas tais como alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus)* e chicória (*Cichorium intybus),* raiz de dália (*Dahlia* spp), cebola (*Allium cepa* L), alho porro (*Allium porro* L), alho (*Allium sativum*) espargos (*Asparragus officinalis*), yacon (*Smallanthus sonchifolius*) entre outros (PANDEY et al., 1999; KAUR e GUPTA, 2002; CHI et al., 2009; LEROY et al., 2010; CHI et al., 2011).

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma planta perene originária da América do Sul. É cultivado como cultura de raiz nos Andes da Colômbia se estendendo até ao noroeste da Argentina em altitudes entre 1000 e 3500 m. Suas raízes tuberosas contêm apenas 0,3-3,7% de proteína, mas 70-80% de sua matéria seca é composta de sacarídeos, principalmente frutooligossacarídeos (FOS) (CAMPOS et al., 2012). Os órgãos de armazenamento de yacon acumulam mais de 60% (em base seca) de inulina tipo β (2-1) frutanos, principalmente oligômeros (GF2-GF16) (ITAYA et al., 2002). As raízes de yacon têm uma longa história de uso na América do Sul e outras regiões, com propriedades potenciais de promoção da saúde, incluindo propppriedades prebióticas, antidiabéticas, efeitos antioxidantes e antimicrobianos (OJANSIVU et al., 2011). A presença de inulina nos tubérculos de yacon motivou o interesse pelo estudo deste material vegetal como um substrato potencial para o crescimento de microrganismos isolados de frutos da região Amazônica com potencial para produção de inulinases.

As frutas exóticas são bastante desejadas pelos consumidores nacional e internacionalmente, devido à tendência de consumir alimentos saudáveis com alto aporte nutricional. Atualmente, algumas dessas frutas têm pouca difusão ou só são conhecidas nas regiões onde são cultivadas, por apresentarem vida útil curta e, portanto, o processo de comercialização é difícil. É o caso dos frutos nativos da região Amazônica: Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*); Araçá-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*) e cubiu (*Solanum sessiliflorum*), utilizados industrialmente na produção de polpas, geleias, néctares, extratos, entre outros. Não se encontraram trabalhos que identifiquem microoorganismos isolados dessas cultivares exóticas com potencial para produção de inulinase. Diante do exposto, o primeiro objetivo foi isolar e identificar bolores e leveduras das frutas amazônicas, pelo sistema de identificação comercial API 20C AUX e uma cepa padrão de fungo filamentoso como controle. Em um segundo momento, escolheu-se os bolores e leveduras identificados para estudar o seu potencial na produção de inulinase, usando yacon como fonte de

carbono, sob fermentação submersa com dois tratamentos: Tratamento 1: pH (4,5); rpm (100); temperatura (20 °C); tempo de fermentação (24, 48, 72, 96 e 120 horas) e Tratamento 2: pH (4,5); rpm (100); temperatura (30 °C); tempo de fermentação (24, 48, 72, 96 e 120 horas).

2. Material e métodos

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Saúde Pública Estadual do Amazonas (Leticia), na área de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Alimentação e Nutrição Humana, Sede de Investigação Universitária (SIU) da Universidade de Antioquia de Medellin-ANT, Colômbia. As coletas dos frutos alvo do estudo foram realizadas no Bioma da Amazônia, em território Colombiano.

2.1 Triagem de microrganismo produtores de inulinase

2.1.1 Isolamento dos microrganismos

Os microrganismos (Fungos filamentosos e leveduras) usados nestse estudo foram isolados a partir de polpa fresca de frutos nativos da região Amazônica como o Cupuaçu, Araçá-boi e cubiu, adquiridos em comércio local do município de Leticia (Amazonas-Colômbia). O isolamento foi realizado com metodologia adaptada de Castanon (2013) e Lopes *et al.* (2014), por meio de plaqueamento em placas, utilizando 2,5g de amostra diluídos em 22,5mL de solução salina esterilizada, e realizando diluições até 10^{-4}.

As diluições 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} foram plaqueadas, em triplicata, em placas com ágar (autoclavado a 121 °C durante 15min), contendo 39g de ágar batata dextrose (BDA) e, 25mL de extrato de yacon para cada litro de água destilada, suplementado com cloranfenicol (100 mg/L) e rosa bengala (50 mg/L). O extrato de yacon foi obtido conforme metodologia adaptada de CHESINI *et al.* (2013) a partir de 1kg de tubérculos lavados, descascados e liquidificados. O extrato foi filtrado (Whatman #41) e mantido congelado a -20 ºC até ser utilizado. Os sólidos remanescentes do filtrado (chamado de bagaço de yacon) foram deixados em condições assépticas.

As placas foram incubadas a 25 ºC durante 5 dias; para a contagem das colônias, foi usado o método de contagem padrão para bolores e leveduras da Norma Técnica Colombiana (NTC) 4092. Um teste adicional mantendo as mesmas

condições analíticas descritas anteriormente, foi realizado com o bagaço obtido do extrato de yacon.

2.1.2 Purificação do microrganismo

A partir das culturas obtidas nas diferentes diluições seriadas descritas anteriormente foi realizada uma purificação com a semeadura de 100µL das células em placas de BDA contendo 1% p/v de inulina comercial e incubadas conforme descrito anteriormente. As colônias obtidas foram isoladas, transferidas para solução salina 0,85% estéril p/v, e plaqueadas novamente.

Os isolados de bolores e leveduras foram classificados mofologicamente por suas características físicas (cor, tamanho, forma, consistência) e presença de pseudohifas mediante coloração de Gram, foram identificados e estocados em cryoperlas e outros em skim milk (20%) e armazenados a -70 ºC.

2.1.3 Identificação das leveduras

Dos morfotipos purificados anteriormente, foram isolados por triplicata para determinar a assimilação de açúcares usando um sistema de identificação de leveduras API 20 C AUX (Biomérieux). Uma fração de colônia isolada em ágar BDA de cultivos recentes (18-24 horas) foi coletada por aspiração ou por toques sucessivos e assepticamente transferida para a ampola API NaCl 0,85% Medium contendo 2 mL de solução e ajustado a uma turbidez (Opacidade) equivalente à escala 2 de *McFarland*. Cerca de 100 µl desta suspensão foi adicionada a ampola API Suspension Medium e homogeneizado. Posteriormente, foi preenchido cada cúpula do painel de identificação, evitando a formação de bolhas. O painel foi incubado em câmara úmida, previamente preparada, e colocado em estufa a 29 ºC por até 72 horas, com leituras em 48 e 72 horas. Considerou-se como resultado positivo e negativo, respectivamente, a presença ou ausência de opacidade nos poços correspondendo a cada carboidrato. A identificação foi alcançada a partir de um perfil numérico, assim, obteve-se um código de sete dígitos, cuja interpretação foi realizada com o auxílio do programa de identificação apiweb ™ (Bio-Mérieux), introduzindo manualmente no teclado o perfil numérico de 7 algarismos, que para efeito de ilustração são mostrados no Apêndice A alguns resultados. Um teste adicional usando ágar arroz com tween 80, foi realizado para identificar as hifas (LACAZ et al., 2002).

2.2 Produção de inulinase por fermentação submersa

A produção de inulinase foi realizada combinando metodologias descritas por Astolfi *et al.* (2011) e Sirisansaneeyakul *et al.* (2012). A fermentação submersa foi conduzida com 0,8% inulina (Sigma Aldrich), 0.5% KH_2PO_4, 0,15% NH_4Cl, 0,12% KCl, 0,07 % $MgSO_4.7H_2O$ e 0,3 % base nitrogenada de levedura-YNB previamente estéril. Para cada 30 mL de meio de cultura foi adicionado 1 mL de microrganismo suspenso em água (~$1x10^6$ esporos. mL^{-1}). Os erlenmeyers contendo o meio de cultura e inóculo foram submetidos a duas condições de fermentação (tratamentos) para avaliar a melhor produção da enzima. Tratamento 1: pH 4,5; agitação de 100 rpm em *shaker* orbital (Actum-HD 4000-L); temperatura de 20 °C (Temperatura máxima do equipamento) e tempos de fermentação de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas; Tratamento 2: pH 4,5; agitação de 100 rpm em *shaker* orbital (New Brunswick Scientific); temperatura de 30 °C (Temperatura teórica para produção de inulinase) e tempos de fermentação 24, 48, 72, 96 e 120 horas (SINGH et al., 2010; ASTOLFI et al., 2011; SIRISANSANEEYAKUL et al., 2012; SOUZA et al., 2015).

Com o intuito de otimizar as funções do *shaker* orbital Actum-HD 4000-L e tomando como referencia estudos realizados pelo Laboratorio de Biotecnología na produção de biomassa vs metabolitos (ZAPATA et al., 2009; ATHEORTUA-GARCÉS et al., 2013; PALACIO-BARRERA et al., 2019), um tratamento adicional avaliando a influência da luz de díodos (emissores LED) de cor azul, verde, vermelha e branca, foi testado na produção de inulinase. Porém, foram escolhidos os microrganismos que apresentaram maior atividade enzimática e mantidas as mesmas condições do tratamento 1.

Para todos os ensaios usou-se como controle de produção de inulinase uma cepa padrão de *Aspergillus niger* ATCC 16888.

2.2.1 Extração da inulinase

Após a fermentação nas diferentes condições, o extrato de fermentação bruto com atividade de inulinase foi obtido usando filtração a vácuo. As amostras de extrato foram coletadas em tubos de 50 mL e armazenadas a 6 ºC para posterior determinação da atividade enzimática e teor de proteína.

2.2.2 Atividade da inulinase por dosagem de açúcar redutor

A atividade enzimática da inulinase foi determinada por meio da quantificação de açúcares redutores usando o método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959). O meio reacional continha 1,0 mL de inulina 2% p/v em tampão fosfato 50 mM pH 5,0 e 1,0 mL de extrato enzimático. A reação de hidrólise foi conduzida a temperatura ambiente (20 ºC) em agitador (Roller Mixer Scientific) e 50 ºC em um banho maria (Indulab) com agitação horizontal. Produtos da hidrólise foram coletados cada 20 minutos durante 1 hora de reação. O teor de frutose livre foi dosado usando 250 µl de DNS (Sigma Aldrich) e 250 µl dos produtos de reação, que foram incubados em banho-maria fervente por 5 minutos. O teste em branco, foi tomado no tempo 0 da reação de hidrólise. Todas as medidas foram conduzidas em triplicatas. A absorbância resultante dessa reação foi medida a 540 nm, utilizando um espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys-^{TM} 50.

A atividade enzimática foi calculada com auxilio de uma curva analítica construída com diferentes concentrações de frutose (0,56 mM a 5,6mM), com um coeficiente de extinção molar Ɛ540nm= 112,2 M^{-1} cm^{-1} (Apêndice B, figura B1)

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1μmol de açúcar redutor por minuto.

2.2.3 Determinação de proteínas totais

O teor de proteínas foi determinado por método Bradford (1976) a 595 nm, utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão (Bioworld, Thomas Cientific). A absortividade foi igual a 2,72 (mg de prot.mL^{-1}) (Apêndice B, figura B2).

A atividade específica da enzima foi definida como a quantidade em µmol de produto liberado por minuto por miligrama de proteína total (U.mg $prot^{-1}$).

2.3 Análise da formação de halo de degradação de inulina

A partir do resultado obtido na análise de açúcares redutores pelo método de DNS, seis fungos foram selecionados e inoculados em placas contendo (2,5 g ágar-ágar, 1,5 g de KH_2PO_4, 6 g $NaNO_3$, 0,5 g de KCl, 0,5 g $MgSO_4$, 0,001 g de $FeSO_4$ e 0,001 g de $ZnSO_4$ em 1 litro de água destilada contendo inulina a 1% (Sigma Alderich) como única fonte de carbono e incubado à temperatura de 27 ºC por 7 dias (CASTANON, 2013).

Após esse período, as placas foram cobertas como uma solução de lugol (1.5% de iodeto de potássio, 1% de iodo) por 5 min. Em seguida, a solução foi retirada e as placas foram lavadas duas vezes com água destilada e deixadas abertas em temperatura ambiente por 15 a 60 min. Halos claros ao redor dos micélios foram considerados resultados positivos (LI et al., 2011).

2.4 Análise estatística

O *Software* RStudio versão 1.1.453 foi utilizado para realizar a análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey, bem como para gerar os gráficos de caixa. Os intervalos de confiança dos coeficientes foram calculados multiplicando o erro padrão por Student-t (t_{n-2}), ajustado aos graus de liberdade ($p<0,05$).

3. Resultados e discussão

A contagem inicial das colônias para cada amostra foi: cupuaçu ($18x10^2$ UFC/mL^{-1}), araçá-boi ($24x10^2$ UFC/mL^{-1}), cubiu ($14x10^2$ UFC/mL^{-1}) e bagaço de yacon ($32x10^2$ UFC/mL^{-1}).

3.1 Identificação da levedura

Como descrito em material e métodos, para atender ao primeiro objetivo, usou-se o teste bioquímico de assimilação e fermentação de diferentes carboidratos, método API 20C AUX, que foi essencial no direcionamento do projeto na perspectiva de screening de microrganismos com potencial para a produção da enzima inulinase também utilizado em outros trabalhos, como o de Arias *et al*. (2002) e outros autores descritos a seguir.

Diversos autores têm demonstrado sua aplicabilidade na indústria de alimentos, entre os quais se destacam o de Córdoba *et al.* (2004) que, visando a produção de xilitol, conseguiu isolar 25 espécies de leveduras de bagaço de cana, das quais 84% puderam ser bioquimicamente identificadas usando o kit API 20C AUX. Uribe (2007), em seu estudo de caracterização fisiológica de leveduras isoladas da amora-preta, encontrou espécies identificadas como *Candida kunwiensis, Cryptococcus laurentii, Cryptococcus humicola e Dipodoscus tetrasperma*. Espécies como *Candida guillermondii* isoladas de frutos de groselha-do-cabo foram estudadas por Buitrago e Escobar (2009) como uma alternativa viável

para retardar o apodrecimento em banana. No trabalho de Carvalho *et al* (2010), 9 espécies diferentes de leveduras foram isoladas de mel. As espécies *Rhodotorula mucilaginosa, Candida magnoliae e Zygosaccharomyces mellis* foram as predominantes. Em uma menor proporção foram identificadas as espécies *Trichosporon mucoides*, *Candida sorbosivorans, Saccharomyces cerevisiae, Candida parapsilosis, Pichia membranifaciens e Zygosaccharomyces rouxii.* Chen *et al.* (2010) estudando leveduras isoladas de leite sem tratamento térmico, obteve resultados agrupados em 11 espécies pertencentes aos gêneros: *Dipodascus, Galactomyces, Geotrichum, Issatchenkia, Phichia, Rhodotorula, Trichosporon e Yarrowia*. No fruto do jambo foram isoladas e caracterizadas as leveduras: *Rhodotorula spp.; Hanseniaspora* spp*.; Brettanomyces* spp*.; Candida* spp*.; Kloekera* sp*.; Torulopsis* sp., além de um fungo dimórfico (TRUJILLO et al.,2015). O trabalho de Robledo-Leal *et al.* (2016) identificou a espécie *Candida guillermondii* a partir de formigas do gênero Atta para avaliar seu efeito no fungo patogênico de tomate vermelho (*Geotrichum candidum*). As leveduras *Sacharomyces cerevisiae, Trichosporom mucoides, Cândida guillermondii e Rodotorula mucilaginosa* foram isoladas e identificadas a partir de purê de pêssego e seu resíduo (FERREIRA et al., 2016).

Em nosso trabalho, foram realizados, inicialmente, 40 testes de API 20C AUX em isolados purificados de cupuaçu, Araçá-boi, cubiu e bagaço de yacon. As amostras marcadas com códigos de 1 a 40, foram classificadas pelas porcentagens de acerto superior a 70% e posteriormente confirmados por triplicata.

Os isolados de fungos refêrenciados com a morfologia do controle também foram submetidos à identificação pelo sistema para obter uma codificação numérica que os relacionasse. Nesse trabalho, foram escolhidos 18 API com códigos: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26 e 27, onde o código 27 corresponde ao controle ATCC 16888 *A. niger.*

Nas tabelas 1.1 a 1.4, estão listados alguns fungos isolados por assimilação de açúcares, identificadas com alta precisão, usando o sistema API 20C AUX. Junto a cada tabela se ilustra o registro fotográfico dos isolados.

Tabela 1.1 - Fungos isolados em polpa fresca de cupuaçu e controle, identificados pelo sistema API 20C AUX.

Fonte		Cupuaçu	Cupuaçu	Cupuaçu	*A. niger* ATCC 16888
Testes	**Substrato**	**1**	**6**	**10**	**27**
Forma	-	Redonda	Esporulada	Esporulada	Esporulada
Cor	-	Branco	Branco	Preta	Preta
BK	-	-	-	-	-
GLU	D-glicose	+	+	+	+
GLY	Glicerol	-	+	+	+
2KG	Calico 2-ceto-Gluconato	-	+	+	+
ARA	L-Arabinose	+	+	+	+
XYL	D-Xilose	+	+	+	+
ADO	Adonitol	-	+	-	-
XLT	Xilitol	-	+	+	+
GAL	D-Galactose	+	+	-	-
INO	Inositol	-	+	+	+
SOR	D-Sorbitol	+	+	+	+
MDG	Metil-αD-Glucopiranosido	-	-	-	-
NAG	N-acetil-Glucosamina	+	+	+	+
CEL	D-Celobiose	+	+	+	+
LAC	D-Lactose	+	-	-	-
MAL	D-Maltose	+	+	+	+
SAC	D-Sacarose	+	+	+	+
TRE	D-Trealose	+	+	+	+
MLZ	D-Melezitose	-	-	+	+
RAF	D-Rafinose	+	+	+	+
Hifa	-	Não	Sim	Não	Não
Perfil numérico	-	2642772	6773376	6723373	6723373
Identifi-cação	-	*Cryptococcus laurentii*	*Candida ciferrii*	*Aspergillus niger*	*Aspergillus niger*
% identificação	-	99,1	99,9	-	-

(+): Opacidade; (-): Sem opacidade

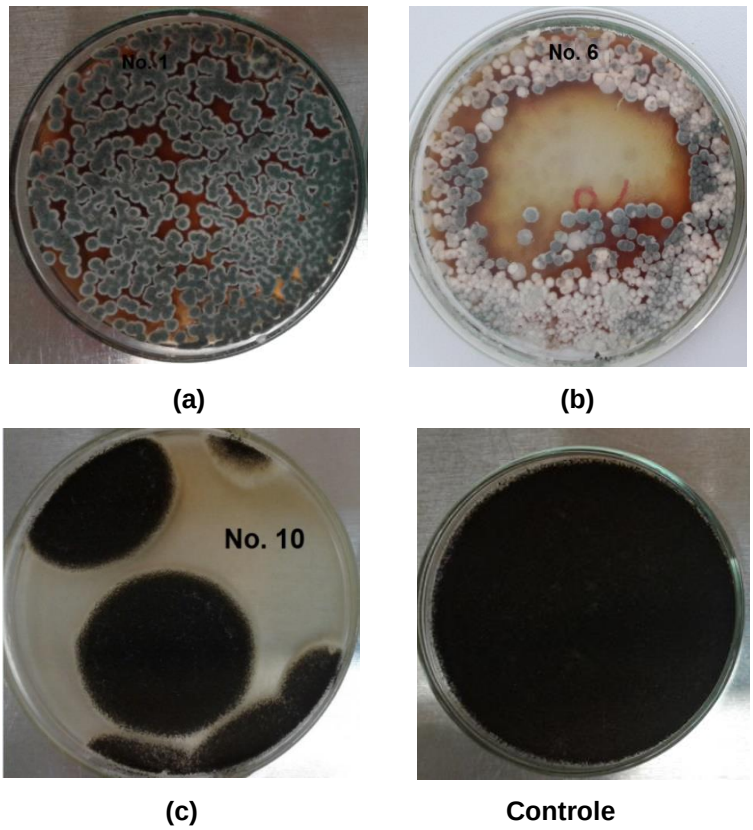


Figura 1.1 - Colônias de bolores identificadas em ágar BDA a partir da polpa de cupuaçu: (a) *Cryptococcus laurentii* (No.1), (b) *Candida ciferrii* (No.6), (c) *Aspergillus niger* (No.10), Controle (*Aspergillus Niger* ATCC 16888) (No.27).

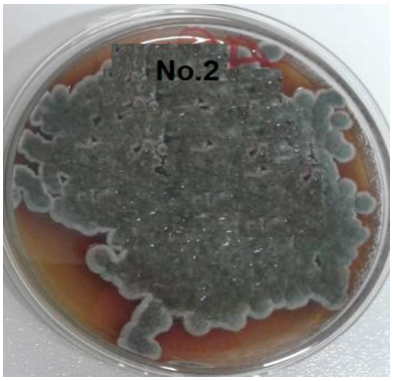
Na polpa de cupuaçu foram identificadas as leveduras: *Cryptococcus laurentii* (No.1) com 99,1% de identificação e *Candida ciferrii* (No.6) com 99,9% de identificação. Pelas características morfológicas em comparação com o controle (*Aspergillus niger* ATCC 16888) e perfil numérico no API 20C AUX, foi identificado o fungo *Aspergillus niger* (No.10).

Na polpa de Araçá-boi (Tabela 1.2) foram identificadas as leveduras: *Trichosporon mucoides* com códigos (No.2 e 17) com 95,3% de identificação; *Candida humicola* (No.9) com 79,9% de identificação. O fungo *Aspergillus niger* (No.3) foi identificado com os resultados da comparação morfológica como o controle (*Aspergillus niger* ATCC 16888) e perfil numérico do API 20C AUX.

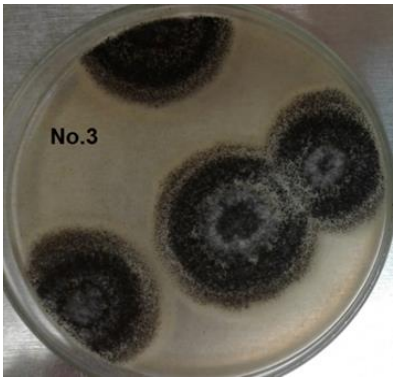
Tabela 1.2 - Leveduras e fungos filamentosos isolados de Araçá-boi com identificação através do sistema API20C AUX.

Fonte		Araçá	Araçá	Araçá	Araçá	*A. niger* ATCC 16888
Testes	**Substrato**	**2**	**3**	**9**	**17**	**27**
Forma	-	Peludo	Esporulada	Convexa	Peludo	Esporulada
Cor	-	Amarelado	Preta	Creme	Verde creme	Preta
BK	-	-	-	-	-	-
GLU	D-glicose	+	+	+	+	+
GLY	Glicerol	+	+	+	+	+
2KG	Calico 2-ceto-Gluconato	+	+	+	+	+
ARA	L-Arabinose	+	+	+	+	+
XYL	D-Xilose	+	+	+	+	+
ADO	Adonitol	+	-	+	+	-
XLT	Xilitol	-	-	-	-	+
GAL	D-Galactose	+	-	+	+	-
INO	Inositol	+	+	+	+	+
SOR	D-Sorbitol	+	+	+	+	+
MDG	Metil-αD-Glucopiranosido	+	-	+	+	-
NAG	N-acetil-Glucosamina	-	+	+	-	+
CEL	D-Celobiose	+	+	+	+	+
LAC	D-Lactose	+	-	+	+	-
MAL	D-Maltose	+	+	+	+	+
SAC	D-Sacarose	+	+	+	+	+
TRE	D-Trealose	-	+	+	-	+
MLZ	D-Melezitose	+	+	+	+	+
RAF	D-Rafinose	+	+	+	+	+
Hifa	-	Sim	Não	Sim	Sim	Não
Perfil numérico	-	6757637	6703373	6757777	6757637	6723373
Identifi-cação	-	*Trichosporon mucoides*	*Aspergillus niger*	*Candida humicola*	*Trichosporon mucoides*	*Aspergillus niger*
% identificação	-	95,3	-	79,9	95,3	-

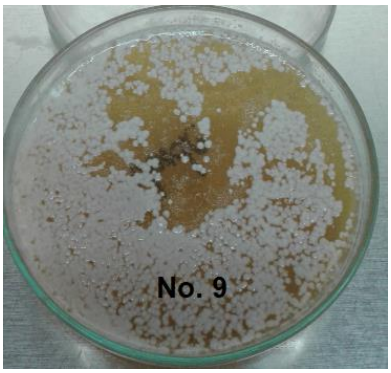
(+): Opacidade; (-): Sem opacidade



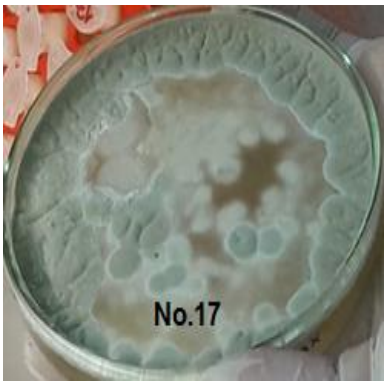
(d)



(e)



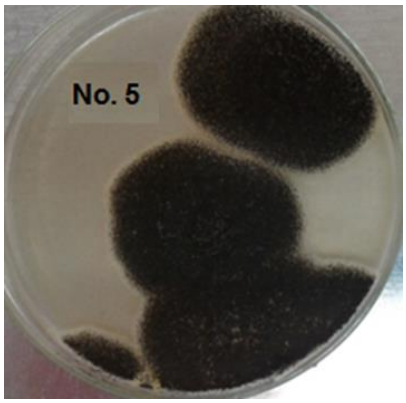
(f)



(g)

Figura 1.2 - Colônias de bolores e leveduras identificadas em ágar BDA a partir da polpa de Araçá boi: (d) *Trichosporon mucoides* (No.2), (e) *Aspergillus niger* (No.3), (f) *Candida humicola* (No.9), (g) *Trichosporon mucoides* (No.17).

Na polpa de cubiu foi identificada a levedura *Candida ciferrii* (No.8) com um 99,9% de identificação e o fungo *Aspergillus niger* (No.5) com referência morfológica do controle (*Aspergillus niger* ATCC 16888) e perfil numérico.



(h)

(i)

Figura 1.3 - Colônias de fungos filamentosos e leveduras identificadas em ágar BDA a partir da polpa de cubiu: (h) *Aspergillus niger* (No.5), (i) *Candida ciferrii* (No.8).

Tabela 1.3 - Leveduras e fungos filamentosos isolados de cubiu identificadas através do sistema API20C AUX.

Fonte		Cubiu	Cubiu	*A. niger* ATCC 16888
Testes	**Substrato**	**5**	**8**	**27**
Forma	-	Esporulada	Esporulada	Esporulada
Cor	-	Preta	Branco	Preta
BK	-	-	-	-
GLU	D-glicose	+	+	+
GLY	Glicerol	+	+	+
2KG	Calico 2-ceto-Gluconato	+	+	+
ARA	L-Arabinose	+	+	+
XYL	D-Xilose	+	+	+
ADO	Adonitol	-	+	-
XLT	Xilitol	+	+	+
GAL	D-Galactose	-	+	-
INO	Inositol	+	+	+
SOR	D-Sorbitol	+	+	+
MDG	Metil-αD-Glucopiranosido	-	-	-
NAG	N-acetil-Glucosamina	+	+	+
CEL	D-Celobiose	+	+	+
LAC	D-Lactose	-	-	-
MAL	D-Maltose	+	+	+
SAC	D-Sacarose	+	+	+
TRE	D-Trealose	+	+	+
MLZ	D-Melezitose	+	-	+
RAF	D-Rafinose	+	+	+
Hifa	-	Não	Sim	Não
Perfil numérico	-	6723373	6773376	6723373
Identifi-cação	-	*Aspergillus niger*	*Candida ciferrii*	*Aspergillus niger*
% identificação	-	-	99,9	-

(+): Opacidade; (-): Sem opacidade

Em bagaço de yacon, nos isolados 19 a 26 foi identificada a levedura *Candida guillermondii* (coloração clara) com uma probabilidade de acerto de 99,7%.

Resultados semelhantes foram obtidos por Trujillo *et al.* (2015), que relataram que a maioria das colônias de leveduras isoladas da polpa de jambo apresentavam-se de cor branca e bege. Da mesma forma, Uribe (2007) relatou que as colônias isoladas da amora-preta apresentavam coloração branca, creme e rosa.

Algumas das leveduras isoladas apresentaram alterações na morfologia de suas colônias. Conforme ilustrado na figura 1.4 (p), o morfotipo 25, além de apresentar variação em sua pigmentação, passando do bege com centro mais escuro ao cinza-preto, apresentou pigmentos de colônia difusíveis à cor laranja

média característico de estresse osmótico (MAGER e SIDERIUS, 2002; LINDOW et al., 2004). Conforme indicado por Dastager *et al.* (2006), os pigmentos difusíveis são produzidos principalmente durante a fase estacionária da curva de crescimento dos fungos, onde realizam seu metabolismo secundário sintetizando metabólitos voláteis, compostos aromáticos e quinonas que podem ter efeito antibiótico.

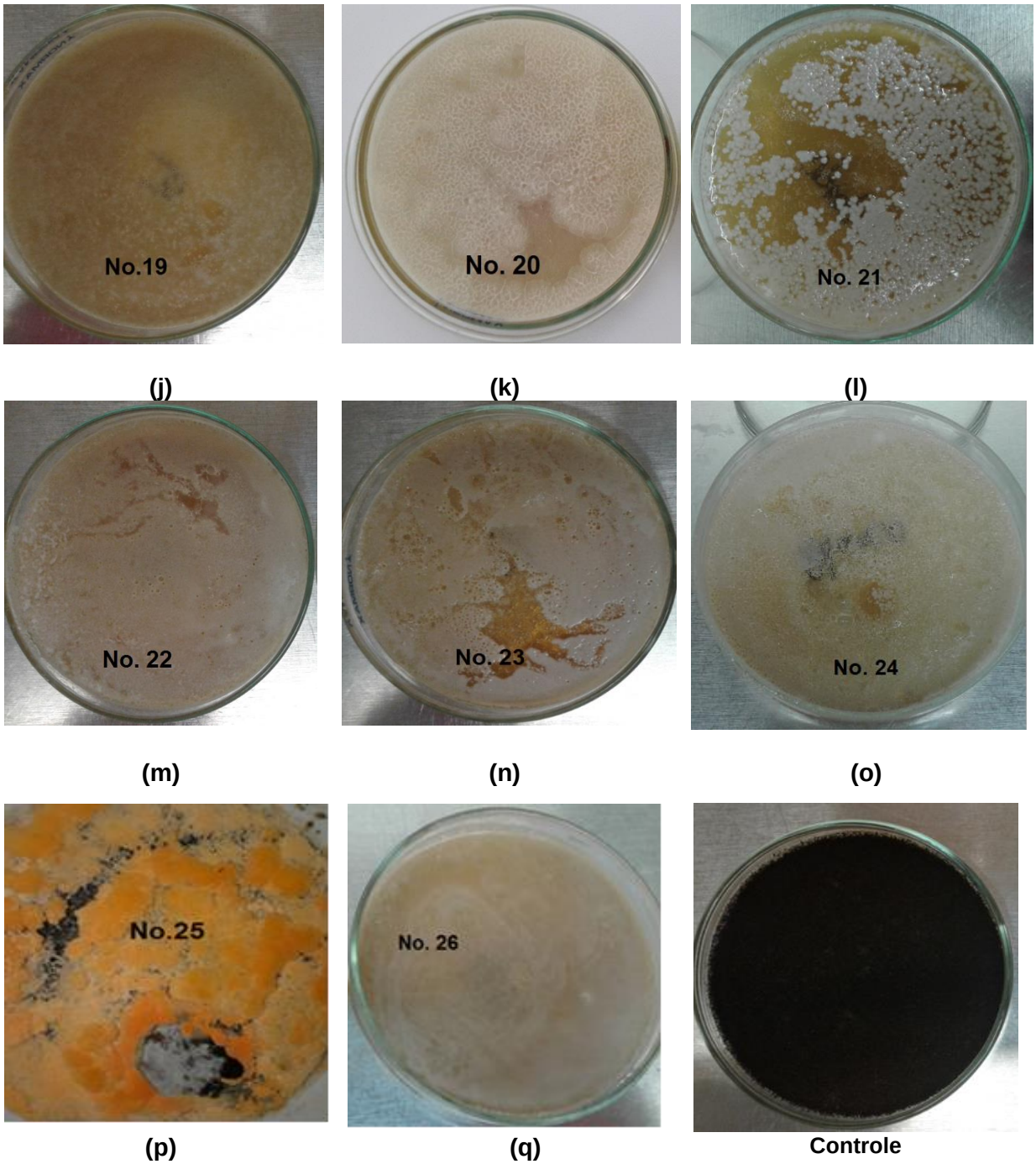


Figura 1.4 - Colônias de fungos filamentosos e leveduras identificadas em ágar BDA a partir de bagaço de yacon: (j) *Candida guillermondii* (No.19), (k) *Candida guillermondii* (No.20), (l) *Candida guillermondii* (No.21), (m) *Candida guillermondii* (No.22), (n) *Candida guillermondii* (No.23), (o) *Candida guillermondii* (No.24), (p) *Candida guillermondii* (No.25), (q) *Candida guillermondii* (No.26) e Controle (*Aspergillus niger* ATCC 16888) (No.27).

Tabela 1.4 - Leveduras isoladas de bagaço de yacon e identificadas através do sistema API20C AUX.

Fonte		Yacon	Yacon	Yacon	Yacon	Yacon	Yacon	Yacon
Testes	**Substrato**	**19**	**20**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**
Forma	-	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
Cor	-	Creme	Creme	Creme	Creme	Creme	Creme	Creme
BK	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	D-glicose	+	+	+	+	+	+	+
GLY	Glicerol	+	+	+	+	+	+	+
2KG	Calico 2-ceto-Gluconato	+	+	+	+	+	+	+
ARA	L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
XYL	D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+
ADO	Adonitol	+	+	+	+	+	+	+
XLT	Xilitol	+	+	+	+	+	+	+
GAL	D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+
INO	Inositol	-	-	-	-	-	-	-
SOR	D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
MDG	Metil-αD-Glucopiranosido	+	+	+	+	+	+	+
NAG	N-acetil-Glucosamina	+	+	+	+	+	+	+
CEL	D-Celobiose	+	+	+	+	+	+	+
LAC	D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-
MAL	D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+
SAC	D-Sacarose	+	+	+	+	+	+	+
TRE	D-Trealose	+	+	+	+	+	+	+
MLZ	D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+
RAF	D-Rafinose	+	+	+	+	+	+	+
Hifa	-	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Perfil numérico	-	6776377	6776377	6776377	6776377	6776377	6776377	6776377
Identificação	-	*Candida Guillermondii*	*Candida guillermondii*	*Candida guillermondii*	*Candida guillermondii*	*Candida guillermondii*	*Candida guillermondii*	*Candida guillermondii*
% identificação	-	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7

(+): Opacidade; (-): Sem opacidade

3.2 Produção de inulinase por fermentação submersa

Os 17 morfotipos obtidos e o controle foram testados para produção de inulinase por fermentação submersa comparando 2 tratamentos, diferenciados unicamente pela temperatura (20 ºC e 30 ºC).

Primeiramente, os resultados foram analizados em gráficos de caixa, método amplamente usado para representar estatísticas descritivas (mediana, primeiro quartil, terceiro quartil, valor máximo, valor mínimo e outliers) de uma amostra e visualizar comparações (SICILIA et al., 2017).

Posteriormente, se apresentam em tabelas as análises de diferença significativa das médias obtidas nas análises de atividade enzimática e atividade específica para cada tratamento e seus respectivos tempos de fermentação.

3.2.1 Tratamento 1

Em relação ao Tratamento 1, conforme se apresenta nas Figura 1.5 e 1.6, as amostras apresentaram maior desvio na reação de hidrólise a 20 ºC, sendo os morfotipos 1, 5, 9, 17 e 21 os mais representativos. Assim, pode-se inferir que o tempo (60 min) escolhido para a hidrólise da inulina, teve melhores resultados quando o extrato enzimático foi mantida a 50 ºC, com agitação constante na reação para ambas temperaturas. Outros autores que etudaram a temperatura ótima da enzima inulinase, referem para fungos valores entre 45-60 ºC e para leveduras entre 30-55 ºC (TREICHEL et al., 2012).

Através dos dados das figuras 1.5 e 1.6 também se observa que a atividade enzimática varia em função do tempo de fermentação submersa. Todos os gêneros apresentaram variabilidade no tempo de fermentação para produzir a enzima.

O morfotipo 17 no tempo 48 horas, apresentou a máxima atividade enzimática (1,18 $U.mL^{-1}$), assim como o maior desvio entre o valor médio.

A tabela 1.5 contém as diferenças significativas de atividades enzimáticas obtidas nos diferentes tempos de fermentação submersa para cada uma das amostras avaliadas.

O tempo 48 horas de fermentação foi o mais representativo com 55,6% na produção de inulinase, seguido por 24 horas com um 27,7% e 11,1% para 96 horas.

As máximas atividades enzimáticas e tempos de fermentação foram: Amostra (No.1) a 96 horas (0,766 $U.mL^{-1}$); No.2 (0,251 $U.mL^{-1}$) em 24 horas; No. 3 (0,323 $U.mL^{-1}$) em 48 horas; No. 5 a 48 horas (0,427 $U.mL^{-1}$); No. 6 em 24 horas

(0,323 U.mL^{-1}); No. 8 em 24 horas (0,473 U.mL^{-1}); No.9 (0,310 U.mL^{-1}) em 24 horas; No. 10 em 48 horas (0,210 U.mL^{-1}); No. 17 em 48 horas (1,18 U.mL^{-1}); No.20 (0,459 U.mL^{-1}) em 48 horas; No.21 em 96 horas (0,200 U.mL^{-1}); No. 22 em 48 horas (0,470 U.mL^{-1}); No. 23 (0,180 U.mL^{-1}) a 48 horas; No. 24 (0,108 U.mL^{-1}) a 24 horas; No. 25 a 48 horas (0,089 U.mL^{-1}); No. 26 a 48 horas (0,123 U.mL^{-1}) e No. 27 (0,262 U.mL^{-1}) a 48 horas.

No que concerne à temperatura na reação de hidrólise de inulinase, o destaque foi para 50 ºC.

A tabela 1.6 apresenta os valores de atividade específica em U.mg^{-1}. A máxima atividade foi encontrada com os morfotipos: No. 17 (456,4 U.mg^{-1}); No. 3 (291,9 U.mg^{-1}); No. 5 (231,0 U.mg^{-1}); No. 20 (138,6 U.mg^{-1}); No. 1 (130,4 U.mg^{-1}) e No. 6 (125,3 U.mg^{-1}).

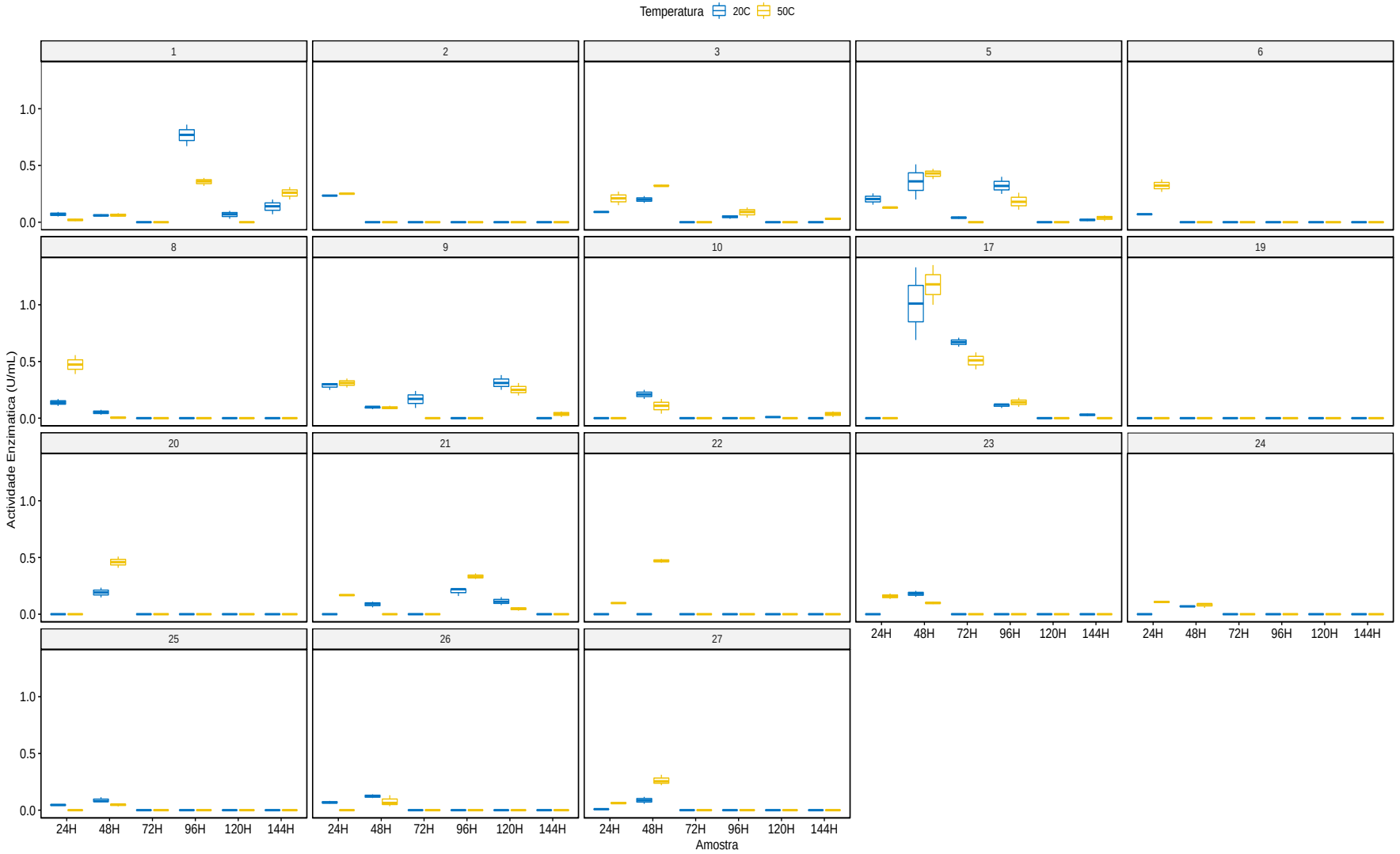


Figura 1.5 - Diagrama de caixa com média de atividade enzimática do Tratamento 1 realizado com fermentação submersa a 20 ºC, pH 4.5, 90 rpm e tempo (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h). Temperaura de hidrólise do substrato a 20 ºC e 50 ºC.

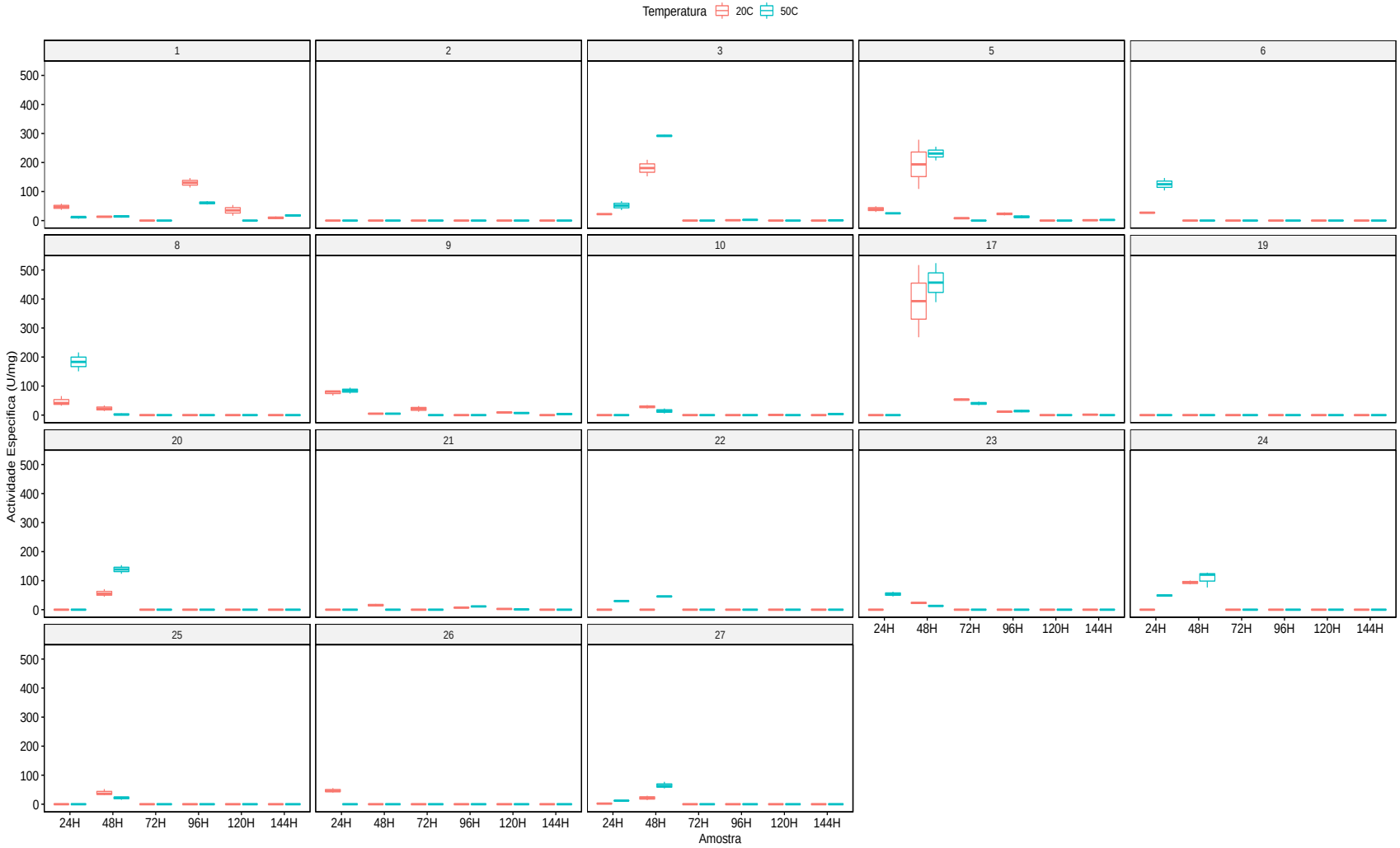


Figura 1.6 - Diagrama de caixa com média de atividade específica do Tratamento 1 realizado com fermentação submersa a 20 ºC, pH 4.5, 100 rpm e tempo (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h). Temperaura de hidrólise do substrato a 20 ºC e 50 ºC.

Tabela 1.5 - Tratamento 1: Efeito do tempo de fermentação e temperatura de hidrólise na produção de inulinase (Atividade enzimatica) a temperatura de 20ºC; pH 4,5 e 100 rpm.

Amostra	Tº Hidrólise	Média U/mL (EP)					
		24h	48h	72h	96h	120h	144h
1	20 ºC	0,07 (0,02) bcdefgh	0,06 (0,02) bcdefg	0,00008 (0,02) a	0,766 (0,02) y	0,07 (0,02) bcdefg	0,14 (0,02) bcdefghijklmn
	50 ºC	0,02 (0,02) abc	0,06 (0,02) abcdefg	0,00002 (0,02) a	0,36 (0,02) tuvw	0,00002 (0,02) a	0,26 (0,02) mnopqrst
2	20 ºC	0,234 (0,02) klmnopqrst	0,00001 (0,02) a	0,164 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00002 (0,02) a
	50 ºC	0,251 (0,02) lmnopqrst	0,00001 (0,02) a	0,0002 (0,02) a	0,00006 (0,02) a	0,00009 (0,02) a	0,00004 (0,02) a
3	20 ºC	0,089 (0,02) abcdefghij	0,200 (0,02) hijklmnopqr	0,00003 (0,02) a	0,047 (0,02) abcde	0,00003 (0,02) a	0,03 (0,02) abcd
	50 ºC	0,210 (0,02) jklmnopqrs	0,323 (0,02) rstu	0,00001 (0,02) a	0,087 (0,02) abcdefghij	0,00001 (0,02) a	0,029 (0,02) abcd
5	20 ºC	0,127 (0,02) abcdefghijklm	0,357 (0,02) tuvw	0,04 (0,02) abcde	0,324 (0,02) rstu	0,00009 (0,02) a	0,002 (0,02) abc
	50 ºC	0,204 (0,02) ijklmnopqrs	0,427 (0,02) uvwx	0,00001 (0,02) a	0,183 (0,02) fghijklmnopq	0,00009 (0,02) a	0,037 (0,02) abcde
6	20 ºC	0,069 (0,02) abcdefgh	0,00004 (0,02) a	0,00001 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00002 (0,02) a
	50 ºC	0,323 (0,02) rstu	0,00002 (0,02) a	0,00003 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00003 (0,02) a	0,00003 (0,02) a
8	20 ºC	0,138 (0,02) bcdefghijklmn	0,052 (0,02) abcdef	0,00001 (0,02) a	0,00008 (0,02) a	0,00005 (0,02) a	0,00001 (0,02) a
	50 ºC	0,473 (0,02) wx	0,006 (0,02) ab	0,00003 (0,02) a	0,00003 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00003 (0,02) a
9	20 ºC	0,286 (0,02) opqrst	0,093 (0,02) abcdefghij	0,167 (0,02) efghijklmno	0,00004 (0,02) a	0,313 (0,02) qrstu	0,00002 (0,02) a
	50 ºC	0,310 (0,02) pqrst	0,093 (0,02) abcdefghij	0,00004 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,253 (0,02) lmnopqrst	0,037 (0,02) abcde
10	20 ºC	0,00003 (0,02) a	0,210 (0,02) jklmnopqrs	0,00002 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,01 (0,02) abc	0,00003 (0,02) a
	50 ºC	0,00002 (0,02) a	0,107 (0,02) abcdefghijk	0,00004 (0,02) a	0,00001 (0,02) a	0,00001 (0,02) a	0,04 (0,02) abcde
17	20 ºC	0,00002 (0,02) a	1,01 (0,02) za	0,67 (0,02) y	0,11 (0,02)	0,00002 (0,02) a	0,03 (0,02) abcd

	50 ℃	0,00002 (0,02) a	1,18 (0,02) zb	0,51 (0,02) x	abcdefghijk 0,14 (0,02) cdefghijklmn	0,00006 (0,02) a	0,00006 (0,02) a
19	20 ℃	0,00002 (0,02) a	0,00003 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00008 (0,02) a	0,00004 (0,02) a	0,00007 (0,02) a
	50 ℃	0,00003 (0,02) a	0,00004 (0,02) a	0,00003 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00002 (0,02) a
20	20 ℃	0,00004 (0,02) a	0,191 (0,02) ghijklmnopqr	0,00001 (0,02) a	0,00006 (0,02) a	0,00001 (0,02) a	0,00006 (0,02) a
	50 ℃	0,00002 (0,02) a	0,459 (0,02) vwx	0,00003 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00001 (0,02) a	0,00003 (0,02) a
21	20 ℃	0,00001 (0,02) a	0,087 (0,02) abcdefghij	0,00006 (0,02) a	0,200 (0,02) hijklmnopqr	0,113 (0,02) abcdefghijk	0,00002 (0,02) a
	50 ℃	0,168 (0,02) efghijklmno	0,00002 (0,02) a	0,00004 (0,02) a	0,333 (0,02) stuv	0,05 (0,02) abcde	0,00002 (0,02) a
22	20 ℃	0,00007 (0,02) a	0,0004 (0,02) a	0,00001 (0,02) a	0,00005 (0,02) a	0,00001 (0,02) a	0,00005 (0,02) a
	50 ℃	0,098 (0,02) abcdefghij	0,470 (0,02) wx	0,00003 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00002 (0,02) a	0,00002 (0,02) a
23	20 ℃	0,00002 (0,02) a	0,180 (0,02) fghijklmnop	0,00004 (0,02) a	0,00008 (0,02) a	0,00008 (0,02) a	0,00005 (0,02) a
	50 ℃	0,158 (0,02) defghijklmno	0,099 (0,02) abcdefghij	0,00002 (0,02) a	0,00006 (0,02) a	0,00006 (0,02) a	0,00001 (0,02) a
24	20 ℃	0,00001 (0,02) a	0,069 (0,02) abcdefgh	0,00006 (0,02) a	0,00004 (0,02) a	0,00006 (0,02) a	0,00001 (0,02) a
	50 ℃	0,108 (0,02) abcdefghijk	0,080 (0,02) abcdefghij	0,00002 (0,02) a	0,00001 (0,02) a	0,00009 (0,02) a	0,0001 (0,02) a
25	20 ℃	0,046 (0,02) abcde	0,089 (0,02) abcdefghij	0,00006 (0,02) a	0,00006 (0,02) a	0,00007 (0,02) a	0,00002 (0,02) a
	50 ℃	0,0001 (0,02) a	0,046 (0,02) abcde	0,0002 (0,02) a	0,00009 (0,02) a	0,00009 (0,02) a	0,00001 (0,02) a
26	20 ℃	0,069 (0,02) abcdefgh	0,123 (0,02) abcdefghijkl	0,00004 (0,02) a	0,00007 (0,02) a	0,00007 (0,02) a	0,00002 (0,02) a
	50 ℃	0,00001 (0,02) a	0,077 (0,02) abcdefghi	0,00002 (0,02) a	0,00008 (0,02) a	0,00008 (0,02) a	0,00009 (0,02) a
27	20 ℃	0,009 (0,02) abc	0,087 (0,02) abcdefghij	0,071 (0,02) a	0,00004 (0,02) a	0,00004 (0,02) a	0,00001 (0,02) a
	50 ℃	0,064 (0,02) abcdefg	0,262 (0,02) nopqrst	0,00002 (0,02) a	0,00001 (0,02) a	0,00004 (0,02) a	0,00002 (0,02) a

Tabela 1.6 - Tratamento 1: Efeito do tempo de fermentação e temperatura de hidrólise na produção de inulinase (atividade específica) a temperatura 20ºC; pH 4,5 e 100 rpm.

Amostra	Tº Hidrólise	Média U/mg (EP)					
		24h	48h	72h	96h	120h	144h
1	20 ℃	47,5 (72,2) abcdefghij	13,4 (72,2) abcdef	0,00002 (72,2) a	130,4 (72,2) lm	35,4 (72,2) abcdefgh	9,5 (72,2) abcde
	50 ℃	10,8 (72,2) abcde	14,4 (72,2) abcdef	0,00001 (72,2) a	61,3 (72,2) fghijk	0,00002 (72,2) a	17,9 (72,2) abcdefg
2	20 ℃	0,00007 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00003 (72,2) a	0,00003 (72,2) a	0,00003 (72,2) a
	50 ℃	0,00001 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00007 (72,2) a	0,00003 (72,2) a	0,00003 (72,2) a	0,00003 (72,2) a
3	20 ℃	22,2 (72,2) abcdefg	180,9 72,2) no	0,00002 (72,2) a	1,3 (72,2) ab	0,00001 (72,2) a	0,00008 (72,2) a
	50 ℃	51,7 (72,2) cdefghij	291,9 (72,2) q	0,00002 (72,2) a	2,5 (72,2) ab	0,00001 (72,2) a	0,77 (72,2) a
5	20 ℃	39,6 (72,2) abcdefghi	193,8 (72,2) op	8,03 (72,2) abcd	23,0 (72,2) abcdefg	0,00001 (72,2) a	1,16 (72,2) ab
	50 ℃	25,1 (72,2) abcdefg	231,0 (72,2) p	0,00002 (72,2) a	13,1 (72,2) abcde	0,00002 (72,2) a	2,23 (72,2) ab
6	20 ℃	27,1 (72,2) abcdefg	0,00001 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00004 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00007 (72,2) a
	50 ℃	125,3 (72,2) lm	0,00001 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00007 (72,2) a	0,00003 (72,2) a	0,00002 (72,2) a
8	20 ℃	46,6 (72,2) abcdefghij	23,2 (72,2) abcdefg	0,00001 (72,2) a	0,00003 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00004 (72,2) a
	50 ℃	183,5 (72,2) nop	2,7 (72,2) ab	0,00001 (72,2) a	0,00009 (72,2) a	0,00003 (72,2) a	0,00004(72,2) a
9	20 ℃	77,5 (72,2) hijk	4,9 (72,2) abc	21,5 (72,2) abcdefg	0,00003 (72,2) a	9,2 (72,2) abcde	0,00003 (72,2) a
	50 ℃	84,5 (72,2) ijkl	5,0 (72,2) abc	0,00001 (72,2) a	0,00003 (72,2) a	7,4 (72,2) abcd	3,8 (72,2) ab
10	20 ℃	0,00003 (72,2) a	28,8 (72,2) abcdefg	0,00003 (72,2) a	0,0004 (72,2) a	0,833 (72,2) a	0,00005 (72,2) a
	50 ℃	0,00003 (72,2) a	14,3 (72,2) abcdef	0,00003 (72,2) a	0,0004 (72,2) a	0,00004 (72,2) a	3,8 (72,2) ab
17	20 ℃	0,00007 (72,2) a	392,7 (72,2) r	53,5 (72,2) defghij	11,0 (72,2) abcde	0,00005 (72,2) a	1,53 (72,2) ab
	50 ℃	0,00005 (72,2) a	456,4 (72,2) s	40,4 (72,2) abcdefghi	14,0 (72,2) abcdef	0,00007 (72,2) a	0,00004 (72,2) a
19	20 ℃	0,00002 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00008 (72,2) a	0,00004 (72,2) a	0,00008 (72,2) a	0,00002 (72,2) a
	50 ℃	0,00002 (72,2) a	0,00009 (72,2) a	0,00005 (72,2) a	0,00008 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00004 (72,2) a

20	20 ℃	0,00002 (72,2) a	56,8 (72,2) efghij	0,00006 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00001 (72,2) a
	50 ℃	0,00003 (72,2) a	138,6 (72,2) mn	0,00003 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00009 (72,2) a
21	20 ℃	0,00009 (72,2) a	15,5 (72,2) abcdef	0,00003 (72,2) a	2,43 (72,2) ab	6,63 (72,2) abcd	0,00002 (72,2) a
	50 ℃	0,00008 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00001 (722) a	1,0 (72,2) a	11,2 (72,2) abcde	0,00003 (72,2) a
22	20 ℃	0,00009 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00007 (72,3) a	0,00008 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00001 (72,2) a
	50 ℃	29,6 (72,2) abcdefg	45,6 (72,2) abcdefghi	0,00009 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a
23	20 ℃	0,00006 (72,2) a	23,2 (72,2) abcdefg	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a
	50 ℃	53,6 (72,2) defghij	12,8 (72,2) abcde	0,00007 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00003 (72,2) a	0,00002 (72,2) a
24	20 ℃	0,00002 (72,2) a	93,7 (72,2) jklm	0,00004 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a
	50 ℃	48,8 (72,2) bcdefghij	108,2 (72,2) klm	0,00005 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a
25	20 ℃	0,00007 (72,2) a	40,1 (72,2) abcdefghi	0,00002 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00001 (72,2) a
	50 ℃	0,00004 (72,2) a	21,1 (72,2) abcdefg	0,00004 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00003 (72,2) a
26	20 ℃	47,1 (72,2) abcdefghij	0,00009 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a
	50 ℃	0,00001 (72,2) a	0,00009 (72,2) a	0,00004 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00002 (72,2) a
27	20 ℃	2,1 (72,2) ab	21,6 (72,2) abcdefg	0,00003 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00001 (72,2) a	0,00003 (72,2) a
	50 ℃	12,4 (72,2) abcde	64,8 (72,2) ghijk	0,00008 (72,2) a	0,00002 (72,2) a	0,00004 (72,2) a	0,00003 (72,2) a

EP: Erro padrão; **a**: O valor não é estatisticamente diferente de zero.
As médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) Ver Apêndice C

3.2.2 Tratamento 2

Em relação ao Tratamento 2 (Figuras 1.7 e 1.8), as atividades enzimáticas e específicas máximas foram observadas nos tempos de fermentação de 24 e 48 horas, sendo a amostra No. 10 a mais representativa (0,941 $U.mL^{-1}$).

Na tabela 1.7 se apresentam os resultados da fermentação 24 horas onde, as máximas atividades enzimáticas foram: No.1 (0,586 $U.mL^{-1}$); No.5 (0,424 $U.mL^{-1}$); No. 17 (0,481 $U.mL^{-1}$); No. 19 (0,412 $U.mL^{-1}$); No. 22 (0,215 $U.mL^{-1}$); No. 23 (0,168 $U.mL^{-1}$); No.24 (0,122 $U.mL^{-1}$); No. 25 (0,089 $U.mL^{-1}$); No. 26 (0,095 $U.mL^{-1}$) e No.27 (0,323 $U.mL^{-1}$. No tempo de fermentação 48 horas se encontram as amostras: No.2 (0,148 $U.mL^{-1}$); No.3 (0,814 $U.mL^{-1}$); No. 6 (0,159 $U.mL^{-1}$); No. 8 (0,174 $U.mL^{-1}$); No. 9 (0,220 $U.mL^{-1}$); No. 10 (0,941 $U.mL^{-1}$); No.20 (0,140 $U.mL^{-1}$) e No. 21 (0,273 $U.mL^{-1}$).

A tabela 1.8 apresenta os valores de atividade específica em $U.mg^{-1}$. As máximas atividades encontradas a 48 horas foram: No. 21 (248 $U.mg^{-1}$); No. 3 (107,9 $U.mg^{-1}$), No. 5 (61,2 $U.mg^{-1}$) e No. 27 (94,6 $U.mg^{-1}$).

Esses resultados podem ser considerados bons se comparados com outros autores. Por exemplo, Ertan *et al.* (2003), usando pó de alcachofra de Jerusalém como substrato, conseguiram atividades de 2,90 $U.mL^{-1}$ apartir de inulinase extraída de *Aspergillus parasiticus e* 1,60 $U.mL^{-1}$ a partir de *Penicillium spinulosum*; a partir de extrato de yacon Cazetta *et al.* (2005) com inulinase extraída de *Kluveromyces marxianus* var. bulgaricus uma atividade de 4,10 $U.mL^{-1}$; Mahmoud *et al.* (2011) que trabalharam com inulinase obtida de *Aspegillus niger* e usando como sustrato extrato de alho cru conseguiram uma atividade de 5,65 $U.mL^{-1}$; Lafuente-Castaneda *et al.* (2012), trabalhando com inulinase obtida apartir de *Penicillium citrinum* e usando inulina como substrato reportaram atividades de 2,24 $U.mL^{-1}$; uma atividade de 2,84 $U.mL^{-1}$ obtida de inulinase extraída de *Penicillium expansum* usando inulina como substrato foi relatado por Fernandes *et al.* (2012); Bonciu *et al.* (2012) a partir de farinha de trigo como substrato e inulinase de *Rhizoctonia sp* conseguiram uma atividade de 1,87 $U.mL^{-1}$ e Flores-Gallegos *et al.* (2015) usando como substrato inulina e inulinase de *Aspergillus fumigatus*, os valores de 7,97 $U.mL^{-1}$.

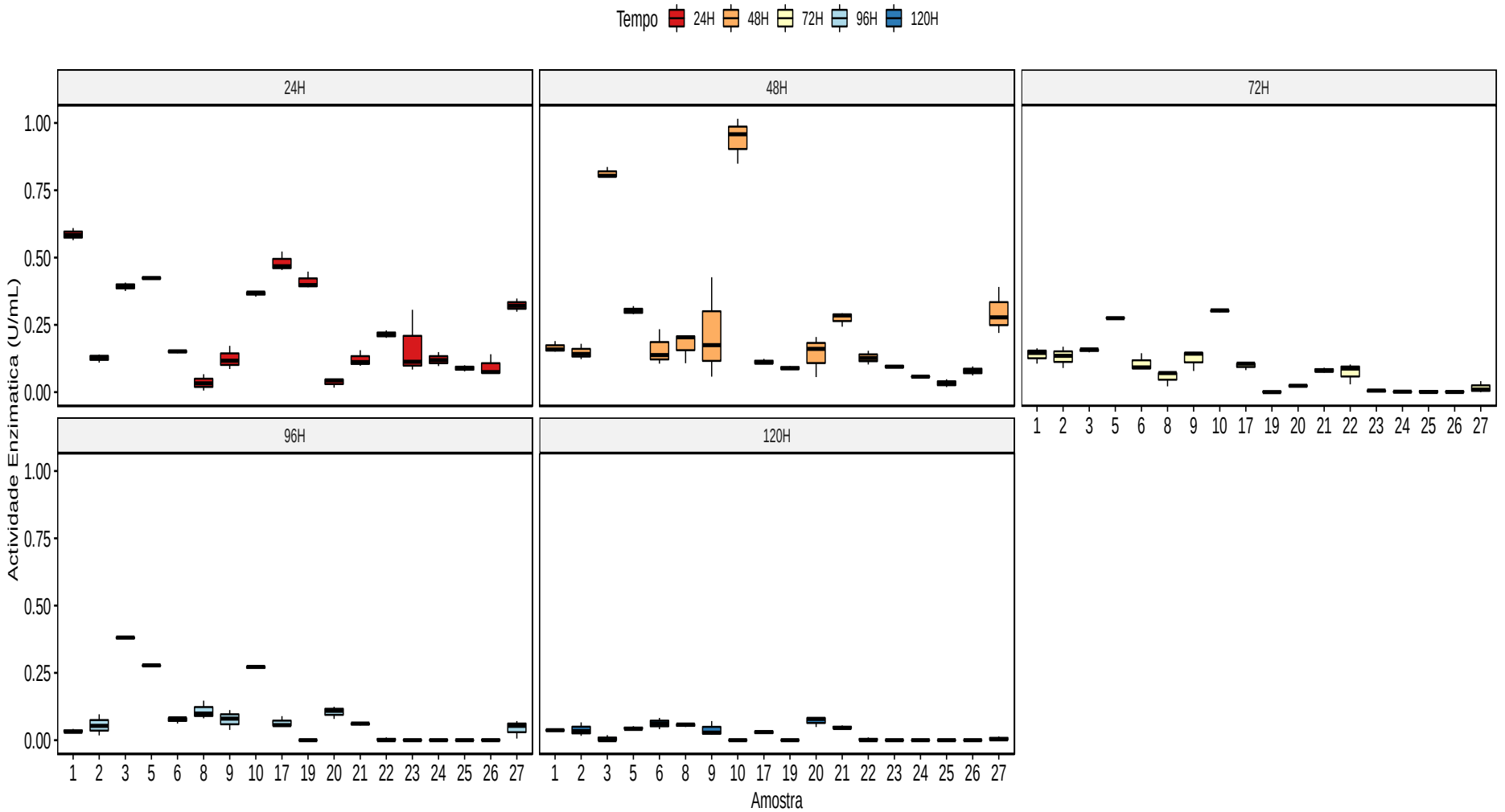


Figura 1.7 - Diagrama de caixa com média de atividade enzimática do tratamento 2 realizado com fermentação submersa a 30 ºC, pH 4.5, 100 rpm e tempo (24h, 48h, 72h, 96h e 120h). Temperaura de hidrólise do substrato a 50 ºC.

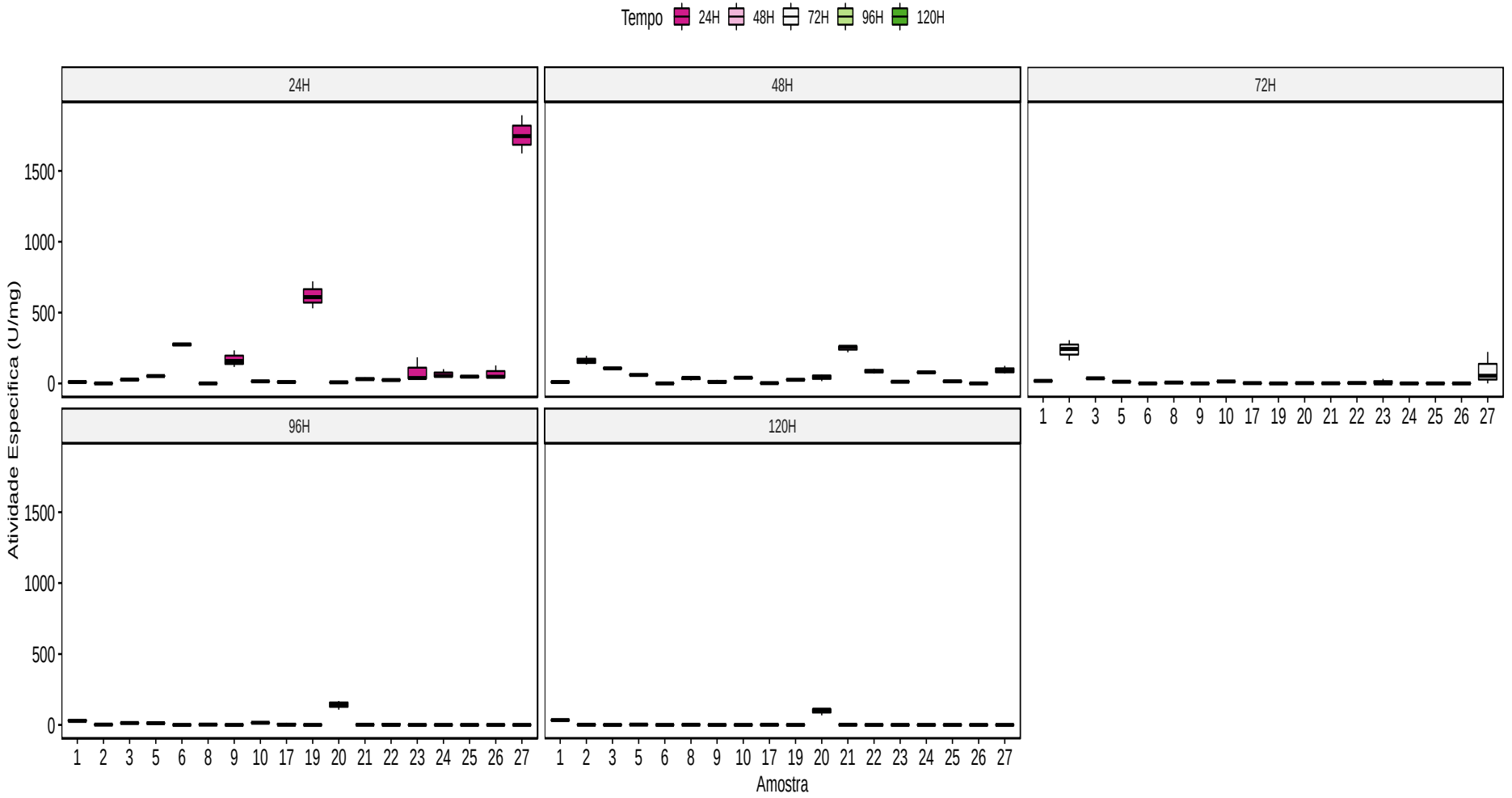


Figura 1.8 - Diagrama de caixa com média de atividade específica do tratamento 2 realizado com fermentação submersa a 30 ºC, pH 4.5, 100 rpm e tempo (24h, 48h, 72h, 96h e 120h). Temperaura de hidrólise do substrato a 50 ºC.

Tabela 1.7 - Tratamento 2: Efeito do tempo de fermentação e temperatura de hidrólise na produção de inulinase (Atividade enzimatica) a temperatura 30ºC; pH 4,5 e 100 rpm.

Amostra	Tº Hidrólise	Média U/mL (EP)				
		24h	48h	72h	96h	120h
1	50 ºC	0,586 (0,02) w	0,166 (0,02) ijklmnop	0,138 (0,02) efghijklm	0,034 (0,02) abcdefg	0,036 (0,02) abcdefgh
2	50 ºC	0,126 (0,02) cdefghijklm	0,148 (0,02) fghijklmn	0,131 (0,02) efghijklm	0,056 (0,02) abcdefghijk	0,039 (0,02) abcdefgh
3	50 ºC	0,392 (0,02) stuv	0,814 (0,02) x	0,155 (0,02) ghijklmnop	0,380 (0,02) stuv	0,006 (0,02) abcd
5	50 ºC	0,424 (0,02) uv	0,303 (0,02) rstu	0,276 (0,02) pqrs	0,277 (0,02) pqrs	0,045 (0,02) abcdefghij
6	50 ºC	0,151 (0,02) fghijklmno	0,159 (0,02) hijklmnop	0,108 (0,02) abcdefghijklm	0,075 (0,02) abcdefghijk	0,062 (0,02) abcdefghijk
8	50 ºC	0,035 (0,02) abcdefgh	0,174 (0,02) klmnopq	0,055 (0,02) abcdefghijk	0,109 (0,02) abcdefghijklm	0,056 (0,02) abcdefghijk
9	50 ºC	0,125 (0,02) bcdefghijklm	0,22 (0,02) mnopqr	0,124 (0,02) bcdefghijklm	0,076 (0,02) abcdefghijk	0,040 (0,02) abcdefgh
10	50 ºC	0,365 (0,02) stuv	0,941 (0,02) y	0,301 (0,02) rstu	0,270 (0,02) nopqrs	0,00006 (0,02) a
17	50 ºC	0,481 (0,02) vw	0,112 (0,02) abcdefghijklm	0,098 (0,02) abcdefghijklm	0,066 (0,02) abcdefghijk	0,030 (0,02) abcdef
19	50 ºC	0,412 (0,02) tuv	0,09 (0,02) abcdefghijk	0,001 (0,02) ab	0,0000011 (0,02) a	0,0000014 (0,02) a
20	50 ºC	0,037 (0,02) abcdefgh	0,140 (0,02) efghijklm	0,02 (0,02) abcde	0,104 (0,02) abcdefghijklm	0,071 (0,02) abcdefghijk
21	50 ºC	0,122 (0,02) abcdefghijklm	0,273 (0,02) opqrs	0,081 (0,02) abcdefghijk	0,06 (0,02) abcdefghijk	0,048 (0,02) abcdefghij
22	50 ºC	0,215 (0,02) lmnopqr	0,128 (0,02) defghijklm	0,073 (0,02) abcdefghijk	0,0033 (0,02) abc	0,0033 (0,02) abc
23	50 ºC	0,168 (0,02) jklmnop	0,095 (0,02) abcdefghijkl	0,0043 (0,02) abcd	0,00033 (0,02) a	0,00000233 (0,02) a
24	50 ºC	0,122 (0,02) abcdefghijklm	0,058 (0,02) abcdefghijk	0,00167 (0,02) ab	0,00066 (0,02) a	0,00000008 (0,02) a
25	50 ºC	0,089 (0,02) abcdefghijk	0,033 (0,02) abcdefg	0,003 (0,02) abc	0,00000005 (0,02) a	0,00000001 (0,02) a
26	50 ºC	0,095 (0,02) abcdefghijkl	0,079 (0,02) abcdefghijk	0,002 (0,02) ab	0,001 (0,02) ab	0,00000004 (0,02) a
27	50 ºC	0,323 (0,02) rstu	0,296 (0,02) qrst	0,017 (0,02) abcde	0,043 (0,02) abcdefghi	0,0056 (0,02) abcd

EP: Erro padrão; **a**: O valor não é estatisticamente diferente de zero; as médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Tabela 1.8 - Tratamento 2: efeito do tempo de fermentação e temperatura de hidrólise na produção de inulinase (atividade específica) a temperatura 30ºC; pH 4,5 e 100 rpm.

Amostra	Tº Hidrólise	Média U/mg (EP)				
		24h	48h	72h	96h	120h
1	50 ℃	10,4 (15,6) ab	10,6 (15,6) ab	17,9 (15,6) abc	31,1 (15,6) abc	33,4 (15,6) abc
2	50 ℃	0,000007 (15,6) a	161,3 (15,6) efgh	237,4 (15,6) ghi	2,0 (15,6) ab	1,4 (15,6) ab
3	50 ℃	27,3 (15,6) abc	107,9 (15,6) cdef	35,2 (15,6) abc	12,9 (15,6) abc	0,866 ab
5	50 ℃	52,4 (15,6) abcd	61,2 (15,6) abcd	12,6 (15,6) abc	12,1 (15,6) abc	2,1 (15,6) ab
6	50 ℃	274,2 (15,6) i	0,000004 (15,6) a	0,000004 (15,6) a	0,000004 (15,6) a	0,000005 (15,6) a
8	50 ℃	0,000005 (15,6) a	33,8 (15,6) abc	5,3 (15,6) ab	2,6 (15,6) ab	1,3 (15,6) ab
9	50 ℃	169,8 (15,6) fgh	13,3 (15,6) abc	0,000004 (15,6) a	0,000002 (15,6) a	0,000002 (15,6) a
10	50 ℃	15,2 (15,6) abc	39,4 (15,6) abc	14,8 (15,6) abc	15,0 (15,6) abc	0,0000 (15,6) a
17	50 ℃	10,8 (15,6) ab	2,0 (15,6) ab	1,7 (15,6) ab	5,5 (15,6) ab	0,5 (15,6) ab
19	50 ℃	620,1 (15,6) j	27,2 (15,6) abc	0,000004 (15,6) a	0,000003 (15,6) a	0,0000004 (15,6) a
20	50 ℃	7,4 (15,6) ab	42,5 (15,6) abc	1,9 (15,6) ab	141,2 (15,6) defg	96,5 (15,6) bcdef
21	50 ℃	33,2 (15,6) abc	248 (15,6) hi	1,0 (15,6) ab	0,8 (15,6) ab	0,6 (15,6) ab
22	50 ℃	24,9 (15,6) abc	86,9 (15,6) abc	3,2 (15,6) ab	4,4 (15,6) ab	0,000007 (15,6) a
23	50 ℃	85,3 (15,6) abcdef	12,3 (15,6) abc	10,8 (15,6) ab	0,000005 (15,6) a	0,000004 (15,6) a
24	50 ℃	66,3 (15,6) abcde	78,2 (15,6) abcdef	1,8 (15,6) ab	0,000002 (15,6) a	0,000001 (15,6) a
25	50 ℃	48,2 (15,6) abcd	15,2 (15,6) abc	1,8 (15,6) ab	0,000005 (15,6) a	0,000006 (15,6) a
26	50 ℃	70,6 (15,6) abcde	0,000005 (15,6) a	0,000001 (15,6) a	0,000006 (15,6) a	0,000006 (15,6) a
27	50 ℃	1753,5 (15,6) k	94,6 (15,6) abcdef	92,4 (15,6) abcdef	0,000001 (15,6) a	0,000001 (15,6) a

3.2.3 Teste de avaliação de influência de cor de luzes LED na produção de inulinase

O ensaio de comprimento de onda (luz LED), foi realizado para avaliar a produção de inulinase, tomando como refêrencia os gêneros que apresentaram maior atividade nos tratamentos 1 e 2 (Figura 1.9 e 1.10).

Como resultado, as leveduras apresentaram variação entre as cores e os fungos foram estáveis em uma só cor. O gênero *Cryptococcus,* ao se usar luz vermelha apresentou uma atividade de 0,160 $U.mL^{-1}$; enquanto que para gênero *Trichosporon* o aumento foi notado com luz branca (0,60 $U.mL^{-1}$) e luz azul para o gênero Candida (0,410 $U.mL^{-1}$); e *Aspergillus niger* apresentaram maior atividade com a luz verde.

Trabalhos similares foram realizados por Zapata *et al.* (2009) que testando a luz LED azul, vermelha e branca para produção de biomassa para *Ganoderma lucidum,* encontraram melhores reultados com a cor azul. Um estudo melhorado sobre o trabalho anterior, foi realizado por Atheortua-Garcés *et al.* (2013) que observaram a maior concentração de proteínas do fungo *Ganoderma lucidum* com a LED amarela, seguido pela azul, depois a vermelha e finalmente a branca, demonstrando o efeito diferencial nos tipos de comprimento de onda o que traduz maior ou menor quantidade de biomassa, obtenção de metabólitos primários ou secundários tipo polissacáridos e ácidos ganódericos. Palacio-Barrera *et al.* (2019), usando LED azul encontrou maior produção de biomassa para os fungos *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus chevalieri*.

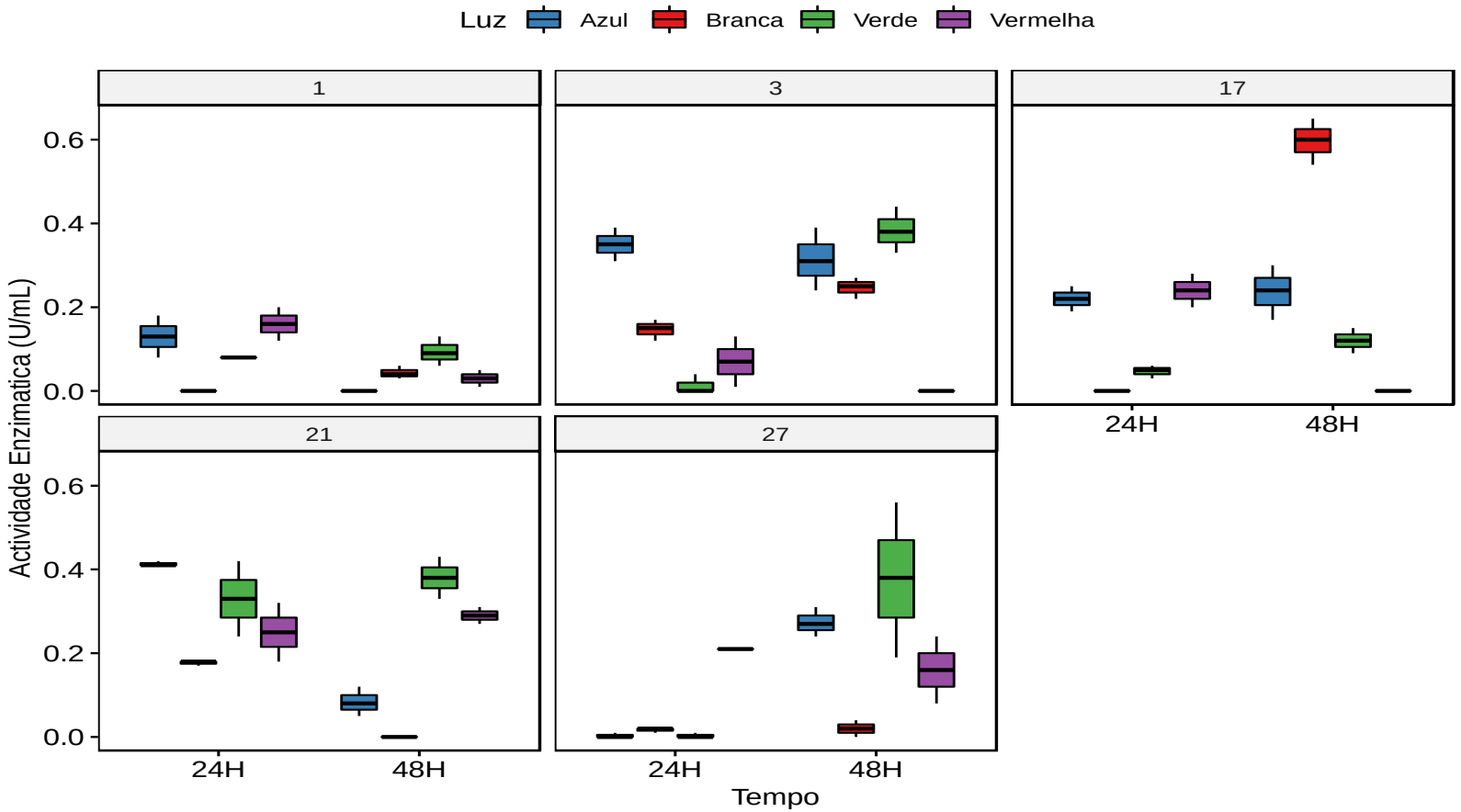


Figura 1.9 - Diagrama de caixa de médias de atividade enzimática para o tratamento com luzes LED (Azul, Branca, verde, Vermelha) dos morfotipos (1,3, 17 e 21). Fermentação submersa a 20 ºC, pH 4,5, 100 rpm e tempos (24h e 48h).Temperatura de hidrólise (50 ºC).

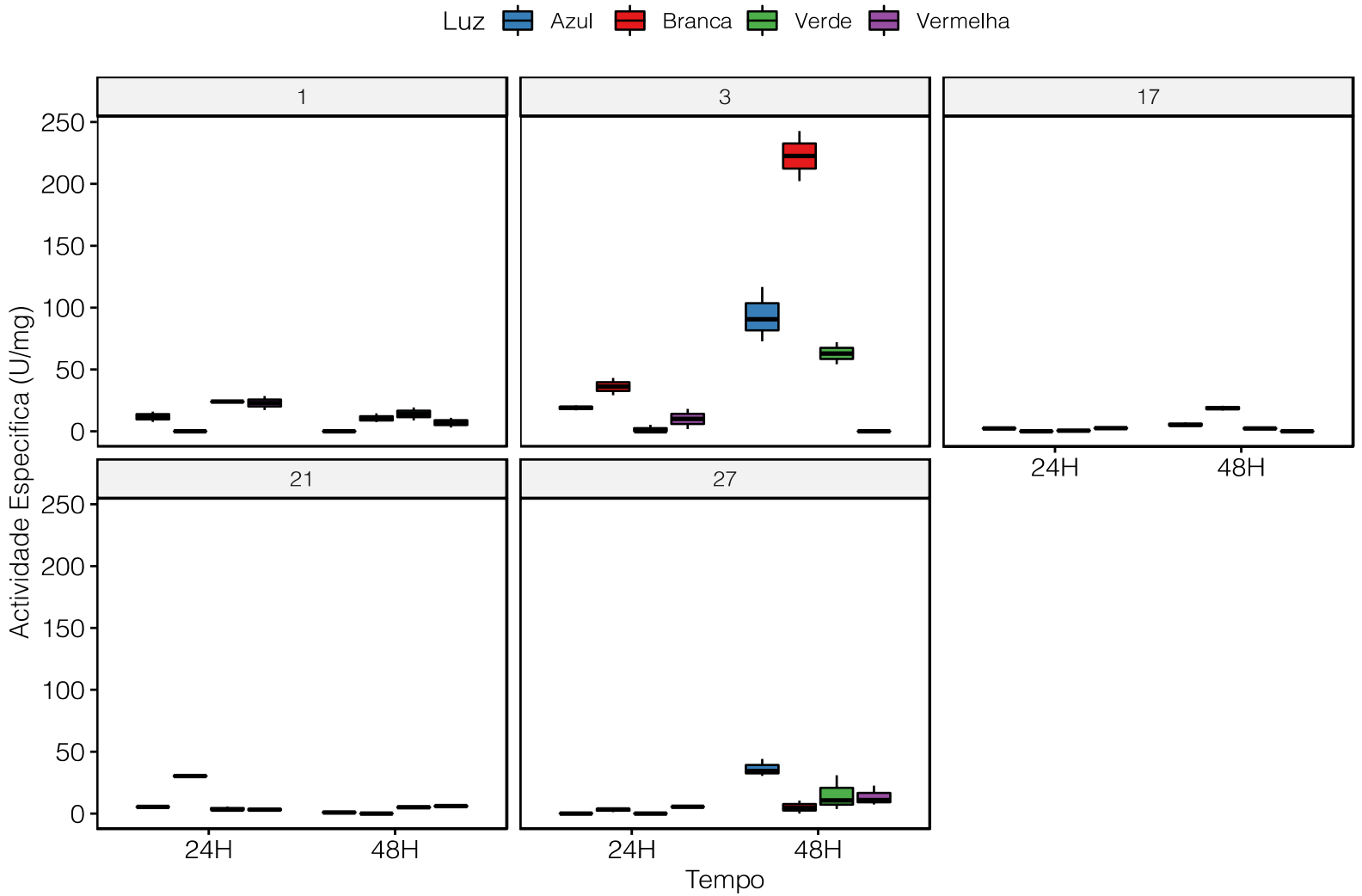


Figura 1.10 - Diagrama de caixa com média de atividade específica para o tratamento com luzes LED (Azul, Branca, verde, Vermelha) dos morfotipos (1,3, 17 e 21). Fermentação submersa a 20 ºC, pH 4,5, 100 rpm e tempos (24h e 48h). Temperatura de hidrólise (50 ºC).

Tabela 1.9 Avaliação da influência de cor de luzes LED na produção de inulinase (Atividade enzimática) a temperatura 20ºC; pH 4,5 e 100 rpm.

Amostra	Tempo	Média U/mL (EP)			
		Azul	**Branca**	**Verde**	**Vermelha**
1	24h	0,13 (0,02) abcdefgh	0,007 (0,02) a	0,08 (0,02) abcde	0,16 (0,02) bcdefghij
	48h	0,004 (0,02) a	0,04 (0,02) abc	0,09 (0,02) abcdefg	0,03 (0,02) abc
3	24h	0,35 (0,02) lmno	0,15 (0,02) abcdefghi	0,01 (0,02) ab	0,07 (0,02) abcd
	48h	0,31 (0,02) jklmno	0,25 (0,02) ghijklmn	0,38 (0,02) no	0,001 (0,02) a
17	24h	0,22 (0,02) defghijklm	0,001 (0,02) a	0,04 (0,02) abc	0,24 (0,02) fghijklmn
	48h	0,24 (0,02) fghijklmn	0,60 (0,02) p	0,12 (0,02) abcdefgh	0,003 (0,02) a
21	24h	0,41 (0,02) o	0,17 (0,02) cdefghijk	0,33 (0,02) klmno	0,25 (0,02) ghijklmn
	48h	0,08 (0,02) abcdef	0,001 (0,02) a	0,38 (0,02) no	0,29 (0,02) ijklmno
27	24h	0,003 (0,02) ab	0,01 (0,02) ab	0,003 (0,02) ab	0,21 (0,02) defghijkl
	48h	0,27 (0,02) hijklmno	0,02 (0,02) abc	0,37 (0,02) mno	0,16 (0,02) bcdefghij

EP: Erro padrão; **a**: O valor não é estatisticamente diferente de zero.
As médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) Ver Apêndice C

Tabela 1.10 Avaliação da influência de cor de luzes LED na produção de inulinase (Atividade específica) a temperatura 20ºC; pH 4,5 e 100 rpm.

Amostra	Tempo	Média U/mg (EP)			
		Azul	**Branca**	**Verde**	**Vermelha**
1	24h	11,8 (3,6) abcd	0,000002 (3,6) a	23,9 (3,6) cde	22,9 (3,6) bcde
	48h	0,000007 (3,6) a	10,7 (3,6) abcd	14,1 (3,6) abcd	7,03 (3,6) abc
3	24h	18,9 (3,6) abcde	36,2 (3,6) e	1,76 (3,6) a	10,03 (3,6) abcd
	48h	93,3 (3,6) g	222,5 (3,6) h	63,1 (3,6) f	0,000006 (3,6) a
17	24h	2,38 (3,6) ab	0,000002 (3,6) a	0,65 (3,6) a	2,57 (3,6) ab
	48h	5,54 (3,6) abc	18,81 (3,6) abcde	2,42 (3,6) ab	0,000005 (3,6) a
21	24h	5,36 (3,6) abc	30,34 (3,6) de	3,86 (3,6) abc	3,20 (3,6) ab
	48h	0,94 (3,6) a	0,000002 (3,6) a	5,08 (3,6) abc	5,98 (3,6) abc
27	24h	0,19 (3,6) a	3,01 (3,6) ab	0,06 (3,6) a	5,56 (3,6) abc
	48h	36,4 (3,6) e	5,11 (3,6) abc	15,11 (3,6) abcd	13,59 (3,6) abcd

EP: Erro padrão; **a**: O valor não é estatisticamente diferente de zero.
As médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) Ver Apêndice C

3.3 Formação de halo de degradação de inulina

Levando em consideração a fonte, caracterização morfológica das colônias, os gêneros identificados com o teste assimilação de açúcares e teste enzimático, seis (6) microrganismos foram escolhidos para aplicar o teste de formação de halo branco de degradação de inulina (Figura 1.11): *Cryptococcus laurentii* (No.1), *Aspergillus niger* (No.3), *Aspergillus niger* (No.5), *Aspergillus niger* (No.10), *Trichosporon mucoides* (No.17), *Candida guillermondii* (No.21) e controleATCC 16888 *Aspergillus Niger* (No.27).

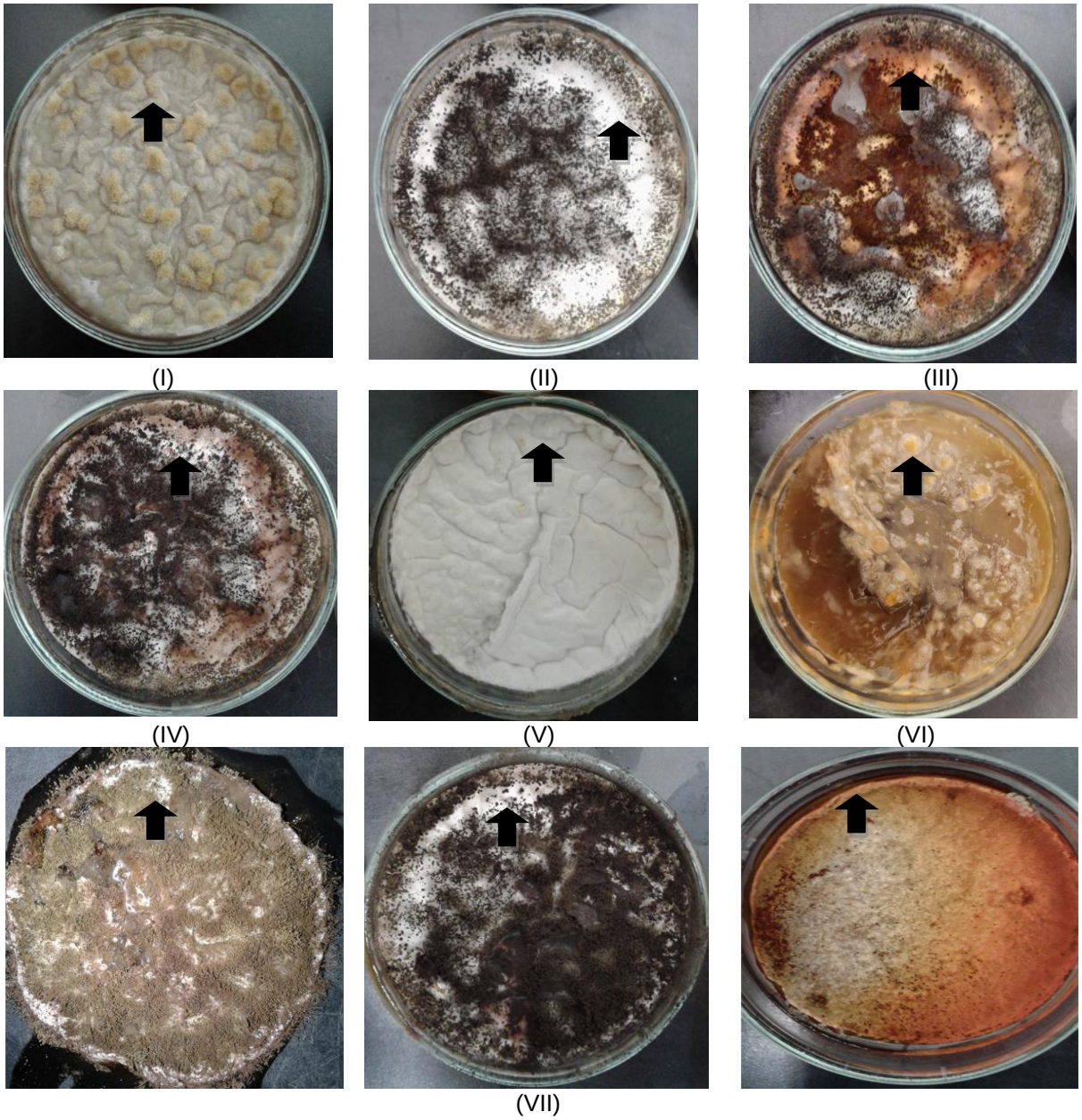


Figura 1.11. - Formação de halo de degradação de inulina. (I) *Cryptococcus laurentii* (II) *Aspergillus niger* (III) *Aspergillus niger* (IV) *Aspergillus niger* (V) *Trichosporun mucoides* (VI) *Candida guillermondii* (VII) ATCC 16888 *Aspergillus niger.*

Os seis microrganismos citados anteriormente formaram halos de degradação de inulina (Figura 1.11). O fungo *Aspergillus niger*, comparado com as amostras 3, 5, 10, e o controle, apresentaram halos de característica similar ao redor do micélio. No caso das leveduras, foi evidenciada a formação de halos. Resultados similares foram obtidos por Canon (2013) ao estudar a inulinase produzida por *F. oxysporum* isolado a partir da rizosfera do yacon.

4 Conclusões

Ao se considerar os dois objetivos específicos dessa etapa, que incluiam isolar e caracterizar microrganismos e conduzi-los à identificação fenotípica por um método de assimilação de açúcares conhecido comercialmente como API 20C AUX, e avaliar a produção de inulinase para aqueles tipificados com, no mínimo, 80% de probabilidade de similaridade, pode se relatar que:

Nas amostras dos frutos nativos de Amazonas (Colômbia) foram identificados dezessete (17) isolados. Entre os isolados foram encontrados cinco (5) gêneros de leveduras e um (1) de fungo filamentoso; em cupuaçu escolheu-se os isolados de *Cryptococcus laurentii*, *Candida ciferri* e *Aspergillus niger*; em Araçá-boi as espécies de *Trichosporon mucoides*, *Candida humicola* e *Aspergillus niger*; em cubiu a levedura *Candida ciferri* e o fungo *Aspergillus niger* e no bagaço de yacon a levedura *Candida guilermondii*, para avaliar o potencial de seu cultivo para produção de inulinase usando dois tratamentos (1 e 2) com diferença de temperatura de fermentação (20 e 30 ºC).

Seis (6) isolados apresentaram o maior teor de atividade enzimática e específica entre os tratamentos. Sendo o tratamento 2 o mais representativo entre as espécies.

A formação de halo de degradação de inulina confirmou a atividade da inulinase nas seis (6) amostras escolhidas por seu teor de açúcar redutor e proteína.

O teste de luzes LED para avaliar o potencial de produção de inulinase mostrou diferentes comportamentos entre os gêneros, sendo necessário continuar com estudos de avaliação de composição de meio de cultura ideal para cada espécie e sua resposta frente os diferentes comprimentos de onda das luzes LED.

Assim, concluiu-se que os isolados *Cryptococcus laurentii* (No. 1), *Aspergillus niger* (No. 3), *Aspergillus niger* (No. 5); *Aspergillus niger* (No. 10); *Trichosporon mucoides* (No. 17) e *Candida guillermondii* (No. 21) a pH (4,5); rpm (100); temperatura (30 °C); tempo de fermentação (48 horas) foram os mais representativos para produção de inulinase e, portanto, serão essas as espécies para dar continuidade aos trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

Identificação genotípica de microrganismos isolados de frutos da região amazônica da colômbia com potencial para produção de inulinases.

Resumo

Nessa etapa do projeto, o primeiro objetivo foi realizar extrações de DNA dos morfotipos 1, 3, 5, 10, 17 e 21, isolados de frutos do Amazonas, da Colômbia. Esses microrganismos foram identificados preliminarmente pelo método API 20CAUX (Etapa 1). Para a extração do DNA testou-se, pré-tratamentos (sem tratamento, nitrogênio líquido, choque térmico e ultrassom) e tratamento (Método trizol e kit DNeasy&Blood de QIAGEN). A qualidade e quantidade de DNA foi avaliada por espectrofotometria considerando as relações A260/280 e A260/230. A integridade do material genético foi visualizada com gel de agarose 2%. Com os resultados das análises obtidas com o kit comercial se obtiveram os melhores desempenhos, tendo sido possível extrair DNA de boa qualidade de 5 isolados (92%), com concentrações que variaram entre 40,3 e 95,6 $\mu l.mL^{-1}$. Além disso, fez-se a extração dos RNAs para o estudo transcriptômico. O segundo objetivo foi identificar molecularmente os morfotipos usando o DNA extraído, amplificando e sequenciando as regiões 18S e ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do ADNr com a empresa Macrogene, Corea do Sul. As sequências foram comparadas *in sílico* com outras depositadas no banco de informações genômicas da NBCI, usando o programa BLAST. Este procedimento permitiu identificar a nível de gênero e espécie três isolados (*Aspergillus niger, Cladosporium tenuissimum, Meyerozyma guillermondii*). A tecnologia de sequenciamento de RNA (RNA-seq) é uma excelente ferramenta para identificar alterações no perfil de expressão dos genes em nível transcricional. No terceiro objetivo, usando RNA-seq, foi realizada uma análise comparativa do transcriptoma do morfotipo No. 3 (por ter apresentado o melhor desempenho na etapa anterior) em duas condições (24 e 48 horas) de fermentação submersa usando inulina como fonte carbono. Mais de 293.019.882 milhões de *reads* foram alinhadas usando o genoma de referência *Aspergillus niger* após o sequenciamento. 40 e 43 genes diferencialmente expressos foram identificados em 48 horas com relação às 24 horas de fermentação submersa. Em geral, genes diferencialmente expressos enriquecidos estiveram envolvidos com genes putativamente relacionados na função metabólica com atividade catalítica, associados a metabolismo de carboidratos, enzimas com atividade hidrolítica, transferase ou transglucosidase. Os genes com maior expressão estão associados à família β-glucosidases.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*. *Cladosporium tenuissimum.* Expressão. Extração. DNA. Inulinase. ITS. 18S. *Meyerozyma guillermondii*. RNA. Sequenciamento. Transcriptômica.

Abstract

At this stage of the project, the first objective was to carry out DNA extractions of morphotypes 1, 3, 5, 10, 17 and 21, isolated from fruits from the Amazon, Colombia. These microorganisms were preliminarily identified by the API 20CAUX method (Step 1). For DNA extraction, pretreatments (no treatment, liquid nitrogen, heat shock and ultrasound) and treatment (Trizol method and QIAGEN DNeasy&Blood kit) were tested. The quality and quantity of DNA was evaluated by spectrophotometry considering the A260/280 and A260/230 ratios. The integrity of the genetic material was visualized with a 2% agarose gel. With the results of the analyzes obtained with the commercial kit, the best performances were obtained, and it was possible to extract good quality DNA from 5 isolates (92%), with concentrations ranging between 40.3 and 95.6 µl.mL-1. In addition, the RNAs were extracted for the transcriptomic study. The second objective was to molecularly identify the morphotypes using the extracted DNA, amplifying and sequencing the 18S and ITS regions (ITS1-5.8S-ITS2) of the rDNA with the company Macrogene, South Korea. The sequences were compared in silico with others deposited in the NBCI genomic information bank, using the BLAST program. This procedure allowed the identification of three isolates at the genus and species level (Aspergillus niger, Cladosporium tenuissimum, Meyerozyma guillermondii). RNA sequencing technology (RNA-seq) is an excellent tool to identify changes in the expression profile of genes at the transcriptional level. In the third objective, using RNA-seq, a comparative analysis of the morphotype No. 3 (because it showed the best performance in the previous step) in two conditions (24 and 48 hours) of submerged fermentation using inulin as a carbon source. More than 293,019,882 million reads were aligned using the Aspergillus niger reference genome after sequencing. 40 and 43 differentially expressed genes were identified at 48 hours compared to 24 hours of submerged fermentation. In general, enriched differentially expressed genes were involved with putatively related genes in metabolic function with catalytic activity, associated with carbohydrate metabolism, enzymes with hydrolytic activity, transferase or transglucosidase. The genes with the highest expression are associated with the β-glucosidases family.

Keywords: *A. niger. C. tenuissimum*. Expressao. Extraction. DNA. Inulinase. ITS. 18S. *M. guillermondii*. RNA. sequencing. Transcryptomics.

1. Introdução

Os métodos morfológicos geralmente não são suficientes para discriminar espécies. Na maioria dos casos, são usados para a identificação taxonômica até o nível de gênero. Os, métodos moleculares estão disponíveis para superar esta limitação, pois apresentam grande sensibilidade e especificidade para identificar isolados de uma grande diversidade de microrganismos (LÓPEZ et al., 2013; BERROUET et al., 2014 LAFUENTE-RINCÓN et al., 2016, MELLADO, 2020).

A técnica biomolecular da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), baseada na amplificação que pode ser, sucedida de sequênciamento e comparação *in silico* das diferentes regiões do genoma do microrganismo, permite que as diferentes regiões do genoma do isolado sejam identificadas de forma rápida e eficiente a nível de gênero, espécie e variedade (AMADO, 1999; GANDRA et al., 2008; VILLEGAS et al., 2009; DIOS et al., 2013).

Os métodos moleculares mais utilizados para tal identificação são as análises comparativas de sequências de DNA ribossômico nuclear (rDNA) pelo método SANGER, especialmente a região ITS (WHITE et al., 1990, ITOO, et al., 2015), pois as unidades desses genes são repetidas em tandem, de um a vários milhares de cópias dentro do genoma do fungo (CULLINGS e VOGLER, 1998).

A organização de uma unidade de rDNA inclui três genes que codificam primeiramente asubunidade pequena baseada no gene 18S (SSU), em um segundo momento para o gene 5.8S e um terceiro a subunidade grande para o gene 28S (LSU) (ATKINS e CLARK, 2004). As regiões de codificação 28S e 18S são separadas por duas classes de espaçadores, espaçadores externos (ETS) e espaçadores internos não transcritos (NTS); no entanto, ambos os espaçadores são geralmente chamados de espaçadores intergênicos (IGS). O gene 5.8S está integrado entre os dois espaçadores internos transcritos, ITS-1 e ITS-2 (EDEL, 1998; HWANG e KIM, 1999).

A extração de DNA é uma etapa fundamental para esses estudos moleculares. Nesse aspecto, os reagentes utilizados e os métodos de extração de DNA são relevantes (DE ARMAS et al., 2011; LÓPEZ 2014).

O procedimento geral para extração de ácidos nucléicos consiste em três etapas consecutivas: desintegração de células ou tecidos (lise celular), inativação de

nucleases intracelulares e separação de ácidos nucléicos de outros componentes celulares (ACEVEDO et al. 2007; MATOS, 2011; RÍOS, 2019).

A lise celular é altamente dependente do tipo de amostra a ser processada. Durante a lise celular, as estruturas formadas por lipídios e proteínas são destruídas, permitindo a liberação de ácidos nucléicos do núcleo da célula. A lise é realizada usando uma solução salina que geralmente contém detergentes que desnaturam proteínas e/ou proteases. Uma vez que os ácidos nucléicos são separados das proteínas e lipídios, sua purificação é realizada (ROJAS et al., 2011; RÍOS-SANCHEZ et al. 2016)

Os métodos de purificação apresentam grande variabilidade e são desenvolvidos com base nas propriedades físico-químicas das moléculas de DNA e RNA. Alguns desses métodos de extração e purificação usados são: Precipitação por sais e álcoois; extração com solventes orgânicos; adsorção em coluna de sílica; separação magnética. Geralmente, os kits comerciais utilizam membranas de sílica no processo de extração de DNA. Um dos kits disponíveis no mercado é o QIAGEN® DNeasy, que utiliza tecnologia de membrana de silicato para purificar rapidamente o DNA celular total, sem o uso de solventes orgânicos que representam risco à saúde humana e ao meio ambiente devido às dificuldades de remoção, por exemplo, do clorofórmio (NIU et al., 2008). Este método permite a lise direta, que é alcançada com proteinase K; O pH é ajustado com diferentes tampões para atingir a máxima ligação do DNA à membrana, e os contaminantes e inibidores de enzimas são removidos por centrifugação (OSORIO et al., 2009; PEREZ, 2018).

A purificação clássica do DNA por adição de fenol e clorofórmio dá origem ao aparecimento de 2 fases: uma fase aquosa superior contendo os ácidos nucleicos e uma fase orgânica contendo as proteínas dissolvidas no fenol e os lipídios dissolvidos no clorofórmio. Para purificação de DNA o fenol deve ter um pH≈7-8. O DNA é então precipitado da fase aquosa com isopropanol ou etanol absoluto e lavado com etanol a 70% para remover sais e pequenas moléculas orgânicas que ainda podem estar presentes na amostra. Finalmente, o DNA é ressuspenso em um tampão apropriado (MATOS, 2011; MEZA et al., 2013; LÓPEZ et al., 2014).

No caso da extração do RNA total em tecidos fúngicos se assemelha aos tecidos vegetais, pela presença de paredes celulares rígidas, quantidades apreciáveis de taninos, pigmentos, polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários. Esses componentes frequentemente coprecipitam com o RNA total,

afetando o rendimento e a qualidade do ácido nucleico (CLAROS e CANOVAS 1998; KIM e HAMADA, 2005, ROJAS et al., 2011).

Um número significativo de métodos para extração de RNA total de tecido foi públicado levando em consideração o problema de obtenção de RNA total livre de contaminantes. Geralmente, RNA total de alta qualidade é alcançado quando a atividade da ribonuclease foi totalmente inibida (PORTILLO et al., 2006; MANICKAVELU et al., 2007). Vários reagentes têm sido usados para inibir a atividade da ribonuclease, incluindo o tiocianato de guanidínio (CHOMCZYNSKI, 1993). Posteriormente, começou a ser utilizado o sistema comercial TRIZOL (Invitrogen), que é composto por uma mistura de isotiocianato de guanidínio, fenol, acetato de sódio, lauroil sarcosinato de sódio (LSS) e outros desnaturantes fortes (LIU et al., 1998; MORIGUCHI et al., 2002). O clorofórmio é misturado com fenol para reduzir as perdas totais de RNA na interface e, assim, aumentar a eficiência do processo de extração. O clorofórmio desnatura as proteínas, remove os lipídios e solubiliza o fenol. Isso favorece a separação dos ácidos nucléicos que permanecem na fase aquosa. O álcool isoamílico é adicionado como antiespumante no processo de mistura de fases (AMBION, 2008; ROJAS 2011).

A qualidade do material genético é um ponto chave na aplicação de várias técnicas moleculares. Os principais parâmetros analisados após uma extração são pureza, quantidade e integridade (PEREZ, 2018).

A pureza da amostra está relacionada ao valor máximo de absorbância dos ácidos nucleicos detectados em comprimento de onda de 260 nm.

A relação das absorbâncias A260/A280 permite saber se o DNA obtido está contaminado pela presença de compostos aromáticos, pois estes absorvem no comprimento de onda de 280 nm. Essa proporção é muito estável e o DNA geralmente é considerado de ótima qualidade quando a proporção 260/280 é maior que 1,8. Uma razão $A_{260/280} > 2,1$ é indicativa de uma presença considerável de RNA na amostra. Por outro lado, se esta relação for baixa ($A_{260/280} < 1,6$), a amostra está contaminada por proteínas ou fenóis. No caso de contaminação protéica será necessário realizar um tratamento adicional para eliminar as proteínas presentes na solução de DNA (por exemplo, adição de proteinase K). Se a contaminação for devido à presença de fenóis, é necessário limpar a amostra com clorofórmio, álcool isoamílico e etanol (GREEN e SAMBROOK, 2012; RÍOS-SÁNCHEZ et al., 2016)

A razão de absorbância $A_{260/230}$ é utilizada como medida adicional para determinar a pureza do DNA, pois em 230 nm é detectada a absorbância máxima de sais presentes na solução, carboidratos ou outros possíveis contaminantes. Em geral, o DNA é considerado puro quando a razão $A_{260/230}$ está próxima de 1,5-2,2. Uma proporção inferior a 1,5 pode ser indicativa da presença de contaminantes na amostra. No entanto, deve-se levar em consideração que esta medida não fornece informações tão exatas quanto a razão A260/280 e que pode ser distorcida por uma baixa concentração de DNA na amostra, pois a concentração de sais presentes no tampão seria superestimada (AMARU et al., 2008; RIOS, 2019).

A Integridade é avaliada através de eletroforese em gel de agarose de 0,7-2% (p/v). Se uma amostra estiver intacta, apresentará uma banda de DNA perfeitamente única, definido na parte superior do gel de agarose. Uma amostra de DNA degradado apresentará uma esteira ou "mancha" ao longo do gel que será mais pronunciada quanto maior for a degradação da amostra (MATOS, 2011).

A análise de expressão gênica sempre inclui amostras de RNA. Determinar a qualidade das amostras de RNA é essencial para garantir que a análise de expressão gênica resultante seja exata e precisa. Como resultado, a avaliação do número de integridade do RNA (RIN) tornou-se prática padrão antes de qualquer estudo de sequênciamento de RNA, pois demonstrou ser robusto e reprodutível em comparação com outros algoritmos de cálculo de integridade de RNA, como a proporção de subunidades 28S:18S ribossomal. Assim, a integridade do RNA é avaliado com o cálculo de RIN em géis com bandas que apresentam valores de RIN ≥ 7,0 em uma escala de 1-10 (IMBEAUD et al., 2005).

Celularmente, a informação genética criptografada no DNA e contida nos genes é expressa através dos mecanismos de transcrição e tradução, dos quais são produzidas moléculas de mRNA e proteína, respectivamente. Eventos celulares, como replicação, diferenciação, divisão celular e outros caracteres macroscópicos como características fenotípicas, morfológicas, funcional e resposta a estímulos são produto da expressão gênica (SEDANO e CARRASCAL, 2012).

A expressão gênica diferencial em uma célula ou tecido, mesmo sem qualquer informação genômica prévia, é possível através da implementação do sequenciamento direto de RNA, conhecida como RNA-seq (WANG et al., 2009; GARBER et al., 2011; EGAN et al., 2012; WARD et al., 2012, MELLADO et al., 2020).

A RNA-seq é uma tecnologia de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing, NGS*) a partir de cDNA. Nesta tecnologia, o RNA total ou mRNA é capturado, fragmentado e convertido em uma biblioteca de cDNA. Um dos passos fundamentais é obter um RNA de boa qualidade que representa todas as transcrições que são produzidas na condição e tecido de estudo (WARD et al., 2012). A fragmentação de RNA ou cDNA é realizada por nebulização, por digestão com enzimas de restrição ou através do uso de cátions bivalentes sob condições de alta pressão (WANG et al., 2009). O fracionamento geralmente é realizado após a síntese de cDNA. Esta síntese é realizada com procedimentos padrão bem estabelecidos para a maioria de organismos que fazem uso da enzima transcriptase reversa (SEDANO e CARRASCAL, 2012; BULTET e FALQUET, 2015). Uma vez obtido o cDNA, os adaptadores são ligados de tal forma que cada fragmento gerado conterá um adaptador ligado em suas extremidades 3' e 5'. As sequências desses adaptadores são conhecidas e serão necessários para que cada fragmento possa ser sequenciado e, em alguns casos, pode ser usado para diferenciar outros grupos de fragmentos obtidos de amostras de diferentes cDNAs; no entanto, não são todos os casos que requerem a ligação de adaptadores, o que dependerá da plataforma de sequenciamento a ser utilizada (CORE et al., 2008; MAHER et al., 2009; MARGUERAT e BAHLER, 2010).

Esta tecnologia de sequenciamento é uma excelente ferramenta para identificar mudanças no perfil de expressão de genes (WANG et al., 2009, GULLEDGE et al., 2012; CORCINO, 2019).

Em relação à quantidade e concentração de mRNA necessária para a tecnologia RNA-seq, a faixa está entre 5 e 10 µg, com uma concentração em torno de 500 $ng.\mu l^{-1}$ (SEDANO e CARRASCAL, 2012).

A tecnologia RNA-seq está atualmente disponível comercialmente nas empresas Roche/454, Solexa/Illumina, SOLiD/Life Technologies e Helicos/Biociências; no entanto, das tecnologias NGS disponíveis os mais aplicados são Roche/454 e Solexa/Illumina (METZKER, 2010; STRICKLER et al., 2012).

A Solexa/Illumina baseia-se no princípio de amplificação em ponte e o uso de marcação por fluorescência de nucleotídeos modificados com terminadores reversíveis (METZKER, 2010) e pode ser resumida da seguinte forma: Os fragmentos de RNA são convertidos em cDNA e então ligados a adaptadores em uma extremidade (*single-end*) ou em ambas as extremidades dos fragmentos

(extremidade pareada). Cada molécula de cDNA é amplificada e então sequenciada. (JU et al., 2006; GUO et al., 2008; METZKER, 2010; WOLF, 2013).

Após o sequenciamento, os milhões de *reads* gerados devem ser montados. Existem duas abordagens para realizar esta montagem. Montagem de novo, não é suportada por nenhuma informação de sequência anterior. O sequenciamento de Sanger é geralmente usado, como para obter leituras mais longas. Montagem com genoma de referência, é realizada em um genoma de referência (WANG et al., 2009).

Dado o grande volume de dados genômicos, foi necessário projetar e adaptar ferramentas informáticas para analisar este tipo de dados, muitos dos quais são de uso livre na internet. Atualmente, o uso de ferramentas bioinformática tem aumentado para ser trabalhada em sistemas operacionais baseados em o ambiente GNU/LINUX. Um desses sistemas operacionais é o Ubuntu, que apresenta uma interface de fácil acesso e gerenciamento de dados através do uso de comandos, que são interpretados, executados e exibidos na mesma janela de execução (CORCINO, 2019).

Neste estudo, o primeiro objetivo foi usar métodos de pré-tratamentos e tratamentos combinados para extração de DNA dos morfotipos 1, 3, 5, 10, 17 e 21. Para a extração de RNA do morfotipo 3 foi escolhido o método de TRIZOL. O segundo objetivo visou identificar a nível de espécie os isolados citados anteriormente, através de amplificação, sequênciamento e comparação *in silico* das regiões ITS e 18S do rDNA nuclear com outros disponíveis em bancos de dados computacionais. Por último, o terceiro objetivo foi identificar genes envolvidos na expressão da inulinase em dois tempos (24 e 48 horas) de fermentação submersa (produção da enzima) usando inulina como única fonte de carbono, através da análise e comparação do transcriptoma RNA-seq do isolado No. 3.

2. Material e métodos

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de GENMOL em parceria com o Laboratório de Nutrição da Sede de Investigação Universitária (SIU) - Universidade de Antioquia (Colômbia) e serviço externo contratado com a empresa MACROGENE (Coreia do Sul), para execução do RNA-seq.

2.1 Microrganismo

De acordo aos resultados apresentados no capítulo 1, os seis (6) morfotipos usados neste trabalho foram escolhidos pelos resultados de atividade enzimática e refêrenciados com os números de identificação API: 1, 3, 5, 10, 17 e 21. O morfotipo No. 3, por suas características fenotípicas orientadas a um microrganismo seguro com calssificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*), foi selecionado para as análises de transcriptômica.

2.2 Extração do material genético

2.2.1 DNA Total

A extração de DNA de cada isolado foi realizada a partir de micélio produzido em meio Batata-dextrose enriquecido com inulina como descrito no capítulo 1. Para este teste as amostras (caldo ou *pellet*) foram submetidas aos métodos de pre-tratamento e tratamento conforme indicado na tabela 2.1.

Tabela 2.1 Pre-tratamento e tratamento para obtenção do DNA total.

PRE-TRATAMENTO		**TRATAMENTO**	
Método	**Procedimento**	**Método Clássico**	**Método comercial (Kit)**
Sem tratamento	Suspensão do microrganismo em 3 mL de água	Trizol	Kit Yeastar TM Genomic DNA Kit (Zymo Research)
Nitrogenio Líquido	Suspensão do microrganismo em 3 mL de água + adição de nitrogênio líquido.	SpeedVac	Kit Dneasy blood & tissue (QUIAGEN)
Ultrassom	Amostra em banho de ultrassom por 30 minutos a temperatura ambiente.		
Choque térmico	Amostra submetida a treis ciclos com temperaturas (-20°C/30 min e 110 °C/30 min para amostra liquída) e (-70°C/30 min e 110 °C/30 min para coletado).		

Pellet: Centrifugação do microrganismo a 5000 rpm x 10 min
SpeedVac: 55 °C x 2 horas + 50 uL de água dd + vortex 30 segundos + 15 segundos de spin.

O método de extração por choque térmico descrito por Caprilesa et al. (2005), consiste em uma série de mudanças de temperatura no início da extração para romper a camada de ergosterol. Como resultado é obtido DNA suficiente para realizar uma PCR.

Os kits refêrenciados anteriormente, foram usados seguindo as instruções dos fabricantes, com modificações mínimas e descritas detalhadamente no Apêndice D.

2.2.2 RNA Total

Para extração do RNA, foi realizado um desenho experimental que consistiu em produzir inulinase a partir de micélio do isolado No. 3 por fermentação submersa, usando inulina como fonte de carbono, em dois tempos de fermentação (24 e 48 horas). Os *pellets* resultantes após esses tempos de fermentação foram submetidos a extração de RNA pelo método de Trizol (Invitrogen^{TM}, Life Technologies) (Apêndice D).

O trizol é um reagente pronto para uso e empregado no isolamento de RNA a partir de células e tecidos, o qual mantém a integridade do RNA durante a homogeneização dos tecidos, ao mesmo tempo que rompe células e componentes celulares do tecido vegetal.

2.2.3 Teste de quantidade, qualidade e integridade do material genético

Tendo em conta a exigência realizada pela empresa Macrogene para a identificação genética das espécies, a quantidade, qualidade e integridade do material genético, primeiramente foram avaliados usando o equipamento Nanodrop Multiskan sky (Thermo scientific), e as amostras que cumprem critérios de aceitação foram submetidas a teste de integridade em gel de agarose.

2.2.3.1 Quantificação e pureza do DNA e RNA

A concentração e pureza do material genético foram quantificadas usando um NanoDrop. Para análise foi usado 2 µl de amostra previamente passada por spin e classificada como aceitável pelos valores de absorbância como se específica na tabela 2.2.

Tabela 2.2 Valores de referência de pureza para o material genético

Material genético	Absorbância	Valor aceitável	Conceito
DNA	$A_{260/280}$	≥ 1,8-2,2	Essa proporção é usada para avaliar a pureza em um extrato de DNA (Quantidade de proteína).
	$A_{260/230}$	≥ 1,6	Essa proporção é usada para avaliar o grau de contaminação do material genético por sais, açúcares, compostos fenólicos e proteínas.
RNA	$A_{260/280}$	≥ 2,0-2,2	Essa proporção é usada para avaliar a pureza em um extrato de DNA (Quantidade de proteína).
	$A_{260/230}$	≥ 1,5	Essa proporção é usada para avaliar o grau de contaminação do material genético por sais, açúcares, compostos fenólicos e proteínas.

2.2.3.2 Gel de integridade

As bandas de DNA foram visualizadas mediante eletroforese em gel de agarose (2% p/v de agarose em tampão TBE 1X). As amostras foram preparadas usando 5 µl de amostra e 3 µl de buffer de carga comercial (DNA Loading) 6X. Posteriormente, a eletroforese horizontal foi realizada em um equipamento BIORAD aplicando uma tensão de 90 volts por 30 minutos. Para visualizar os fragmentos de ácido nucleico no gel, foi adicionado 5 µl de uma solução de brometo de etídio (Sigma, EUA) por cada 50 mL de solução de agarose (Biocell Science), posteriormente observado por meio de iluminação com luz ultravioleta em um transiluminador modelo UVP (BioDoc-lt Imaging System). Na corrida no gel foram usados marcadores de peso molecular de 100 pb (Promega) e 50 pb (Biolab) como material de refêrencia.

Com o intuito de manter a integridade do RNA extraído não foram realizadas as eletroforeses das amostras em Colômbia. Estas análises foram feitas diretamente pela empresa Macrogene previamente a análise de transcriptômica.

O bioanalisador realiza uma eletroforese capilar para determinar Integridade do RNA através de dois tipos de leituras: o número de integridade do RNA (RIN) e as proporções de RNA ribossomal (rRNA) presente (23S/16S). O primeiro é calculado através de um *software* que analisa todo o padrão eletroforético de corrida e o segundo método calcula as proporções das intensidades de banda correspondentes ao rRNA (o mais visível em uma eletroforese de RNA total). RINs de boa qualidade estão acima de seis, em uma faixa de um a dez, e boas proporções de rRNA são iguais ou maiores que um (CUBILLOS et al., 2014).

2.3 Identificação molecular (amplificação e sequênciamento de regiões ribossomais (18S e ITS)

2.3.1 Seleção da amostra

Para a realização das análises foram escolhidos os DNA dos morfotipos 1, 3, 5, 10, 17 e 21 extraídos com as melhores características (boa concentração, alta pureza e o menor grau de degradação). Posteriormente, as amostras de DNA foram enviadas em duplicata (Back up) e seguindo os protocolos da empresa MACROGEN em Seul, Coréia do Sul. Cada tubo continha 70 µl do material genético extraído com o Kit de QUIAGEN reconstituído em buffer AE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0) e no caso das amostras extraídas com Trizol (80 uL reconstituído com Hepes).

2.3.2 Amplificação e sequênciamiento da amostra

No estudo de identificação molecular através do sequênciamiento bidirecional das regiões 18S e ITS, foi usado o método SANGER.

As amostras de DNA genômico foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em duplicata em um volume de 25 µl por amostra com os seguintes reagentes: Buffer PCR 1X, $MgCl_2$ 2 mM, dNTP 200 µM, Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA) 2U.μ^{-1}, água grau molecular (1.5%), ADN fúngico de 25-50 ng.μ^{-1} e 0,4 µM de oligonucleotídeos iniciadores universais (*prymers*) para identificação da região ITS: ITS1-*Forward* (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3'), ITS2 reverse (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e para identificação da região 18S NS1 (5' GTAGTCATATGCTTGTCTC 3') e NS2 (5' GGCTGCTGGACCAGACTTGC 3'). As temperaturas e tempos de reação para *prymers* NS1/NS2 foram: desnaturação inicial do DNA molde a 94°C por 3 minutos, desnaturação cíclica a 94°C por 30 segundos, alinhamento por 40 segundos a 50°C, extensão por 1 minuto a 72°C, e extensão final a 72°C por 7 minutos, com um número total de 35 ciclos de amplificação. Para os primers ITS1/ITS2, a desnaturação do DNA molde foi realizada a 94°C por 3 minutos, desnaturação cíclica a 94°C por 30 segundos, alinhamento 40 segundos a 57°C, extensão 1 minuto a 72° C, e extensão final de 72°C por 7 minutos, totalizando 36 ciclos de amplificação. Posteriormente, foi realizada uma eletroforese horizontal em gel de agarose para determinar a presença do produto das amplificações por PCR das regiões ITS e 18S, para a qual foi utilizado um gel de agarose 1% p/v em tampão SB (borato de sódio, 1-10 mM, pH 8,0), corado com brometo de etídio 4%, adicionando 5 µL do produto amplificado e 1 µL de tampão de carregamento.

2.3.3 Alinhamento das sequências com BLAST

A sequência obtida para cada região genômica de cada morfotipo foi comparada *in silico* com outras sequências fúngicas depositadas no banco de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dos Estados Unidos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), acessando a opção Nucleotide BLAST, inserindo a sequência e selecionando o botão "BLAST".

BLAST é um programa de computador para alinhamento de Sequências de DNA, RNA ou proteínas. O programa é capaz de comparar uma sequência problema

contra muitas sequências encontradas no banco de dados, sendo capaz de identificar gênero e espécie (VEGA 2013, SANCHEZ 2016).

2.4 Transcriptômica (NGS): Expressão gênica diferencial

O método de sequência paralela, massiva ou de nova geração NGS (*Next Generation Sequencing*) com a tecnologia de RNA-Seq foi usado para realizar a expressão gênica diferencial de genes (DEGs) do morfotipo No. 3. Amostras de RNA do tempo de fermentação 24 horas e 48 horas foram enviados triplicata e com respectiva contra-amostra (Back up) para a empresa MACROGEN em Seul, Coréia do Sul para as respectivas análises. Cada tubo tipo ependorf continha 90 µl do RNA reconstituído em 28 µl de água ultra pura tratada com dietilpirocabonato (DEPC) e 62 µl de etanol grau HPLC.

2.4.1 Sequenciamento

O fluxo de trabalho Illumina NGS inclui 4 etapas básicas (Figura 2.1):

Figura 2.1 - Visão geral do sequenciamento.
Fonte: Adptado de informe de resultados Macrogene

2.4.1.1 Preparação da Amostra

Para a construção da biblioteca, o DNA/RNA é extraído de uma amostra. Após realizar o controle de qualidade (QC), as amostras qualificadas prosseguem para a construção da biblioteca.

2.4.1.2 Construção da biblioteca

A biblioteca de sequenciamento é preparada por fragmentação aleatória da amostra de DNA ou cDNA, seguida por ligação de adaptador 5' e 3'. Alternativamente, a "tagmentação" combina a fragmentação e a ligação em reações de uma única etapa que aumenta muito a eficiência do processo de preparação da

biblioteca. Os fragmentos ligados ao adaptador são então amplificados por PCR e purificados em gel.

2.4.1.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma Illumina HiSeq 3000 do tipo *single-end*, usando um modo de leitura de 50bp. O sequenciador HiSeq3000 (Illumina) adota a tecnologia de sequenciamento SBS. Esta tecnologia permite o sequenciamento paralelo em massa de milhões de fragmentos usando um método baseado em um terminador reversível que detecta bases únicas à medida que são incorporadas em fitas molde de DNA. O resultado é um sequenciamento base por base altamente preciso que praticamente elimina a sequência específica do contexto de erros, mesmo dentro de regiões de sequências repetitivas e homopolímeros.

2.4.1.4 Dados brutos

Os dados de sequenciamento foram convertidos em dados brutos para a análise. O sequenciador Illumina gera imagens brutas utilizando um *software* de controle de sequenciamento a através de um *software* de análise primária integrado chamado RTA (*Real Time Análise*). O binário BCL (chamadas de base) é convertido em FASTQ utilizando o pacote Illumina bcl2fastq. Os adaptadores não são aparados das leituras.

2.4.2 Análises bioinformáticas

Após o processo de sequenciamento, os dados foram obtidos na forma de leituras contidas em arquivos informáticos. Esses arquivos podem se tornar muito grandes; quanto maior seja o genoma do organismo estudado, maior será o tamanho dos arquivos, para os quais é recomendado ter um *cluster* ou um servidor para poder analisá-los de forma eficiente. Recomenda-se ter, prefêrencialmente, um servidor com 16Gb de RAM ou mais; se não for possível, pelo menos 4Gb de RAM e capacidade de armazenamento maior que o tamanho das bibliotecas porque os arquivos resultantes da análise bioinformática também são muitas vezes pesados (VANVERK et al., 2013; CUBILLOS et al., 2014). Os dados geralmente estão no formato.fastq. Este formato contém as sequências das leituras e seus valores de qualidade correspondentes de sequenciamento. Os passos básicos na análise

bioinformática são: (1) Preparação das leituras, (2) Mapeamento e montagem, e (3) Identificação de genes diferencialmente expressos.

2.4.2.1 Análise de qualidade de sequenciamento de RNA-Seq

O controle de qualidade das leituras (*reads*) obtidas por RNA-seq foi realizado por meio do programa FastQC disponível em http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/ (VAN VERK et al., 2013). Esa ferramenta permite observar a longitude das sequências, a distribuição por nucleotídeos, o conteúdo de (%GC) nas amostras, a presença de adaptadores, bem como sequências sobre-representadas para detectar possíveis erros de sequenciamento.

O valor da qualidade (*Phred score, Q*) foi verificado, sendo $Q=-10Log_{10}(P)$, onde P é a probabilidade de que a base esteja errada. Por exemplo, uma pontuação *Phred score= 10*, indicaria uma probabilidade de identificação incorreta de 1 em 10 bases (precisão de 90%) e, uma pontuação *Phred= score 30* indicaria uma probabilidade na identificação incorreto para 1 em 1000 bases (99,9% de precisão) (EWING e GREEN, 1998/MARTINEZ 2019).

Com essas informações pode ser identificado o *status* das leituras e as ações para otimizar as mesmas; isso é chamado de limpeza das leituras.

Existem vários critérios para identificar qual limpeza deve ser feita. Por exemplo, a qualidade das leituras deve estar acima de 28 no índice de qualidade (*quality score*) e deve ser removido as porções de sequências que aumentam o desvio padrão de amostra. Se deve levar em conta a distribuição e frequência de nucleótideos; uma incoerência em essas características geralmente implica a presença de fragmentos dos adaptadores ligados durante o processo de sequenciamento.

2.4.2.2 Montagem e alinhamento das sequências ao genoma de referência

Para analisar as leituras adequadamente e ser capaz de descobrir genes diferencialmente expressos em um tratamento três etapas devem ser seguidas 1) mapeamento com genoma de referência, 2) Montagem e estimativa das abundâncias dos transcritos e 3) Identificação de transcritos diferencialmente expressos.

Feita a análise de qualidade das leituras, procedeu-se à montagem. As leituras foram montadas em “contigs” (segmentos de DNA sobrepostos que juntos

representam uma região de consenso do DNA) antes de alinhá-los às sequências de um genoma de referência. Foi usado como genoma de referência *Aspergillus niger* relatado no *JGI Genoma Portal* (https://mycocosm.jgi.doe.gov/Aspni7/Aspni7.home.html) e no NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000230395.2#/st). Isso foi realizado com o programa HISAT (http://ccb.jhu.edu/*software*/hisat/index.shtml). Este programa de acesso livre permite a análise da expressão gênica, descoberta de novos genes e novas variantes de dados obtidos por sequenciamento de mRNA de alto rendimento.

Posteriormente, foi utilizado o programa HTSeq, um pacote Python que calcula o número de leituras mapeadas para cada gene. O primeiro passo para gerar valores de expressão gênica a partir de um alinhamento RNA-Seq no genoma de referência é gerar uma contagem de *reads* mapeados para cada gene. Os arquivos HTSeq-Count estão disponíveis em um formato delimitado por tabulação com uma coluna de ID de genes Ensembl e uma coluna de leituras mapeadas para cada gene. Esses arquivos são posteriormente processados com *scripts* personalizados para gerar valores FPKM (fragmentos por kilobase de transcrição por milhão de leituras mapeadas, método de normalização de nível de expressão simples. O FPKM normaliza a contagem de leitura com base no comprimento do gene e no número total de leituras mapeadas).

2.4.2.3 Identificação de genes expressos: anotação de genes

Há uma variedade de programas capazes de identificar expressões de genes diferenciais (DEGs). A seleção do programa dependerá em grande parte do número de réplicas biológicas disponíveis no ensaio.

Após a montagem das sequências, o próximo desafio é interpretar as informações que elas contêm. Isso requer a identificação das características das leituras, um processo conhecido como anotação. Para realizar a anotação funcional, é utilizada a ferramenta Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Essa ferramenta é capaz de comparar uma sequência de consulta com muitas sequências encontradas em um banco de dados. Também foi utilizada a base de dados InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/), que fornece uma análise funcional das proteínas, classificando-as em famílias e prevendo domínios e sítios importantes; e a base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

(http://www.genome.jp/kegg/) para associar genes expressos a vias metabólicas e assim elucidar sua possível função.

Para completar a anotação do gene, buscou-se a homologia das sequências obtidas no transcriptoma com as sequências do banco de dados do *Gene Ontology* (GO) (http://geneontology.org) utilizando o programa Blast2GO (https://www.blast2go.com) para determinar funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos (Conesa e Götz, 2008).

Este programa permitiu a categorização dos SDRs de acordo com sua funcionalidade agrupando-os em 3 categorias: Processos Biológicos (PB), Função Molecular (FM) e Componente Celular (Componente Celular, CC).

Além de realizar a anotação global do transcriptoma, foram procurados em particular genes que codificam proteínas que podem ser significativas para o metabolismo da frutose.

2.4.2.4 Expressão diferencial

Utilizando o programa R, os perfis de expressão gênica foram comparados e analisados entre o tempo de fermentação de 24 h e 48 h ao qual foram submetidas as amostras.

Inicialmente, os dados resultantes do HTSeq-Count foram normalizados, para calcular contagens por milhão (CPM) ou leituras por kilobase por milhão (RPKM).

Posteriormente, foi usada a biblioteca EdgeR do programa R, para fazer a tabela dos genes mais diferencialmente expressos. Aqui, os genes expressos mais diferencialmente são extraídos, classificados por valor *p* ou por mudança logarítmica absoluta (log-fold-change).

A mudança de expressão (*fold change*) será considerada significativa se o valor de *p* desse gene é menor que 0,01 ($p<0,01$), ou seja, apenas 1% de probabilidade para inferir falsos positivos. Aqueles genes com mudança significativa de expressão foram nomeados como genes diferencialmente expressos (Diferencialmente Genes Expressos, DEGs). Dentro deste grupo de genes, aqueles com valor de mudança de dobra maior que 2, eles serão considerados como genes superexpressos e aqueles com valor de mudança de dobra < -2 serão os genes reprimidos.

3. Resultados e discussão

3.1 Extração do material genético

Embora a extração de DNA e RNA em tecidos e células sejam uma etapa clássica e amplamente utilizada no preparo dessas macromoléculas, é frequente a necessidade de se testar e otimizar as condições de extração para cada caso, qundo alteram-se os organismos, tecidos ou células. Por isso, como descrito em material e métodos, foram realizados ensaios preliminares. A extração do material genético foi realizada com testes de pré-tratamentos e tratamentos para obter os valores de concentração e pureza mínima para cada amostra. Estes valores foram quantificados com medidas de absorbância geradas em um Nanodrop e confirmados com a realização de um gel de integridade.

3.1.1 Quantificação e pureza do DNA e do RNA

Nas tabelas 2.3-2.6, são apresentados os resultados da extração de DNA e do RNA respectivamente, conforme o pre-tratamento e o tratamento usado para cada método. Tomando como refêrencia os valores aceitáveis de concentração e absorbância 260/280, foram realizadas as eletroforeses em gel de agarose para cada um dos morfotipos.

Tabela 2.3 - DNA quantificado em NanoDrop (Kit Zymo), a partir dos morfotipos No.1, 3, 5, 10, 17 e 21.

MÉTODO KIT YEASTAR TM GENOMIC DNA KIT (ZYMO RESEARCH)					
No. Amostra	**Fungo/ Levedura (Identif. API)**	**Fruto**	**Sem tratamento**		
			Concent $\mu l.mL^{-1}$	260/230	260/280
1	*C. Laurentii*	Cupuaçu	16,4	0,832	1,98
			22,4	0,706	1,85
3	*Aspergillus niger*	Araçá	25	0,507	1,64
			14,6	0,8	1,53
5	*Aspergillus niger*	Cubiu	39,7	0,508	1,7
			6,2	0,303	1,53
10	*Aspergillus niger*	Cupuaçu	8,1	0,507	1,7
			10,7	0,61	1,63
17	*T. mucoides*	Araçá	24,8	1,01	1,89
			33,9	1,2	1,91
21	*C. guillermondii*	Yacon	19,3	1,27	2,27
			23	1,35	2,28

Os resultados apresentados na tabela 2.3 indicam que o *screening* realizado com o *Kit Yeastar Genomic* (Zymo®) consegue extrair concentração baixas de DNA

considerando 50 $\mu.mL^{-1}$ como o valor mínimo requerido para as análises de identificação molecular pela empresa Macrogene. No entanto, o método consegue valores de pureza representativos sugerindo a possibilidade de usar pré-tratamentos e tratamentos para ajudar no processo de extração do material genético, direcionando assim os procedimentos do presente estudo.

Tabela 2.4 - DNA quantificado em NanoDrop (Kit QUIAGEN), a partir dos morfotipos No.1, 3, 5, 10, 17 e 21.

No. Amostra	MÉTODO KIT DNEASY BLOOD & TISSUE (QUIAGEN)														
	AMOSTRA LÍQUIDA (SEM ATL)									*PELLET* (COM ATL)					
	Nitrogenio Líquido			Ultrassom			Choque térmico			Sem tratamento			Choque térmico		
	µl.mL^{-1}.	260/230	260/280	µl.mL^{-1}	260/230	260/280	µl.mL^{-1}.	260/230	260/280	µl.mL^{-1}	260/230	260/280	µl.mL^{-1}	260/230	260/280
1	-6,6	0,247	2,06	-2,2	0,232	1,83	-0,6	0,154	-6,0	45,4	0,88	2,21	32,8	0,249	1,93
	-6,5	0,32	1,86	-5,0	0,342	2	-1,6	0,296	2,29	40,3	0,718	2,19	-4,6	0,554	1,84
3	-5,0	0,204	2,0	0,4	-0,0385	2	31,8	5,68	2,32	59,2	0,753	1,7	117	0,883	2,05
	-5,8	0,209	1,81	2	-0,377	2	34,6	4,17	2,16	18,7	0,597	1,72	46,1	0,677	1,91
5	7,80	-0,396	1,77	4	-0,348	1,74	16,1	NaN	1,92	64,3	2,03	2,15	10,1	0,264	1,71
	4,9	-0,195	2,04	7,6	-0,752	1,95	21,9	2,41	1,89	95,6	1,82	2,17	31,5	0,222	1,91
10	1,2	0,119	73,00	0,7	-0,05	0,70	21,7	2,86	1,92	2,9	-2,64	1,81	45,1	0,302	1,93
	4,7	-0,288	2,04	-11,2	0,552	1,37	13,8	0,613	1,86	24,4	0,299	1,91	39,6	0,256	2,06
17	-6,2	0,549	1,94	-5,1	0,251	2,04	0,2	0,00971	0,5	26,9	0,41	1,88	138	0,312	1,75
	-7,4	0,237	2,06	-4,8	0,287	2,4	0,2	0,0164	0,4	84,8	0,432	2	44,5	0,194	1,85
21	-8,9	0,271	1,93	-3,9	0,183	1,95	13,1	-1,7	2,11	28,7	0,852	2,09	85,8	0,806	2,04
	-5,3	0,18	2,21	4,5	-0,9	0,833	9,5	1,0	1,94	49,6	0,664	2,16	44,9	1,49	2,14

Tabela 2.5 - DNA quantificado em NanoDrop (Método Trizol), a partir dos morfotipos No.1, 3, 5, 10, 17 e 21.

MÉTODO TRIZOL																		
No.	**AMOSTRA LÍQUIDA**												***PELLET***					
	Sem tratamento			**Nitrogenio Líquido**			**Ultrassom**			**Choque térmico**			**Sem tratamento**			**Choque térmico**		
	µl.m^{-1}	260/230	260/280	µl.m^{-1}.	260/230	260/280	µl.m^{-1}	260/230	260/280	µl.m^{-1}	260/230	260/280	µl.m^{-1}	260/230	260/280	µl.m^{-1}	260/230	260/280
1	8	0,0733	1,29	18,7	-0,122	1,89	19,9	-0,122	1,78	19,4	-0,118	1,87	2.780	1,02	1,15	1.290	1,49	1,83
	171	0,858	1,36	23,4	-0,16	1,81	18,4	-0,112	1,98	13,7	-0,069	2,01	2.800	0,995	1,13	234	0,921	1,61
3	18,7	-1,1	1,56	20	-0,105	1,74	50	1,11	1,6	103	-1,04	1,89	259	0,604	1,63	2.790	1,19	1,32
	24	-0,774	1,61	31,3	-0,205	1,92	27,1	-0,165	1,84	116	-0,923	1,99	NaN	NaN	NaN	65,4	0,692	1,03
5	4,7	0,195	1,57	51,3	-0,77	1,83	49,4	0,113	1,81	78,4	-0,71	1,79	1.270	1,58	1,65	2.810	NaN	1,09
	14,1	-0,456	1,76	29,1	-0,148	1,84	48,1	-0,455	1,71	94,1	4,34	1,82	2.590	1,22	1,19	2.640	0,928	1,07
10	2,7	-0,0431	1,8	52,3	-0,345	1,53	243	1,66	1,47	104	-1,1	1,66	401	1,09	1,74	NaN	NaN	NaN
	3,5	-0,0602	1,4	47	-0,339	1,75	79,8	0,473	1,66	0,8	-0,00338	4,00	175	0,68	1,74	2.870	NaN	1,07
17	1,8	-0,00918	1	22,8	-0,127	1,82	19,8	-0,126	1,77	5,2	-0,0274	2,36	868	1,42	1,71	2.750	1,08	1,13
	23,9	-0,244	1,72	27,9	-0,236	1,78	27,4	-0,201	1,61	34,6	-0,213	1,66	207	0,978	1,54	2.720	NaN	1,18
21	4,6	-0,0713	1,64	49,1	-0,29	1,62	47,2	-0,294	1,81	218	-11,6	1,99	154	0,838	1,53	193	0,954	1,46
	8,8	-0,178	1,52	2,8	-0,0103	1,47	4	-0,0175	1,33	177	-1,97	2,01	218	1,06	1,89	53,9	0,653	1,33

Tabela 2.6 - Concentração de DNA quantificadas em NanoDrop (SpeedVac), a partir dos morfotipos No.1, 3, 5, 10, 17 e 21.

No. Amostra	SPEEDVAC								
	Kit Zymo			Trizol-sem tratamento			Trizol-choque térmico		
	µl.m^{-1}	260/230	260/280	µl.m^{-1}	260/230	260/280	µl.m^{-1}	260/230	260/280
1	39,4	0,699	1,82	139,0	0,207	1,53	18,6	0,0353	1,9
3	14,6	0,529	2,43	34	0,0736	1,43	196	0,234	1,78
5	19,1	0,575	1,65	13	0,0289	1,65	160	0,109	1,75
10	10,6	0,658	1,86	8,7	0,0201	1,61	241	0,237	1,63
17	31	0,886	1,89	67,7	0,128	1,54	47,6	0,0742	1,69
21	65	0,588	1,8	13,4	0,0305	1,41	414	0,58	2,14

Como pode ser visualizado nas tabelas 2.3-2.6 os diferentes métodos usados combinando pré-tratamentos e tratamentos mostraram que os melhores resultados são obtidos quando a extração é realizada a partir do *pellet* do microrganismo, pré-tratamento (Sem tratamento e choque térmico) e tratamento com o Kit QUIAGEN.

Comparando os resultados obtidos a partir de amostras líquidas e *pellet* do microrganismo, foram alcançadas taxas de extrações de 8,3% e 43,8% de DNA de qualidade, respectivamente. Trabalhos similares realizados por Thyagarajan *et al.* (2005) e Meza *et al.* (2013) sugeriram que a fim de extrair uma quantidade adequada de DNA se deve ter em consideração o número de células contidas no tecido coletado no tubo de reação.

Os pré-tratamentos usados para romper a parede celular do microrganismo e otimizar o processo de extração do material genético mostraram que as amostras submetidas a choque térmico representam cerca de 12,5% frente às amostras sem tratamento em que se obteve 33,3%. Os dados apresentados são consistentes com o estudo de Gutcovsky (2008), que comparando diferentes métodos de extração de DNA de *Candida* e Ríos (2019) ao realizar análises comparativa de diferentes métodos de extração de DNA demonstram que o método de choque térmico não foi o mais eficaz devido à sua baixa qualidade. As amostras tratadas com nitrogênio líquido e ultrassom não apresentaram bons resultados (0 e 4,3 % respectivamente), pois as concentrações e purezas foram baixas em todos os casos. Resultados

similares foram obtidos por Castañeda *et al.* (2004) ao avaliar várias técnicas de extração de DNA a partir *Cryptococcus* spp.

No tratamento, utilizando os protocolos de Trizol e o kit comercial DNeasy blood&tissue (QIAGEN), a partir de amostra em *pellet*, foram alcançadas concentrações de DNA, variando entre 218 e 1.290 $\mu l.mL^{-1}$, e 40,3 e 95,6 $\mu l.mL^{-1}$ respectivamente. Trabalhos com resultados comparáveis foram realizados por Acevedo *et al*. (2007); Ossa *et al.* (2012); Sampaio *et al.* (2012); Meza *et al.* (2013); Perez (2018) e Ríos-Sánchez *et al.* (2019).

Em relação aos índices de pureza, a relação A260/A280 responsável por dar indicativos de contaminação protéica foi semelhante nas duas metodologias Trizol (1,7-1,8) e kit comercial QUIAGEN (1,9-2,0), com valores ideais entre 1,8 e 2,2 (Santos et al. 2008), indicando boa performance. A relação A260/A230 apresentou valores de (0,6-1,5) para os protocolos de extração fenólica e QUIAGEN (0,3-2,0). Este índice com valores aceitáveis de 1,6 mostra contaminação com sais, açúcares, fenóis ou compostos aromáticos. No caso, da metodologia de extração fenólica, acredita-se que os resultados do índice 260/230 possam ter sido afetados negativamente pelos reagentes, não podendo afirmar a mesma teoria para o kit comercial pois não é publicada a natureza dos tampões ATL, AW1, AW2 que fazem parte do procedimento (SANTOS et al. 2008, MEZA et al. 2013)

Em termos gerais, o método Trizol apresentou maior (89%) contaminação por compostos fenólicos, sais e açúcares o que interfere na concentração e integridade do DNA (AMARU *et al.*, 2008; LOPERA-BARRERO *et al.*, 2008, OSSA 2012), fato que influênciaria nas reações de RT-PCR, uma vez poderiam-se associar às polimerases e inibir a atividade enzimática. O baixo rendimento apresentado pelo protocolo clássico com solventes orgânicos, pode ser atribuído à possível oxidação. Além disso, o protocolo inclui muitas etapas que o tornam longo e trabalhoso, podendo ocorrer perda de DNA nas diferentes etapas da técnica, e, gerando resultados, pouco reprodutíveis, além do uso de solventes poluentes e tóxicos (LÓPEZ et al. 2014).

O teste realizado usando SpedVac para concentrar as amostras, na maioria dos casos, duplica o valor de DNA, mas não melhora a pureza do material, o que é coerente com a finalidade dessa ação, ou seja, concentrar.

De modo ainda mais delicado, o preparo de RNA total de fungos e leveduras não é simples. Trata-se de uma operação dificultada pela estrutura das paredes

celulares complexas, e, sobretudo, a presença de RNases intracelulares (LOGAN et al., 1998) e os altos níveis de carboidratos excretados durante o crescimento em meio líquido (SOKOLOVSKY et al., 1990). É por isso que uma variedade de protocolos para a extração e purificação de RNA total é citada para esses organismos (JELLE et al.,2006; ROJAS et al. 2011).

A tabela 2.7 apresenta os resultados da extração de RNA a partir do morfotipo No. 3 pelo método TRIZOL nas duas condições de tratamento 24 e 48 horas de fermentação submersa usando inulina como fonte de carbono.

Tabela 2.7 - RNA quantificado em NanoDrop (Método Trizol), a partir do morfotipo No.3, cultivado por 24 e por 48 h em fermentação submersa.

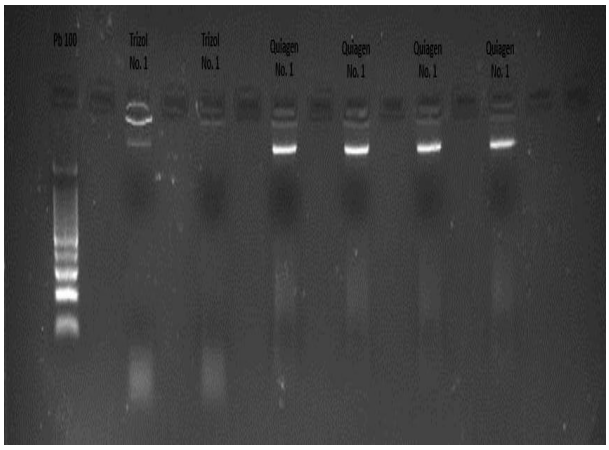
MÉTODO TRIZOL								
No. Amostra	**API**	**Fruto**	**24 horas**			**48 horas**		
			µl.m^{-1}	260/230	260/280	µl.m^{-1}	260/230	260/280
3 (1)	*A. niger*	Araçá	149	0,141	1,76	99,4	0,111	1,88
3 (2)	*A. niger*	Araçá	190	0,164	1,86	531	0,259	1,68
3 (3)	*A. niger*	Araçá	173	0,178	1,81	128	0,239	1,65
3 (4)	*A. niger*	Araçá	161	0,140	1,83	2,64	0,122	1,83
3 (5)	*A. niger*	Araçá	121	0,112	1,91	119	0,136	1,77
3 (6)	*A. niger*	Araçá	117	0,0728	1,85	87,4	0,16	1,7
3 (7)	*A. niger*	Araçá	145	0,105	1,84	102	0,117	1,81
3 (8)	*A. niger*	Araçá	133	0,114	1,82	119	0,0769	1,88
3 (9)	*A. niger*	Araçá	141	0,143	1,83	194	0,163	1,66
3 (10)	*A. niger*	Araçá	151	0,128	1,83	152	0,133	1,79
3 (11)	*A. niger*	Araçá	124	0,0945	1,95	289	0,147	1,72
3 (12)	*A. niger*	Araçá	81	0,0905	1,8	128	0,182	1,66
3 (13)	*A. niger*	Araçá	1.190	1,63	1,78	644	0,85	2,09
3 (14)	*A. niger*	Araçá	545	1,45	2,1	1.540	1,76	2,09
3 (15)	*A. niger*	Araçá	165	1,03	1,96	1.020	0,90	2,1
3 (16)	*A. niger*	Araçá	1.090	0,680	2,11	1.120	1,07	2,08
3 (17)	*A. niger*	Araçá	1.410	1,550	1,94	1.460	1,65	2,03
3 (18)	*A. niger*	Araçá	1.060	0,600	2,09	1.330	1,61	2,02
3 (19)	*A. niger*	Araçá	1.040	1,250	1,97	1.630	1,53	2,08
3 (20)	*A. niger*	Araçá	1.350	1,590	2,08	1.340	1,72	2,12
3 (21)	*A. niger*	Araçá	1.350	1,800	2,1	1.530	1,63	2,07
3 (22)	*A. niger*	Araçá	835	1,45	2,11	744	0,83	2,05
3 (23)	*A. niger*	Araçá	1.170	1,32	2,08	980	1,01	1,87
3 (24)	*A. niger*	Araçá	772	0,98	2,13	13	0,54	1,67

Como indicado na tabela 2.7, o método usado neste trabalho, gera a obtenção de um RNA total com bom rendimento (81-1.410 µl.mL^{-1}), mas ao avaliar os valores de absorbância na relação A260/A280 (≥ 2,0-2,2) foram aceitos 45,8% dos dados experimentais e 11,1% para A260/A230 (≥ 2,0-2,2) representando contaminação. Isso pode interferir nas reações futuras com esses RNAs (ROJAS et al. 2011; OSSA et al. 2012; MEZA et al. 2013; LÓPEZ et al. 2014).

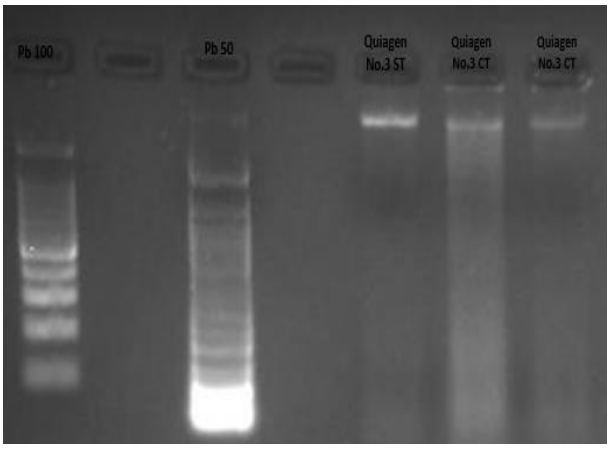
3.1.2 Análise de integridade do DNA (Gel de integridade)

A eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) permite avaliar a integridade da amostra de DNA. Se uma amostra estiver intacta, apresentará uma única banda de DNA bem definida no topo do gel de agarose. Uma amostra de DNA degradado apresentará um rastro ou "mancha" ao longo do gel que será mais pronunciada quanto maior for a degradação da amostra (FIERRO, S.D; RIOS, 2019).

No presente estudo, foram dadas prioridades às amostras que obtiveram valores de pureza A260/A280 entre 1,8-2; entretanto, amostras de DNA cujo valor de pureza foi 1,7, também foram utilizadas; portanto, pode-se afirmar que embora a pureza seja um fator importante na extração de DNA, é possível utilizar amostras que não estejam na faixa pré-estabelecida (OSORIO et al., 2009; RIOS, 2019).
Em termos de integridade, o kit de QUIAGEN permitiu a obtenção de DNA com maior integridade, observando-se uma única banda grande (Figura 2.2).



(A)



(B)

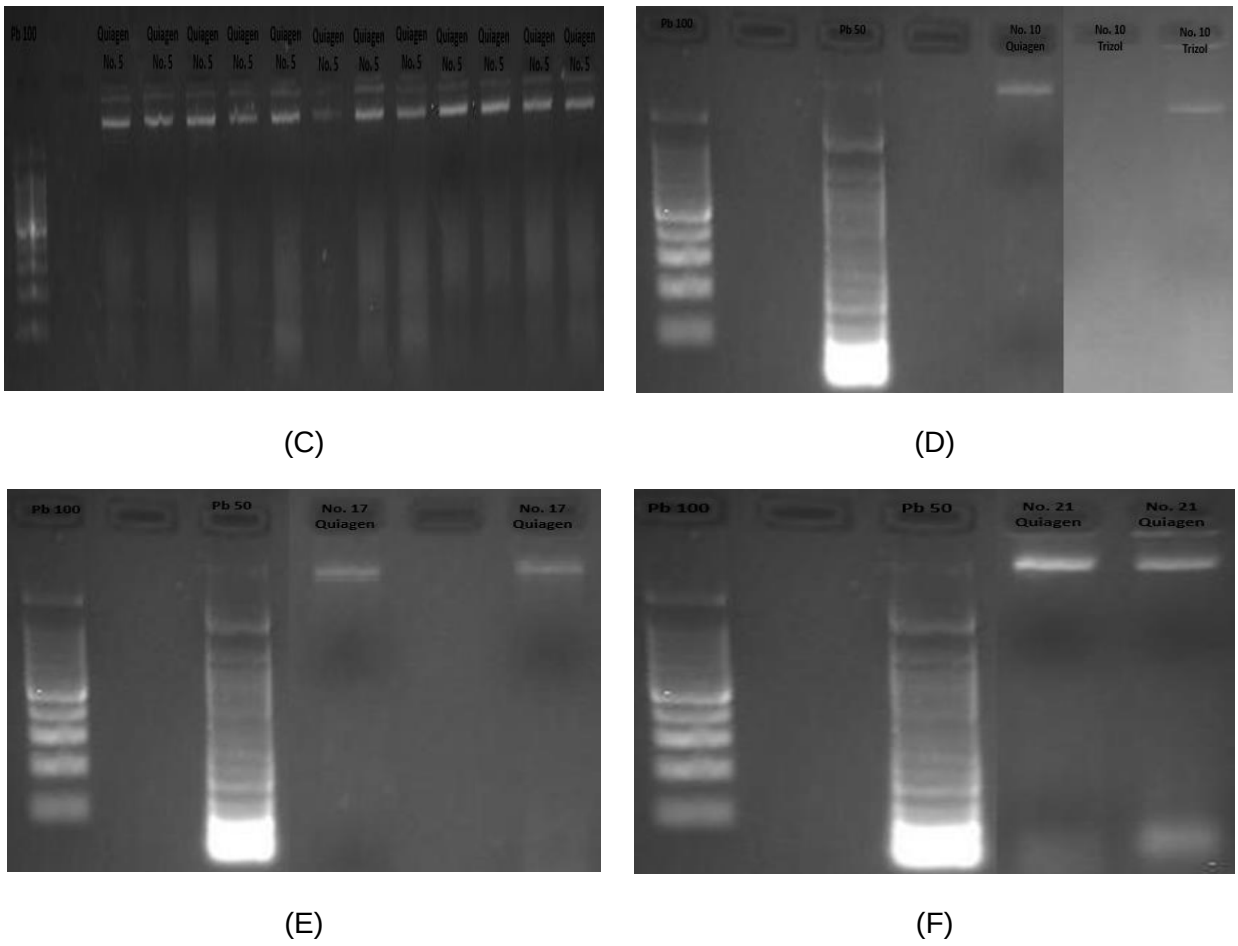


Figura 2.2 - Eletroforese em gel de agarose 2%. (A) Morfotipo No.1; (B) Morfotipo No.3; (C) Morfotipo No.5; (D) Morfotipo No.10; (E) Morfotipo No.17; (F) Morfotipo No.21. As colunas foram identificadas da seguinte manera: Pb 100 corresponde a marcador de peso molecular de 100 pares de bases; Pb 50 corresponde a marcador de peso molecular de 50 pares de bases; ST: sem tratamento; CT: com tratamento; Quiagen e Trizol indica o tratamento usado em cada morfotipo para à extração do DNA.

3.2 Identificação molecular (amplificação e sequênciamento de regiões ribossomais 18S e ITS)

3.2.1 Seleção das amostras de DNA

As características ideais do ADN que se aplicam aos estudos moleculares são os que apresentam uma boa concentração, uma alta pureza e o menor grau de degradação (ARMAS et al. 2011, VELASQUEZ et al. 2014).

Na tabela 2.8 são apresentadas as amostras de DNA escolhidas tomando como refêrencia o teste de integridade (Gel de agarose), para identificação das regiões 18S e ITS pelo método SANGER.

Tabela 2.8 - Amostras de DNA selecionadas para identificação molecular

Morfotipo	DNA			Morfotipo	DNA BACK UP		
	Concent (ul.mL^{-1})	260/230	260/280		Concent (ul.mL^{-1})	260/230	260/280
1	45,4	0,88	2,21	1	40,3	0,72	2,19
3	59,2	0,75	1,70	3	46,1	0,68	1,91
5	64,3	2,03	2,15	5	95,6	1,82	2,17
10	45,1	0,30	1,93	10	401	1,09	1,74
17	84,8	0,432	2,00	17	84,8	0,432	2,00
21	49,6	0,664	2,16	21	85,8	0,806	2,04

3.2.2 Alinhamento das sequências com BLAST

Os resultados do sequênciamento de ambas as regiões para cada isolado foram comparados *in silico* com outras sequências fúngicas depositadas no CBNI, utilizando o programa BLAST. O BLAST fornece uma série de dados interessantes ao avaliar a comparação. Entre eles, encontrasse o valor E, que é um dado estatístico que representa a semelhança entre a sequência em estudo e à encontrada na base de dados. Quanto mais perto estiver de zero, mais semelhantes são as sequências (significativo < 0,01). O *Ident.* fornece a porcentagem de identidade entre a sequência do banco de dados dentro do comprimento que foi encontrado (MEDINA et al. 2012, SANCHEZ, 2016).

A tabela 2.9 apresenta os resultados da identificação fenotipica obtida no capítulo I, comparados com os resultados da identificação molecular, produto da amplificação e sequênciamento das regiões ribossomais 18S e ITS.

Tabela 2.9 - Comparação da identificação fenotípica e genotípica dos isolados de polpa de frutos do Amazonas.

No. Amostra	**Identificação fenotípica**		**Identificação genotípica**				
	Morfologia	API 20C AUX	Região	Nome	%	E-Valor	N° Acesso
1	*Cladosporium sp*	*Cryptococcus laurentii*	18S	*Cladosporium sp*	99	0,0	GU322367.1
			ITS	*Cladosporium tenuissimum*	98	0,0	KY921925.1
3	*Aspergillus niger*	N. I	18S	*Aspergillus niger*	100	0,0	XM025599236.1
			ITS	*Aspergillus niger*	100	0,0	XM025599236.2
5	*Aspergillus niger*	N. I	18S	*Meyerozyma guilliermondii*	91	0,0	KX258468.1
			ITS	N. I	-	-	-
10	*Aspergillus niger*	N. I	18S	N. I	-	-	-
			ITS	N. I	-	-	-
17	*Trichosporon mucoides*	*Trichosporon mucoides*	18S	*Meyerozyma guilliermondii*	99	0,0	KX258468.1
			ITS	N. I	-	-	-
21	*Candida guillermondii*	*Candida guillermondii*	18S	*Meyerozyma guilliermondii*	99	0,0	KX258468.1
			ITS	*Pichia guilliermondii*	99	0,0	EF222224.1

N.I: Não identificado

Como mencionado na tabela anterior, neste trabalho a amplificação das sequências 18S e ITS permitiu conhecer a identidade a nível de espécie dos isolados Número 1, 3, 5, 17 e 21, mas no caso do isolado No.10 não foi possível corroborar sua identidade em nenhuma das regiões avaliadas, portanto será necessário realizar outras extrações e testes de PCR utilizando marcadores moleculares diferentes para conhecer sua identidade.

A não amplificação no isolado No.10 não teve causa exata determinada, mas, pode ser devido a uma má técnica de extração de DNA por provável presença de resíduos de alguns dos reagentes utilizados no método Trizol, que inibem a reação de PCR, tais como: fenol, etanol, entre outros, assim como a concentração de trifosfatos de desoxirribonucleotídeos (dNTPs), que aprisionam o cloreto de magnésio, impossibilitando o bom funcionamento da Taq polimerase, ou mesmo um volume excessivo ou baixo dos primers, o que produz um desempenho ineficiente da reação (ESPINOSA, 2007). Em outra teoria, os primers ITS para este isolado não são amplificadores, o que pode estar associado a uma mutação específica no sítio de hibridização dos primers (VEGA, 2013).

A identificação fenotipica de três (3) dos seis (6) isolados coincidiu com os resultados obtidos nas análises moleculares utilizando as regiões 18S e ITS do rDNA. Observa-se na Tabela 2.9 que a única exceção correspondeu ao isolado 5 e 7, pois ao nível de ambas metodologias não coincidiram porque a identificação API não foi possível, uma vez que o kit é especifico para identificação de leveduras. Também essas diferenças obtidas entre a morfologia e a identificação molecular podem estar associadas a uma contaminação do material biológico com *Meyerozyma guilliermondii* na hora de produzir o micélio.

Os resultados confirman que os genes 18S são mais conservados, por isso servem para estudar as relações evolutivas dos diferentes grupos de fungos nem sempre sendo úteis na resolução em nível de espécie (BRUNS et al. 1991, VEGA 2013).

Dos isolados identificados neste trabalho, No. 1 (*Cladosporium tenuissimum*), No. 3 (*Aspergillus niger*) e No. 21 (*Meyerozyma guilliermondii*), têm sido bastante estudados e isolados a partir de frutos como maracujá, copuaçu, pêssego e corozo, respectivamente (FEOLI et al., 1997; NAM et al., 2015; FERREIRA et al., 2016; NABOR-ROMERO et al., 2018; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ et al., 2020; YAN et al., 2020; SUÁREZ e FIGUEREDO et al., 2021).

Cladosporium tenuissimum é um fungo filamentoso saprófita de plantas em decomposição, têxteis, couro, borracha e madeira, além de ser um parasita de gramineae. Seus esporos são geralmente cerca de 10 µm de comprimento e 4 µm de largura, forma elipsoidal e de cor hialina a marrom amarelado (AGRIOS, 2005). Também produz conidióforos longos e escuros que crescem eretos, seus conídios são ovais, irregulares ou castanhos cilíndricos escuro ou preto, e pode consistir de uma a três células, e eles dão ao fungo uma aparência aveludada escura. A germinação dos conídios é favorecida pela alta umidade ambiente e pode causar lesões em folhas, galhos ou frutos (AGRIOS, 2005; SANTOS et al., 2020).

Aspergillus niger e de grande importância na indústria alimentícia, pois é utilizado como produtor de ácido cítrico, ácido glucônico e enzimas. Os produtos desta espécie possuem a categoria GRAS (Geralmente considerados seguros) pela Food and Drug Administration (FDA) (DE VRIES e VISSE, 2001; VILLENA e CORREA, 2003; ROJAS et al., 2021). O ácido cítrico é um dos principais aditivos na indústria alimentícia, sendo utilizado, entre outros produtos, em refrigerantes, sucos de frutas, geleias, balas e vinhos. Este fungo apresenta algumas vantagens devido ao seu alto nível de produção, possui boas propriedades para cultivo, o que possibilita a produção em larga escala. É um importante produtor de enzimas como: pectinase, protease, catalase, glicose-oxidase, α-amilase, celulase, esterases, entre outras (NIELSEN, 2009; LOPEZ-TRUJILLO et al., 2017; LIMA et al, 2019; ALDANA-PORRAS et al., 2021). Atualmente, as técnicas de recombinação de DNA permitem superexpressar a produção dessas enzimas e obter cepas recombinantes de *A. niger.* A segurança das cepas produtoras, bem como de seus produtos, é avaliada antes de ir ao mercado através de testes biológicos (PARIZA e JOHNSON, 2001; SEPÚLVEDA et al., 2020).

Candida guilliermondii, também conhecida como *Pichia guilliermondii* ou *Meyerozyma guilliermondii* (KURTZMAN e SUZUKI, 2010; ROSALES-LOPEZ et al., 2018), é uma levedura ascomiceta amplamente distribuída no ambiente natural, é de fácil isolamento de frutas e bagas, com alto teor de açúcar. Também, faz parte da pele humana e microbiota da mucosa (PAPON et al., 2013). Várias propriedades são atribuídas a esta levedura que a tornam de interesse biotecnológico, por exemplo, para controle biológico (ZAMBRANO et al., 2014), para a bioconversão de xilose em xilitol de hidrolisados hemicelulósicos, como fonte de energia (HERAZO e ARRÁZOLA, 2011). Da mesma forma, *C. guilliermondii* é uma fonte promissora de

enzimas, por exemplo, inulinase e glutaminase (LIU et al., 2014; ARYUMAN et al., 2015), bem como biocombustíveis (SCHIRMER-MICHEL et al., 2008), geração de aroma e sua importância clínica na superprodução de riboflavina (RF, vitamina B2) (HERAZO e ARRÁZOLA, 2011). Além disso, tem potencial para ser utilizado em um processo de fermentação em estado sólido para obtenção de biomassa protéica para consumo humano e animal (SALVADOR et al., 2011). No entanto, esta espécie de levedura também tem efeitos negativos, por exemplo na indústria vinícola a presença massiva de *C. guilliermondii* reduz ou interrompe o processo de fermentação e aumenta a concentração de acetoína, por isso é importante usar uvas sãs na colheita e filtrar o mosto se necessário para reduzir a presença de *C. guilliermondii* (SUÁREZ-LEPE, 2002).

Com relação à identificação molecular, trabalhos refêrenciando a região ITS para identificação destes microrganismos foram publicados como o de Sugita et al. (2004) ao avaliar por PCR três espécies do gênero *Aspergillus*, isolados de amostras biologicas; Delgado-Mendez et al. (2013) ao caracterizarem o *Cladosporium* como o causador de danos em maracujá; Corte et al. (2015) ao estudarem as características fenotípicas e moleculares de *Meyerozyma guilliermondii* isolada de alimentos; Rosales-López et al. (2018) ao avaliarem o crecimento dimórfico e caracterização molecular de *Candida guillermondii* isolado de *Pannicum maximun*; Santos et al. (2020) ao publicar o primeiro relato de *Clasosporium tenuissimum* causante da praga da flor em morangos em Brasil e Suárez e Figueredo (2022) ao realizar a identificação molecular de fungos filamentosos dos géneros *Trichoderma, Geotrichum, Purpureocillium, Laburnicola, Penicillium, Aspergillus, Beauveria, Bipolaris, Curvularia e Alternaria* para avaliar o seu potencial biotecnológico.

3.3 Transcriptômica (NGS): Expressão gênica diferencial

3.3.1 Seleção das amostras de RNA

Na tabela 2.10 são exibidos os RNAs escolhidos conforme o desenho experimental estabelecido com a variável tempos de fermentação (24 e 48 horas) e tomando como refêrencia os valores de concentração e pureza do material genético. O teste de integridade não foi realizado *in situ* só foi realizado no momento de preparo das amostras para RNA-seq, de modo a se evitarem possíveis degradações do RNA.

Tabela 2.10 - Amostras de RNA selecionadas para análise de transcriptômica

Morfotipo No.3								
Tratamento	Código Macrogene	RNA			Código Macrogene	ARN BACK UP		
		Concent ($\mu l.mL^{-1}$)	260/230	260/280		Concent ($\mu l.mL^{-1}$)	260/230	260/280
24 H	7	1.350	1,80	2,10	7	1.190	1,63	1,78
	8	1.350	1,59	2,08	8	835	1,45	2,11
	9	1.410	1,55	1,94	9	545	1,45	2,10
48 H	10	124	2,38	2,30	10	1.530	1,63	2,07
	11	1.540	1,76	2,09	11	1.460	1,65	2,03
	12	1.340	1,72	2,12	12	1.330	1,61	2,02

3.3.2 Sequenciamento do RNA

Os dados brutos do sequenciamento de três réplicas biológicas independentes foram analisados para cada tempo (24 e 48 horas) de fermentação submersa usando inulina como fonte de carbano para avaliar a produção de inulinase. Foram obtidas um total de 12 bibliotecas, as quais se sequenciaram na plataforma Ilumina Hi-Seq™. Os resultados foram enviados pela empresa Macrogene, Coreia do Sul da seguinte maneira:

Tabela 2.11 - Dados brutos e resultados da análise a partir do morfotipo No.3, cultivado por 24 e por 48 h em fermentação submersa.

Link para Download	Tamanho do arquivo	md5sum
10_1.fastq.gz	1.2G	fc40a45eaf32abaf1db78dfb89596b60
10_2.fastq.gz	1020.9M	6451be170410bdc300ae201f5caccfe8
11_1.fastq.gz	1.0G	e8f5b681ff801e2a581139256f55e02e
11_2.fastq.gz	1.3G	d3cd4955e7966501b65127207ce57e8a
12_1.fastq.gz	1.3G	36764d1ca9957bdc571ba7a87eb59984
12_2.fastq.gz	1.3G	c032f527b5d6e0e2a38d75b3bf0bfa45
7_1.fastq.gz	1.3G	9c36ffcda21d6a13c5c704e3a5305aad
7_2.fastq.gz	1.3G	b749768c524b248084101dbffb6b5cbf
8_1.fastq.gz	1.3G	71956b0a956b180df00110ea934349d9
8_2.fastq.gz	1.4G	4c9cb06fec2474b0d3d5105ac56ef906
9_1.fastq.gz	1.2G	bc87444752511b470cc3b5690977b42c
9_2.fastq.gz	1.2G	9867b7f92912e9a0e3e3a25dace27343

1) fastq.gz: Este é um arquivo zip de dados brutos usados na análise.
2) md5sum: É usado para verificar a integridade dos arquivos. Se os valores de md5sum são os mesmos, não há falsificação, modificação ou omissão.

3.3.3 Análise de bioinformática

O sequenciamento das bibliotecas gerou 293.019.882 milhões de *reads* (Tabela 2.12).

3.3.3.1 Análise de qualidade de sequenciamento de nucleotídeos

Terminado o sequenciamento, procedeu-se à análise da qualidade das sequências, por meio do programa *FastQC (*SCHMIEDER E EDWARDS, 2011).

Assim o número total de bases, leituras GC (%), Q20 (%) e Q30 (%) foram calculados para cada uma das 12 bibliotecas (6 amostras).

Observou-se que, em média, mais de 43 milhões de leituras por biblioteca foram sequenciadas (Tabela 2.12).

A porcentagem de GC (guanina e citosina) nas leituras obtidas foi avaliada, a fim de verificar se estão em distribuição normal teórica. O conteúdo de GC em média deste trabalho foi de 53% não relatando sobrerepresentação de bases. Portanto, não há necessidade de filtrar sequências com base na qualidade. Para dados obtidos de uma biblioteca com distribuição normal, um conteúdo de GC deve estar entre 40% e 60% (Zhao et al., 2017). De acordo com a literatura, o genoma de *Aspergillus niger* tem em média um GC de 49,5% concordante com este estudo (XIE, 2018).

Tabela 2.12 - Estatísticas de dados brutos (máximo de 20 amostras) a partir do morfotipo No.3, cultivado por 24 e por 48 h em fermentação submersa.

Identificação Amostra	Total leituras bases (bp)	Total leituras	GC (%)	% AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
10	4,863,507,136	48,153,536	53,39	46,61	98,59	95,73
11	4,356,258,472	43,131,272	52,44	47,56	98,73	96,13
12	5,071,934,574	50,217,174	53,73	46,27	98,49	95,6
7	5,086,599,774	50,362,374	53,48	46,52	98,67	95,99
8	5,424,496,486	53,707,886	53,38	46,62	98,56	95,66
9	4,792,211,640	47,447,640	52,8	47,2	98,62	95,83

A Figura 2.3 mostra uma visão geral da qualidade das sequências de uma das bibliotecas em todas as bases. No eixo das abcissas, temos posição em pares de bases (bp), e no eixo das ordenadas, o valor da qualidade na escala de pontuação Phred. A cor de fundo do gráfico divide o eixo Y em zonas de acordo com a

qualidade das sequências: muito boa qualidade (zona verde), de qualidade razoável (zona amarela) e qualidade ruim (zona vermelha).

Também pode ser observado que o comprimento das sequências estava entre 0-100 pares de bases.

No programa *FastQC* foram calculados os valores de qualidade de cada base em cada leitura ou Phred Scores, que são superiores a 30 (Figura 2.3). Isso significa que aproximadamente 1 em 1.000 pares de bases (EWING e GREEN, 1998) provavelmente foi sequenciada incorretamente, ou há uma precisão de base correta de 99,9%, garantindo assim que o processamento de sequências para remover regiões de baixa qualidade não seja necessário.

A qualidade média das sequências foi igual a um valor de Phred de 36, qualidade que supera o valor de Phred superior a 20 (que é aceito como mínimo) para realizar uma análise bioinformática (Figura 2.3). (EWING e VERDE, 1998). Espinoza (2017) relatou alto grau de pureza de sequências obtidas após o sequenciamento, uma vez que estavam em uma faixa de acordo com o escore de Phred de 22 a 30. Observou-se que o escore de Phred para todas as bibliotecas foi maior que 30, ou seja, a qualidade de todas as sequências obtidas neste trabalho foi ótima.

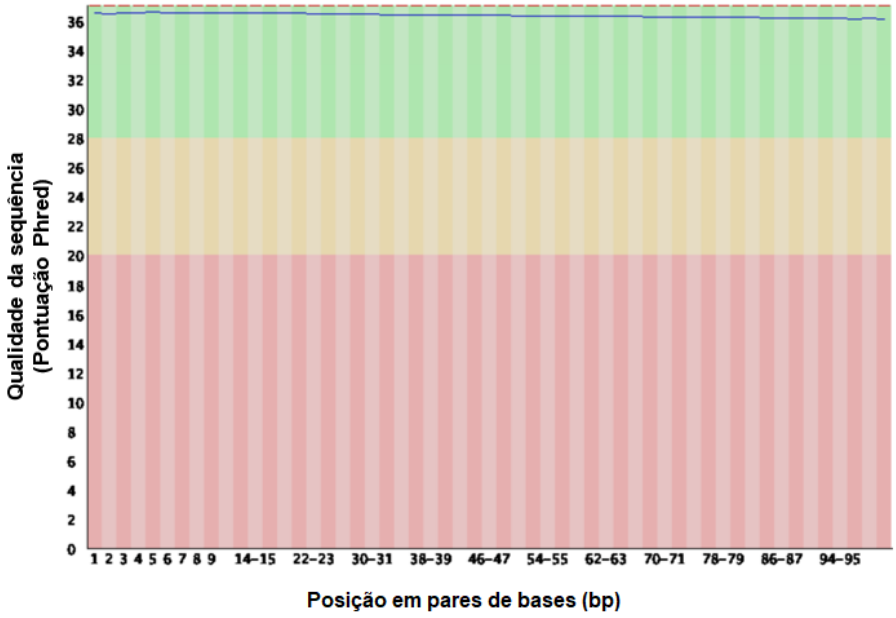


Figura 2.3 - Avaliação da qualidade do sequenciamento de bibliotecas. Qualidade média de sequenciamento por posição de leitura (Gráfico representativo de uma das bibliotecas sequenciadas) (*Software* FastQC). Pontuação de Phred superior a 20 é aceito como mínimo para realizar uma análises bioinformática.

3.3.3.2 Montagem e alinhamento das sequências ao genoma de referência

Montagem e alinhamento das sequências usando o genoma de referência (ATCC 1015 *Aspergillus niger*) constataram-se que houve uma média de 623.580 transcritos por biblioteca, onde as bibliotecas que apresentaram os valores mínimos de transcritos foram as amostras com 24 h de fermentação (Tabela 2.13).

Tabela 2.13. Número de transcritos identificados nas bibliotecas das amostras de RNAs do morfotipo No.3 a 24 e 48 h de fermentação submersa.

Amosta	Transcritos identificados
7	341.039
8	265.779
9	257.527
10	452.989
11	2.041.510
12	382.641

3.3.3.3 Identificação de genes expressos: anotação de genes

Do total de transcritos (10.947), 990 puderam ser anotados funcionalmente pelo BLAST contra os bancos de dados UniProtKB (Swiss-Prot e TREMBL) e 6.729 transcritos puderam ser anotados no banco de dados do gene Ontology (GO). Esta relativamente baixa anotação funcional no BLAST determina que possivelmente muitos dos mecanismos envolvidos nos processos biológicos estudados não possuem e não possam ser descritos com precisão até o presente (Figura 2.4).

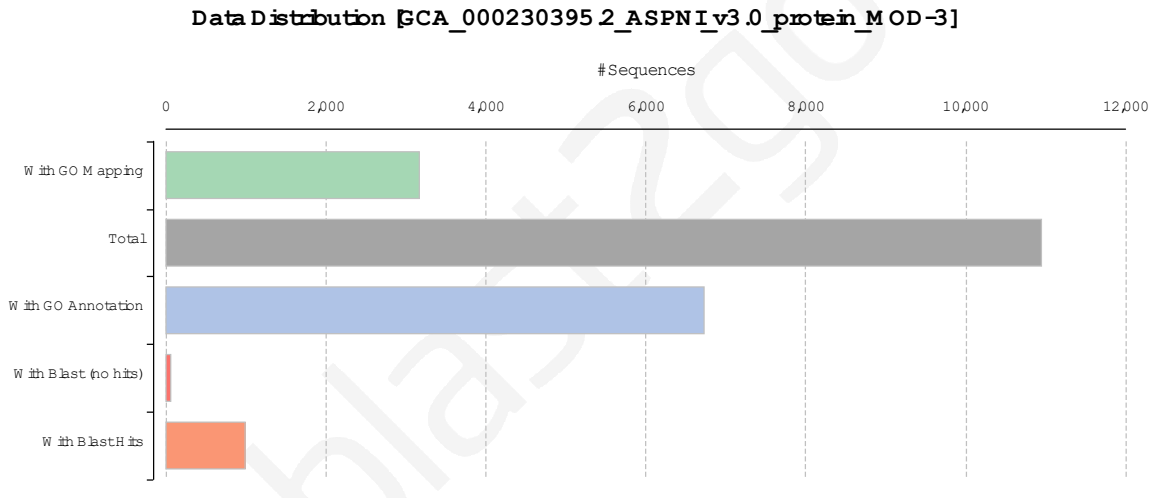


Figura 2.4 – Distribuição de dados em términos de transcritos anotados (blast2go *software*) a partir do morfotipo no.3, cultivado por 24 e por 48 h em fermentação submersa.

3.3.3.4 Expressão diferencial

A fim de examinar a expressão diferencial dos genes, primeiramente, foi realizada uma normalização adicional (EdgeR) para levar em conta o viés produzido na distribuição de contagens pela expressão diferencial relativamente alta de um pequeno número de transcritos nas bibliotecas. Todas essas etapas de normalização permitem a comparação dos níveis de expressão entre transcritos de diferentes amostras. A Figura 2.5 representa os valores de expressão normalizados para cada amostra.

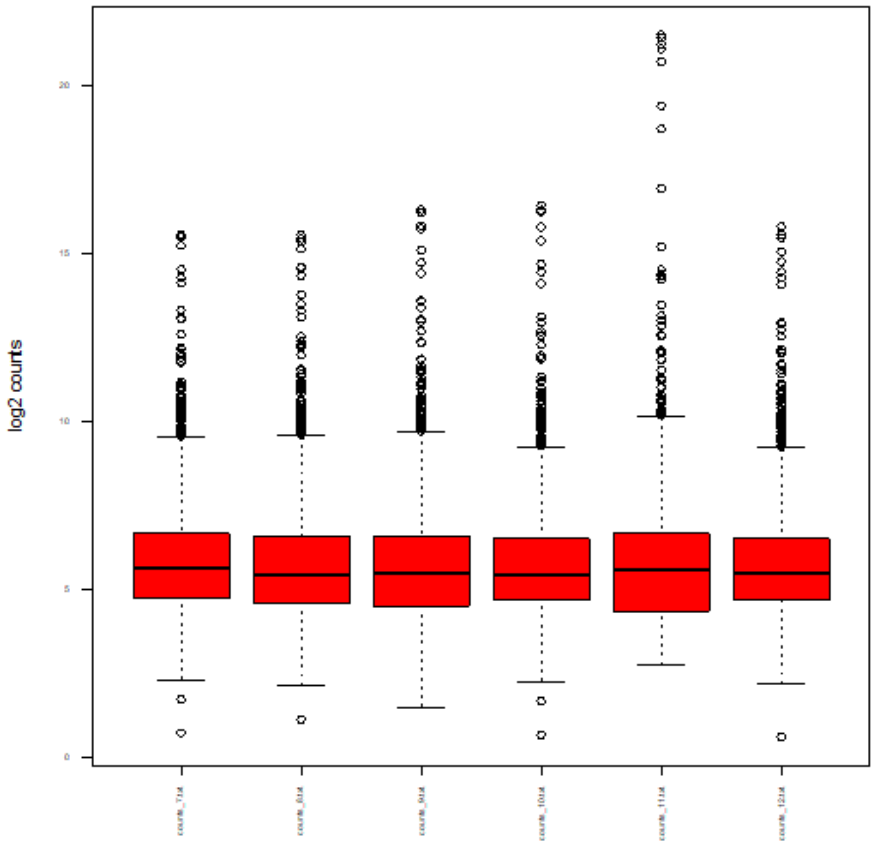


Figura 2.5 - Gráfico de caixa e bigode representando valores de expressão normalizados para cada amostra de RNA do Morfotipo No. 3 após fermentação submersa a 24 e 48h.

A avaliação estatística realizada com EdgeR, permitiu obter a tabela 24H_VS_48H_Excel, onde são detectados os genes mais diferencialmente expressos, classificados por valor p ou por mudança logarítmica absoluta (*Log-Fold-Change*)).

Esses dados foram representados em um gráfico de Vulcão (Vulcão plot), que representa os transcritos regulados positivamente (*Log-Fold-Change*) maior que 0) e os regulados negativamente (*Log-Fold-Change* menor que 0) (Figura 4).

Os genes representados como pontos cinzas no gráfico, correspondem a genes que não alteraram sua expressão significativamente (p-value>0,01), enquanto os genes que se expressaram significativamente (DEGs) foram representados nos gráficos do vulcão como pontos vermelhos e azul para os genes silenciados (Figuras 2.6).

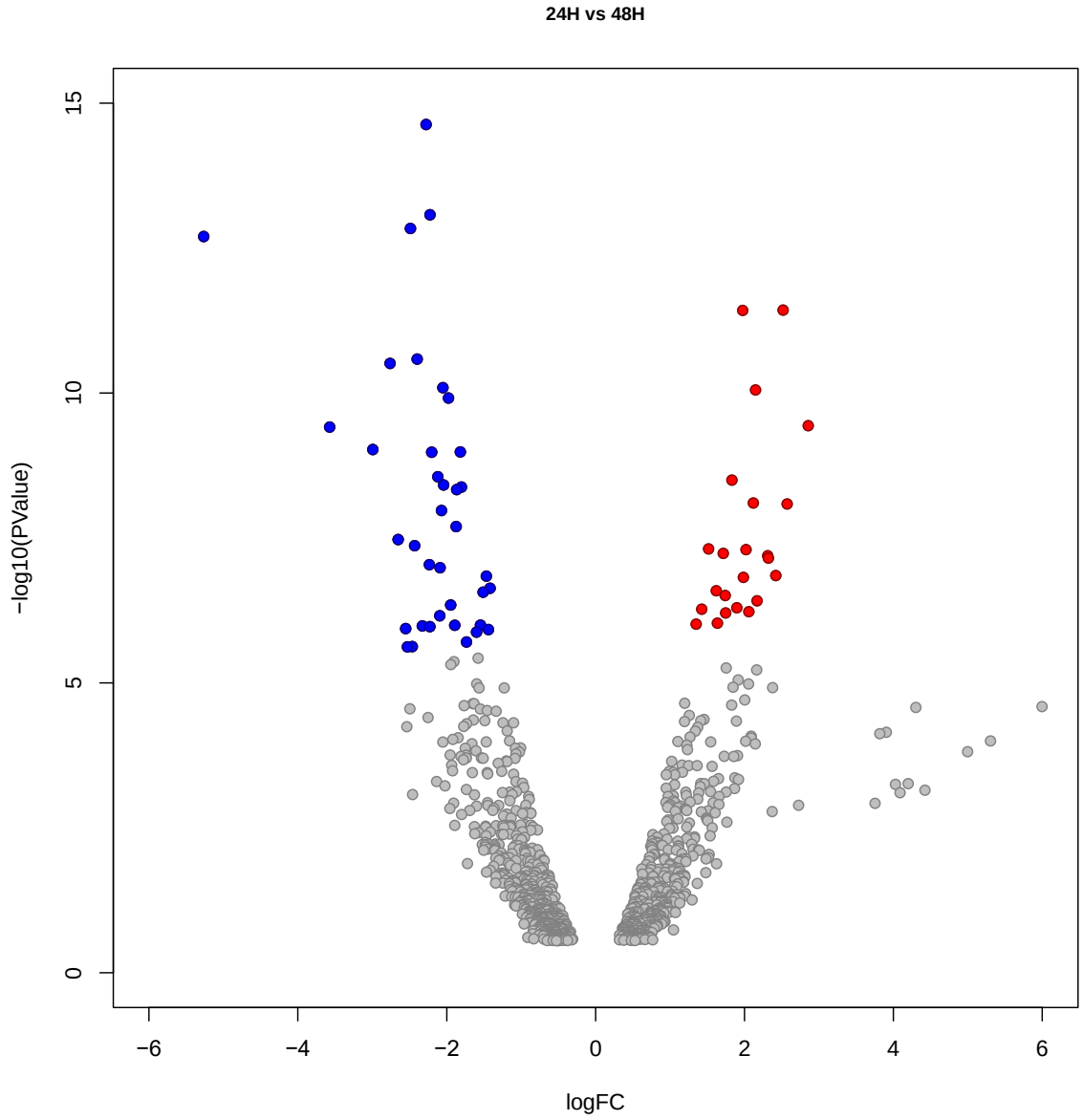


Figura 2.6 - Figura de vulcão representando transcritos regulados positiva e negativamente. Os genes representados como pontos cinzas no gráfico, correspondem a genes que não alteraram sua expressão significativamente (p-value>0,01), os genes que se expressam significativamente com pontos vermelhos e azul para os genes silenciados.

A figura anterior pode ser resumida pelo diagrama de Venn (Figura 2.7), onde se indica que 43 são os transcritos regulados positivamente entre a condição de fermentação de 48h em relação a 24h; 40 são os transcritos regulados negativamente entre as 48H em relação à condição de fermentação de 24h; e 1744 é o número de transcritos não significativos ao comparar 48 h em relação a 24 h.

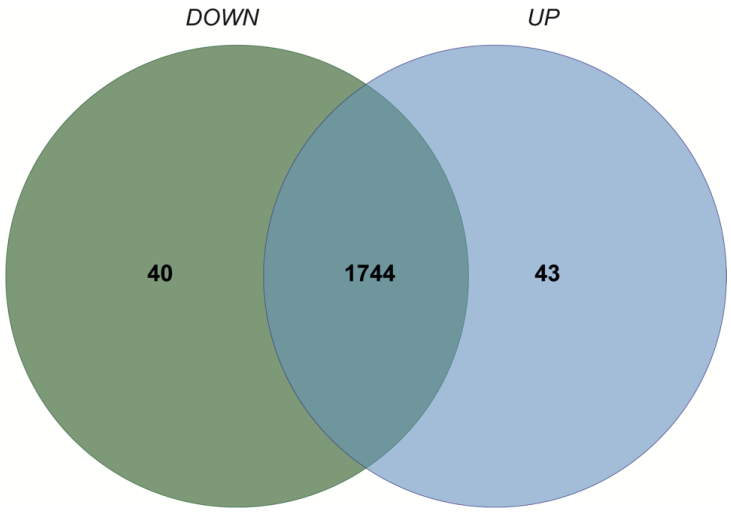


Figura 2.7 - Diagrama de Venn indicando transcritos regulados positivamente (Up) com cor azul e transcritos regulados negativamente (Down) com cor verde. Com cor cinza os genes que não alteraram sua expressão.

3.3.3.5 Categorais GO e vias metabólicas afetadas

A ferramenta PANNZER (http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/ sanspanz/) quantifica o grau de super-representação de uma determinada classe GO.

As categorias GO são derivadas de Gene Ontology (http://www.geneontology.org). A análise do caminho para DEGs foi fornecida, com base no banco de dados mais recente KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; https://www.genome.jp/kegg).

As listas de genes significativamente expressos diferencialmente (DEGs) foram obtidas com os valores de p≤0,01 e um *fold-change* ≥2.

O gráfico KEGG representa os transcritos sobre e sub-regulados, em um diagrama de bolhas (Figura 2.8). A cor da bolha significa o conjunto de genes expressos no transcriptoma, agrupados principalmente de acordo com: a) Processos biológicos (BP), refere-se ao papel das células ou função fisiológica desempenhada pelo gene. b) Função molecular (MF); refere-se à atividade molecular do gene. c) Componente celular (CC), refere-se à posição na célula onde o gene executa sua função. Além disso, o tamanho da bolha significa o número de DEGs nessas funções celulares.

Figura 2.8 - Gráfico de bolhas de enriquecimento da via KEGG de DEGs. A cor da bolha significa o conjunto de genes expressos no transcriptoma, agrupados principalmente: a) Cor verde: Processos biológicos (BP) b) Cor Azul: Função molecular (MF) e c) Cor roxa: Componente celular (CC). O tamanho da bolha significa o número de DEGs nessas funções celulares.

Com base nessa categorização, os principais processos e funções que são ativadas na fermentação submersa (24h vs 48 h), usando inulina como fonte de carbono para produção de inulinase, foram os envolvidos em atividades catalíticas (GO:0003824, 12 genes) e ligação molecular (GO:0005488, 5 genes).

Em processos biológicos os GO mais frequentes foram processos metabólicos (GO:0008152, 8 genes), processos celulares (GO:0009987, 6 genes), resposta a estímulos (GO:0050896, 3 genes) e localização (GO:0051179, 2 genes).

Para a categoria de componente celular, os genes encontrados em maior número estavam localizados na membrana (GO:0016020, 5 genes) e na célula (GO:0005623, 3 genes) (Figura 2.8).

Na análise KEGG, pode ser inferido que os DEGs foram significativamente enriquecidos na atividade catalítica, encontrando genes para expressão de hidrolases (GO:0016787; GO:0016798; GO:0004553) atuando nas ligações glicosil e inulinase (GO:0051670).

- Identificação de enzimas envolvidas na via metabólica de carboidratos

Os nomes das enzimas relacionadas com carboidratos foram procuradas na base NCBI com o genoma de refêrencia. A codificação dos genes relacionados, foram comparados com os genes obtidos com a ferramenta PANNZER, com os seguintes resultados (Tabela 2.14):

Tabela 2.14. Genes encontrados na via metabólica de carboidratos

Gene/Enzima	24H	24H	24H	48H	48H	48H
ASPNIDRAFT_56664 (inuE (Exo-inulinase)	6	2	0	0	0	2
ASPNIDRAFT_52928 (inuA/inuB (Endo-inulinase)	1	4	3	0	0	1
ASPNIDRAFT_212992 genes suc1 (Invertase) designado sucA)	34	15	9	23	6	31
ASPNIDRAFT_206681 Gene CreaA	19	14	4	22	2	14
ASPNIDRAFT_174680 ALG8 glycosyltransferase family	4	3	3	15	4	4
ASPNIDRAFT_173825 Alpha-2-glucosyltransferase alg10	2	2	0	4	1	13
ASPNIDRAFT_45893 Putative glucosyltransferase. hypothetical protein	2	3	0	3	0	1

ASPNIDRAFT_55204 Glycosyltransferase_GTB-type	32	35	36	35	7	46
ASPNIDRAFT_212915 Glycogen synthase [Carbohydrate transport and metabolism	2	0	0	1	0	0
ASPNIDRAFT_43469 Galactosyltransferase	5	4	2	9	3	9
ASPNIDRAFT_171254 Galactosyltransferase	2	3	5	7	0	3
ASPNIDRAFT_49515 Galactosyltransferase	19	13	9	7	4	22
ASPNIDRAFT_195017 Galactosyltransferase	3	1	5	13	2	10
ASPNIDRAFT_55640 Galactosyltransferase	5	5	7	1	1	2
ASPNIDRAFT_57332 Galactosyltransferase	2	4	0	4	3	2
ASPNIDRAFT_176601 beta-glucosidase BglX	5	5	5	9	3	17
ASPNIDRAFT_129799 Periplasmic beta-glucosidase and related glycosidases [Carbohydrate transport and metabolism]	3	4	1	4	1	2
ASPNIDRAFT_182309 Periplasmic beta-glucosidase and related glycosidases [Carbohydrate transport and metabolism]	5	0	1	0	2	7
ASPNIDRAFT_142108 Periplasmic beta-glucosidase and related glycosidases [Carbohydrate transport and metabolism]	13	1	5	5	2	5
ASPNIDRAFT_56782 Periplasmic beta-glucosidase and related glycosidases [Carbohydrate transport and metabolism]	3	2	2	10	8	8
ASPNIDRAFT_179265 beta-glucosidase BglX	1	2	0	1	0	3
ASPNIDRAFT_225679 Beta-glucosidase (SUN family)	68	16	8	22	6	31
ASPNIDRAFT_120104 Periplasmic beta-glucosidase and related glycosidases [Carbohydrate transport and metabolism]	0	1	1	2	0	1
ASPNIDRAFT_45461 Periplasmic beta-glucosidase and related glycosidases [Carbohydrate transport and metabolism]	122	99	57	168	35	242
ASPNIDRAFT_44520 Periplasmic beta-glucosidase and related glycosidases [Carbohydrate transport and metabolism]	13	8	7	28	3	19
ASPNIDRAFT_208871 Periplasmic beta-glucosidase and related glycosidases [Carbohydrate transport and metabolism]	1	0	0	0	1	2

O gene mais representativo encontrado no *Aspergillus niger* isolado de araçá-boi e avaliado em 24 e 48 horas de fermentação submersa, pertence à família beta-glicosidase, seguido pelas galactosiltransferases, glicosiltransferases e invertase.

A expressão gênica para inulinase foi baixa comparada com as enzimas citadas anteriormente, sendo que o tempo 24 horas de fermentação submersa apresenta a maior contagem de genes. Na prática a maior atividade enzimática foi obtida com 48 horas de fermentação, indicando assim que a baixa expressão de genes nesse tempo pode estar associada à repressão catabólica (ROS et al., 1985; GONZALEZ, 1996; CORONA-GONZÁLEZ et al., 2005; AGUADO, 2011). Biologicamente é razoável se esperar que a máxima expressão relativa de RNAs anteceda à máxima expressão proteica ou de atividade enzimática, embora possa haver variantes.

4. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância de se escolher um método de extração de DNA adequado e considerar seu impacto na tipificação de genótipos, além de considerar principalmente os valores de pureza e integridade do material genético.

Os pré-tratamentos com nitrogênio líquido e ultrassom usados para romper a parede celular no processo de extração de DNA não foram eficientes, pois não foi possível conseguir boa quantidade, qualidade e integridade do material genético.

O método de TRIZOL, comparado com o kit comercial DNeasy&Blood de QIAGEN, gerou maior contaminação nas amostras, possivelmente pela presença de resíduos de reagentes que fazem parte do procedimento.

A caracterização fenotípica realizada morfologicamante e/ou com o kit API20CAUX (Etapa 1) coincidiu com três das seis espécies confirmadas genotípicamente com as sequências basadas nas regiões ITS e 18S.

A técnica de RNA-seq permitiu avaliar os perfis de expressão gênica de *Aspergillus niger* em dois tempos de fermentação usando inulina como fonte de carbono.

A análise global da expressão gênica revelou DEGs induzidos e reprimidos ao comparar os tempos de fermentação submersa 24h vs 48h. No tempo 48 horas foram encontrados o maior número de transcritos, mas com baixa contagem para o gene de inulinase.

Os principais processos e funções que são ativadas na fermentação submersa (24h vs 48 h) usando inulina como fonte de carbono para produção de inulinase, foi a categoria de funções moleculares específicamente a refêrencia de atividade catalítica.

O estudo apresenta o potencial do fungo filamentoso para produzir outras enzimas como a beta-glicosidase, galactosiltransferase, glicosiltransferase e invertase com potencial de estudo para fins industriais. No entanto, ressalta-se que há necessidade de validação dos dados da transcriptômica, inicialmente por *Real-Time* PCR e, em seguida, em ensaios biológicos com genes-alvo selecionados desse estudo.

CAPÍTULO 3

Produção, purificação, imobilização e caracterização de inulinase produzida por *Aspergillus niger (*morfotipo no. 3)isolado de Araçá-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*)

Resumo

As inulinases são amplamente utilizadas na hidrólise da inulina para a produção de frutose e frutooligossacarídeos, que são ingredientes importantes na indústria alimentícia e farmacêutica. O objetivo do presente estudo foi produzir, purificar, imobilizar e caracterizar bioquimicamente a enzima livre e imobilizada obtida de *Aspergillus niger* isolado de polpa de araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh). Para isto, isolaram-se e caracterizaram-se microrganismos putativamente produtores dessas enzimas, como é o caso das inulinases intracelular (II) e inulinase extracelular (IE). Essa produção foi feita via fermentação submersa em um meio de cultura M2 contendo inulina como fonte de carbono principal. As enzimas foram parcialmente purificadas com resina DEAE Sephacel em NaCl 0,25M, e, em seguida, imobilizadas em grafeno oxidado (GO) e caracterizadas bioquimicamente. Os resultados mostraram que a inulinase II foi purificada 4,74 vezes a 33% de recuperação; IE 6,43 vezes com 25,9% e o controle 2,35 vezes com 6,9% de recuperação. Na eletroforese SDS-PAGE 10% uma banda de proteína com peso molecular de em torno de 97 kDa foi observado. A imobilização covalente da II, IE e controle em GO tiveram um rendimento de 90%, 88% e 77% respectivamente. Os derivados foram utilizados para geração contínua de frutose a partir de inulina (Sigma Aldrich), reusando o catalisador imobilizado por até ciclos para II, 10 ciclos para IE e 7 ciclos para o controle. A caracterização das enzimas revelou que o pH ótimo para II, IE e controle livre e imobilizada foi o mesmo (4,5) e as temperaturas máxima de atividade para enzima livre foram (50°C, 60°C, 60°C) respectivamente e para enzima imobilizada (60°C, 70°C, 70° C), respectivamente. Os parâmetros cinéticos foram calculados por gráficos Lineweaver-Burk com K_m de 24 $mg.mL^{-1}$, 5,2 $mg.mL^{-1}$, 6,7 $mg.mL^{-1}$ e V_{max} de 269 $U.mg^{-1}$, 40 $U.mg^{-1}$, 59 $U.mg^{-1}$ para II, IE e controle respectivamente. A estabilidade ao armazenamento da inulinase (IE) foi estudada a por 30 dias a uma temperatura de 6 ºC, ao final dos quais a conversão de inulina em frutose foi de 7% para enzima livre e 34% para enzima imobilizada. Este estudo garante informações valiosas e significativas sobre a purificação e caracterização da inulinase extracelular imobilizada para aplicação industrial.

Palavras-chaves: *Aspergillus niger,* imobilização, inulina, inulinase, produção, purificação.

Abstract

Inulinases are widely used in the hydrolysis of inulin for the production of fructose and fructooligosaccharides, which are important ingredients in the food and pharmaceutical industry. The aim of the present study was to produce, purify, immobilize and biochemically characterize the free and immobilized enzyme obtained from Aspergillus niger isolated from araçá-boi pulp (*Eugenia stipitata McVaugh*). For this, microorganisms putatively producing these enzymes were isolated and characterized, as is the case of intracellular inulinase (II) and extracellular inulinase (IE). This production was carried out via submerged fermentation in an M2 culture medium containing inulin as the main carbon source. The enzymes were partially purified with DEAE Sephacel resin in 0.25M NaCl, and then immobilized on oxidized graphene (GO) and biochemically characterized. The results showed that inulinase II was purified 4.74 times at 33% recovery; IE 6.43 times with 25.9% and the control 2.35 times with 6.9% recovery. In SDS-PAGE 10% electrophoresis a protein band with a molecular weight of around 97 kDa was observed. The covalent immobilization of II, IE and control in GO had a yield of 90%, 88% and 77% respectively. The derivatives were used for continuous generation of fructose from inulin (Sigma Aldrich), reusing the immobilized catalyst for up to cycles for II, 10 cycles for IE and 7 cycles for control. Enzyme characterization revealed that the optimal pH for II, IE and free and immobilized control was the same (4.5) and the maximum activity temperatures for free enzyme were (50°C, 60°C, 60°C) respectively and for immobilized enzyme (60°C, 70°C, 70°C), respectively. The kinetic parameters were calculated by Lineweaver-Burk plots with K_m of 24 $mg.mL^{-1}$, 5.2 $mg.mL^{-1}$, 6.7 $mg.mL^{-1}$ and V_{max} of 269 $U.mg^{-1}$, 40 $U.\ mg^{-1}$, 59 $U.mg^{-1}$ for II, IE and control respectively. The storage stability of inulinase (IE) was studied for 30 days at a temperature of 6 ºC, at the end of which the conversion of inulin to fructose was 7% for free enzyme and 34% for immobilized enzyme. This study provides valuable and significant information on the purification and characterization of immobilized extracellular inulinase for industrial application.

Keywords: *Aspergillus niger*, immobilization, inulin, inulinase, production, purification.

1. Introdução

A frutose por ser mais doce que a sacarose, e com amplas aplicações em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos, está sendo bastante explorada na área biotecnológica. Atualmente, é produzida a partir de amido por um processo enzimático envolvendo quatro enzimas (α-amilase, glucoamilase, isoamilase e glicose isomerase), resultando em uma mistura de diferentes produtos como oligossacarídeos (8%), frutose (42%) e glicose (50%). Também, pode ser produzida pela hidrólise química da sacarose; contudo, este processo gera subprodutos indesejáveis como hidroximetilfurfural (TRAPALA et al., 2020). A hidrólise ácida da inulina também produz frutose, no entanto, na reação são formados anidridos de difrutose, que são coloridos e sem capacidade adoçante (GUILL et al., 2006). Uma abordagem inovadora representa a produção de frutose a partir da inulina catalisada por inulinase microbiana (Exo e Endo), pois consiste em uma reação de etapa única (COITINHO et al., 2010; SINGH, et al., 2017).

A exo-inulinase (E.C. 3.2.1.80) é uma enzima que hidrolisa as ligações β-2,1 da inulina em uma única etapa para produzir frutose com rendimentos próximos a 90–95% em condições melhoradas (LIMA et al., 2011; GARUBA e ONILUDE, 2018; RAWAT et al., 2021).

A endo-inulinase (E.C. 3.2.1.7) é uma enzima que catalisa a hidrólise da inulina em frutose e frutooligossacarídeos (FOS). Os frutooligossacarídeos têm boas propriedades funcionais e nutricionais, trata-se de fator de estimulação para o gênero *Bifidubacterium* presente na flora intestinal e fonte de fibra dietética em preparações alimentícias. Portanto, são amplamente usados como prebióticos e para substituir açúcares em muitas aplicações alimentares, como chocolate e produtos lácteos (RAMAPRIYA et al., 2018; TEMKOV et al., 2018, LI et al., 2021).

As inulinases podem ser produzidas por uma série de microrganismos incluindo fungos, leveduras e bactérias. No entanto, *Aspergillus niger* é amplamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica, por produzir metabólitos geralmente reconhecidos como seguros GRAS (*Generally recognized as safe*) e com altos rendimentos (ZHANG et al., 2004; GUILL et al., 2006; GERMEC e TURHAN, 2020).

Existem dois principais problemas associados à aplicação industrial de inulinases para a produção de frutose: (i) a inulina tem uma solubilidade limitada à temperatura ambiente, e, (ii) há ampla chance de contaminação microbiana quando

o processo é realizado em temperatura ambiente. Assim, o processo industrial de produção de frutose e frutooligossacarídeos é realizado em temperaturas próximas de 60 ºC. A maioria das inulinases relatadas perdem sua atividade após algumas horas a esta temperatura e, portanto, precisam de reposição, aumentando assim o custo de produção (GILL et al., 2006). Porém, há um interesse crescente em isolar e caracterizar inulinases termoestáveis (SINGH e CHAUHAN, 2018).

As inulinases são geralmente purificadas por técnicas convencionais tais como: centrifugação, ultrafiltração, precipitação com sal ou solvente orgânico, diálise e cromatografia iônica, de afinidade ou eletroforese (PANDEY et al., 1999; SINGH e SINGH, 2010; TEMKOV et al., 2018). As inulinases intracelulares requerem um passo adicional, químico, físico ou mecânico, para a ruptura da parede celular, visando a extração (GERMEC e TURHAN, 2020). Essas técnicas para purificação de proteínas incluem várias etapas e, portanto, encontra muitas desvantagens como baixos rendimentos, limitada reprodutibilidade, difícil separação dos sólidos, perda de atividade, alto consumo de tempo e energia (TEMKOV et al., 2018).

Atualmente, a imobilização é um método usado para otimizar a atividade das enzimas. Este processo confere maior estabilidade à enzima o que permite: uso contínuo, controle do processo catalítico, reuso e rendimento de produção de produtos (NGUYEN et al., 2011; TRIVEDI et al., 2015; KUHN et al., 2016; GARUBA e ONILUDE, 2018; RAWAT et al., 2021). Apesar da enorme diversidade de estratégias e suportes orgânicos ou inorgânicos usados para imobilizar enzimas para aplicação em processos da indústria alimentícia e farmacêutica, estudos visam encontrar suportes prontamente disponíveis contendo grupos reativos que permitam procedimentos de imobilização fáceis e de baixo custo (CARCELLER et al., 2019).

O rápido desenvolvimento da nanotecnologia contribuiu para o aparecimento de muitos suportes novos. Os nanomateriais, à base de grafeno ganharam grande interesse em pesquisas em diferentes campos relacionados às proteínas. Suas propriedades físico-químicas excepcionais, como resistência eléctrica, óptica, térmica, mecânica e propriedades de superfície permitem interações mais eficazes com diferentes moléculas biológicas (SCIDAA et al., 2011; BOLIBOK et al., 2017; ADEEL et al., 2018). A característica estrutural do grafeno oxigenado, isto é, óxido de grafeno (GO) coberto com muitos grupos funcionais contendo oxigênio, como epóxi, hidroxila, carboxila, carbonila, fenol, lactona e quinona presente em suas folhas 2-D de camada única, conferem a natureza hidrofílica do material e uma ótima

área de superfície para imobilização de enzimas (ZHANG et al., 2004; LIU et al., 2010; CARCELLER et al., 2019). As características físico-químicas do GO, juntamente com a possibilidade de fabricação escalonável e estabilidade microbiológica, conduziram este trabalho para usar o GO como suporte para imobilização de inulinases.

A caracterização bioquímica de uma enzima é realizada para definir o potencial do material biológico para aplicações industriais. Assim, o estudo do efeito da temperatura e do pH na estabilidade enzimática são relevantes. Baixo pH e alta temperatura oferecem vantagens para produção industrial de xarope de frutose a partir de inulina, uma vez que altas temperaturas favorecem a solubilidade da inulina, ao mesmo tempo que evita a contaminação microbiana e reduz os custos de produção ao minimizar reprocessos (SABER e EL-NAGGAR, 2009; CHESINI et al., 2013).

Neste trabalho, a produção, purificação, imobilização e caracterização bioquímica de inulinase foram realizadas. A enzima intracelular e extracelular foi produzida por uma cepa de *A. niger* isolada de Araçã-boi, identificada por similaridade do resultado com outras sequências depositadas no GENE BANK. O maior % de similaridade foi com *A. niger* ATCC 1015 (número de acceso XM025599236.1). Para tal finalidade, o primeiro objetivo foi testar diferentes fontes de carbono (M1, M2, M3 e M6) para otimizar a produção de inulinase com a interação de variáveis como: concentração de substrato, tampão, agitação (*shaker*) e tempo de hidrólise. No segundo, testaram-se métodos de concentração da enzima como diálise, precipitação com solventes orgânicos (álcool e acetona) e liofilização. O terceiro, visava, a purificação parcial da enzima usando resina DEAE Sephacel a través da técnica de “batch” acompanhado de um teste de gradiente de sal e eletroforese (SDS-PAGE 10%). No quarto, usou-se grafeno oxidado como material de suporte para os testes de imobilização da inulinase, avaliando os parâmetros de: atividade enzimática, rendimento de imobilização, atividade recuperada e reuso do derivado. O quinto determinou o pH e temperatura máxima de atividade da enzima, assim como os valores das constantes cinéticas (K_m e V_{max}) e, no sexto, foi avaliada a influência do armazenamento na atividade da inulinase livre e imobilizada.

2. Material e métodos

Nesta etapa todas as análises foram realizadas com: inulinase intracelular (II), inulinase extracelular (IE) do isolado, e controle (C) inulinase de *Aspergillus niger* ATCC 16888. A avaliação da estabilidade de armazenamento foi feita com inulinase livre e imobilizada, realizada unicamente para a enzima que apresentou maior atividade enzimática total.

Todas as análises para determinar a atividade enzimática e teor de proteína foram realizadas conforme o procedimento descrito no item 2.2.2 do capítulo 1.

2.1 Microrganismo

O Microrganismo em estudo foi *Aspergillus niger* isolado de araçá-boi (No. 3), que foi identificado mediante as análises bioquímicas e de transcriptômica realizadas nos capítulos 1 e 2 deste trabalho.

A cepa foi mantida em meio BDA estéril enriquecido com suco de yacon 25% v/v onde foram realizados repiqueis mensais. A cultura nova foi incubada por 5 dias em estufa bacteriológica a 25 ºC e, depois conservada em temperatura de refrigeração. Essas culturas foram usadas para a obtenção da inulinase mediante fermentação submersa com agitação de 200 rpm em *shaker*.

Para o controle *Aspergillus niger* ATCC 16888, também foram realizados os mesmos tratamentos.

2.2 Enzima

A enzima inulinase excretada para o meio extracelular (IE) foi obtida através de filtração a vácuo do meio de cultura após o tempo de fermentação submersa. O sobrenadante coletado foi denominado como extrato bruto e usado para a caracterização bioquímica da enzima secretada, ou extracelular.

A biomassa da fermentação (*pellet*) foi usado como fonte de enzima intracelular (II), que foi ressuspenso em 50 ml de tampão de acetato de sódio (200 mM, pH 5,0) e submetido a forte agitação com vórtex, seguido de incubação a 30 ºC e 50 rpm por 30 minutos. Em seguida, foi sonicado a 30 ºC por 10 minutos e por último centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi usado como extrato bruto intracelular conforme metodologia adptada de Dinarvand *et al.* (2017).

2.3 Estudo de variáveis para otimizar a produção de inulinase

2.3.1 Meios de cultura

Para melhorar a produção da enzima, foram testados meios em caldo com diferentes fontes de carbono, visando praticidade e custo. Após esterilização a 120 ºC por 15 minutos, 10 % (v/v) do pré-inóculo incubado por 24 horas em um meio de acondicionamento (M1) foi adicionado assepticamente a cada meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono denominados M2, M3 e M6. O pH de cada meio foi ajustado com uso de ácido cloridrico 1N como indicado na tabela 3.1.

O meio de cultura M2 foi elaborado partindo de trabalhos referentes à produção de inulinase obtida do gênero *Aspergillus* (SKOWRONEK et al., 2004; SIRISANSANEEYAKUL et al., 2007; GOOSEN et al., 2008; KANGO, 2008; CHEN et al., 2011; SIRISANSANEEYAKUL et al., 2012; CHESINI et al., 2013; SILVA et al., 2013; ATY et al., 2014; DINARVAND et al., 2017; PRANGVISET et al., 2018; ILGIN et al., 2020).

Os meios de cultura M3 e M6 foram elaborados seguindo metodologias padronizadas do Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara. Os meios tiveram as características citadas na tabela 3.1:

Tabela 3.1 - Meios de cultura usados para produção de inulinase

Meio M1		**Meio M2**	
Erlenmeyer	500 mL	Erlenmeyer	250 mL
Quantidade do meio	100 mL	Quantidade do meio	50 mL
Inóculo Microrganismo	10 mL	Inóculo Microrganismo	5 mL
Extrato de levedura	12 g/L	$NaNO_3$	2%
Inulina	10 g/L	K_2HPO_4	0,4%
$MgSO_4.7H_2O$	2 g/L	$MgSO_4.7H_2O$	0,87%
Mcllvaine	0.1 M pH 5,0	Extrato de levedura	2%
Temperatura	30 ºC	Inulina	1%
pH	5,0	KCl	0,15%
rpm	200	$ZnSO_4$	0,07%
Tempo fermentação	24 horas	$FeSO_4$	0,02%
		NH_4Cl	0,2%
		Mcllvaine	0.1 M pH 5,0
		Temperatura	30 ºC
		pH	5,0
		rpm	200
		Tempo fermentação	48 horas

Meio M3		**Meio M6**	
Erlenmeyer	125 mL	Quantidade do meio	250 mL
Quantidade do meio	25 mL	Inóculo Microrganismo	5 mL
Inóculo Microrganismo	5 mL	$CaCO_3$	0,250 g
$CaCO_3$	0,1%	NH_4Cl	0,125 g
NaCl	0,5%	NaCl	1,250 g
NH_4Cl	0,1%	Gelatina	0,625 g
Água de maceração de milho	0,5%	Peptona	0,250 g
Água destilada	25 mL	Extrato de levedura	2 g
Farelo de trigo	1%	Água destilada	250 mL
Temperatura	30 ºC	Temperatura	30 ºC
rpm	200	rpm	200
pH	6,0	pH	6,0
Tempo fermentação	48 horas	Tempo de fermentação.....	48h

A fermentação submersa ocorreu à temperatura controlada de 30 ºC, 48 horas e agitação de 200 rpm em *shaker* IKA 4000 I CONTROL de acordo aos trabalhos referentes citados anteriormente. Após esse tempo, foi realizado um procedimento para obtenção do extrato bruto como descrito no item 2.2.

2.3.2 Concentração de substrato (inulina) e tampão

Usando enzima extracelular presente no sobrenadante do meio de cultura M2 foi realizado uma avaliação da concentração do substrato (Inulina, Sigma Aldrich), utilizando as seguintes concentrações: 0,5%, 1%, 1,5% e 2%. A hidrólise ocorreu a 50 ºC, 100 rpm e 60 minutos usando tampão McIlvaine (0,1M e pH 5,0) e tampão fosfato (0,05M e pH 5,0).

2.3.3 Inulinase extracelualar (IE)

O extrato bruto da IE e enzima controle obtido de *Aspergillus niger* ATCC 16888 foram submetidos a um teste de interação de variáveis como: meios de cultura (M1, M2, M3 e M6), tampão McIlvaine (0,1M e pH 5,0) e tampão fosfato (0,05M e pH 5,0), e usando para o processo de hidrólise um *shaker* (Aberto e fechado) a 50 ºC, 100 rpm e tempo de hidrólise (1 hora e 2 horas).

2.3.4 Inulinase intracelualar (II)

A II do extrato bruto e controle foram avaliadas com a interação das variáveis: meios de cultura (M1, M2, M3 e M6), tampão McIlvaine (0,1M e pH 5,0) *shaker* (Aberto) e tempo de hidrólise (1 hora).

2.3.5 Estudo comparativo entre a inulinase extracelular (IE) e intracelualar (II)

O extrato bruto IE, II e controle foram submetidos a um teste estatístico comparativo da interação das variáveis, meios de cultura (M1, M2, M3 e M6), tampão Mcllvaine (0,1M e pH 5,0) *shaker* (Aberto) e tempo de hidrólise (1 hora).

2.4 Métodos de concentração da enzima

Antes de submeter a enzima ao processo de purificação, foram realizados três testes de concentração do extrato bruto extracelular e intracelular para aumentar a atividade enzimática e teor de proteína conforme foi proposto por diferentes autores (KUSHI et al., 2000; CHO et al., 2002; GILL et al., 2006; SHARMA et al., 2007; SINGH et al., 2007; RAMAPRIYA et al., 2018).

Assim, primeiramente foi usado o método de separação de diálise e posteriormente foram testados os métodos de concentração por precipitação com solventes orgânicos (etanol e acetona) e liofilização.

A diálise foi realizada colocando o extrato em bolsas de celulose contra água destilada por 24 horas, temperatura ambiente e agitação constante, sendo realizada a troca da água a cada 12 horas. Após este tratamento, todo o volume foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e posteriormente realizado os testes de precipitação com solventes orgânicos e liofilização.

A enzima foi concentrada com solventes frios (etanol ou acetona) em uma relação 1:3 (extrato:solvente) e mantido *overnight* por 12 horas. Após esse tempo, os extratos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi mantido em cabina de extração até completa eliminação dos vapores orgânicos. A amostra foi reconstituída com água equivalente a divisão de dez (10) vezes o valor com respeito ao volume inicial.

A liofilização do extrato dialisado foi realizado em um liofilizador Labconco 120964853 F, por 48 horas. Posteriormente, a amostra foi reconstituída com água dividindo dez (10) vezes o valor com respeito ao volume inicial e solubilizada suavemente.

2.5 Purificação parcial da enzima inulinase

Seguindo a metodologia proposta por Martinez (2016), o extrato bruto (enzima livre) foi concentrado por liofilização a partir do fungo No. 3 e controle. Para isso, foram transferidos para uma seringa com filtro® contendo resina DEAE

(dietilaminoetil) Sephacel através da técnica de “batch” na proporção de 10:1 (mL de extrato: gramas de resina) e mantido em agitação suave por 1 hora. A resina foi tratatada previamente com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,8 para equilibrar as cargas iônicas e através da realização de ensaios de atividade enzimática e/ou dosagem de proteína no sobrenadante foi monitorada a interação iônica entre a enzima e a resina. Após 1 hora de agitação, o sobrenadante foi separado da resina por filtração da seringa e armazenado em refrigeração para posterior análise (dosagem de proteína e atividade).

2.5.1 Teste do gradiente de sal

Para liberar a proteína retida na superfície da resina foi usado cloreto de sódio com diferentes concentrações (0,05 – 1M). A seringa com filtro® contendo resina DEAE (dietilaminoetil) Sephacel, enzima e 5 mL da concentração de sal, foram mantidos sobre agitação constante. Após esse tempo, o sobrenadante de cada concentração de sal foi coletado cada 20 minutos em tubos Falcon de 15 mL (pressionando a seringa). Seguidamente, a seringa foi carregada com 5 mL da solução de sal com a seguinte concentração (mantendo a proporção de menor a maior). Todos os sobrenadantes foram dialisados para remoção do sal e posterior analise de atividade enzimática e proteína.

2.5.2 Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese (SDS-PAGE 10%) foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970). As amostras foram preparadas em tampão Tris-glicerol-β-mercaptoetanol, e colocadas a 100 ºC por 5 minutos antes da aplicação no gel para facilitar a desnaturação completa e o desdobramento das moléculas de proteína. Além disso, as subunidades de proteína se separarão se os dissulfetos as mantiverem juntas. O padrão de massa molecular (Marker Sigma S8445 IVL) usado na corrida, consistiu de miosina (200 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), desidrogenase glutâmica (55 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio bovino (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), α-lactoalbumina bovina (14,2 kDa) e aprotinina bovina (6,5 kDa).

A eletroseparação foi realizada por quatro horas a 90V e aplicando uma corrente de 15 mA, após as amostras penetrarem no gel, a corrente foi aumentada para 20 mA.

Com o término da migração, os géis foram colocados em solução corante de *coomassie brilliant blue* por três horas. A seguir foram descorados com uma mistura de metanol, ácido acético e água e fotografados para a determinação da massa molecular.

2.6 Imobilização da inulinase

O suporte grafeno oxidado (GO), usado para imobilização da inulinase, foi preparado conforme Hummers e Offeman (1958). Para o preparo do suporte, foram pesados 10 mg do GO em tubos ependorf de 2 mL com adição de 1 mL de tampão (Mcllvaine 50 mM, pH 4,5) para solubilizá-lo e posteriormente ativá-lo em ultrassom por 15 minutos. Após este tempo foi retirado o sobrenadante e adicionado 2 mL do extrato enzimático purificado com resina DEAE-Sephacel, mantido com agitação suave e temperatura ambiente (25 ºC). Para as analises, foram coletados 100 µL de amostra no tempo 0 e posteriormente a cada 15 minutos durante uma hora, duas e três horas. Após esse tempo foram realizadas medições de teor de proteína no sobrenadante e calculada a % de imobilização. O tempo de imobilização foi estabelecido após conseguir valores de proteínas constantes e com % de imobilização acima de 70% em testes preliminares.

2.6.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática do derivado ($U.g^{-1}$) foi determinada usando o derivado em 2 mL de inulina 1% (Sigma Aldrich) em tampão Mcllvaine (50 mM, pH 4,5) a 60 ºC. Os açúcares redutores foram quantificados cada 10 minutos, durante 30 minutos.

A atividade dos derivados foi calculada com a seguinte formula:

$$\frac{U}{g}\text{derivado} = \frac{\Sigma\ \text{Absorbância x 1000 x Volume total do ensaio (mL)}}{\varepsilon\ \text{molar x}\ \Sigma\ \text{tempo min x massa do derivado (g)}}$$

2.6.2 Rendimento de imobilização (RI)

O rendimento de imobilização (RI) foi calculado dividindo a atividade do sobrenadante final, após o processo de imobilização sobre a atividade inicial da enzima oferecida (CARCELLER et al., 2019).

$$\% = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Onde:

A: Atividade enzimática inicial (Tempo 0 no processo de imobilização); B: Atividade enzimática final, que corresponde a enzima que não se ligou ao suporte (Após tempo imobilização).

2.6.3 Atividade recuperada (AR)

Relação entre a atividade do derivado e da atividade enzimatica inicial (CARCELLER et al., 2019).

$$\% = \frac{C}{A} \times 100$$

Onde:

A: Atividade enzimática inicial (Tempo 0 no processo de imobilização); C: Atividade do derivado obtida após a imobilização.

2.6.4 Reuso dos derivados

Para os derivados foram determinadas atividades enzimáticas por hidrólise de inulina durante 30 minutos de reação pela técnica de "*batch*". A medida enzimática da primeira reação de hidrólise foi considerada 100%. Os derivados foram retirados do *shaker*, lavados com tampão McIlvaine (50 mM, pH 4,5) e novamente utilizados para hidrólise de inulina. Este procedimento foi repetido de forma continua até alcançar a meia vida (50% com relação à atividade inicial) do derivado.

2.7 Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada

O extrato enzimático purificado, bem como a enzima imobilizada em grafeno oxidado, ficaram armazenados a 6 ºC por 48 horas, até a caracterização bioquímica: pH e temperatura de máxima atividade, e parâmetros cinéticos (K_m e $V_{max\ aparente}$).

2.7.1 Determinação do pH de máxima atividade (enzima livre e imobilizada)

O pH ótimo de máxima atividade da enzima foi verificado incubando o extrato obtido por purificação em DEAE 0,25M, com o substrato (inulina 1%) em tampão de Mcllvaine (fosfato de sódio, 200 mM e citrato de sódio, 100 mM), com valores de pH entre 2,0-8,0. O tampão bicarbonato (Carbonato acido de sódio, 100mM e carbonato de sódio 100mM) foi usado para as medições realizadas em pH 9,0 e 10,0. Após o período de incubação de 30 minutos a 60 ºC, foram realizadas as análises do item 2.2.2 referenciado no capítulo 1.

2.7.2 Determinação da temperatura ótima (enzima livre e imobilizada)

A temperatura ótima de máxima atividade de hidrólise foi conduzida entre 10 ºC e 100 ºC em tampão Mcllvaine pH 5,0 e inulina 1% como substrato. Após o tempo pré-determinado (30 minutos), alíquotas eram retiradas e analisadas.

2.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos (enzima livre e imobilizada)

Foram realizadas medidas de atividade enzimática em diferentes concentrações (0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,8%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% e 3,0%) de inulina (Sigma Aldrich) em tampão Mcllvaine 50 mM, pH 4,5. A partir dos valores obtidos no ensaio anterior, a reação foi conduzida a 60 ºC por 60 minutos para a enzima livre e enzima imobilizada. A determinação das constantes cinéticas (K_m e V_{max}), foram realizadas de acordo com o procedimento gráfico proposto por Lineweaver-Burk. Os experimentos foram realizados em triplicata e a reta foi obtida por regressão linear, a partir das médias dos valores obtidos em cada experimento.

2.8 Influência do armazenamento na atividade da inulinase livre e imobilizada

O extrato da enzima livre, bem como a enzima imobilizada em grafeno oxidado, foram armazenados a 6 ºC por um período de 30 dias em tampão Mcllvaine pH 4,5 e analisado conforme descrito no item 2.2.2 do capítulo 1.

2.9 Análise estatística

O *software* RStudio versão 1.1.453 foi utilizado para realizar a análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey, bem como para gerar os gráficos de caixa. Os intervalos de confiança dos coeficientes foram calculados multiplicando o erro padrão por Student-t (t_{n-2}), ajustado aos graus de liberdade ($p<0,05$).

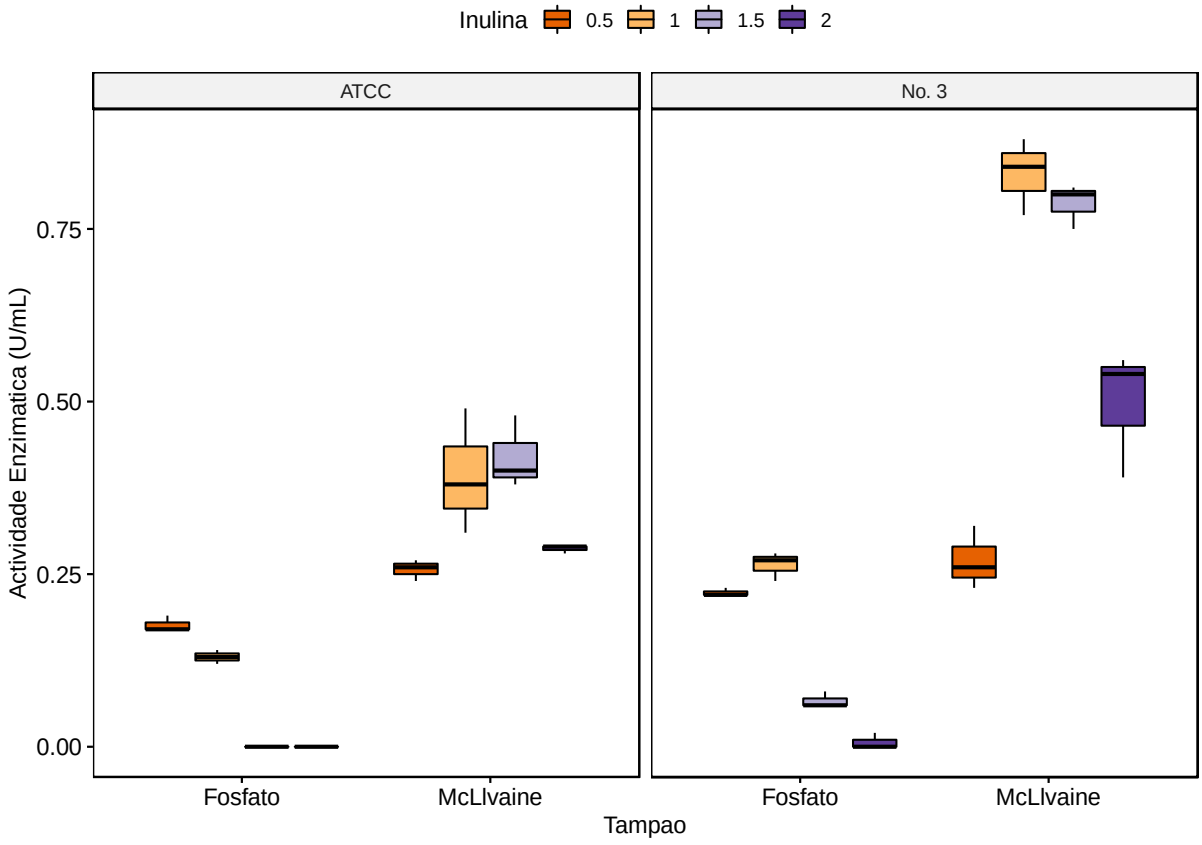
3. Resultados e discussão

3.1 Variáveis para otimizar a produção de inulinase

A produção da enzima foi otimizada utilizando interação de variáveis como meio de cultura com diferentes fontes de carbono, concentração do substrato, tampão, tipo de agitação (*shaker*) e tempo de reação de hidrólise. Com os melhores resultados descritos em sequencia, foram realizadas as produções em maior escala para os testes de concentração da enzima, purificação, imobilização, caracterização bioquímica e estabilidade da enzima livre e imobilizada.

3.1.1 Concentração de substrato (inulina) e tampão

A enzima extracelular, obtida no sobrenadante do meio de cultura M2, foi avaliada com diferentes concentrações de Inulina com tampão McIlvaine e tampão fosfato. A figura 3.1 apresenta o gráfico de caixas com os resultados das atividades enzimáticas total e específicas após a interação das variáveis descritas anteriormente. Neste estudo, a atividade hidrolítica da exo-inulinase do fungo No. 3 e do controle ocorre a uma concentração de 1% de inulina em tampão McIlvaine (0,1M e pH 5,0), sendo mais representativo o fungo No.3.



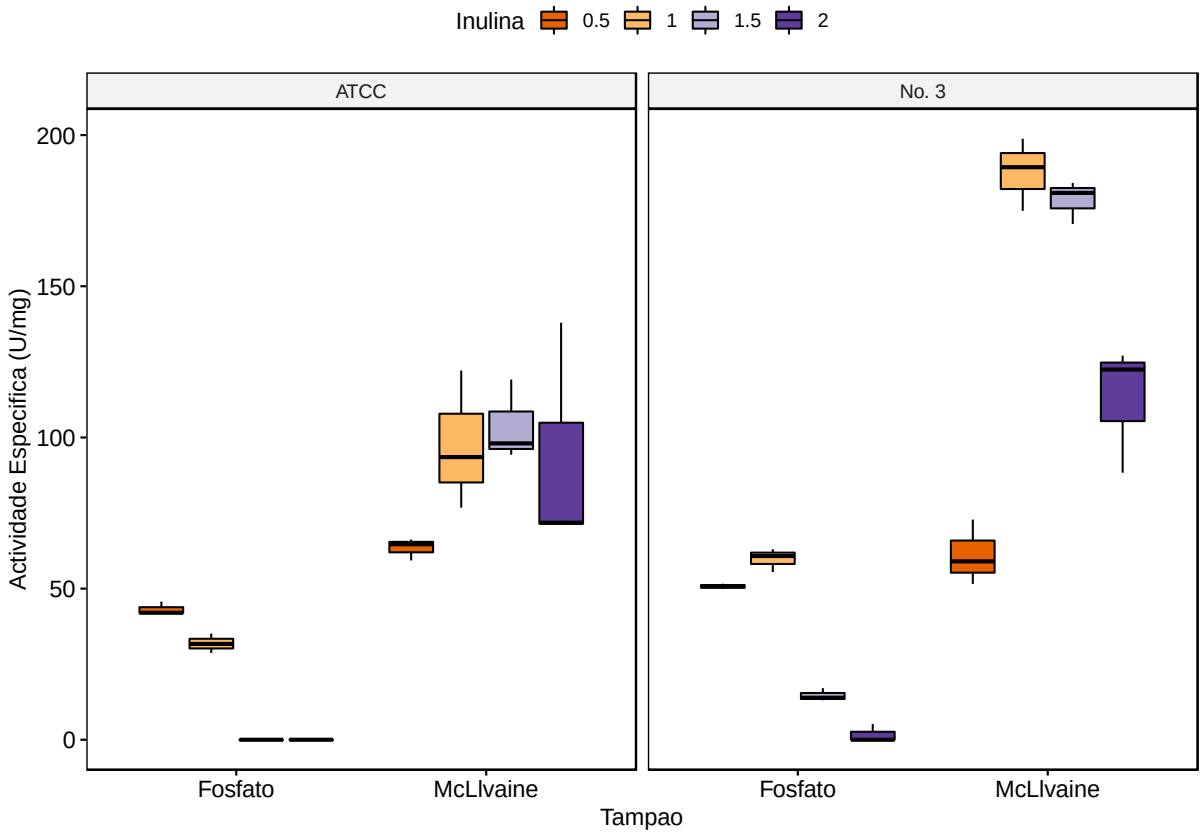


Figura 3.1 - Diagrama de caixa com média de atividade enzimática e específica da inulinase extracelular (IE) usando diferentes concentração de inulina em tampão fosfato e Mcllvaine.

Na tabela 3.2 encontram-se os valores de atividades enzimáticas e específicas para a IE do fungo No. 3 e controle, obtidos na interação da concentração de substrato e tampão.

Para ambas amostras o tampão Mcllvaine gerou melhores resultados, sendo destacado o fungo No. 3 com um valor de atividade enzimática de 0,83 $U.mL^{-1}$ e atividade específica de 187,7 $U.mg^{-1}$ usando 1% de inulina (Sigma) como substrato na reação de hidrólise. O controle gerou uma atividade enzimática de 0,42 $U.mL^{-1}$ e específica de 103,8 $U.mg^{-1}$ tem melhores resultados na concentração de 1,5% e apresenta diferença significativa com a concentração de 1%. Trabalhos usando inulina Sigma (1%) como substrato foram reportados por Kango (2008) e Aty *et al.* (2014), ao estudarem inulinase de *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* respectivamente, usando tampão acetato de sódio 0,2M e pH 5,0.

Outros autores como Sirisansaneeyakul *et al.* (2007), Sirisansaneeyakul *et al.* (2012), Chesini *et al.* (2013) e Prangviset *et al.* (2018), estudando inulinase de *Aspergillus niger*, refêrenciaram em seus trabalhos a hidrólise enzimática usando

inulina (Sigma) em buffer McIlvaine 0,05M e pH 5,0. Desse modo, embora haja pequenas variações nas variáveis de estudo, o comportamento geral foi similar.

Tabela 3.2 - Efeito da concentração de substrato (inulina) e tampão na atividade enzimática total e específica do morfotipo No. 3 e controle.

Amostra	Tampão	Média de atividade enzimática (EP) Concentração de inulina			
		0,5%	**1,0%**	**1,5%**	**2,0%**
No.3	Fosfato	0,22 (0,02) de	0,26 (0,02) e	0,07 (0,02) abc	0,007 (0,02) ab
	McLlvaine	0,27 (0,02) ef	0,83 (0,02) h	0,79 (0,02) h	0,50 (0,02) g
Controle (ATCC)	Fosfato	0,18 (0,02) cde	0,13 (0,02) bcd	0,00003 (0,02) a	0,00003 (0,02) a
	McLlvaine	0,26 (0,02) e	0,39 (0,02) fg	0,42 (0,02) g	0,29 (0,02) ef
		Média de atividade específica (EP)			
No.3	Fosfato	50,7 (7,9) bc	59,7 (7,9) cd	14,7 (7,9) ab	1,74 (7,9) a
	McLlvaine	61,1 (7,9) cd	187,7 (7,9) g	178,5 (7,9) g	112,6 (7,9) f
Controle (ATCC)	Fosfato	43,2 (7,9) bc	31,8 (7,9) abc	0,00003 (7,9) a	0,00003 (7,9) a
	McLlvaine	63,4 (7,9) cde	97,5 (7,9) def	103,8 (7,9) ef	93,6 (7,9) def

EP: Erro padrão; **a**: O valor não é estatisticamente diferente de zero.
As médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) Ver Apêndice C

3.1.2 Inulinase extracelular (IE)

No estudo de produção de inulinase extracelular (IE) foi avaliada a interação das variáveis: meios de cultura (M2, M3 e M6), tampão McIlvaine (0,1M e pH 5,0) e tampão fosfato (0,05M e pH 5,0), tipo de *shaker* (Aberto e fechado) e tempo de hidrólise (1 hora e 2 horas) no extrato bruto da inulinase extracelular do fungo No. 3 e controle.

A interação dos meios de cultura com um *shaker* de sistema aberto e um *shaker* fechado é apresentada na figura 3.2. Como pode ser observado o *shaker* aberto foi mais representativo em todos os meios de cultura e para ambas as amostras (IE e controle).

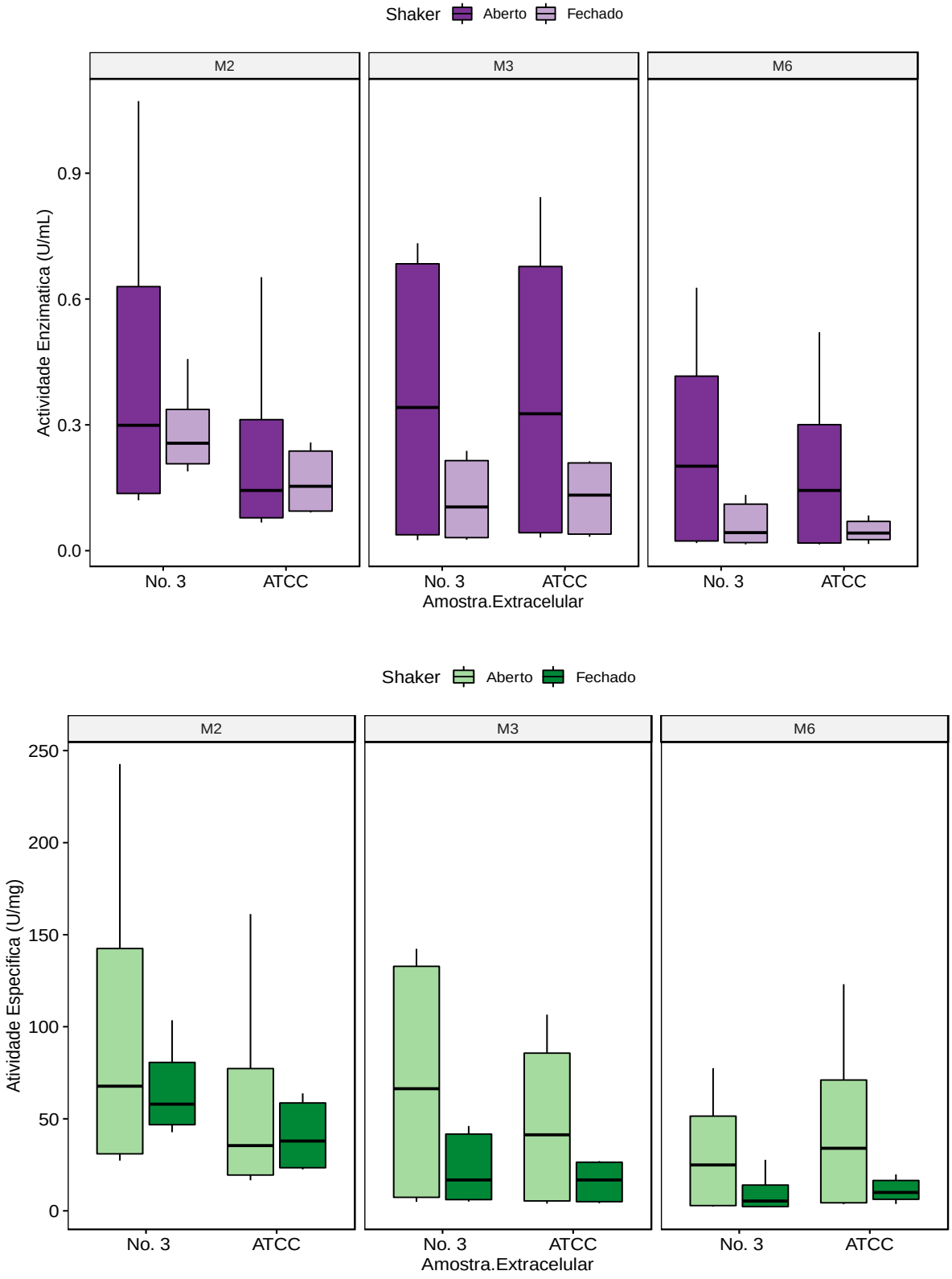


Figura 3.2 – Diagrama de caixa com média do efeito da interação do tipo de meio de cultura e *shaker* na atividade enzimatica e específica da inulinase extracelular (IE).

A figura 3.3 destaca a interação com o tipo de tampão. O gráfico de caixa demonstra que cada meio teve um comportamento frente à ação do tampão. No entanto, o tampão fosfato apresenta um maior desvio médio entre os valores.

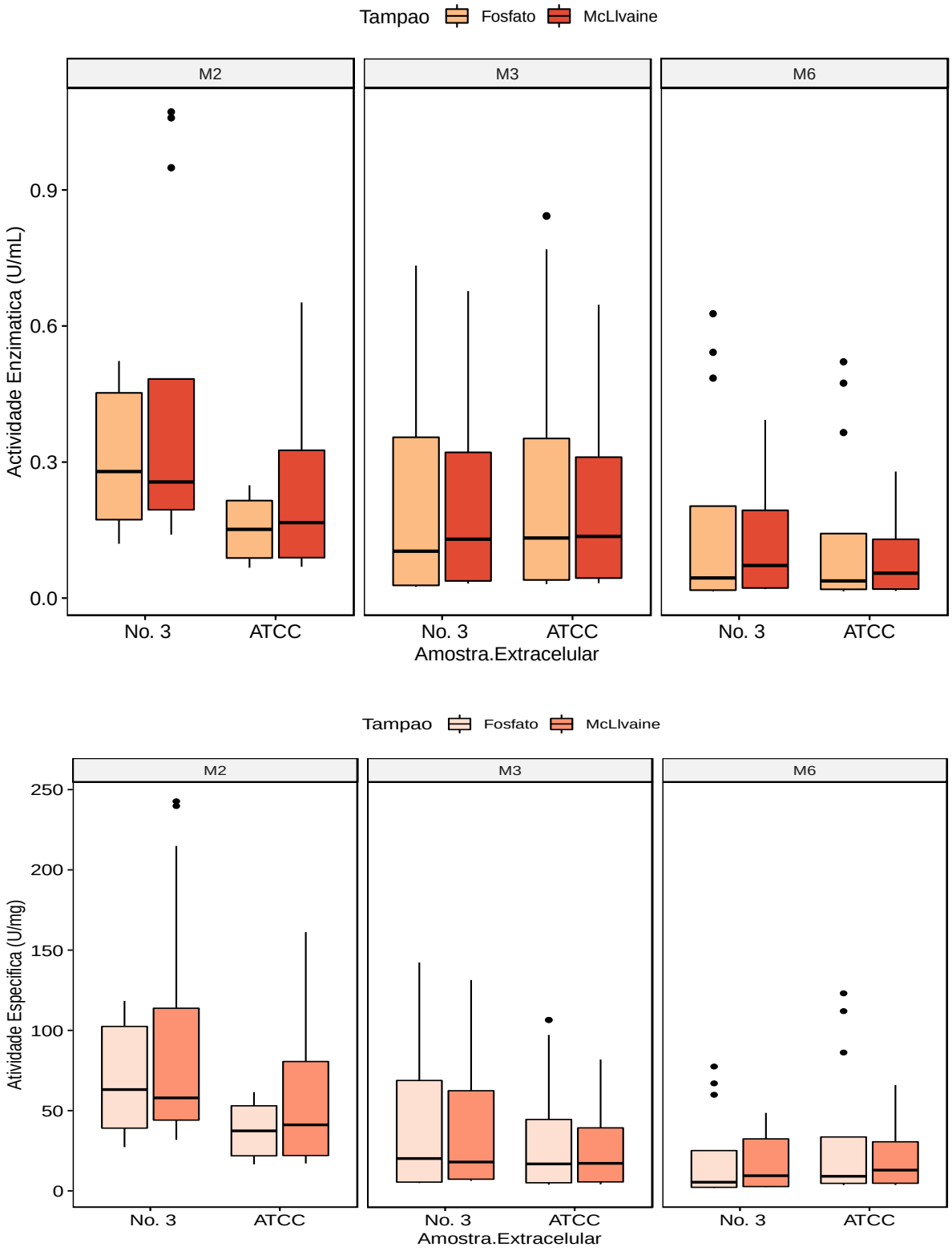


Figura 3.3 - Diagrama de caixa com média do efeito da interação do tipo de meio de cultura e tampão na atividade enzimatica e específica da inulinase extracelular (IE).

O gráfico de caixa apresentado na figura 3.4 refere a interação do tempo de hidrólises enzimática, sendo 1 hora o tempo com melhores resultados em todos os casos.

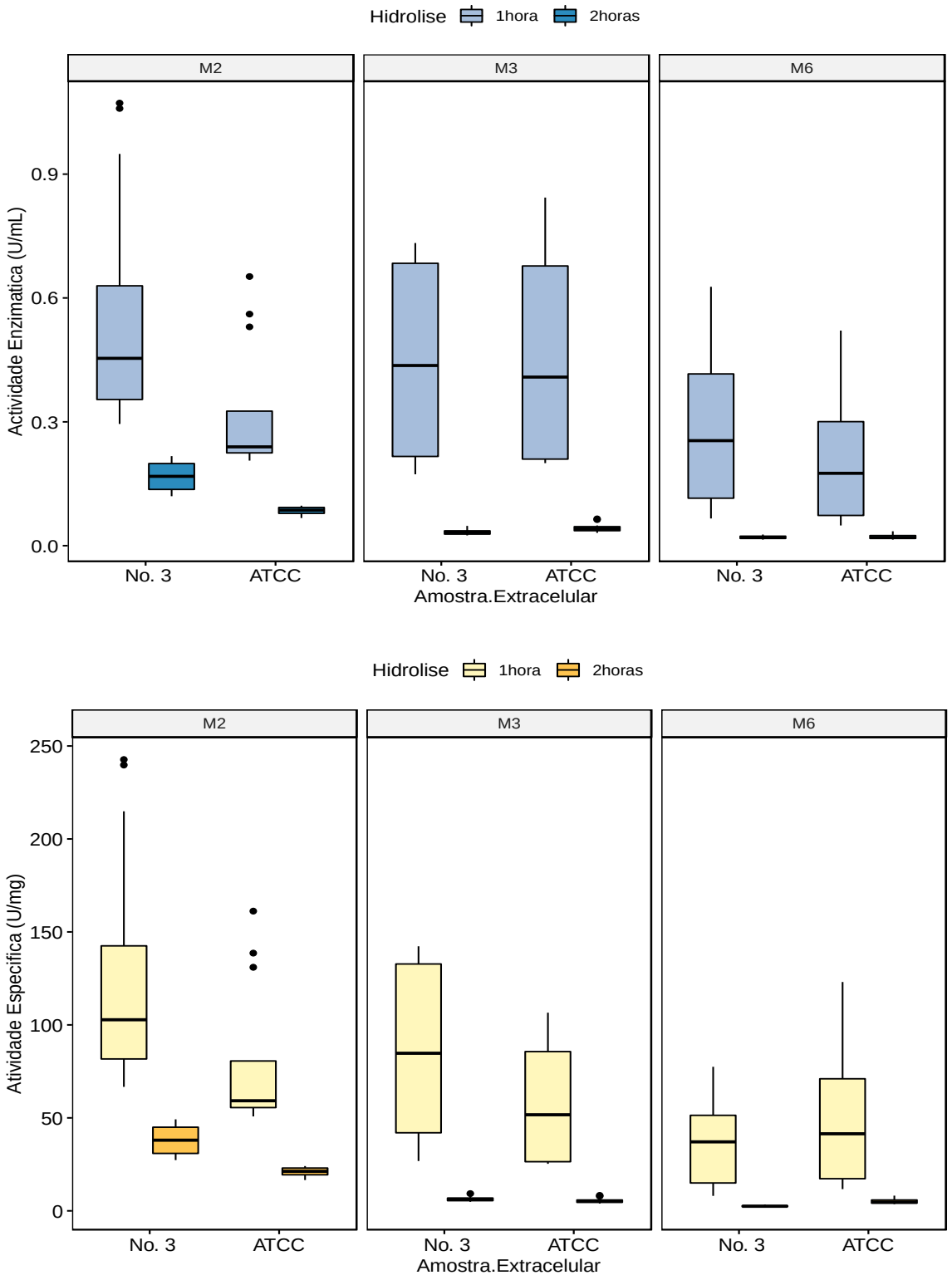


Figura 3.4 - Diagrama de caixa com média do efeito da interação do tipo de meio de cultura e tempo de hidrólise na atividade enzimatica e específica inulinase extracelular (IE).

Tabela 3.3 - Efeito da intereção das variáveis: meio de cultura, tampão, *shaker* e tempo de hidrólise na atividade enzimática da IE.

Atividade enzimática total											
Amostra	**Meio de cultura**	**Tampão**	***Shaker***	**Hidrólise**	**Média (EP)**	**Amostra**	**Meio de cultura**	**Tampão**	***Shaker***	**Hidrólise**	**Média (EP)**
No.3	M2	Fosfato	Aberto	1hora	0,48 (0,01) kl	Controle (ATCC)	M2	Fosfato	Aberto	1hora	0,22 (0,01) fg
	M2	Fosfato	Aberto	2horas	0,12 (0,01) bcde		M2	Fosfato	Aberto	2horas	0,07 (0,01) abcd
	M2	Fosfato	Fechado	1hora	0,41 (0,01) jk		M2	Fosfato	Fechado	1hora	0,23 (0,01) g
	M2	Fosfato	Fechado	2horas	0,19 (0,01) efg		M2	Fosfato	Fechado	2horas	0,09 (0,01) abcd
	M3	Fosfato	Aberto	1hora	0,72 (0,01) o		M3	Fosfato	Aberto	1hora	0,82 (0,01) p
	M3	Fosfato	Aberto	2horas	0,03 (0,01) a		M3	Fosfato	Aberto	2horas	0,04 (0,01) ab
	M3	Fosfato	Fechado	1hora	0,21 (0,01) fg		M3	Fosfato	Fechado	1hora	0,20 (0,01) efg
	M3	Fosfato	Fechado	2horas	0,02 (0,01) a		M3	Fosfato	Fechado	2horas	0,05 (0,01) abc
	M6	Fosfato	Aberto	1hora	0,55 (0,01) lm		M6	Fosfato	Aberto	1hora	0,45 (0,01) jk
	M6	Fosfato	Aberto	2horas	0,02 (0,01) a		M6	Fosfato	Aberto	2horas	0,02 (0,01) a
	M6	Fosfato	Fechado	1hora	0,08 (0,01) abcd		M6	Fosfato	Fechado	1hora	0,06 (0,01) abcd
	M6	Fosfato	Fechado	2horas	0,02 (0,01) a		M6	Fosfato	Fechado	2horas	0,02 (0,01) a
	M2	McLlvaine	Aberto	1hora	1,03 (0,01) q		M2	McLlvaine	Aberto	1hora	0,58 (0,01) mn
	M2	McLlvaine	Aberto	2horas	0,14 (0,01) def		M2	McLlvaine	Aberto	2horas	0,07 (0,01) abcd
	M2	McLlvaine	Fechado	1hora	0,32 (0,01) hi		M2	McLlvaine	Fechado	1hora	0,24 (0,01) gh
	M2	McLlvaine	Fechado	2horas	0,22 (0,01) fg		M2	McLlvaine	Fechado	2horas	0,09 (0,01) abcd
	M3	McLlvaine	Aberto	1hora	0,65 (0,01) no		M3	McLlvaine	Aberto	1hora	0,63 (0,01) mn
	M3	McLlvaine	Aberto	2horas	0,04 (0,01) abc		M3	McLlvaine	Aberto	2horas	0,05 (0,01) abc
	M3	McLlvaine	Fechado	1hora	0,21 (0,01) fg		M3	McLlvaine	Fechado	1hora	0,21 (0,01) fg
	M3	McLlvaine	Fechado	2horas	0,03 (0,01) a		M3	McLlvaine	Fechado	2horas	0,05 (0,01) abc
	M6	McLlvaine	Aberto	1hora	0,38 (0,01) ij		M6	McLlvaine	Aberto	1hora	0,27 (0,01) gh
	M6	McLlvaine	Aberto	2horas	0,02 (0,01) a		M6	McLlvaine	Aberto	2horas	0,02 (0,01) a
	M6	McLlvaine	Fechado	1hora	0,13 (0,01) cde		M6	McLlvaine	Fechado	1hora	0,08 (0,01) abcd
	M6	McLlvaine	Fechado	2horas	0,02 (0,01) a		M6	McLlvaine	Fechado	2horas	0,03 (0,01) a

EP: Erro padrão; **a**: O valor não é estatisticamente diferente de zero.

As médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) Ver Apêndice C

Tabela 3.4 - Efeito da intereção das variáveis: meio de cultura, tampão, *shaker* e tempo de hidrólise na atividade específica da IE.

					Atividade específica						
Amostra	**Meio de cultura**	**Tampão**	***Shaker***	**Hidrólise**	**Média (EP)**	**Amostra**	**Meio de cultura**	**Tampão**	***Shaker***	**Hidrólise**	**Média (EP)**
No.3	M2	Fosfato	Aberto	1hora	109,1 (3,2) rs	Controle (ATCC)	M2	Fosfato	Aberto	1hora	53,8 (3,2) jklmn
	M2	Fosfato	Aberto	2horas	27,8 (3,2) defgh		M2	Fosfato	Aberto	2horas	18,5 (3,2) abcdef
	M2	Fosfato	Fechado	1hora	92,3 (3,2) qr		M2	Fosfato	Fechado	1hora	56,7 (3,2) klmno
	M2	Fosfato	Fechado	2horas	43,5 (3,2) hijkl		M2	Fosfato	Fechado	2horas	23,1 (3,2) bcdefg
	M3	Fosfato	Aberto	1hora	139,8 (3,2) t		M3	Fosfato	Aberto	1hora	103,4 (3,2) r
	M3	Fosfato	Aberto	2horas	5,9 (3,2) ab		M3	Fosfato	Aberto	2horas	4,8 (3,2) ab
	M3	Fosfato	Fechado	1hora	40,9 (3,2) ghijk		M3	Fosfato	Fechado	1hora	25,9 (3,2) cdefgh
	M3	Fosfato	Fechado	2horas	5,3 (3,2) ab		M3	Fosfato	Fechado	2horas	5,9 (3,2) ab
	M6	Fosfato	Aberto	1hora	68,2 (3,2) nop		M6	Fosfato	Aberto	1hora	107,1 (3,2) r
	M6	Fosfato	Aberto	2horas	2,57 (3,2) a		M6	Fosfato	Aberto	2horas	4,3 (3,2) a
	M6	Fosfato	Fechado	1hora	10,2 (3,2) abcd		M6	Fosfato	Fechado	1hora	14,5 (3,2) abcde
	M6	Fosfato	Fechado	2horas	1,97 (3,2) a		M6	Fosfato	Fechado	2horas	5,3 (3,2) ab
	M2	McLlvaine	Aberto	1hora	232,5 (3,2) u		M2	McLlvaine	Aberto	1hora	143,6 (3,2) t
	M2	McLlvaine	Aberto	2horas	32,5 (3,2) efghi		M2	McLlvaine	Aberto	2horas	18,9 (3,2) abcdef
	M2	McLlvaine	Fechado	1hora	73,7 (3,2) opq		M2	McLlvaine	Fechado	1hora	60,4 (3,2) lmno
	M2	McLlvaine	Fechado	2horas	48,7 (3,2) ijklm		M2	McLlvaine	Fechado	2horas	23,4 (3,2) bcdefg
	M3	McLlvaine	Aberto	1hora	126,1 (3,2) st		M3	McLlvaine	Aberto	1hora	79,8 (3,2) pq
	M3	McLlvaine	Aberto	2horas	8,4 (3,2) abc		M3	McLlvaine	Aberto	2horas	5,8 (3,2) ab
	M3	McLlvaine	Fechado	1hora	36,8 (3,2) fghij		M3	McLlvaine	Fechado	1hora	26,6 (3,2) cdefgh
	M3	McLlvaine	Fechado	2horas	6,4 (3,2) ab		M3	McLlvaine	Fechado	2horas	5,6 (3,2) ab
	M6	McLlvaine	Aberto	1hora	47,5 (3,2) ijklm		M6	McLlvaine	Aberto	1hora	64,2 (3,2) mnop
	M6	McLlvaine	Aberto	2horas	3,1 (3,2) a		M6	McLlvaine	Aberto	2horas	4,2 (3,2) a
	M6	McLlvaine	Fechado	1hora	19,9 (3,2) abcdef		M6	McLlvaine	Fechado	1hora	18,9 (3,2) abcdef
	M6	McLlvaine	Fechado	2horas	2,5 (3,2) a		M6	McLlvaine	Fechado	2horas	6,9 (3,2) ab

EP: Erro padrão; **a**: O valor não é estatisticamente diferente de zero.

As médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) Ver Apêndice C

A tabela 3.3 e 3.4 apresentam respectivamente, as atividades enzimáticas totaise específicas como resultado da interação de todas as variáveis citadas anteriormente. Assim, pode ser demonstrado que a enzima inulinase do morfotipo No. 3 produzida em um meio de cultura M2 contendo inulina como fonte de carbono e usando no processo de hidrólise enzimática tampão Mcllvaine, *shaker* de sistema aberto e 1 hora, consegue sua máxima atividade catalítica com valores de 1,03 $U.mL^{-1}$ e 232,5 $U.mg^{-1}$. A enzima produzida no meio M3 contendo como fonte de carbono água de maceração de milho e farelo de trigo, ao ser comparado com o meio M2 (100%) apresenta uma porcentagem de 69,9% de atividade enzimática total usando tampão fosfato, *shaker* aberto e 1 hora no processo de hidrólise. No caso do meio M6 sem fonte de carbono, contendo gelatina sem sabor e hidrolisando a enzima em tampão fosfato, *shaker* aberto e 1 hora, a atividade foi de 53,4% com respeito a enzima produzida com o meio M2 tomando como referencia 100%.

A inulinase do controle apresenta uma atividade enzimática total de 0,82 $U.mL^{-1}$ ao produzir a enzima no meio M3 e usando no processo de hidrólise tampão fosfato, *shaker* aberto e 1 hora de reação. No entanto, os meios M2 e M6 não mostraram diferenças significativas. Com respeito à atividade específica a produção da enzima no meio M2 e usando tampão Mcllvaine, *shaker* aberto e 1 hora de reação foi mais representativo com um valor de 143,6 $U.mg^{-1}$.

Com estes resultados pode ser inferido que a produção de inulinases do fungo No.3 e controle foram induzidas pela inulina presente no meio M1 (usado para o acondicionamento do microrganismo) e M2 usado na fermentação submersa. Trabalhos semelhantes usando inulina como fonte de carbono foram realizados por Ertan *et al.* (2003) que a partir de pó de alcachofra de Jerusalém (3%) como substrato, conseguiram atividades de 2,90 $U.mL^{-1}$ de inulinase extraída de *Aspergillus parasiticus e* 1,60 $U.mL^{-1}$ a partir de *Penicillium spinulosum*; usando extrato de yacon (30-40%) Cazetta *et al.* (2005) e extraindo inulinase de *Kluveromyces marxianus* var. bulgaricus conseguiram uma atividade de 4,10 $U.mL^{-1}$; Gao *et al.* (2007) estudando inulinase obtida de *Cryptococcus aureus, Pichia guillermondii* e *Yarrowia lipolytica* refêrenciaram valores de 52,37, 39,56 e 62,85 $U.mL^{-1}$ respectivamente usando inulina comercial (2%); Kango (2008) a partir de *Aspergillus niger* e usando extrato de raízes de dente de leão (40%) conseguiram valores de 55 $U.mL^{-1}$; Saber e El-Naggar (2009) com extrato de tubérculos de dáhlia (4%) reportaram valores de 57,07 $U.mL^{-1}$; Trivedi *et al.* (2012) a partir de *Aspergillus*

tubingensis e usando como substrato pó de raízes de chicória (1%) refêrenciaram valores de 21,90 $U.mL^{-1}$; Lafuente-Castaneda *et al.* (2012) com inulinase obtida apartir de *Penicillium citrinum* e usando inulina (0,1%) como substrato reportaram atividades de 2,24 $U.mL^{-1}$; Sirisansaneeyakul *et al.* (2012), ao produzir inulinase a partir de um mix de *Aspergillus niger* TISTR 3570 e *Candida guilliermondii* TISTR 5844 encontraram uma atividade enzimática de 23,3 $U.mL^{-1}$ usando inulina comercial (0,5%); Chesini *et al.* (2013) a partir de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 obteve uma atividade de 35 $U.mL^{-1}$ usando inulina comercial (0,5%); Flores-Gallegos *et al.* (2015) usando como substrato inulina comercial (1%) e inulinase de *Aspergillus fumigatus* conseguiram uma atividade de 7,97 $U.mL^{-1}$ e Prangviset *et al.* (2018) com uma exo-Inulinase obtida da sinergia entre *Aspergillus niger* e *Candida guilliermondii* com uma atividade de 4,0 U/g usando inulina obtida de alcachofra de Jerusalém (0,5%) conseguiram produzir 1.03 $g/L^{-1}.h^{-1}$ de frutose.

3.1.3 Inulinase intracelular (II)

Partindo dos melhores resultados obtidos na interação de variáveis estudadas com a enzima extracelular (IE) foi realizada a produção da enzima intracelular com diferentes meios de cultura (M1, M2, M3 e M6) e hidrolisando o substrato com tampão McIlvaine (0,1M e pH 5,0), *shaker* (Aberto) e tempo de hidrólise (1 hora) para determinar sua máxima atividade catalítica.

A figura 3.5, representada em um diagrama de caixa, demonstra que a II do fungo No.3 apresentou maior atividade enzimática que a II do controle em todos os meios de cultura testados, sendo o meio M2 o mais representativo.

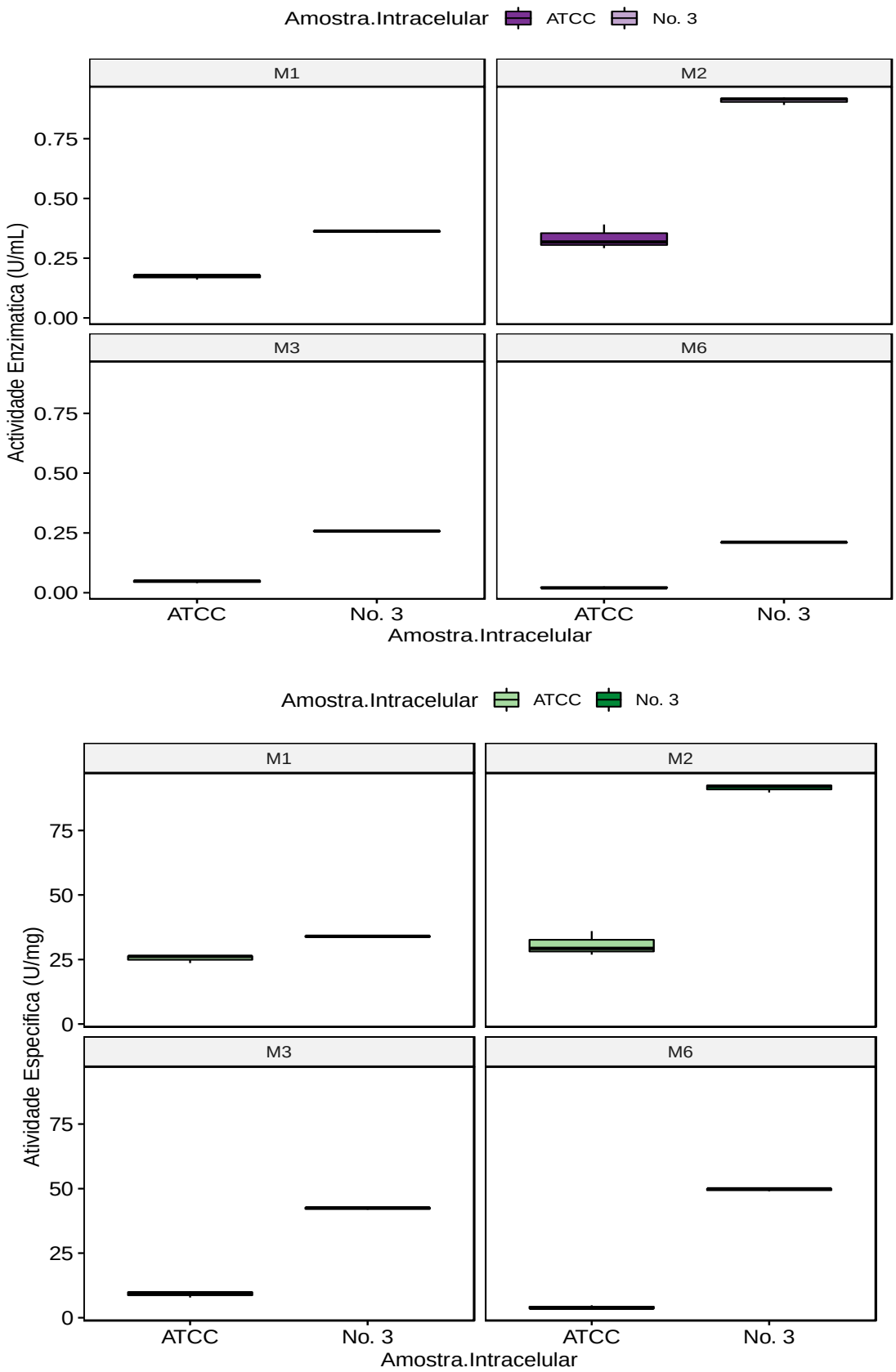


Figura 3.5 - Diagrama de caixa representando a média da atividade enzimatica e específica da inulinase Intracelular (II) e controle.

Para confirmar esta afirmação, na tabela 3.5 são apresentados os valores das atividades enzimáticas totais e específicas como resultado da produção da enzima com diferentes meios de cultura. Desta forma, se verifica que a enzima produzida pelo fungo No. 3 usando o meio M2 que contém inulina como substrato, gerou maior atividade enzimática 0,91 $U.mL^{-1}$ frente ao controle com um valor de 0,33 $U.mL^{-1}$, assim como os valores de atividade específica 91,5 $U.mg^{-1}$ e 30,7 $U.mg^{-1}$ respectivamente.

Tabela 3.5 - Influência do meio de cultura na atividade enzimática e específica da inulinase intracelular (II).

Amostra Intracelular	**Tampão**	**Média de atividades enzimáticas totais vs meios de cultura (EP)**			
		M1	**M2**	**M3**	**M6**
No. 3	McLlvaine	0,36 (0,01) d	0,91 (0,01) e	0,26 (0,01) c	0,21 (0,01) bc
Controle	McLlvaine	0,17 (0,01) b	0,33 (0,01) d	0,05 (0,01) a	0,02 (0,01) a
		Média atividades específicas vs meios de cultura (EP)			
No. 3	McLlvaine	33,9 (1,12) c	91,5 (1,12) f	42,4 (1,12) d	49,6 (1,12) e
Controle	McLlvaine	25,4 (1,12) b	30,7 (1,12) bc	9,2 (1,12) a	3,9 (1,12) a

EP: Erro padrão; **a**: O valor não é estatisticamente diferente de zero.

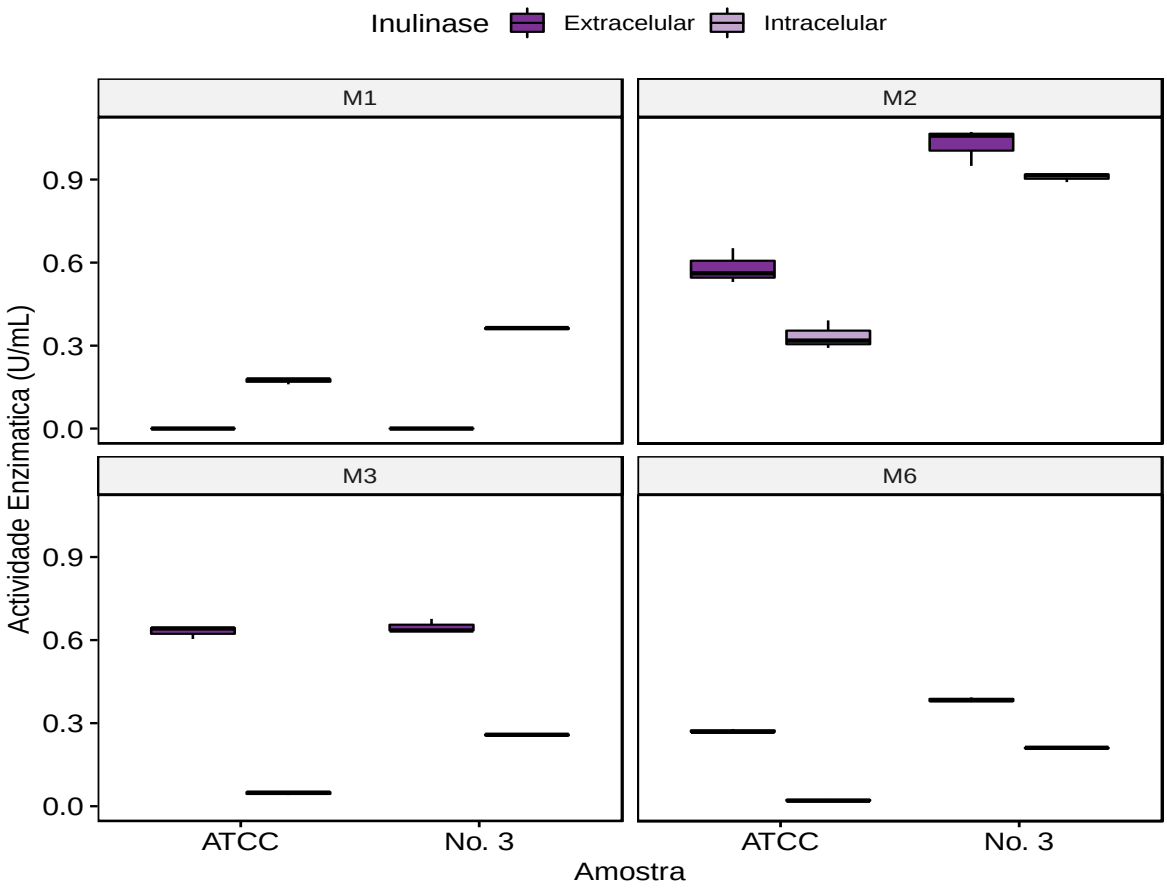
As médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) Ver Apêndice C

Os resultados aqui obtidos se assemelham a outros trabalhos, como os de Jing *et al.* (2003) que a partir de inulinase obtida de *Aspergillus ficuum* conseguiram valores de 25 $U.mL^{-1}$ usando inulina comercial; Mahmoud *et al.* (2011) que trabalhando com inulinase obtida de *Aspegillus niger* e usando como sustrato extrato de alho cru conseguiram uma atividade de 5,65 $U.mL^{-1}$; Fernandes *et al.* (2012) relatou uma atividade de 2,84 $U.mL^{-1}$ a partir de inulinase extraída de *Penicillium expansum* usando inulina como substrato; Bonciu *et al.* (2012) a partir de farinha de trigo como substrato e inulinase de *Rhizoctonia sp* conseguiram uma atividade de 1,87 $U.mL^{-1}$; Aty *et al.* (2014) associando o gênero *Aspergillus* e *Penicillium* conseguiram valores de 21,1 $U.mL^{-1}$; Rawat *et al.* (2015) usando como substrato extrato de raízes de aspargo para produzir inulinase de *Aspergillus awamori* refêrenciaram valores de 8,21 $U.mL^{-1}$. Os estudos também demonstram que o sinergismo entre microrganismos melhora a atividade da inulinase. Esse sinergismo não foi testado nesse projeto.

3.1.4 Estudo comparativo entre a inulinase extracelular (IE) e intracelualar (II)

Como um complemento aos estudos anteriores (Figura 3.6), a enzima extracelular e enzima intracelular foram analisadas estatisticamente com o intituito de serem comparadas frente a interação das variáveis: meios de cultura (M1, M2, M3 e M6), tampão Mcllvaine (0,1M e pH 5,0) *shaker* (Aberto) e tempo de hidrólise (1 hora).

A figura 3.6 destaca que a enzima extracelular teve um melhor desempenho em todos os meios de cultura analisados a exceção do meio M1, sendo o meio M2 a máxima expressão para ambas as enzimas extraídas do fungo No. 3.



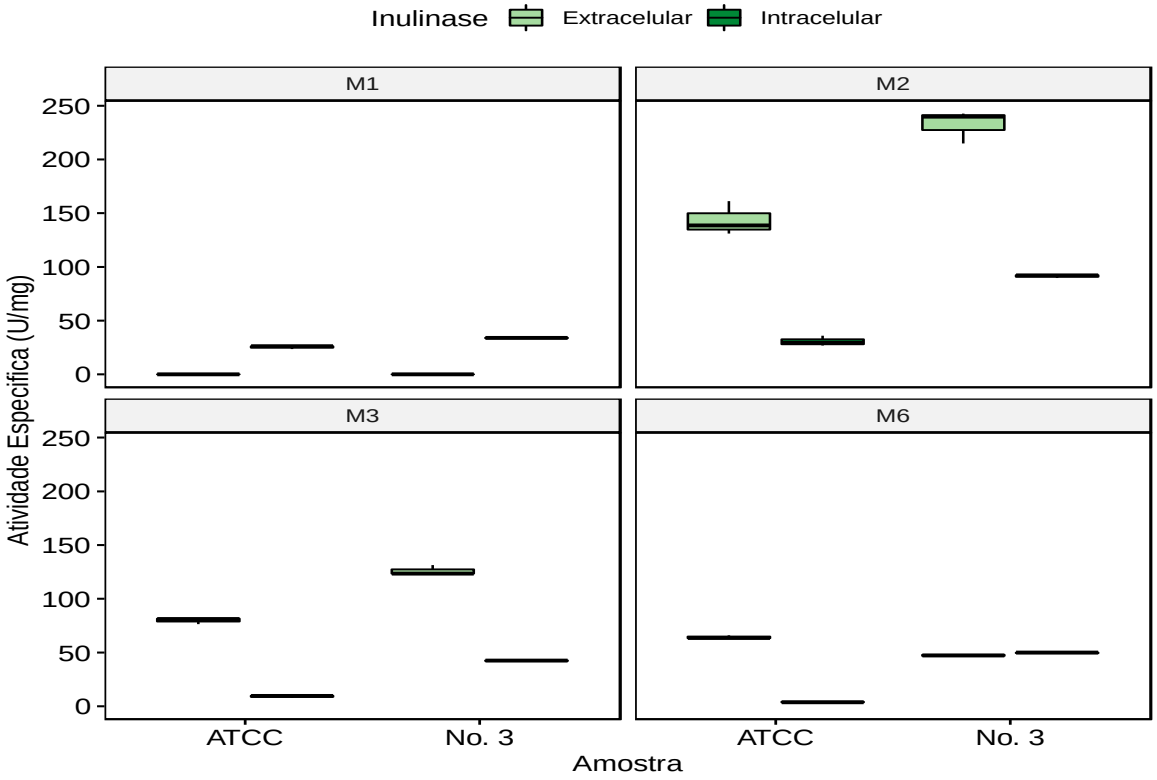


Figura 3.6 - Diagrama de caixa representando as médias de atividade enzimatica e específica da inulinase extracelular (IE) e inulinase intracelular (II).

Na tabela 3.6, verificase que o meio de cultura M2 foi o mais adequado para produzir ambas enzimas, valores de 1,03 U.mL^{-1} foram obtidos para IE e 0,91 U.mL^{-1} para II.

Tabela 3.6 - Comparação da atividade enzimática e específica da II e IE do morfotipo No. 3 e controle.

Amostra	**Inulinase**	**Média de atividades enzimáticas totais (EP)** **Meios de cultura**			
		M1	**M2**	**M3**	**M6**
No.3	Intracelular	0,36 (0,01) e	0,91 (0,01) g	0,26 (0,01) bcd	0,21 (0,01) bc
	Extracelular	0,00 (0,01) a	1,03 (0,01) h	0,65 (0,01) f	0,38 (0,01) e
Controle	Intracelular	0,17 (0,02) b	0,33 (0,01) de	0,05 (0,01) a	0,02 (0,01) a
(ATCC)	Extracelular	0,00 (0,01) a	0,58 (0,01) f	0,63 (0,01) f	0,27 (0,01) cd
		Média de atividades específicas (EP)			
No.3	Intracelular	33,9 (3,3) cde	91,5 (3,3) h	42,4 (3,3) cde	49,6 (3,3) ef
	Extracelular	0,00 (3,3) a	232,5 (3,3) j	126,1 (3,3) i	47,5 (3,3) def
Controle	Intracelular	25,4 (3,3) bc	30,7 (3,3) cd	9,2 (3,3) ab	3,96 (3,3) a
(ATCC)	Extracelular	0,00 (3,3) a	143,6 (3,3) i	79,8 (3,3) gh	64,2 (3,3) fg

EP: Erro padrão; **a**: O valor não é estatisticamente diferente de zero.
As médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) Ver Apêndice C

O controle manteve a mesma tendência, mas com uma menor atividade 0,58 $U.mL^{-1}$ e 0,33 $U.mL^{-1}$. Também, pode ser destacado que a enzima extracelular expressou uma maior atividade enzimática total, resultado comparável com o trabalho realizado por Dinarvand *et al.* (2017) que destacaram uma maior produtividade com inulinase extracelular (3,9 $U.mL^{-1}$) com respeito a inulinase intracelular (3,2 $U.mL^{-1}$), extraída de *A. niger* ATCC 20611 e produzida por fermentação submersa.

3.2 Métodos de concentração da enzima

Após dialisar o extrato bruto da II e IE do fungo No. 3 e controle, estes foram testados com vários métodos de concentração da enzima: solventes orgânicos (acetona e etanol) e liofilização. Como pode-se observar na tabela 3.7, o processo de liofilização apresentou, de modo geral, melhores resultados. Com acetona, apesar do procedimento ser satisfatório, optou-se pela sequencia diálise e liofilização devido a políticas ambientais. Também, estes resultados mostraram que a inulinase extracelular teve uma melhor porcentagen de recuperação. Resultados similares foram encontrados por Kushi et al. (2000) com inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus.*

Tabela 3.7 - Métodos de concentração da enzima inulinase produzida por *Aspergillus niger* (Morfotipo No. 3) e controle.

Extrato	Volume (mL)	Proteína (µg/mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Atividade Total	Fator de purificação	Recuperação (%)
***Aspergillus niger* (Morfotipo No.3)**							
Intracelular							
Bruto	150	12 ± 0,0	0,39 ± 0,01	34 ± 0,4	58,5	1	100
Dialisado	130	4 ± 0,0	0,30 ± 0,01	69 ± 2,7	39,0	2,03	66,7
Liofilizado	13	76 ± 0,0	2,77 ± 0,02	36 ± 0,2	36,0	1,06	61,6
Acetona	13	71 ± 0,0	2,84 ± 0,03	39 ± 0,4	36,9	1,15	63,1
Etanol	13	57 ± 0,0	2,38 ± 0,01	42 ± 0,1	30,9	1,24	52,9
Extracelular							
Bruto	300	23 ±0,0	0,328 ± 0,01	14 ± 0,6	98,4	1	100
Dialisado	250	8 ± 0,0	0,324 ± 0,01	41 ± 1,2	81,0	2,93	82,3
Liofilizado	25	107 ± 0,0	3,524 ± 0,04	33 ± 0,3	88,1	2,36	89,5
Acetona	25	110 ± 0,0	3,039 ± 0,03	28 ± 0,2	76,0	2	77,2
Etanol	25	80 ± 0,0	2,558 ± 0,05	32 ± 0,7	64,0	2,29	65,0

Controle (*Aspergillus niger* ATCC 16888)							
Intracelular							
Bruto	100	5 ± 0,0	0,517 ± 0,01	97 ± 2,4	51,7	1	100
Dialisado	90	4 ± 0,0	0,569 ± 0,01	163 ± 1,8	51,2	1,68	99,1
Liofilizado	9	82 ± 0,0	4,063 ± 0,04	50 ± 0,5	36,6	0,52	70,7
Acetona	9	74 ± 0,0	1,453 ± 0,02	20 ± 0,3	13,1	0,21	25,3
Etanol	9	33 ± 0,0	1,165 ± 0,03	35 ± 0,9	10,5	0,36	20,3
Extracelular							
Bruto	150	4 ± 0,0	0,206 ± 0,01	59 ± 3,9	30,9	1	100
Dialisado	120	16 ± 0,0	0,211 ± 0,02	13 ± 1,0	25,3	0,92	81,9
Liofilizado	6	73 ± 0,0	4,109 ± 0,01	56 ± 0,2	24,7	1,80	79,8
Acetona	6	94 ± 0,0	4,161 ± 0,1	44 ± 1,1	25,0	1,82	80,8
Etanol	6	71± 0,0	3,641 ± 0,08	52 ± 1,1	21,8	1,59	70,7

3.3 Purificação parcial da enzima inulinase

O extrato enzimático dialisado e liofilizado das enzimas II e IE do fungo No. 3, e controle, após a interação com a resina, foi monitorado cada 20 minutos através da medida de teor de proteína, onde foi constatado que após 1 hora, a enzima estava ligada à resina confirmado pela ausência de proteína no sobrenadante.

3.3.1 Teste do gradiente de sal

A resina contendo a enzima ligada, foi submetida ao processo de dessorção de proteína usando gradiente de sal em várias concentrações. A figura 3.7 confirma que através da atividade enzimática e teor de proteína foi determinado que a concentração de 0,25 M de cloreto de sódio apresenta os melhores resultados.

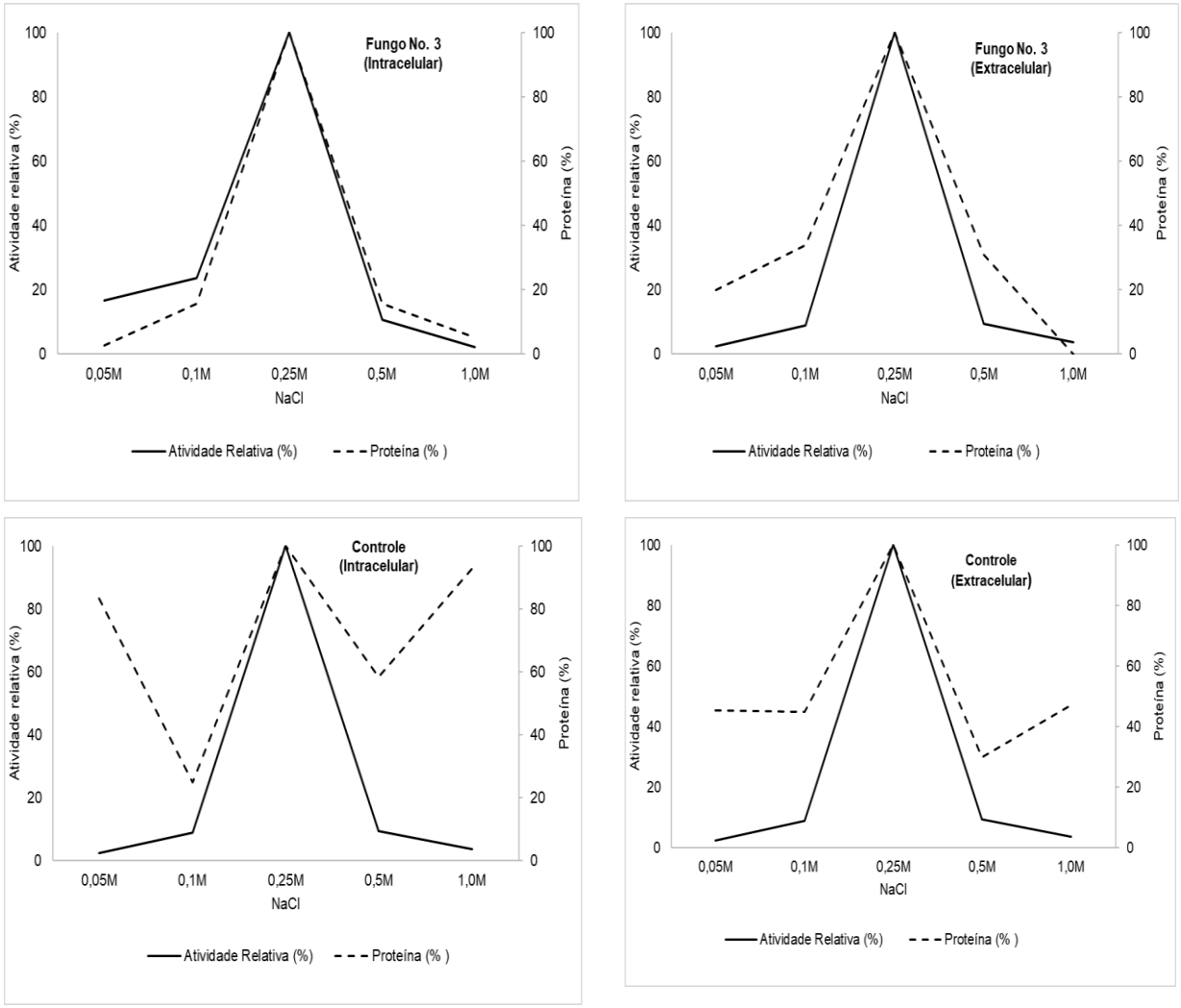


Figura 3.7 - Purificação parcial da inulinase usando cloreto de sódio a diferentes concentrações (0.05M, 0.1M, 0.25M, 0.5M e 1.0M)

Com a realização do teste de gradiente de sal foi determinado que a enzima de trabalho seria produzida concentrando-a por liofilização e purificando-a com NaCl 0,25M.

No presente estudo, usando um procedimento de quatro etapas (diálises, liofilização, purificação com DEAE 0,25M e diálise), pode ser observado na tabela 3.8 a purificação parcial da II e IE do fungo No. 3 e controle. Após o processo de purificação com resina de troca iônica o fator de purificação aumenta entre 1 e 6 vezes frente ao extrato bruto liofilizado, sendo IE do morfotipo No.3 a que apresenta o melhor fator de purificação (6,43 vezes), recuperação de 25,9% e atividade específica de 90 U/mg.

Também, pode ser destacado que os valores de proteína ($\mu g.mL^{-1}$) obtidos após o processo, resultou na remoção de outras proteínas e a fração de inulinase foi

eluida com gradiente de NaCl 0,25M. A purificação foi verificada com eletroforese SDS-PAGE 10%.

Tabela 3.8 - Purificação parcial da enzima inulinase produzida por *Aspergillus niger* (Morfotipo No. 3) e controle.

Extrato	Volume (mL)	Proteína (ug/mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Atividade Total	Fator de purificação	Recuperação (%)
***Aspergillus niger* (Morfotipo No.3)**							
Intracelular							
Bruto	150	12 ± 0,0	0,39 ± 0,01	34 ± 0,4	58,5	1	100
Dialisado	130	4 ± 0,0	0,30 ± 0,01	69 ± 2,7	39,0	2,03	66,7
Liofilizado	13	76 ± 0,0	2,77 ± 0,02	36 ± 0,2	36,0	1,06	61,6
DEAE 0,25M	10	12 ± 0,0	1,93 ± 0,03	161 ± 2,8	19,3	4,74	33,0
Extracelular							
Bruto	300	23 ±0,0	0,328 ± 0,01	14 ± 0,6	98,4	1	100
Dialisado	250	8 ± 0,0	0,324 ± 0,01	41 ± 1,2	81,0	2,93	82,3
Liofilizado	25	107 ± 0,0	3,524 ± 0,04	33 ± 0,3	88,1	2,36	89,5
DEAE 0,25M	20	14 ± 0,0	1,272 ± 0,02	90 ± 1,7	25,4	6,43	25,9
Controle (*Aspergillus niger* ATCC 16888)							
Intracelular							
Bruto	100	5 ± 0,0	0,517 ± 0,01	97 ± 2,4	51,7	1	100
Dialisado	90	4 ± 0,0	0,569 ± 0,01	163 ± 1,8	51,2	1,68	99,1
Liofilizado	9	82 ± 0,0	4,063 ± 0,04	50 ± 0,5	36,6	0,52	70,7
DEAE 0,25M	7	4 ± 0,0	0,096 ± 0,02	25 ± 0,5	0,7	0,26	1,3
Extracelular							
Bruto	150	4 ± 0,0	0,206 ± 0,01	59 ± 3,9	30,9	1	100
Dialisado	120	16 ± 0,0	0,211 ± 0,02	13 ± 1,0	25,3	0,92	81,9
Liofilizado	6	73 ± 0,0	4,109 ± 0,01	56 ± 0,2	24,7	1,80	79,8
DEAE 0,25M	5	4 ± 0,0	0,426 ± 0,00	97 ± 0,9	2,1	2,35	6,9

Trabalhos realizados com inulinase do gênero *Aspergillus* foram refêrenciados por vários autores (Tabela 3.9) e os resultados são equitativos àqueles deste experimento.

Ao comparar os resultados desta investigação com Guill *et al.* (2006) que também usou DEAE-Sephacel no processo de purificação de exo-inulinase extraída de *Aspergillus fumigatus*, pode ser analisado, que para obter um fator de purificação de 74,6 tiveram que usar quatro (4) métodos cromatográficos, conseguindo uma atividade específica de 551,7 $U.mg^{-1}$ e 3,2% de recuperação da enzima. Nesta

proposta, usando unicamente a cromatografía de troca iônica com resina DEA-Sephacel por *batch*, sendo um método simples e econômico, foi encontrado um fator de purificação de 6,4, uma atividade específica de 90 $U.mg^{-1}$ e recuperação de 25,9%.

Tabela 3.9 - Análise comparativa com outros estudos do processo de purificação da inulinase no gênero *Aspergillus*.

Autor	Fonte	Substrato	Método	U/mg	Fator de purificação	% R
Presente estudo	*Aspergillus niger*	Inulina	Diálise Liofilização DEAE-Sephacel Diálise	90	6,4	25,9
	Aspergillus niger ATCC 16888	Inulina	Diálise Liofilização DEAE-Sephacel Diálise	97	2,4	6,9
Cruz *et al.* (1998)	*Aspergillus niger 245*	Inulina	Sulfato de amônio DEAE-Sephadex A-50 CM-celulose	38,9	13	7,2
Zhang *et al.* (2004)	*Aspergillus niger* AF10	-	Sulfato de amônio Sp-coluna	-	4,8	11
Gill *et al.* (2006)	*Aspergillus fumigatus*	Inulina	Sulfato de amônio DEAE-Sephacel Sepharose Sephacryl-200 Sephacryl-100	551,7	74,6	3,2
Coitinho *et al.* (2010)	*Aspergillus terréus CCT4083*	Inulina	Sulfato de amônio Ultrafiltração 8400 Sepharose	38,3	179	32,1
Kumar *et al.* (2011)	*Aspergillus niger MTCC 1344*	Inulina	TPP	43,9	10,2	88
Holyavka *et al.* (2014)	*Aspergillus niger*	-	Filtração G25 DEAE Celulose Filtração G200	34,7	16,2	93,2

%R: Porcentagem de recuperação

3.3.2 Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)

A SDS-PAGE, representada na figura 3.8, revelou dez bandas de proteínas no extrato bruto liofilizado (EB-LIO) e confirma que após o processo de purificação e eluição com NaCl 0,25M permitiu eliminar o maior número de proteínas.

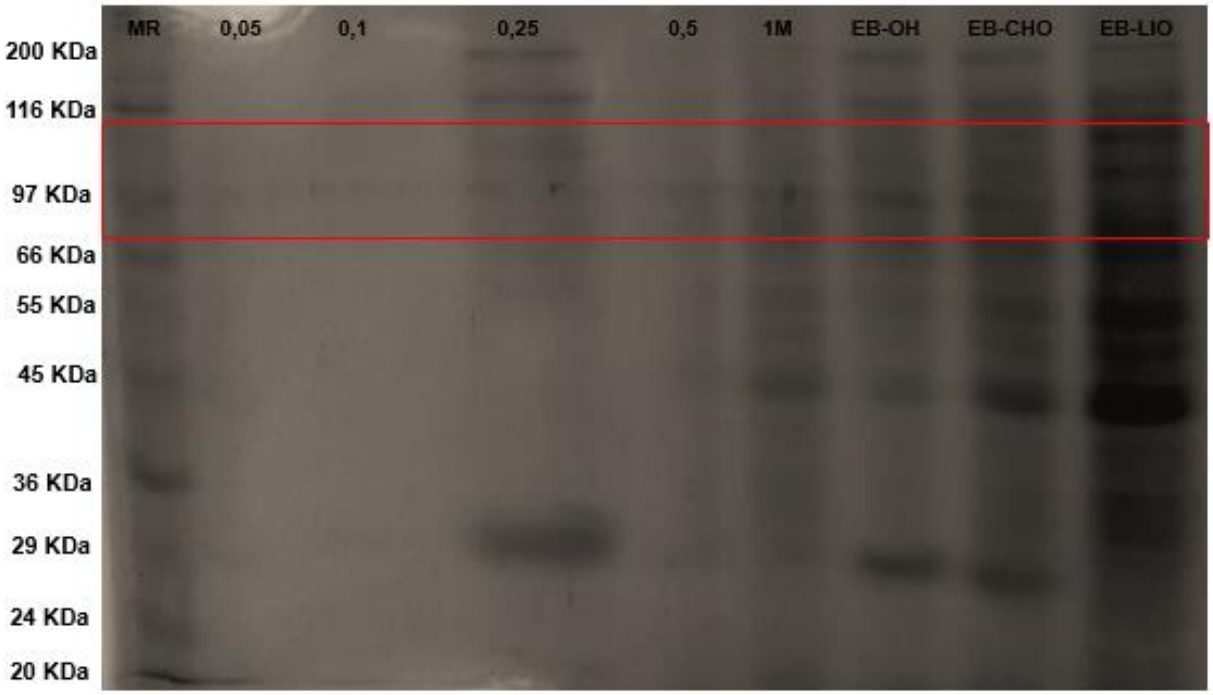


Figura 3.8 - Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE **10%**) da inulinase. MR: padrão de massa molecular (Marker Sigma S8445 IVL); Purificação DEAE-Sephacel (NaCl: 0,05-1M); EB-OH: Extrato bruto concentrado com álcool; EB-CHO: Concentrado com acetona; EB-LIO: Concentrado por liofilização.

A enzima produzida por *Aspergillus niger* isolado de araçá-boi apresentou uma massa molar aparente de 97 kDa, similar ao reportado por Zhang *et al.* (2004), que estudaram uma exo-inulinase de 83 kDa a partir de *Aspergillus niger* AF10 e por Holyavka *et al.* (2014) com uma exo-inulinase de *Aspergillus niger* (102 ± 4 kDa).

No entanto, e conforme os resultados citados por vários autores (Tabela 3.10) o tamanho da inulinase varia entre 20 e 250 kDa aproximadamente, e está influênciado pela fonte (microrganismo), tipo (exo o endoinulinase) e processo de purificação (Informação não mostrada).

Nesta revisão bibliográfica o gênero *Aspergillus* apresenta uma variação de massa molecular entre 40 e 176,5 kDa, e a espécie *Aspergillus niger* entre 55,9 e 106 kDa.

Tabela 3.10 - Análise comparativa de SDS-PAGE de inulinases de vários microrganismos.

Autor	Microrganismo	Inulinase	Tamaño kDa
Kushi *et al.* (2000)	*Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*	Exo	57 e 77
Cho e Yun (2002)	*Xanthomonas oryzae No.5*	Endo	139
Gill *et al.* (2004)	*Aspergillus fumigatus*	Exo	176,5
Zhang *et al.* (2004)	*Aspergillus niger AF10*	Exo	83
Gill *et al.* (2006)	*Aspergillus fumigatus*	Exo	62
Sharma e Guill (2007)	*Streptomyces sp*	Exo	45
Chen *et al.* (2009)	*Aspergillus ficuum*	Exo	70
		Endo	40 e 46
Chi *et al.* (2009)	*Aspergillus niger* AF10	Exo	55,9
Coitinho *et al.* (2010)	*Aspergillus terreus CCT4083*	Exo	57
Fawzi E.M. (2011)	*Aspergillus foetidus*	Exo	78
Kumar *et al.* (2011)	*Aspergillus niger MTCC 1344*	Exo	63,8
Holyavka *et al.* (2014)	*Aspergillus niger*	Exo	102 ± 4
Garuba (2018)	*Aspergillus tamarii-U4*	Exo	66
Temkov *et al.* (2018)	*Bacillus sp*	Exo	24 e 56
Germec e Turhan (2020)	*Aspergillus niger A42 (ATCC 204447)*	Exo	60-70
Trapala *et al.* (2020)	*Kluyveromyces marxianus*	Exo	256
Li *et al.* (2021)	*Aspergillus niger (I6285)*	Endo	66 e 57
Rawat *et al.* (2021)	*Aspergillus niger NFCCI 2426*	Exo	64

3.4 Imobilização da inulinase

Os extratos enzimáticos da IE e II do fungo No.3, assim como a IE do controle, purificados com resina DEAE foram imobilizados em grafeno oxidado (GO). A imobilização da inulinase no suporte foi acompanhada pela diferença de teor de proteína residual no sobrenadante da solução (Figura 3.9). A queda da concentração de proteína indicou que a enzima estava sendo imobilizada. Após 180 minutos a II e IE do fungo No. 3 e IE do controle ligaram-se ao suporte, com rendimentos de imobilização de 90, 88 e 77% respectivamente e com 100% de atividade recuperada.

Não foram encontrados registros de uso de GO para imobilização de inulinase, no entanto, tem sido amplamente usado como suporte para imobilização de outras enzimas (ZHANG et al., 2010; ZHOU et al., 2012; HERMANOVA et al., 2015; PATEL et al., 2016; BOLIBOK et al., 2017; CARCELLER et al., 2019). Comparando os resultados deste trabalho com Carceller *et al.* (2019), conseguiram de forma rápida (3h) e completa (100%) imobilizar naringinase em GO e atribuíram

ao fato de que possivelmente no grafeno oxidado os grupos carboxílicos e epóxidos estejam acompanhados de interações não específicas (Van der Waals, pontes de hidrogênio), contribuindo com a estabilização da enzima na superfície.

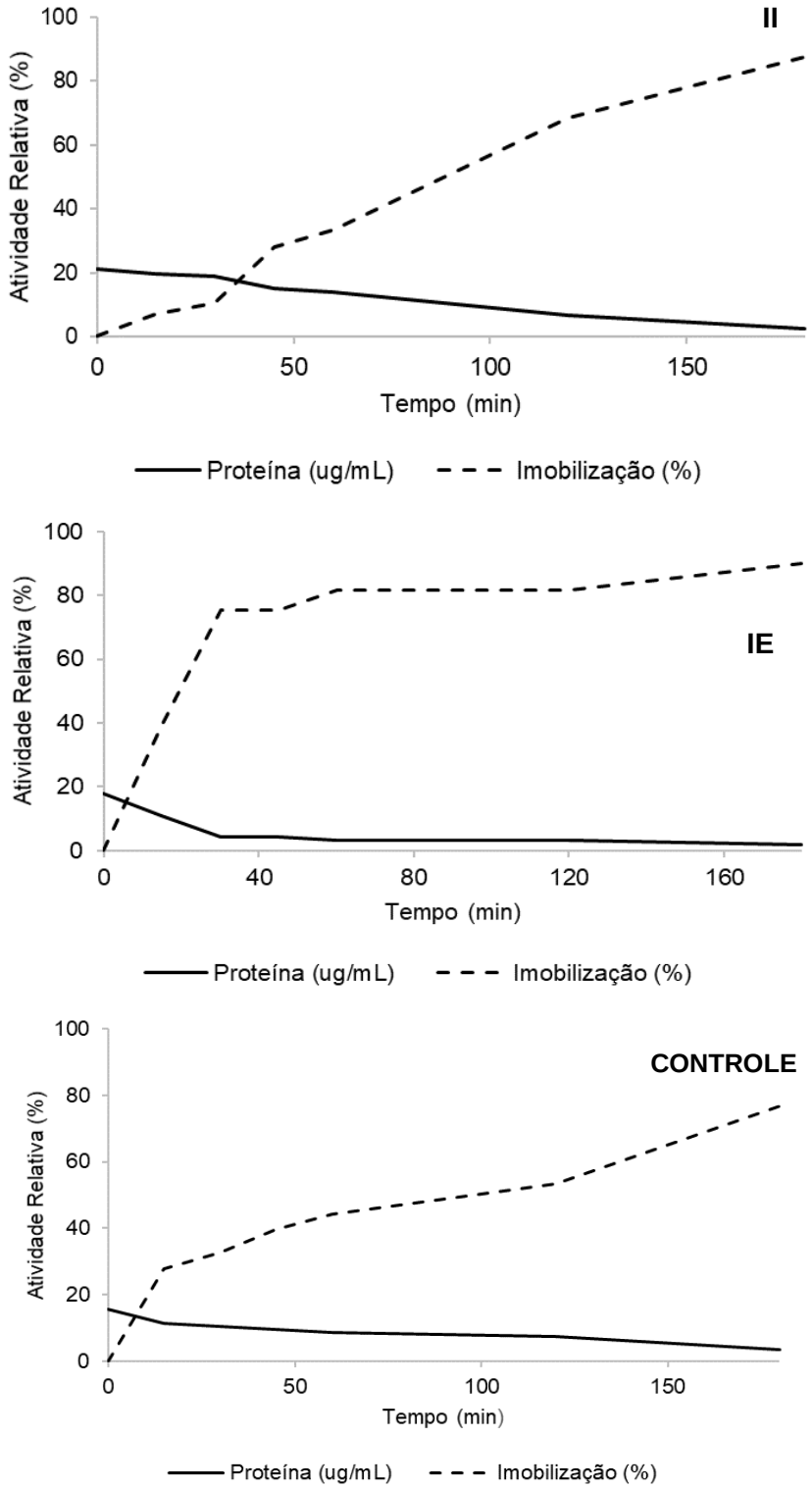


Figura 3.9 - Imobilização inulinase em grafeno oxidado. II: Inulinase intraceluar de *A. niger* (Morfotipo No. 3); IE: Inulinase extraceluar de *A. niger* (Morfotipo No. 3); Controle: IE *A. niger* ATCC 16888.

Vários suportes têm sido usados para imobilizar a inulinase. Para enzimas extraídas do gênero *Aspergillus* podemos citar os trabalhos de Ettalibi e Baratti (2001) com uma inulinase de *A. ficuum* que foi imobilizada em vidro poroso, que reteve 70-77% da atividade enzimática. Esses dados podem ser comparados com inulinase de *A. fumigatus*, que mostrou 100% de retenção de atividade quando imobilizado em quitina, caseína e alginato de sódio (GUILL et al., 2006). Uma endoinulinase extraída de *A. niger* e imobilizada em quitina por Nguyen *et al.* (2011) apresentou um rendimento de 66%. Santa *et al.* (2011) com uma exo-inulinase obtida de *A. niger* conseguiram 80% de atividade ao usar como suporte Sol-gel. Usando partículas de quitosana para imobilizar inulinase obtida de *A. tubingensis*, Trivedi *et al.* (2015) apresentaram um rendimento de 85%. Paripoorani *et al.* (2015) a partir de *A. niger* imobilizou uma exo-inulinase em micropartículas de quitosana conseguindo um 81% de atividade. A exo-inulinase de *A. tamarii-U4* foi imobilizada na argila de caulim pelo método de imobilização reticulada usando glutaraldeído como agente quelante com 66% de rendimento (GARUBA e ONILUDE, 2018). Torabizadeh *et al.* (2018) usando nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 funcionalizadas com hidrolisados de glúten de trigo imobilizaram inulinase de *A. niger* com um rendimento de imobilização de 80%. Rawat *et al.* (2021) com uma inulinase obtida de *A. fumigatus* e usando alginato de sódio como suporte para o processo de imobilização conseguiram rendimentos de 80%. Um teste adicional foi realizado para verificar o tipo de união enzima-suporte. Usando NaCl a diferentes concentrações (0,05 M; 0,1 M; 0,25 M; 0,5M e 1M) foi confirmado se a imobilização da inulinase foi através de ligação covalente (Tabela 3.11). Os valores foram negativos para as concentrações entre 0,05 e 0,25M e positivos (valores baixos) nas concentrações de 0,5 e 1M, indicando provavelmente uma ligação covalente.

Tabela 3.11 Teste de dessorção de inulinase do GO em gradiente de sal

NaCl	% Proteína imobilizada	Proteína liberada (ug/mL)	% Proteína dessorvida
0,05 M	100	0	0
0,1 M	100	0	0
0,25 M	100	0	0
0,5 M	100	0,01	0
1,0 M	100	0,09	0

Nota: Teste realizado com imobilizado de IE de *Aspergillus niger* (Morfotipo No.3).

3.4.1 Reuso dos derivados

Para cada derivado foram realizados treze ciclos de reuso consecutivos com respectiva medida da atividade enzimática ao final de cada reação (Figura 3.10). A II do fungo No. 3 foi estável até o ciclo sete mantendo 100% da sua atividade, no caso da IE até dez ciclos com uma taxa de hidrólise da inulina constante de 90%. No caso da IE do controle, esta apresentou atividade hidrolítica até o ciclo sete com retenção de 80% de atividade. Para inulinase extraída de *A. niger* e imobilizada em micropartículas de quitosana, Paripoorani *et al.* (2015) demonstraram que para o ciclo número 8 a enzima apresentava 50% de atividade e após 15 ciclos caiu para 0%; Kuhn *et al.* (2016) estudando uma inulinase de *A.niger* imobilizada em espuma de poliuretano conseguiram após 24 ciclos de reuso uma atividade de 49%; Torabizadeh *et al.* (2018) usando nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 funcionalizadas com hidrolisados de glúten de trigo imobilizaram uma exo-inulinase de *A.niger* com um 80% de atividade após 10 ciclos.

Comparando este estudo com trabalhos que usaram GO como material de suporte para imobilizar enzimas, são apresentados os autores Patel *et al.* (2016) que usando a enzima lacase conseguiram manter uma atividade relativa de 80% até o ciclo número dez.

Outras publicações relacionadas com número de ciclos (Reusos) e produção de frutose usando inulinase imobilizada em diferentes suportes, foram citados por Kim *et al.* (1997) que trabalhando com uma enzima obtida de *A. niger*, usando chicória como substrato e Sol-gel como material de suporte, conseguiram após 29 ciclos de reuso uma produção de 47 $g.L^{-1}$ de frutose em 24 horas; Singh *et al.* (2007) usando uma inulinase extraída de *K. marxianus*, inulina pura e Duolite A568 como material de imobilização, alcançaram rendimentos de 40,2 $g.L^{-1}$ com 55 ciclos e Santa *et al.* (2011) usando chicória como substrato, inulinase de *A. niger* e partículas magnéticas de Sol-gel arranjaram em 29 ciclos uma produção de 46 $g.L^{-1}$ de frutose em 24 horas.

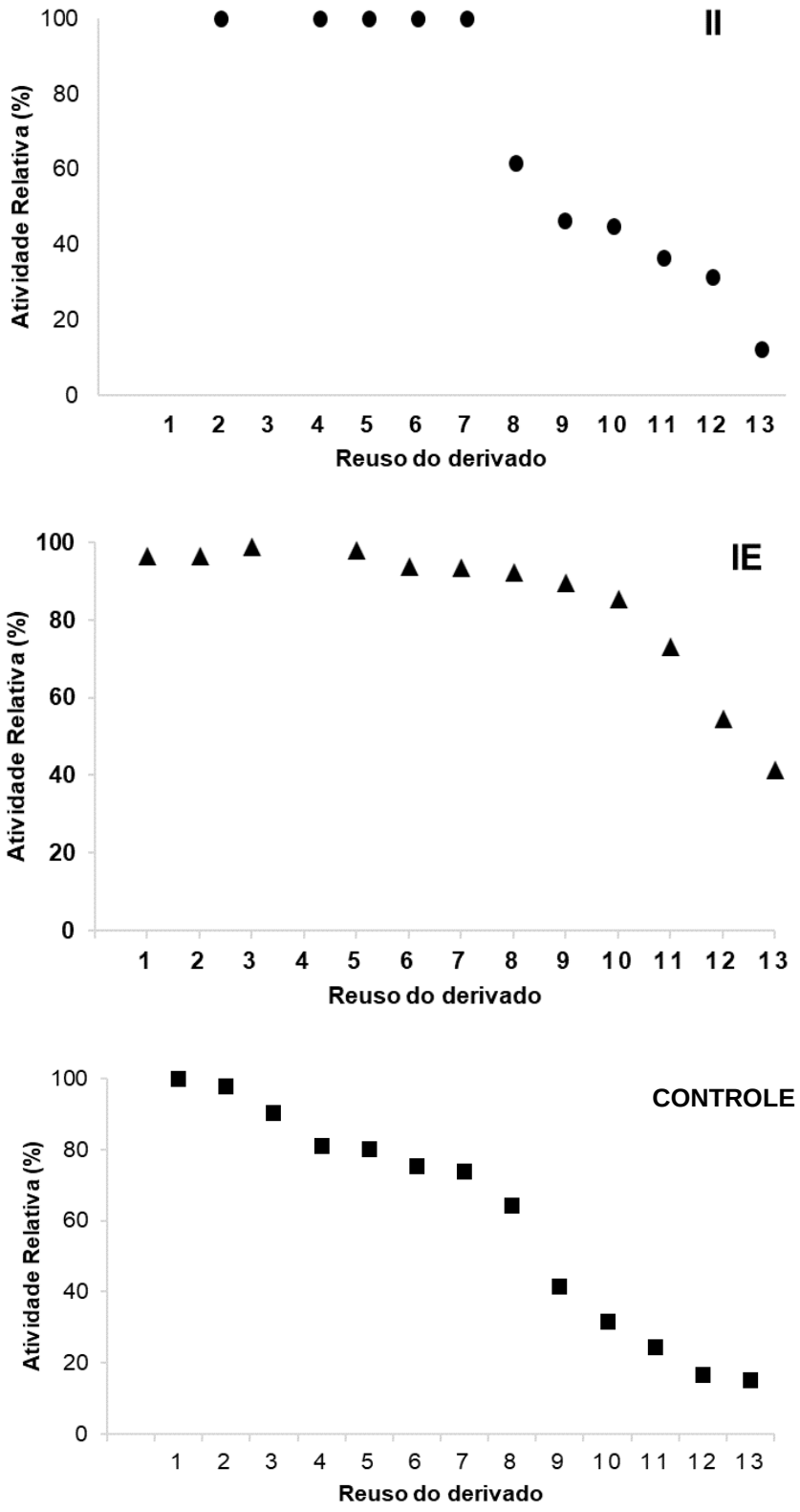


Figura 3.10 - Hidrólise da inulina pela inulinase imobilizada em grafeno oxidado. II: Inulinase Intracelular de *A. niger* (Morfotipo No. 3); IE: Inulinase extraceluar de *A. niger* (Morfotipo No. 3); Controle: IE ATCC 16888 *Aspergillus niger*.

3.5 Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada

Neste estudo a fração (0,25M de NaCl) que apresentou maior atividade enzimática no processo de purificação parcial com resina DEAE-Sephacel foi denominada inulinase livre e após o processo de imobilização em gafeno oxidado, inulinase imobilizada. A partir destas amostras foram realizadas as caracterizações bioquímicas da II, IE e controle como descrito a continuação.

3.5.1 Determinação do pH ótimo (enzima livre e imobilizada)

Os resultados do pH ótimo da II, IE e controle da enzima livre e imobilizada é apresentada na figura 3.11. Como mostrado, o pH 4,5 foi o que apresentou a máxima atividade enzimática total para todas as enzimas avaliadas, e se manteve após a imobilização com grafeno oxidado. Esses resultados são comparáveis com relatos da literatura que relatam valores entre 4,5 e 6,0 para fungos e leveduras (PANDEY et al., 1999; SINGH et al., 2007; CHEN et al., 2009; KUMAR et al., 2011; TRIVEDI et al., 2015; RAWAT et al., 2021).

Como é apresentado na tabela 3.12 o pH ótimo de 4,5 para inulinase livre foram relatados por vários autores, entre os quais podem ser encontrados: Cruz *et al.* (1998) para exo-inulinase de *A. niger*; Zhang *et al.* (2004) com exo-inulinase de *A. niger*; Catana *et al.* (2005), exo-inulinase de *A. niger*; Rocha *et al.* (2006) com exo-inulinase de *A. niger*; Chen *et al.* (2009), exo-inulinase de *A. ficuum*; Nguyen *et al.* (2011) com endoinulinase de *A. niger e* Garuba e Onilude (2018) com exo-inulinase de *A. tamarii.*

Também pode ser observado na tabela que a enzima imobilizada apresenta comportamento variável de pH (4,0-6,0), prevalecendo a têndencia a aumentar o pH após o processo de imobilização. Geralmente, após o processo de imobilização com ligações covalentes, algumas propriedades da enzima como pH e temperatura mudam. Os resultados do presente estudo, para enzima livre e imobilizada são comparáveis com Garuba e Onilude (2018) que conseguiram um valor de pH de 4,5 para enzima livre e 4,5 para enzima imobilizada.

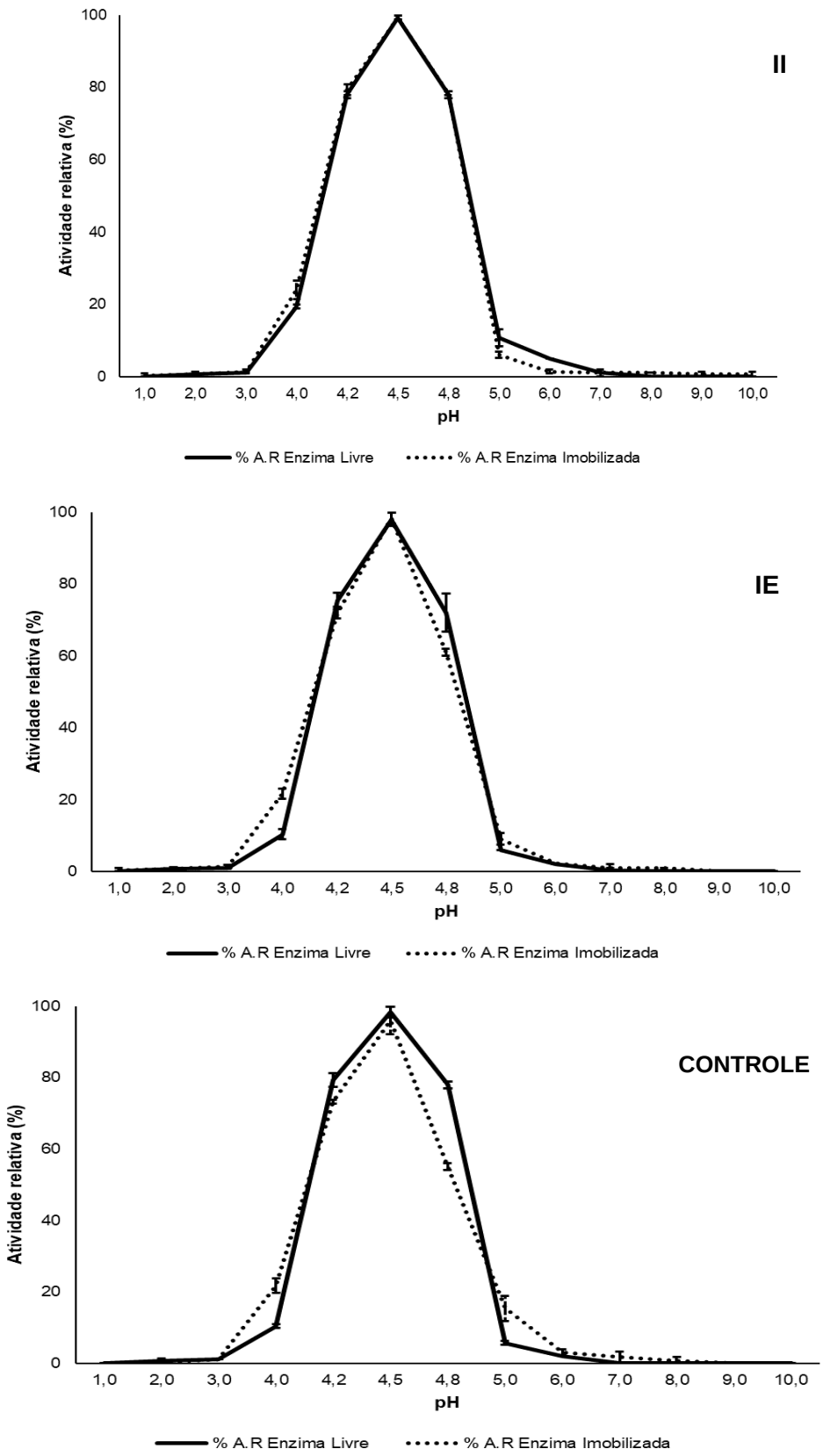


Figura 3.11 - pH ótimo inulinase livre e imobilizada em grafeno oxidado. II: Inulinase Intracelular de *A. niger* (Morfotipo No. 3); IE: Inulinase extraceluar de *A. niger* (Morfotipo No. 3); Controle: *Aspergillus niger* ATCC 16888.

3.5.2 Determinação da temperatura ótima (enzima livre e imobilizada)

O efeito da temperatura sobre a enzima livre e imobilizda da II, IE e controle foram avaliados na faixa de 10 a 100 ºC.

A II livre e imobilizada foi ativa a 50 ºC e 60 ºC, respectivamente (Fig. 3.12). No caso da IE do fungo No.3 e controle, a temperatura ótima para a inulinase livre foi de 60 ºC, enquanto a imobilizada apresentou maior atividade a 70 ºC. Como é apresentado na figura, uma atividade aumentada foi observada com a inulinase imobilizada em comparação com a inulinase livre.

A variação no ótimo da temperatura da enzima livre e imobilizada pode ser devido ao efeito protetor do grafeno oxidado após a imobilização (ligações covalentes entre a enzima e o suporte), protegendo a conformação do sitio ativo do desdobramento térmico. Esa estabilidade aprimorada em temperaturas elevadas é vantajoso na indústria para produção a grande escala, pois permite maior solubilidade da inulina (substrato) e menor contaminação microbiana (DE PAULA et al., 2008; GARUBA e ONILUDE, 2018; SURYAWANSHI et al., 2019).

Estudos semelhantes a este trabalho foram descritos por Nguyen *et al.* (2011) que relataram a imobilização em quitina de uma endoinulinase de *A.niger* com mudança de temperatura ótima de 60 ºC (enzima livre) para 65 ºC; Housseiny (2014) encontraram em uma imobilização de *A. niger* AUMC 9375 em grânulos de alginato de Ca um aumento na temperatura ótima de 50 ºC (enzima livre) para 60 ºC. Paripoorani *et al.* (2015) com uma exo de *A. niger* imobilizada em micropartículas de quitosana conseguiram temperauras ótimas de 50 ºC para enzima livre e 70 ºC para enzima imobilizada. Em outro estudo, a inulinase comercial de *A. niger* imobilizada em alginato de cálcio tinha temperatura ótima de 45 a 50 ◦C para enzima livre e imobilizada respectivamente (HANG et al., 2018). Da mesma forma, a inulinase obtida de *A. niger* mostrou mudança na temperatura ótima após a imobilização em nanopartículas magnéticas funcionalizadas (45 ◦C) em comparação com a enzima livre (40 ◦C) (TORABIZADEH et al., 2018). O máximo de atividade para exo inulinase de *Aspergillus fumigatus* imobilizada em alginato de sódio foi relatado por Rawat *et al.* (2021) com um valor de 60 ºC para enzima livre e 65 ºC para a imobilizada. No entanto, como é resumido na tabela 3.12, o aumento da temperatura com o processo de imobilização não é universal para todas as enzimas, bem como para todos os métodos de imobilização.

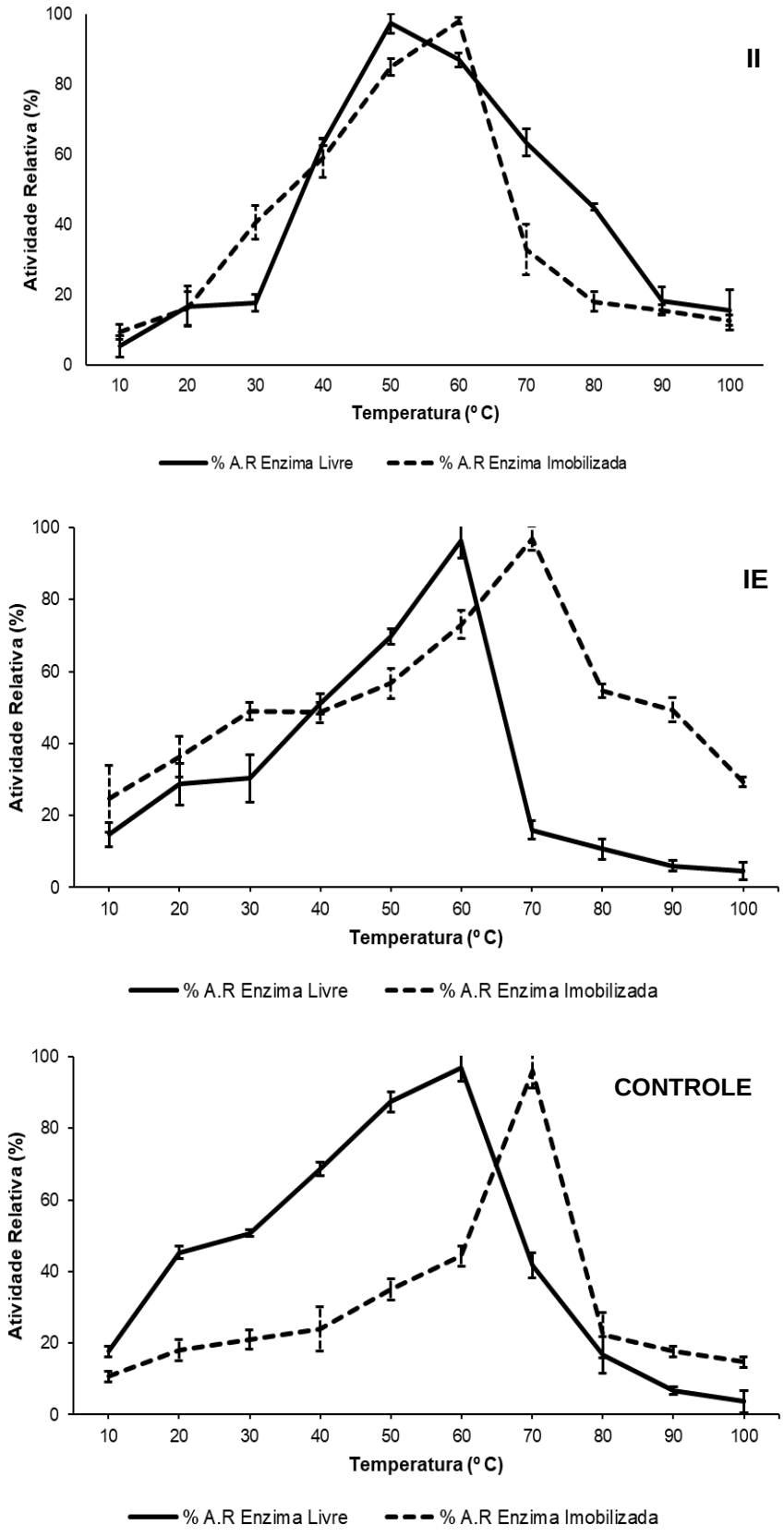


Figura 3.12 - Temperatura ótima inulinase livre e imobilizada em grafeno oxidado. II: Inulinase intracelular de *A. niger* (Morfotipo No. 3); IE: Inulinase extraceluar de *A. niger* (Morfotipo No. 3); Controle: IE de *Aspergillus niger*.ATCC 16888.

3.5.3 Determinação dos parâmetros cinéticos (enzima livre e imobilizada)

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram determinados medindo a inulinase livre e imobilizada (II, IE, controle) em diferentes concentrações de inulina (0,1%-3%) e ajustando os dados experimentais ao modelo de Michaelis-Menten com o gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 3.13). Como pode ser observado na tabela 3.12 os valores de K_m obtidos para II, IE e cotrole da enzima livre foram 874 $mg.mL^{-1}$, 146 $mg.mL^{-1}$ e 296 $mg.mL^{-1}$ respectivamente e para enzima imobilizada 24 $mg.mL^{-1}$, 5,2 $mg.mL^{-1}$ e 6,7 $mg.mL^{-1}$. A V_{max} da enzima livre para II, IE e controle foram respectivamente 896 $U.mg^{-1}$, 464 $U.mg^{-1}$, 321 $U.mg^{-1}$ e para enzima imobilizada 269 $U.mg^{-1}$, 40 $U.mg^{-1}$, 59 $U.mg^{-1}$. Os resultados indicaram uma redução nos parâmetros cinéticos para a enzima imobilizada o que atribui uma maior afinidade pelo substrato (inulina) ocasionado pela posição do sítio ativo (mudanças conformacionais, propriedade alostéricas e dissociação de subunidades) devido a proximidade entre a enzima e o suporte (GILL et al., 2006; YEWALE et al., 2013; GARUBA e ONILUDE, 2018).

Redução semelhante nos parâmetros cinéticos da inulinase após o processo de imobilização foi relatado por Gill *et al.* (2006) para inulinase de *A. fumigatus* imobilizada em quitina com valores de K_m para enzima livre (1,30 mM) e imobilizada (0,36 mM); Rocha *et al.* (2006) trabalhando com *A. niger* imobilizado em Amberlite IRC conseguiram valores de K_m para enzima livre de 153 $g.L^{-1}$ e 108 $g.L^{-1}$ para enzima imobilizada; Trivedi *et al.* (2015) expressando os resultados nas mesmas unidades experimentais do presente estudo, encontrararam para exo-inulinase de *A. tubingensis* imobilizada em quitosana um valor de K_m para enzima livre (8,3 mg/mL) e imobilizada de (7,4 mg/mL) e Garuba e Onilude (2018) partindo de uma exo-inulinase de *Aspergillus tamarii-U4* imobilizada em argila de caulim conseguiram um K_m de 0,39 mM e 0,37 mM para enzima livre e imobilizada respectivamente. Os autores também citaram valores de V_{max} da enzima livre (4,21 µmol/min) e imobilizada (4,01 µmol/min).

No entanto, como pode ser observado na tabela 3.12 outros autores (PARIPOORANI et al., 2015 e HANG, 2018) com trabalhos similares, mostraram que o K_m da inulinase imobilizada foi maior do que a enzima livre indicando sua menor afinidade para o substrato, provavelmente devido à resistência à transferência de massa para o substrato na matriz de polímero, mudanças configuracionais na

estutura, interação covalente ou ocupação de sítios ativos (IBRAHIM et al., 2016; AHMED et al., 2019; RAWAT et al., 2021)

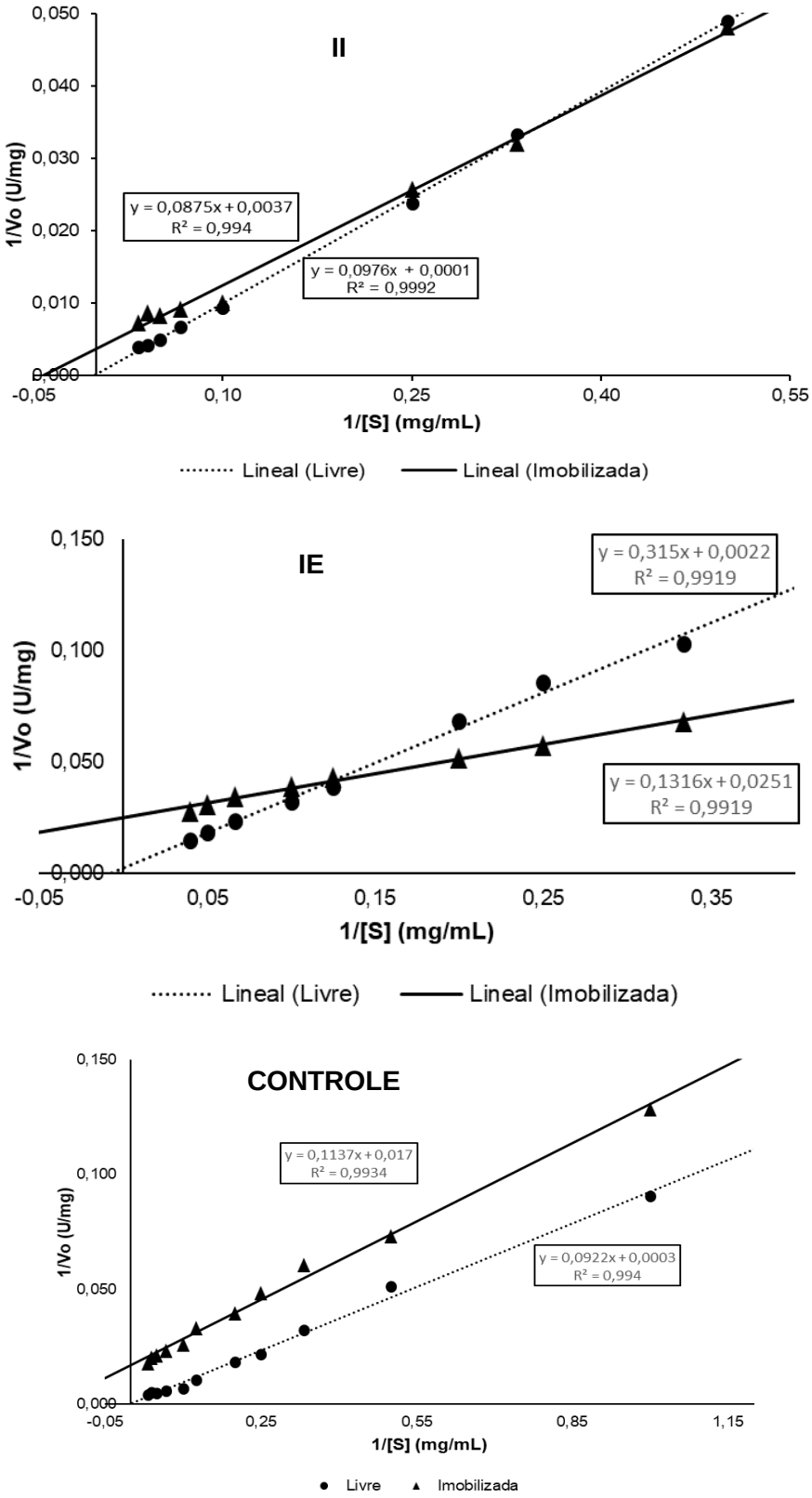


Figura 3.13 - Determinação do km da inulinase livre e imobilizada. II: Inulinase intracelular de *A. niger* (Morfotipo No. 3); IE: Inulinase extraceluar de *A. niger* (Morfotipo No. 3); Controle: *Aspergillus niger* ATCC 16888.

Tabela 3.12 - Caracterização bioquímica da II, IE e controle (livre e imobilizada) e comparados com trabalhos do gênero *Aspergillus.*

Autor	Fonte	Inulinase	Substrato	pH		Tº (ºC)		K_m		V_{max}	
				Livre	Imob	Livre	Imob	Livre	Imob	Livre	Imob
Presente estudo	*A. niger*	Endo	Inulina	4,5	4,5	50	60	874 mg/mL	24 mg/mL	896 U/mg	269 U/mg
	Fungo No.3	Exo	Inulina	4,5	4,5	60	70	146 mg/mL	5,2 mg/mL	464 U/mg	40 U/mg
	A. niger ATCC	Exo	Inulina	4,5	4,5	60	70	296 mg/mL	6,7 mg/mL	321 U/mg	59 U/mg
Cruz (1998)	*A. niger 245*	Exo	Inulina	4,0-4,5	-	60	-	1,44 mM	-	10,48 mM/min	-
Ettalibi (2001)	*A. ficuum*	Exo	Sacarose	4,7	5,0	60	-	0,06 M	-	192 U/g	-
Zhang (2004)	*A. niger*	Exo	Inulina	4,5	-	55	-	2,57 mM	-	-	-
Catana (2005)	*A. niger*	Exo	Sacarose	4,5	4	60	50-60	82 mM	184 mM	-	-
Gill (2006)	*A. fumigatus*	Exo	Inulina	5,5	6,5	60	-	1,25 mM	-	-	-
Rocha (2006)	*A. niger*	Exo	Inulina	4,5	5,5	55	50	153 g/L	108 g/L	-	-
Chen (2009)	*A. ficuum*	Exo	Inulina	4,5	-	45	-	25,3 mg/mL	-	-	-
		Endo		5,0	-	45	-	14,8 mg/mL	-	-	-
Coitinho (2010)	*A. terréus*	Exo	Inulina	4,0	-	60	-	11 mM	-	18,5 mM/min	-
Kumar (2011)	*A. niger 1344*	Exo	Inulina	4,6	-	60	-	0,89mg/mL	-	17,3 mM/min	-
Nguyen (2011)	*A. niger*	Endo	Inulina	4,5-5,0	5,5-6,0	60	65	2,0 %	2,2%	-	-
Housseiny2014)	*A. niger AUMC*	Endo	Inulina	5,0	5,0	50	60	-	-	-	-
Paripoorani (2015)	*A. niger*	Exo	Inulina	6	4,5	50	70	24,2 mg/L	35,5 mg/L	6,25 µmol/min	5,63 µmol/min
Trivedi (2015)	*A. tubingensis*	Exo	Inulina	5	5	60	60	8,3mg/L	7,4 mg/L	-	-
Garuba (2018)	*A. tamarii-U4*	Exo	Inulina	4,5	4,5	65	65	0,39 mM	0,37 mM	4,21 µmol/min	4,01 µmol/min
Hang (2018)	*A. niger*	Exo	Inulina	5,0	5,5	45	50	57,6 mg/L	65,8 mg/L	5,24 µmol/min	4,32 µmol/min
Torabizadeh	*A. niger*	Exo	Inulina	6,0	5,5	40	45	-	3,52 mg/L	-	25 U/mg
Germec (2020)	*A. niger*	Exo	-	-	-	-	-	49,4mg/mL	-	-	-
Rawat (2021)	*A. fumigatus*	Exo	Inulina	6	-	60	65	5,88 mM	-	1,66 µmol/min	-

3.6 Influência do armazenamento na atividade da inulinase livre e imobilizada

Conforme mostrado na figura 3.14, a enzima imobilizada em grafeno oxidado (GO) com 34% de atividade após armazenamento a 6 ºC por 30 dias apresentou uma maior estabilidade em comparação com a enzima livre (7%). A meia-vida da atividade da inulinase imobilizada foi estimada como 26 dias e para a enzima livre 19 dias. Esses dados podem ser comparados com a inulinase de *A. fumigatus* imobilizado em quitina, QAE-Sephadex e ligada à ConA esferas de sílica ativadas por amino, que exibiram meia-vida de 35, 22 e 45 dias, respectivamente (Gill et al., 2006); De Paula *et al.* (2008) conseguiram manter 58% de atividade em 33 dias ao imobilizar em gelatina uma exo-inulinase obtida de *K. marxianus* var. *bulgaricus*; A partir de *A. niger* Nguyen *et al.* (2011) alcançaram a imobilizar uma endoinulinase em Quitina e manter em 33% seu processo de hidrólise durante 60 dias e com uma meia vida de 48 dias; Altunbas *et al.* (2013) usando criogel para imobilizar inulinase de *A. niger*, conseguiram em 45 dias uma atividade de 15% para enzima livre e 20% para enzima imobilizada com um tempo de meia vida de 7 dias (60%) e 15 dias (60%) respectivamente; Silva *et al.* (2013b) a partir de inulinase de *A. niger* conseguiram em 59 dias manter 49,7% de atividade usando como suporte de imobilização espuma de poliuretano; Paripoorani *et al.* (2015) em 20 dias conseguiram demonstrar uma estabilidade de 26% e 113% para enzima livre e imobilizada em micropartículas de quitosana de inulinase obtida a partir de *A.niger*; Karimi *et al.* (2016) encontraram um tempo de meia vida de 9 e 19 dias para enzima livre e imobilizada em sílica de uma inulinase extraída de *A.niger*; Garuba e Onilude (2018) com uma exo-inulinase obtida a partir de *A. tamarii*-U4 conseguiram em 30 dias demostrar uma atividade de 22% para imobilizado em argila de caulim e 0% para a enzima livre. Um trabalho de Zhou *et al.* (2012) usando GO como suporte para imobilizar Glicose oxidase, comprovaram em uma avaliação de 33 dias uma estabilidade de 65% para enzima livre e 86% para enzima imobilizada.

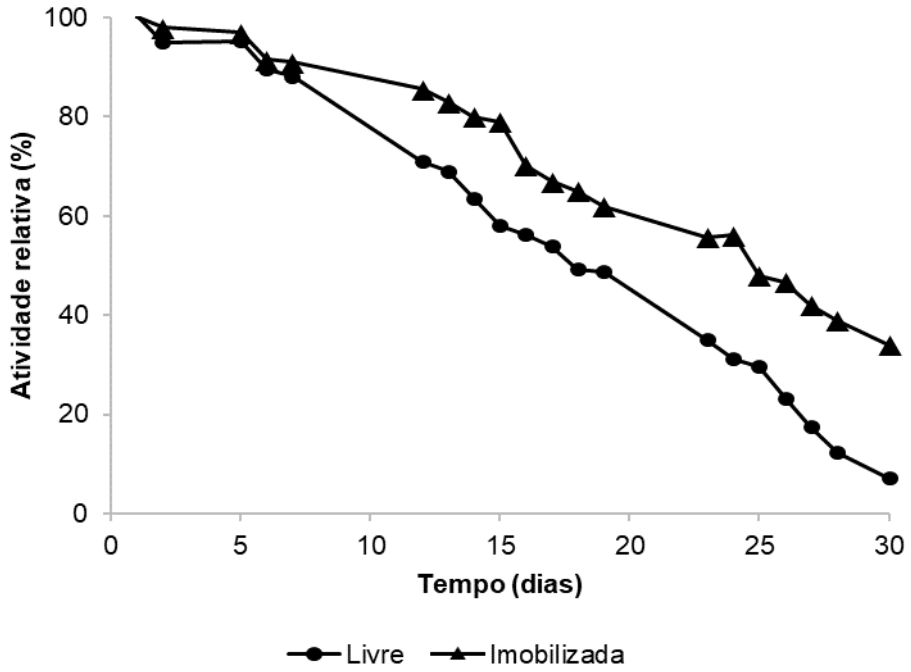


Figura 3.14 Avaliação da estabilidade a 6 ºC da inulinase extraceluar livre e imobilizada de *A. niger* (morfotipo no. 3)

4 conclusões

As inulinases intra e extracelular produzidas pelo fungo nativo *Aspergillus niger* (Morfotipo No. 3) isolado de araçá-boi (*Eugenia stipitata McVaugh*) e fungo comercial (controle), apresentaram atividade enzimáticas totais e especificas comparáveis ou superiores a dados encontrados em referências bibliográficas.

A produção, por fermentação submersa, usando um meio de cultura (M2) com inulina como fonte de carbono principal é eficiente para a produção dessas enzimas.

Ao comparar os métodos de concentração enzimática, com acetona e liofilização são eficientes e equivalentes quanto à atividade enzimática total.

A enzima obtida do fungo comercial e do fungo nativo foram purificadas parcialmente com etapas simples, e aumentada sua atividade após esse processo.

As inulinases imobilizadas em grafeno oxidado (GO) mostraram aproximadamente 85,0% de atividade retida e com reuso do derivado de até 10 ciclos com aproximadamente 90% de atividade enzimática.

A caracterização parcial da enzima revelou que é relativamente estável em uma ampla faixa de pH e temperatura. Além disso, a enzima extracelular (IE) obtida do fungo nativo, e a imobilizada, tiveram uma maior temperatura ótima do que a enzima livre, pH de 4,5, K_m igual a 5,2 $mg.mL^{-1}$ demonstrando maior afinidade pelo substrato e com um tempo de meia vida de 26 dias, tornam esta forma imobilizada um candidato potencial para produção de xaropes com alto teor de frutose em larga escala a partir de inulina com a possibilidade de operar continuamente a 60 ºC para hidrólise de substrato e evitar contaminação microbiana.

O suporte inorgânico (GO) é uma matriz promissora para imobilização covalente de inulinase desde o ponto de vista de retenção de atividade, ao custo-benefício no processo de imobilização e a opção de vários reusos, o que proporciona um grande potencial em processos biotecnológicos industriais.

Considerações finais

O legado majoritário desta Tese, embora não original, tem seu ineditismo por prospectar microrganismos, *in situ*, no macrobioma Amazônico, nesse caso específico em território colombiano. A afirmativa de não ser original não reduz o mérito da ideia, nem dos achados, apenas autodeclara que se trata de uma Tese que tem uma pergunta de pesquisa e métodos de pesquisa também abordado por outros trabalhos. A contribuição inédita está consubstanciada nos materiais em que os microrganismos foram prospectados e nas consequências dessa prospecção. Ressalta-se que isso é relevante, tendo em vista que um dos biomas mais citados e visados no planeta é o Bioma Amazônico, mas que, de fato, os trabalhos *in situ* ainda ficam aquém dos textos teóricos amplamente disponíveis. É nesse contexto que esse trabalho foi realizado, buscando validar, de modo experimental biológico, o potencial genético existente.

Para isso, usaram-se materiais vegetais nativos do bioma (cupuaçu, araçá-boi e cubiu), na expectativa de que pudessem ser suporte de microrganismos de interesse tecnológico. O yacon, rico em inulina, nativo da região Andina, foi um indutor chave na produção e classificação dos microrganismos. Este fato abre a possibilidade de orientar futuros trabalhos direcionados para identificação e caracterização de material vegetal rico em inulina ainda não explorado que poderia ser encontrado na região Amazônica.

Para a identificação fenotípica optou-se pelo uso do kit comercial API 20CAUX®, que, embora receba críticas quanto à exatidão, foi eficiente (concordância de 50 % com os estudos moleculares) e essencial no direcionamento do projeto na perspectiva de screening de microrganismo para a produção da enzima inulinase.

A levedura *Cândida guillermondii* identificada com código API No. 21, que não teve estudo aprofundado nesta Tese, pode ser usada para futuros estudos por sua facilidade de produção e poder fermentativo.

O fungo No. 3, identificado como *Aspergillus niger* (GenBank XM025599236.1), tem potencial para produzir inulinase com atividades enzimáticas equivalentes ou superiores a outros estudos, mesmo apresentando

baixa expressão de genes INU. O estudo demonstra, também, o potencial do fungo para produzir outras enzimas como a *beta-glicosidase, galactosiltransferase, glicosiltransferase* e *invertase* com potencial de estudo para outros fins industriais. Essa afirmativa é feita com base no estudo de transcriptômica, mas ainda é uma hipótese, já que, nem sempre uma maior expressão transcricional representa uma maior expressão fisiológica.

Enzimas intra e extracelulares foram estudadas. A fração extracelular apresentou melhores características bioquímicas e uma maior estabilidade de armazenamento (a 6 ºC) tanto na forma livre e quanto imobilizada. O suporte grafeno oxidado foi adequado para ligar covalentemente as enzimas inulinases.

Por fim, essa Tese entrega à comunidade científica um descritivo experimental relativamente aprofundado de um microrganismo (*Aspergillus niger*) isolado no Bioma Amazônico, com potencial de produção de inulases, com boa atividade enzimática na forma livre e imobilizada. Também, um descritivo transcriptômico desse fungo, em dois momentos de fermentação submersa. No entanto, esses resultados ainda precisam ser validados. Complementarmente, a Tese entrega às Instituições colombianas parceiras outros microrganismos, não GRAS, a serem estudados.

Referências bibliográficas

ACEVEDO B, NAVARRO E, CONSTANTINO C, GIL P, BENAVIDES M. Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca del café y su uso en PCR. **Cenicafé**, v. 58, n. 2, p. 134-141, 2007.

ACIOLI A, COSTA G, MOURA T, GUIMARAES M, ALMEIDA R, MIRANDA J. Entomofauna associada ao cultivo do cubiu (*Solanum sessiliflorum Dunal)* no município de Benjamin Constant, Amazonas, Brasil. **EntomoBrasilis**. v.7, n.2, p.99-105, 2014.

ADEEL M, BILAL M, RASHEED T, SHARMA A, IQBAL H. Graphene and graphene oxide: Functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1430-1440, 2018.

ADRIANO, W.S.; MENDOÇA, D.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E.; GIORDANO, R. L. C. Improving the properties of chitosan as support for the covalente multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**. v.9, n.1, p.2170-9, 2008.

AGRIOS, N., G. **Fitopatología**. México: Limusa. P. 324- 337, 726. 2005

AGUADO A.L. **Análisis molecular, modificación funcional y producción de enzimas susceptibles de ser utilizadas en la síntesis de fructooligosacáridos**. 2011. Tesis Doctorado, Universidad de Valencia, Valencia. 2011.

AHMED, S. A., SALEH, S. A. A., ABDEL-HAMEED, S. A. M., & FAYAD, A. M. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of free and immobilized caseinase on mica glass-ceramics. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p.1674, 2019.

ALBERTI, K. G. M. M.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z.; CLEEMAN, J. I. Harmonizing the metabolic syndrome a Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; Internacional Artherosclerosis Society; and International Association for de Study of Obesity. **Circulation**. v. 120, n. 1, p.1640-5, 2009.

ALDANA-PORRAS A, YEPES D, ARANGO W, ARTEAGA J. *Aspergillus niger y Rhizopus oryzae* inmovilizados para la producción de almidón modificado.

Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 2, p. 69-81, 2021.

ALTUNBAS C, UYGUN M, UYGUN D, AKGOL S, DENIZLI A. Immobilization of inulinase on concanavalin A-Attached super macroporus cryogel for production of high-fructose syrup. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 170, p. 1909-1921, 2013.

AMADO A.P. Reacción en cadena de la polimerasa. **Revista archivo médico de Camaguey**, v. 3, n. 2, p. 69-81, 1999.

AMBION. **The basics: RNA isolation**. 2008 Em: http:// www.ambion.com/techlib/basics/rnaisol/index.html#1 (consulta: abril 2020).

AMARU R, PEÑALOZA R, MIGUEZ H, TORRES G, CUEVAS H. UMSAgen, método para la extracción simultânea de RNA y DNA para diagnostico molecular. **Revista Cuadernos**, v. 53, n. 1, p. 38-43, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 20, n. 1, p. 43-48, 2006.

AMORÓS L, et al. **Diálisis y ultrafiltración**. **Bioquímica I**, p. 1-4, 2013.

ANSARI S, HUSAIN Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**. v.30, n.3, p.512-23, 2012.

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, 2014.

ARAGON, C. C. **Imobilização multipontual covalente de xilanases: seleção de derivados ativos e estabilizados**. 2013. 120 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Quimica, Araraquara, 2013.

ARAÚJO, A. C. M. F.; ARAÚJO, W. M. C. Adequação a legislação vigente, da rotulagem de alimentos para fins especiais dos grupos alimentos para dietas com restrição de carboidratos e alimentos para dieta de ingestão controlada de açúcares. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 52, 2001.

ARIAS, C., BURNS, J., FRIEDRICH, L., GOODRICH, R., PARISH, M. Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. **Applied and environmental microbiology**, American Society for Microbiology, vol. 68, n. 4, p. 1955-1961, 2002.

ARMAS, Y.; CAPO, V.; LÓPEZ, L.; MEDEROS, L.; DÍAZ, R. Comparación de tres métodos de extracción de tejidos embebidos en parafina. **Biotecn. Apl**. v.28, p.40-43, 2011.

ARUNA, K.; AMITA, H. Optimization . Optimization of Inulinase Production by Bacillus sp. B51f Isolated from Rhizosphere Soil of *Agave sisalana*. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 2, n. 3, p.161-176, 2014.

ARYUMAN P., LERTSIRI S., VISESSANGUAN W., NIAMSIRI N., A BHUMIRATANA. “Assavanig Glutaminase-producing *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* isolated from Thai soy sauce”. **International Journal of Food Microbiology**, v.192, p. 7–12, 2015.

ASHOKKUMAR, B., N.KAYALVIZHI AND GUNASEKARAN, P. Optimization Of Média For Â Fructofuranosidase Production By *Aspergillus Niger* In Submerged And Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 4, p.331-338, 2001.

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

ASTOLFI, V., JORIS, J., VERLINDO, R., OLIVEIRA, J., MAUGERI, F., MAZUTTI, M., OLIVEIRA, D. TREICHEL, H. Operation of a fixed-bed bioreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 58, n. 59, p. 39-49, 2011.

ATEHORTÚA, Lucia; ZAPATA, Paola; SEPÚLVEDA, Liuda; ROJAS, Diego. Proceso para potenciar la producción de sustancias de *Ganoderma lucidum* y su actividad antifúngica. Depositante: Olarte Moure & Asociados LTDA, Carlos R. Olarte. P2013/000041 Déposito 20 fev. 2013.

ATKINS, S., CLARK, I.Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetic**, v. 45, n.1, p. 3-15, 2004.

ATY AAAE, WEHAIDY HR, MOSTAFA FA. Optimisation of inulinase production from low cost substrates using Plackett-Burman and Taguchi methods. **Carbohydr Polym**, v.102, p. 261-8, 2014.

AZHARI, R.; SZLAK, A.M.; ILAN, E.; SIDEMAN, S.; LOTAN, N.Purification and Characterization of endo- and exo-Inulinase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.ll, p.105-117,1989.

BAJPAI, P.; MARGARITIS, A. Characterization of molecular-sieve bound inulinase. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, p. 239-242, 1987.

BARRANCO-FLORIDO, E.; GARCÍA- GARIBAY, M.; GÓMEZ-RUÍZ, L.; AZAOLA, A. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 37, n.1, p.513-519, 2001.

BARREIROS, R. C. *et al*. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005.

BARRERA M, PINILLA A, CORTÉS E, MORA G, RODRÍGUEZ M, MPH B. Síndrome metabólico: uma mirada interdisciplinaria. **Revista Colombiana de Cardiología**, v. 15, n. 3, p. 111-126, 2008.

BASTON, O.; NEAGU, C. Establishing the optimal conditions for fructose production from chicory inulin. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, n. 3, p.8263-8270, 2013.

BASTOS, M.S.R.; GURGEL, T.E.P.; SOUSA, M.S.M.F.; LIMA, I.F.B.; SOUZA, A.C.R.; SILVA, J.B. efeito da aplicação de enzimas pectinoliticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, jaboticabal, v.24, n.1, p. 240-242, 2002.

BAUMGARTNER, S., DAX, T.G., PRAZNIK, W., FA, H. Characterisation of the highmolecular weight fructan isolated from garlic (Allium sativum L.). **Carbohydr. Res**. v.328, n. 1, p.177–183, 2000.

BEJARANO A.S.H; DAZA S.S.C. Obtención de uma cobertura de chocolate a partir de cacao silvestres copoazú (Theobroma grandiflorum) y maraca (Theobroma bicolor), de la Amazonia Colombiana. 2006. 142f. Trabajo de investigacion como opcion al titulo de Ingeniero de Alimentos. Universidad de la Salle, 2006.

BENDER, J. P., MAZUTTI, M. A., OLIVEIRA, D., DI LUCCIO, M., & TREICHEL, H. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.129–132, n.1, p.951–958, 2006.

BENDER, J. P., MAZUTTI, M. A., DI LUCCIO, M.,&TREICHEL, H. Extraction of inulinase obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.149, n. 1, p. 195–203, 2008.

BERROUET K, SÁMCHEZ P, MONTOYA M. Identificación molecular de hongos aislados de tejido de frijol con síntomas de antracnosis. **Acta Biológica Colombiana**, v. 19, n. 2, p. 143-153, 2004.

BIOMÉRIEUX. API 20 C AUX. Yeast Identification System. bioMérieux, Marcy-l'Etoile: France. Available from: http://www. biomerieux.com.co/diagnostico-clinico/apir. Cited: 01/07/2018

BOLIBOK P, WISNIEWSKI M, ROSZEK K, TERZYK A. Controlling enzymatic activity by immobilization on graphene oxide. **Sci Nat**, v. 104, n. 36, p. 1-10, 2017.

BOLIVAR-MEJÍA A, VESGA B, VERA L. Prevalencia de síndrome metabólico y grado de concordancia diagnóstica según tres diferentes definiciones en una población colombiana. **Med Int Méx**, v. 35, n, 3, p. 355-363, 2019.

BONCIU CN, CONSTANTIN O, BAHRIM G. Increase in extracellular inulinase production for a new *Rhizoctonia sp*. strain by using buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) flour as a single carbon source. **Lett Appl Microbiol**, v.55, p. 195-201, 2012.

BOPP M, BARBIERO S. Prevalencia de síndrome metabólico em pacientes de um ambulatório do Instituto de Cardiología do Rio Grande do Sul. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n, 5, p. 473-477, 2009.

BOUCHARD C. Genetics and the metabolic syndrome. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 19, suppl 1, p. S52–S59, 1995.

BRADFORD, M. A Rapid and sensitivemethod for the quantitation of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**., v.72, p.248–254, 1976.

BRASIL, 1998. Portaria no. 29, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. ANVISA-Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http:// www.anvisa.gov.br/legis/portarias/29_98 htm> Acesso em: 10 de fevereiro de 2017.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Instrução normativa Nº 1 de 7 de janeiro de 2000, *Diário Oficial da União*, Nº 6, Brasília, 10 de janeiro de 2000. Seção I., p. 54-58. **Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta.**

BRAY, G.A.; NIELSEN, S.J.; POPKIN, B.M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **Am J Clin Nutr,** v.79, n. 1, p. 537–543, 2004.

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.

BRUNS, T., WHITE, T., TAYLOR, J. Fungal Molecular Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematic**, v. 22, p. 525-564, 1991.

BUITRAGO, J., ESCOBAR, M. **Aplicación de levadura *Candida spp*. como una alternativa viable para la retardación en la pudrición del banano (*Musa acuminata*).** 2009. Trabajo de grado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C. 2009.

BULTER L, FALQUET L. Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos pátogenos. **Rev. Salud Anim.**, v. 37, n. 2, p.125-132, 2015.

CABEZAS, M.J.C., BRAVO, R.S., SHENE, C. Inulin and sugar contents in Helianthus tuberosus and Cichorium intybus tubers: effect of postharvest storage temperature. **J. Food Sci.** v.67, n. 1, p. 2860–3865, 2002.

CALZAVARA, B.B. G.; MILLER C.H.; KAHNAGE, O.N.C. **Fruticultura tropical: O cupuacuzeiro.** Belém: EMBRAPA CPATU, p. 99,1984.

CAMPOS, D.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; CHIRINOS, R.; AGUILAR-GALVEZ, A.; NORATTO, G. and PEDRESCHI, R. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, vol. 135, n. 3, p. 1592-1599, 2012.

CAPITO, S. M. P. **Raiz tuberosa de yacon, *Polymnia sonchifolia* Poep. Endl.): Caracterização química e métodos de determinação de frutanos (CG e HPLC-DPA)**. 2001. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Estadual de São Paulo. Departamento de Ciências dos Alimentos, São Paulo.

CAPRILESA, C.H., MATA-ESSAYAG S, ABATE T, WAARD J, PÉREZ C, OLAIZOLA C, ROSELLÓ A, COLELLA M. Extracción simplificada de ADN em especies de *Candida***. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 25, n.2, p. 260-263,2005.

CARCELLER J, MARTÍNEZ J, MONTI R, BASSAN J, FILICE M, IBORRA S, YU JIHONG, CORMA A. Selective synthesis of citrus flavonoids prunin and naringenin using heterogeneized biocatalysis on graphene oxide. **Green Chemistry**, Royal Society of Chemistry, v. 21, p. 839-849, 2019.

CARDONA J, CUCA L, BARRERA J. Determinacao de alguns metabólitos secundários em três morfotipos de cubiu (*Solanum sessiflorum Dunal*). **Revista Colombiana de Quimica**, v. 40, n.2, p.185–200, 2011.

CARDOSO, C.L. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Quimica Nova**, v. 32, n.1, p175–187, 2009.

CARVALHO, W. et al. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, n. 23, p. 60-70, 2006.
CARVALHO A., GARCÍA N., FARFÁN J. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 28, n. 4, p. 986-993, 2008.

CARVALHO, CM., MEIRINHO, S., ESTEVINHO, M., CHOUPINA, A. Yeast species associated with honey: diferente identification methods. **Archivos de zootecnia**, v. 59, n. 225, p. 103-113, 2010.

CARVALHO P, CARVALHO E, SILVA S, LACERDA C, HERNANDEZ A, SOL M. Efectos metabólicos del consumo excessivo de fructosa añadida. **In. J. Morphol**, v.37, n.3, p.1058-1066, 2019.

CASTANON, F. S. **Isolamento de fungos filamentosos produtores de inulinase**. 2013. 55 f. Dissertação (Magister Scientiae) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2013.

CASTAÑEDA A, MCEWEN J, HIDALGO M, CASTAÑEDA E. Evaluación de várias técnicas de extracción de ADN de *Cryptococcus spp*. a partir de muestras ambientales. **Biomédica**, v. 24, p. 324-331, 2004.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial

residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v.71, n. 1, p.45–50, 2000.

CASTRO, H. F. *et al*. Immobilization of Porcine Pancreatic Lipase on Celite for Application in the Synthesis of Butyl Butyrate in a Nonaqueous System. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 1, p. 147-152, 1999.

CATANA R, FERREIRA B-S, CABRAL J-MS, FERNANDES P. Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 91, p. 517-520, 2005.

CAVALCANTE, K. F. Estudo da imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* em organo-gel para aplicação em síntese orgânica. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2014.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5. Ed. Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém: ed. CEJUP, p. 279, 1991.

CAZETTA, M.; MARTINS, P.; MONTI,;R.; CONTIERO, J. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus var. Bulgaricus*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 1, p. 301-305, 2005.

CERQUEIRA V. C. **Produção de frutose a partir de hidrolisado enzimático de amido de mandioca. São Paulo**, 2012. 86 f. Tese (Doutorado em Agronomía) – Programa de Pós–Graduação em Energia na Agricultura– Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

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.

CHAVES FLORES, W. B.; CLEMENTE, C. R. Considerações sobre o araçá-boi (Eugenia stipitata McVaugh, Myrtaceae) na Amazônia Brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., Florianópolis, 1984. Anais, Florianópolis: SBF, 1984. p.167-177.

CHEN, X.; WANG, J.,& LI, D. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surfasse methodology. **Biochemical Engineering Journal**, 34, 179–184, 2007.

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 characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. **Food Chem**, v. 115, p.1206-12, 2009.

CHEN, L-S.; MA, Y.; MAUBOIS, J-L.; CHEN, L-J.; LIU, Q-H.; GUO, J-P. Identification of yeast from raw milk and selection for some specific antioxidante properties. **International Journal of Dairy Technology**, Hoboken, v. 63, n. 1, p. 47-52, 2010.

CHEN, H-Q.; CHEN, X-M.; CHEN, T-X.; XU, X-M.; JIN, Z-Y. Extration optimization of inulinase obtained by solid state fermentation of Aspergillus ficuum JNSP5-06. **Carbohydrate Polymers,** v.85, n. 1, p.446-451, 2011

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-M., CHI, Z., ZHANG, T., LIU, G. AND YUE, L. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v.82, n. 1, p. 211–220, 2009.

CHI, Z-M., ZHANG, T., CAO, T-S., LIU, X-Y., CUI, W. AND ZHAO, C-H. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. **Bioresource Technology**, v.102, n. 1, p.4295–4303, 2011.

CHO Y, YUN J. Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 1325-1331, 2002.

CHOMCZYNSKI, P A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteinsfrom cell and tissue samples. **Biotechniques**, v.15, p. 532-537,1993.

CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B. N. **Basidiomycetous Yeasts**: Current Status. In: T. Satyanarayana and G. Kunze. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. 1st Ed. New Delhi: Springer, 2009.19-43 p.

CLAROS MG, CANOVAS FM. Rapid high quality RNA preparation from pine seedlings. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.16, p. 9-18, 1998.

COHEN K, JACKIX M. Obtenção e caracterização física, química e físico-química de liquor de cupuaçu e de cacau. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, n. 1, p.57-67, 2004.

COITINHO JB, GUIMARÃES VM, DE ALMEIDA MN, FALKOSKI DL, DE QUEIRÓZ JH, DE REZENDE ST. Characterization of an exo-inulinase

produced by *Aspergillus terreus* CCT 4083 grown on sugarcane bagasse. **J Agric Food Chem**, v. 58, p.8386-91, 2010.

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.

CONTADO, E. W. F.; QUEIROZ, E. R.; ROCHA, D. A.; FRAGUAS, R. M.; SIMAO, A. A.; BOTELHO, L. N. S.; ABREU, A. F.; ABREU, M. A. B.C. M. P. Extraction, quantification and degree of polymerization of yacón (Smallanthus sonchifolia) fructans. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 21, p. 1783-1789, 2015.

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

CORCINO, D.S.M. **Análisis transcriptómico de la respuesta al estrés por helada en dos variedades de Solanum tuberosum subsp. andigena**. 2019. Trabajo de investigación para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 2019.

CÓRDOBA, I., PÉREZ, M., VILLADIEGO, O. Producción de xylitol a partir de leveduras nativas colombianas. **Revista Colombiana de biotecnología**, v. VI, n. 2, p. 31-36, 2004.

CORE, L., J. WATERFALL, J. LIS. Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters. **Science**, v.322, p. 1845-1848, 2008.

CORREA-DELAGADO, K., AGUILERA-BECERRA, A., ALFONSO-VARGAS, N. *Candida auris*, un microrganismo emergente. **Revista Dermatológica Mexicana**, v. 64, n. 4, p. 393-404, 2020.

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.

CORTE L, CAGNO R, GROENEWALD M, ROSCINI L, COLABELLA C, GOBBETTI M, CARDINAL G. Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains isolated from food and other environmental niches, hints for an incipient speciation. **Food Mcrobiology**, v.48, p. 206-215, 2015.

CORTEZ E.V.; PESSOA A. JR. Xylanase and β-xylosidase separation by fractional precipitation**. Process Biochemistry**, v. 35, n.1, p. 277-283, 1999.

COSMA. A, et al. Effect of fructose on glycemic control in diabetes**. Diabetes Care**, v. 35, p. 1611-1620, 2012.

COWAN, A.; FERNANDEZ, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n.4, p. 326-46, 2011.

CRUZ VD, BELOTE JG, BELLINE MZ, CRUZ R. Production and action pattern of inulinase from *Aspergillus niger*- 245: Hydrolysis of inulin from several sources. **Rev Microbiol**, v.29, p.301-6,1998.

CULLINGS, K., VOGLER, D. A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. **Molecular Ecology** v.7, p. 919- 923, 1998

DALLA-VECCHIA, R. *et al*. Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DASTAGER, S., LI, W-J., DAYANAND, A., TANG, S-K., TIAN, X-P., ZHI, X-Y., XU, L-H., JIANG, C-L. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyce*s. **African Journal of Biotechnology**, Academic Journals, v. 5, n. 8, p. 1131-1134, 2006.

DATTA, S. *et al.* Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **Biotechnology**, v. 3, p. 1-9, 2013.

DE ARMAS Y, CAPO V, LÓPEZ L, MEDEROS L, DÍAZ R. Comparison of three methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues. **Biotecnol Apl.**, v. 28, n.1, p. 40-3, 2011.

DELGADO-MÉNDEZ C, CASTAÑO J, VILLEGA B. Caracterización del agente causante de la Roña del Maracuyá (*Passifora edulis f. flavicarpa Degener*) en Colombia. **Rev. Acad. Colomb. Cienc.**, v. 37, n.143, p. 215-227, 2013.

DEMEL, R. A.; DORREPAAL, E.; EBSKAMP, M. J.M.; SMEEKENS, J. C. M.; DE KRUIJFF, B. Fructans Interact strongly with model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1375, p. 36-42, 1998.

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.

DE ROOVER, J., VANDENBRANDEN, K., VAN LAERE, A., AND VAN DEN ENDE, W. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Chicorium intybus* L.). **Planta**, v. 210, n. 1; p.808-814, 2000.

DE VRIES, R., VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and molecular biology**, Reviews, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOHAN, N. Enhanced inulinase production by *Streptomyces sp*. In solid state fermentation through statistical designs. **3 Biotech**, v.3, n. 1, p.509-515, 2013.

DINARVAND M, REZAEE M, FOROUGHI M. Optimizing culture conditions for production of intra and extracelluar inulinase and invertase from Aspergillus niger ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). **Brazilian journal os microbiology**, v. 48, p.427-441, 2017.

DIOS T, IBARRA C, VELASQUILLO C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. **Tecnología en Salud**, v. 2, n. 2, p. 70-78, 2013.

DONNELLY, K.L.; SMITH, C.I.; SCHWARZENBERG, S.J.; JESSURUN, J.; BOLDT, M.D.; PARKS, E.J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Invest**, v.115, n. 1, p.1343–1351, 2005.

DOS SANTOS, F.A. **Processamento de Grafeno Oxidado na forma de filmes ultrafinos e aplicações em sensores**. São Carlos: São Paulo; 2012.

EDEL, V. **Polymerase Chain Reaction in Mycology**: an Overview. *In:* Bridge, P.; Arora, D.; Reddy, C. y Elander, R. (eds). Applications of PCR in Mycology. UK, University Press. p.1-20, 1998.

EGAN, A., J. SCHLUETER, D. SPOONER. Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology. **American Journal of Botany**, v. 99, n.2, p.175-185, 2012.

EMBRAPA. **Processamento das sementes de cupuacu para obtenção de cupulate**. Boletim de pesquisa número 108, Belém, 1990.

ERTAN F, EKINCI F, AKTAC T. Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride.* **Pak J Biol Sci**, v. 6, p.1332-5, 2003.

ESPINOSA, L. **Guía práctica sobre la técnica de PCR**. *In:* Instituto Nacional de de Ecología. (eds). Ecología molecular. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp: 517-540, 2007.

ESPINOZA KOU MEY-LING. **Análisis transcriptómico de la respuesta a heladas en papas nativas**. Tesis para optar grado de Magíster en Bioquímica y Biología Molecular. 2017. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7, p. 596-601, 2001.

ETTALIBI, M. & BARATTI, J.C. Purification, properties and comparision of invertase, ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Quimica Nova**, v. 32, n.1, p175–187, 2009.

EWING, B. AND GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research,** v. 8, p.186–194, 1998.

FALCÄO M, GALVAO R, CLEMENT C, FERREIRA S, SAMPAIO S. Fenologia e produtividade do araca-boi (Eugenia Stipitata, Myrtaceae) na Amazonia central. **Acta Amazônica**, v. 30, n. 1, p. 9-21, 2000.

FAWZI EM. Comparative study of two purified inulinases from thermophile *Thielavia terrestris* NRRL 8126 and mesophile *Aspergillus foetidus* NRRL 337 grown on *Cichorium intybus* L. **Braz J Microbiol**, v. 42, p. 633-49, 2011.

FEOLI M, GÓMEZ Z, MUÑOZ A. Aislamiento y caracterización de microrganismos con actividad pectinolitica a partir de *Mangifera indica*. **Rev. Col. Cienc. Quím. Farm**., v. 26, p. 33-37, 1997.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2. Ed. Zaragoza: Acribia, S. A.1993. 1095p.

FERNANDES MRVS, NSABIMANA C, JIANG B. *Penicillium expansum* SK16 as a novel inulinase-producing strain isolated from decomposed dahlia tubers. **Res J Biotech**, v.7, p.102-6, 2012.

FERNANDEZ R, ROSELL C, CAANAN L, RODES L, GUISAN J, BALLESTEROS F. **Stabilization of immobilized enzymes against organic solvents:** Complete hydrophylization of enzymes environments by solidphase chemistry with poly-functional macromolecules. Progress in Biotechnology: Elsevier; 1998. p. 405-10.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1995. ***Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética***. 2a ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220 p., 1995.

FERREIRA, M. V.; AVILA, T. L.; KUHN, C. R.; TORALLES, R. P., ROMBALDI, C. V. Identifying yeast isolated from spoiled peach puree and assessment of its batch culture for invertase prodution. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 4, p. 701-708, 2016.

FIERRO, F. **Electroforesis en gel de agarosa**. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, p: 27-51, sem ano.

FIETZ, V. R.; SALGADO, M. S. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. **Ciênc. Ciência e Tecnolnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 318-321, 1999.

FIGUEIRA, G.M. **Desenvolvimento agrotecnológico da espécie *Cichorium intybus* L.** Campinas: UNICAMP/FEAGRI, 2000. 68p. (Tese de Doutorado).

FILHO D, YUYAMA L, AGUIAR J, OLIVEIRA M, MARTINS L. Caracterizacao e avaliação do potencial agonnomico e nutricional de etnovariedades de cubiu (Solanum sessiflorum Dunal) da Amazonia. **Acta Amazônica**, v. 35, n. 4, p. 399-406, 2005.

FLORES-GALLEGOS AC, CONTRERAS-ESQUIVEL JC, MORLETT-CHÁVEZ JA, AGUILAR CN, RODRÍGUEZ-HERRERA R. Comparative study of fungal strains for thermostable inulinase production. **J Biosci Bioeng**, v. 119, p. 421-6, 2015.

FONSECA, Z. A. **Plantas medicinais**, 2003. Disponível em: <http://www. Plantamed.hpg.ig.com.br/PG/TEXTOS/NCP/Polymniasonchifolia. htm> Acceso em 23 de fevereiro de 2017.

FRANZON, R. C. et al**. Araçás do gênero Psidium Principais espécies, ocorrência, descrição e usos.** Embrapa Cerrados, Planaltina, v. 1, p. 11-41, 2009.

FRAZIER, W. **Microbiología de los alimentos**. Acribia Zaragoza, España, 2008.

FRIZZERA D, FABBRO S, ORTIS G, ZANNI V, ANNOSCIA D. Possible side effects of sugar supplementary nutrition on honey bee health. **Apidologie**, v. 51, p. 594-608, 2020.

GALAEV, I.Y.; MATTIASSON, B. Protein purification by affinity ultrafiltration, In: WANG, W.K. (Ed.). **Membrane Separations in Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. Cap. 2, p. 243-263.

GALEANO P, CUELLAR L, SCHNELLA G. Influência del procesamiento del grano de copoazu (Theobroma grandiflorum), sobre la actividad antioxidante y el contenido fenolico. **Vitae**, v. 19, n. 1, p. S284-S287, 2012.

GALVÃO, G. ALMEIRÃO. **Natureza**, v.8, n.7, p.53-55, 1995.

GANDRA E, GANDRA T, MELLO W, GODOI H. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118,2008.

GAO, L.M.; CHI, Z.M.; SHENG, J.; NI, X.M.; WANG, L. Single-cell protein from Jerusalem artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.77, n. 1, p.825–832, 2007a.

GAO LM, CHI ZM, SHENG J, WANG L, LI J, GONG F. Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes. **Microbiol Ecol**, v.54, n. 1, p.722–729, 2007b.

GAO J.; YUAN, W.; LI, Y.; XIANG, R.; HOU, S.; ZHONG, S.; BAI, F. Transcriptional analysis of Kluveromyces marxianus for etanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology. **Biotechnol Biofuels**, v.8, n. 1, p.115, 2015.

GARBER, M.; M. GRABHERR; M. GUTTMAN; C. TRAPNELL. Computational Methods for Transcriptoma Annotation and Quantification Using RNAseq. **Nature Methods**, v.8, p. 469-478, 2011.

GARCÍA, V. **Introducción a la microbiología**. EUNED, Costa Rica, 2010.

GARCIA-GALAN, C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, Heidelberg, v. 353, n.16, p. 2885-2904, 2011.

GARUBA, E. O.; ONILUDE, A. A. Characterization of crude thermostable exo-inulinase produced by *Saccharomyces sp*. **AU J.T.**, v. 16, n. 2, p. 81-88, 2012.

GARUBA E, ONILUDE A. Immobilization of thermostable exo-inulinase from mutant thermophilic Aspergillus tamarii-U4 using kaolin clay and its application in inulin hydrolysis. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 341-346, 2018.

GBD 2016. Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2016. Lancet 2017; 390 (10100): 1151-1210.

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

GE, X.Y., QIAN, H.; ZHANG, W.G. Improvement of L-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and Lactobacillus sp. **Bioresour. Technol**., v.100, n. 1, p.1872–1874, 2009.

GENTIL, D. F. O.; CLEMENT, C. R. The araza (*Eugenia stipitata*): results **directions. Interamerican Society For Tropical Horticulture,** Curitiba, p. 83-89,1996.

GERMEC M, TURHAN I. Partial purification and characterization os Aspergillus niger inulinase produced from sugar-beet molasses in the shaking incubator and stirred-tank bioreactors. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16a, p. 1-11, 2020.

GHOSH, R. Novel cascade ultrafiltration configuration for continuous, high-resolution protein–protein fractionation: a simulation study. **Journal of Membrane Science***,* v. 226, n. 1, p. 85–99, 2003.

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.

GILL PK, MANAS RK, SINGH J, SINGH P. Purification and characterization of an exo-inulinase from *Aspergillus fumigatus*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 117, p. 19-31, 2004.

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

GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in online high performance liquid chromatography: **A review. Journal of Chromatography B**, p. 3-16, 2005.

GLUSHAKOVA, O.; KOSUGI, T.; RONCAL, C.; UM, W.; HEINIG, M.; CIRILLO P.; SANCHEZ-LOZADA, L.G.; JOHNSON, R.J.; NAKAGAWA, T. Fructose induces the inflammatory moleculeICAM-1 in endothelial cells. **J Am Soc Nephrol**, v.19, n. 1, p.1712–1720, 2008.

GOLUNSKI, S. M.; SALA, L.; SILVA, M. F.; DALLAGO, R. M.; MULINARI, JÉSSICA ; MOSSI, A. J.; BRANDELLI, A. ; KALIL, S. J.; DI, L.; MARCO; TREICHEL, H. Interference of salts used on aqueous two-phase systems on the quantification of total proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, n.1, p. 30-33, 2016.

GONÇALVES M.V.V.A. **Segurança microbiológica de polpa de cupuaçu processada termicamente**. 2014. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

GONG F, SHENG J, CHI ZM, LI J. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. **J Indu Microbiol Biotechnol**, v. 34, n. 1, p.179–185, 2007.

GONZÁLEZ, A.E.E. **Estudio de la represión catabólica por glucosa en Candida *utilis***. 1996. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Madrid, 1996. GREEN, M., & SAMBROOK, J**. Molecular Cloning**. A laboratory manual (4th ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GOOSEN C, MAAREL M, DIJKHUIZEN. Exo-inulinase of *Aspergillus niger* N402: A hydrolytic enzyme with significant transfructosylating activity. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 1-2, p. 49-58, 2008.

GUISÁN, J.M. **Immobilization of enzymes as the 21st century begins**: na already solved problem or still an exciting challenge. In: GUISÁN, J.M. (Ed.).

Immobilization of Enzymes and Cells. Totowa: Humana Press, 2006. Cap.1, p. 1-13.

GULLEDGE A., ROBERTS A., VORA H., PATEL K., LORAINE A. Mining Arabidopsis thaliana RNA-Seq Data with Integrated Genome Browser Reveals Stress Induced Alternative Splicing of the Putative Splicing Regulator SR45A. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 2, p. 219- 231, 2012.

GUO, N.; GONG, F.; CHI, Z.M.; SHENG, J.; LI, J. Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast Pichia guilliermondii using surface response methodology and inulin hydrolysis. **J Ind Microbiol Biotechnol** doi:10.1007/s10295-008-05192, 2008.

GUTCOVSKY, C. **Estudio comparativo de dos técnicas de extracción de ADN genómico de leveduras del género *Candida* para su análisis por RAPD-PCR**. 2008. Trabajo de investigación para optar por el título de Cirujano-Dentista. Pontificia Universidad de Chile. Facultad de Odontología, Departamento de Ciencias Físicas y Químicas. Área de Bioquímica Clínica Santiago de Chile. 2008.

GUPTA, A.K.; NAGPAL, B.; KAUR, N.; SINGH, R. Mycelial and extracellular inulinases from *Fusarium oxysporum* grown on aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. **J. Chem. Tech. Biotechnology,** v.42, p.69-76, 1988.

GUPTA, A.K.; RATHORE, P.; KAUR, N.; SINGH, R Production, Thermal Stability and Immobilization of Inulinase from *Fusarium oxysporum.i.* **Chem. Tech. Biotechnology,** v.47, p.245-257,1990.

GUPTA, A.K.; SINGH, D.P.; KAUR, N.; SINGH, R. Production, Purification and Immobilization of Inulinase from *Kluyveromyces fragilis.* **J. Chem. Tech. Biotechnol.,** v.59, p.377-385, 1994 a.

GUPTA, A.K.; GILL, A.; KAUR, N.; SINGH, R. High Thermal Stability ofInulinases from *Aspergillus* species. **Biotechnology Letters,** v.16, n.7, p.733-734,1994 b.

GUPTA A. K. & KAUR N. Fructan storing plants-A potential source of high fructose syrups. **J Sci Ind Res**, v. 56, n. 1, p.447–452, 1997.

GUPTA A. K.; KAUR, N.; KAUR, N. Preparation of Inulin from Chicory Roots **J. Sci Ind Res**, v. 62, n. 1, p.916–920, 2003.

GUTIERREZ-RODELO C, GUIBERNA A, REYES J. Mecanismo moleculares de la resistencia a la insulina: Una actualización.**Gac Med Mex.**, v. 2017, p.214-228, 2017.

HAFFNER, S. M.; VALDEZ, R. A.; HAZUDA, H. P.; MITCHELL, B.D.; MORALES, P. D. Prospective Analysis of the Insulin-Resistance Sydrome (Syndrome X). **Diabetes**, v. 41, n. 1, p.715–22, 1992.

HANG, H., WANG, C., CHENG, Y., LI, N., & SONG, L. Design and properties of an immobilization enzyme system for inulin conversion. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 184. N.2, p. 453–470, 2018.

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.

HENDRY, G.A. F.; WALLACE, R. K. **The origin, distribution and evolutionary significance of fructans**. In: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N. J. (Ed.). Science and Technology of Fructans, Boca Raton: CRC Press, 1993, p. 119-139.

HENSING, M.C.M.; ROUWENHORST, R.J.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Production and Localization of Inulinase in *Kluyveromyces* yeasts, p.241-250. In: FUCHS, A. (Ed.) **Inulin and Inuiin-containing** Crops. Elsevier Science Publishers, 1993, 417p.

HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C. BAARTMANS, R.; VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 42, n.4, 516-521, 1994.

HENSING, M. C. M., VROUWENVELDER, J. S., HELLINGA, C., VAN DIJKEN, J. P. Y PRONK, J. T. Use of chemostat data for modeling extracellular-inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in a high-cell-density fed-batch process. **J. Ferment. Bioeng**. v.79, n. 1, p. 54-58, 1995.

HERAZO I., ARRÁZOLA G. “Utilización de *Candida guilliermondii* aislada del corozo chiquito (Bactris guineensis) en la producción de xilitol”. **Rev. Colomb. Biotecnol**., v. XIII, No. 1, p.52-57, 2011.

HERMANOVÁ S, ZAREVÚCKÁ M, BOUŠA D, PUMERAD M, SOFER Z. Graphene oxide immobilized enzymes show high thermal and solvent stability. **Nanoscale**, v. 7, n.1, p.5852-5858, 2015.

HERNÁNDEZ P., MATA C., LARES M., VELAZCO Y., BRITO S. Índice glicémico y carga glucémica de las dietas de adultos diabéticos y no diabéticos. **An Venez Nutr**, v. 26, n.1, p.5-13, 2013.

HERNÁNDEZ-URIBE J.P., RODRÍGUEZ-AMBRIZ S.L., BELLO-PÉREZ L.A. Obtención de jarabe fructosado a partir de almidón de plátano (Musa paradisíaca L.). Caracterización parcial. **Interciencia**, v. 33, n.5, p.372-376, 2008.

HINCHA, D. K.; ZUTHER, E.; HELLWEGE, E.M.; HEYER, A. Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. **Glycobiology**, v. 12, p. 103-110, 2002.

HOUSSEINY, M. Production of an endoinulinase from *Aspergillus niger* AUMC 9375, by solid state fermentation of agricultural wastes, with purification and characterization of the free and immobilized enzyme. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 5, p.389–398, 2014.

HU, E.B.; MANSON, J.E.; STAMPER, M.J. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. **N Engl J Med**, v.345, n. 11, p. 790-7, 2001.

HUMMERS WS, OFFEMAN RE. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n.6, p.1339, 1958.

HWANG, U., KIM, W. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 37, n. 4, p. 215-228,1999.

IBRAHIM, A., AL-SALAMAH, A., EL-TONI, A., ALMAARY, K., EL-TAYEB, M., ELBADAWI, Y., & ANTRANIKIAN, G. Enhancement of alkaline protease activity and stability *via* covalent immobilization onto hollow core-mesoporous shell silica nanospheres. **International Journal of Molecular Sciences**, *v.*17, n.2, p. 184, 2016.

ICONTEC, Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2009. Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos. NTC 4092. Bogotá D.C. 2009.

IHME. Global Burden of Disease Study 2017 (GBD 2017) Results [Internet]. The Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) 2020. [cited 2019 Dez 15]. Available at: Http://vizhub.healthdata.org/gbdcompare% 3E.

ILGIN M, GERMEC M, TURHAN I. Statistical and kinetic modeling of *Aspergillus niger* inulinase fermentation from carob extract and its partial concentration. **Industrial Crops & Products**, v. 156, p. 1-12, 2020.

IMBEAUD S, GRAUDENS E, BOULANGER V, BARLET X, ZABORSKI P, EVENO E, MUELLER O, SCHROEDER A, AUFFRAY C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. **Nuclei Acid Research**, v. 33, n. 6, p.56-68, 2005.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome, 2010. Disponivel em: http://www.idf.org/metabolic-syndrome. Acesso, 24 de março de 2017.

ISHIHARA, T.; YAMAMOTO, S. Optimization of monoclonal antibody purificationby ion-exchange chromatography_Application of simple methods with linear gradient elution experimental data**. Journal of Chromatography A**, v. 1069, n. 1, p. 99–106, 2005.

ITAYA, N.M.; DE CARVALHO, M.A. and FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rhizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). **Physiologia Plantarum**, vol. 116, no. 4, p. 451-459, 2002.

ITOO, Z. A.; RESHI, Z.; BASHARAT, Q.; MAJEED, S. T.; ANDRABI, K. I.; Identification and Characterization of Ectomycorrhizal *Cortinarius* Species (Agaricales, Basidiomycetes) from Temperate Kashmir Himalaya, India, by ITS Barcoding. Hindawi Advances in Molecular Biology, v. 2015, p. 1-9, 2015.

JARILLO, L. F. **obtención de inulina y oligosacárideos derivados de la alcachofa**. 2016. Trabajo de investigación en Ciencias de la alimentación (CIAL-CSIC). Universidad Autónoma de Madrid. 2016.

JELLE, DK, ISABEL RR, ERIK VB, ARNE H, DENIS DK. Efficient extraction of high-quality total RNA fromvarious hop tissues. **Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p.355-362, 2006.

JESIONOWSKI, T*. et al.* Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, p. 801–821, 2014.

JING, W.; ZHENGYU, J.; BO, J.; AUGUSTINE, A., Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 5-11, 2003.

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.

JU, J., KIM D., BI L., MENG Q., X. BAI, Z. LI, X. LI, M. MARMA, S. SHI, J. WU, J. EDWARDS, A. ROMU, N. TURRO. Four-Color DNA Sequencing by Synthesis Using Cleavable Fluorescent Nucleotide Reversible Terminators. **PNAS**, v. 103, p. 9635-19640, 2006.

KAKIHARA, T. S.; CAMARA, F. L. A.; VILHENA, S.M.C. Cultivo e industrialização de yacón (*Polymnia sonchifolia*): uma experiência brasileira. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE RAIZES TROPICAIS, 1.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 9., 1996, São Pedro. Anais...São Pedro: CERAT-UNESP, 1996. P. 148.

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.

KANGO, N. Production of inulinase using tap roots of dandelion (Taraxacum officinale) by *Aspergillus niger*. **J Food Eng**, v. 85, n. 1, p.473– 478, 2008.

KANGO, N.; JAIN, S. C. Production and properties of microbial inulinases: Recent Advances. **Food Biotechnology**, v.25, n. 3, p. 165–212, 2012.

KARIMI M, REZAEI M, REZAEI K, MOOSAVI A, KOKINI J. Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* on octadecyl substited nanoporous silica: Inulin hydrolysis in a continuous mode operation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 174-180, 2016.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D.M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potencial. **Journal of Molecular Catalysis**, v 10, p. 157-176, 2000.

KAUR, N., GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **J. Biosci**., v.27, n. 1, p. 703–714, 2002.

KHOLYAVKA MG, KOVALEVA TA, KARPOV SI, SEREDIN PV, ARTYUKHOV VG. Investigation of mechanisms of interaction between inulinase from *Kluyveromyces marxianus* and the matrices of ion-exchange resins and fiber. **Biophysics**, v. 59, p. 223-9, 2014.

KIM, D.H.; RHEE, S.K. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 201-206, 1989.

KIM B-W, KIM H-W, NAM S-W. Continuous production of fructose-syrups from inulin by immobilized inulinase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Bioprocess Eng**, v. 2, p. 90-93, 1997.

KIM, SH, HAMADA T. Rapid and reliable method of extracting DNA and RNA from sweetpotato,Ipomoea batatas (L). **Lam. Biotechnology Letter**, v. 27, p.1841-1847, 2005.

KLURFELD, D.M.; FOREYT, J.; ANGELOPOULOS, T. J.; RIPPE, J. M. Lack of evidence for high fructose corn syrup as the cause of the obesity epidemic. **International Journal of Obesity**. v.37, n. 1, p. 771–773, 2013.

KNOWLER, W.C.; FOWLER, S.E.; HAMMAN, R.F. Diabetes Prevention Program Research Group. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. **Lancet**, v.374, n.1, p.1677-86, 2009.

KOCHHAR, A.; KAUR, N.; GUPTA, A.K. Inulinase from *Aspergillus versicolor*. A potent enzyme for producing fructose from inulin. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 56, p. 721-726, 1998.

KONSTANTINOVA, T., PARVANVA, D.; ATANASSOV, A.; DJILIANOV, D. Freezing tolerant tobacco transformes to accumulate osmoprotectans. **Plant Science**, v. 163, p. 157-164, 2002.

KUHN G, SILVA M, MULINARI J, GOLUNSKI S, DALLAGO R, ROSA C, VALÉRIO A, OLIVEIRA D, OLIVEIRA J, MOSSI A, TREICHEL H. N. *Aspergillus niger* inulinase immobilized in polyurethane foam and treated in pressurized LPG: A potential catalyst for enzymatic synthesis of fructooligosaccharides. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 9, n. 43, p. 1-4, 2016.

KUMAR, V. V.; PREMKUMAR, M. P.; SATHYYASELVABALA, V. K; DINESHKIRUPHA, S.; NANDAGOPAL, J.; SIVANESAN, S. *Asperigillus niger*

exo-inulinase purification by three phase partitioning. **Eng. Life Sci**, v. 11, n. 6, p. 607-614, 2011.

KURTZMAN C.P., SUZUKI M.“Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera Babjeviella, Meyerozyma, Millerozyma, Priceomyces, and Scheffersomyces”. **Mycoscience**, v. 51, p. 2-14, 2010.

KUSCHNIRI M. et al. ERICA: prevalência de síndrome metabólica em adolescentes brasileiros. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 1, p. 1s-13s, 2016.

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

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9a ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 22, n.7, 680-685,1970.

LAFUENTE-CASTANEDA, C., MARTINEZ, G., CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C., RODRIGUEZ-HERRERA, R., PRADO-BARRAGAN, A. AND AGUILAR, C.N. Inulinase production by *Penicillium citrinum* ESS in submerged and solid-state cultures. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.7, n. 1, p.129-134, 2012.

LAFUENTE-RINCÓN D, CORONA J, HERNÁNDEZ R, JUÁREZ R, MARTÍNEZ D, SALCIDO N. Identificación molecular de hongos fitopatógenos de fresa por PCR (ITS y EF-1x) Y susceptibilidad a bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. **Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 1 n.1, p. 417-422, 2016.

LAKKA TA, LAAKSONEN DE, LAKKA H-M, MÄNNIKKO N, NISKANENN LK, RAURAMAA R. Sedentary lifestyle, poor cardiorrespiratory fitness, and the metabolic syndrome. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, p. 1279–1286, 2003.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P**.** *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister’s shadow**. Fungal Biology Reviews**. 2010.doi:10.1016/j.fbr.2010.01.001.

LANNES S, MEDEIROS M, AMARAL R**.** Formulação de “chocolate” de cupuaçu e reologia do produto líquido**. Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas**, v. 38, n. 4, p. 463-469, 2002.

LANNES S, MEDEIROS M**.** Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer**. Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas**, v. 39, n. 1, p. 115-123, 2003.

LARA-FALLOS, M. **Avances en la producción de inulina**. 2017. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Central del Ecuador, Quito. 2017.

LEBLANC B, EGGLESTON G, SAMMATARO D, DEEBY T, CYR E**.** Formation of Hydroxymetilfurfural in domestic High-Fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee (*Apis mellifera*)**. J. Agric. Food Chem**, v. 57, p. 7369-7376, 2009.

LEROY, G., GRONGNET, J.F., MABEAU, S., LE CORRE, D., BATY-JULIEN, C. Changes in inulin and soluble sugar concentration in artichokes (*Cynara scolymus L.*) during storage. **J. Sci. Food Agric**. v.90, n. 1, p. 1203–1209, 2010.

LI, S.Z., CHAN-HALBRENDT, C. Ethanol production in (the) People’s Republic of China: potential and technologies. **Appl. Energy**, v. 86, p.162–169, 2009.

LI, A-X., GUO, L.Z., FU, Q., LU, W-D. A simple and rapid plate assay for screening of inulin-degrading microorganisms using Lugol´s iodine solution. **African Journal of Biotechnology**, Academic Journals, v.10, n. 46, p. 9518-9521, 2011.

LI X, ZHANG Q, WANG W, YANG S-T. A novel inulin-mediated ethanol precipitation method for separating endo-inulinase from inulinases for inulooligosaccharides production from inulin. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 1-10, 2021.

LIESE AD, MAYER-DAVIS EJ, HAFFNER SM. Development of the multiple metabolic syndrome: an epidemiologic perspective. **Epidemiol Rev**, v. 20, p. 157–172, 1998.

LIMA S, SOUZA B, SARAIVA L. Utilização de microrganismos isolados dos resíduos do processamento de cupuaçu na oxidação biológica de compostos fenólicos.2010.

LIMA D, FERNANDES P, NASCIMENTO D, RIBEIRO R, DE ASSIS S. Fructose 569 syrup: a biotechnology asset, **Food Technol Biotech**, v. 49, p. 424-434, 2011.

LIMA M. A., DE OLIVEIRA M. D., PIMENTA A. T., UCHOA P. K. "*Aspergillus Niger*. A hundred years of contribution to the natural products chemistry". **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n.10. p. 2029-2059, 2019.

LINDOW, S., HECHT-POINAR, E., ELLIOTT, V. 2004. Phyllosphere microbiology. **American Phyto pathological Society**. United States of America. p. 393.

LINDSTROM J, ILANNE-PARIKKA P, PELTONEN M. Finnish Diabetes Prevention Study Group. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. **Lancet**, v.368, n. 1, p.1673-9, 2006.

LIU, JJ, GOH CJ, LOH CS, LIU P, PUA EC A method for isolation of total RNA from fruit tissues ofbanana. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.16, p.1-6, 1998.

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. and CHI, Z.M. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. **Metabolic Engineering**, vol. 12, n. 5, p. 469-476, 2010.

LIU Y, YU D, ZENG C, MIAO Z, DAI L. Biocompatible graphene oxide-based glicose biosensors. **Langmuir**, v. 26, n. 9 p. 6158-6160, 2010.

LIU Y, LI Q, FENG Y, JI G, LI T, TU J. Molecular characterization and expression of microbial inulinase genes. **Critical Reviews in Microbiology**, v.39, n.2, p. 152–165, 2013.

LIU Y, LI Q, FENG Y, JI G, LI T, TU J. Immobilisation of acid pectinase on graphene oxide nanosheets. **Chemical Papers**, v.68, n.6, p. 732–8, 2014.

LOGAN, DA, MUKHTARB M, PARVEENC Z. Isolation of RNA from the filamentous fungus Mucorcircinelloides. **Journal of Microbiological Methods**, v. 33, p.115-118, 1998.

LOPERA-BARRERO, N. M., POVH, J. A., RIBEIRO, R. P., GOMES, P. C., JACOMETO, C. B., DA SILVA, L. T. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. **Cien. Inv. Agr**., v. 35, n.1, p. 77-86, 2008.

LOPES A.S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (Theobroma cação L.) e cupuacu (Theobroma grandiflorum Schum) em funcao do processamento**, 2000. 112 f. Dissertação (mestrado em Tecnologia de alimentos) – Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

LOPES, A. M.; TORALLES, R. P.; ROMBALDI, C. V. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in Jubileu clingstone peach and yeast isolated from its spoiled puree. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p.150-156, 2014.

LOPEZ M.; MANCILLA-MARGALI, N.; MENDOZA, D. Molecular structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. **Journal of Agricultural and food Chemestry**, v. 51, n. 1, p. 7835-7840, 2003.

LÓPEZ C, VEGA N, MONTOYA M. Identificación molecular de microrganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. **Acta Biológica Colombiana**, v. 18, n.2, p. 293-306, 2013.

LÓPEZ M, RIVERA M, VIETTRI M, LARES M, MOROCOIMA A, HERRERA L, FERRER E. Comparación de dos protocolos de extracción de ADN de Trypanosoma cruzi cultivado en medio axénico. **Rev Peru Med Exp Salud Pública.**, v. 31, n.2, p. 222-7, 2014.

LOPEZ-TRUJILLO J., MEDINA-MORALES M., SANCHEZ-FLORES A., AREVALO C., ASCACIO-VALDES J., MELLADO M., AGUILAR C., AGUILERA A. Solid bioprocess of tarbush (*Flourensia cernua*) leaves for β-glucosidase production by *Aspergillus niger*: initial approach to fiber–glycoside interaction for enzyme induction. **Biotech**, v. 7, n. 4, p. 271, 2017.

LOURENÇO, M. C. **Desenvolvimento de processo contínuo de obtenção de frutose a partir de sacarose.** 2004. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry,** Bethesda**,** v.193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MA Y, LI Y, ZHAO G, YANG L, WANG J, SHAN X. Preparation and characterization of graphite nanosheets decorated with Fe3O4 nanoparticles used in the immobilization of glucoamylase. **Carbon 5 0**, v.2, n.1, p.29 7 6 –2 9 8 6, 2012.

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.

MAGER, W., SIDERIUS M. Novel Insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS yeast research**, v. 2, p. 251-257, 2002.

MAHER, C., KUMAR-SINHA C., CAO X., KALYANA-SUNDARAM S., HAN B., JING X., SAM L., BARRETTE T., PALANISAMY N., CHINNAIYAN A. Transcriptome Sequencing to Detect Gene Fusions in Cancer. **Nature, v.** 458, p. 97-101, 2009.

MAHMOUD DAR, MAHDY E-SME, SHOUSHA WGH, HALA W, REFAAT HW, ABDEL-FATTAH AF. Raw garlic as a new substrate for inulinase production in comparison to dry garlic. **Aust J Basic Appl Sci**, v.5, p. 453-62, 2011.

MAIORANO, A. E.; PICCOLI, R. M.; SLVA, E. S.; RODRIGUES, M. F.A. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pe-biotics. **Biotechnol Lett,** v.30, n. 1, p. 1867-1877, 2008.

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.

MANICKAVELU, A, KAMBARA K, MISHINA K, KOBA T. An efficient method for purifying high quality RNAfrom wheat pistils. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.54, p. 254-258, 2007.

MANZONI M., CAVAZZONI V. Hydrolisis of topinambur (Jerusalem artichoke) fructans by extracelular inulinases of Klyveromyces marxianus var. Bulgaricus. **Journal of Chem. Technol. Biotechnol**, v. 53, n. 1, p. 311-315, 1992.

MARGUERAT, S.; J. BAHLER. RNA-seq: from technology to biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 569-579, 2010.

MÁRQUEZ-SANDOVAL F, MACEDO-OJEDA G, VIRAMONTES-HÖRNER D, BALLART JDF, SALVADÓ JS, VIZMANOS B. The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: A systematic review. **Public Health Nutrition**, v. 14, n.10, p. 1702-1713, 2011.

MARTINEZ, J. P.G. **Imobilização multipontual da naringinase em agarose e suporte alternativo pó de sabugo de milho**. 2016. 102 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista (Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2016.

MARTÍNEZ-GAMBOA M, SÁNCHEZ-DÌAZ M. Importancia de algunas frutas, verduras y hortalias en la prevención de la diabetes mellitus tipo II. **Revista Iberoamericana para la investigación y el desarrollo educativo**, v. 3, n. 6, p. 186-202, 2013.

MASCATO D, MONTEIRO J, PASSARINHO M, GALENO D, CRUZ R, ORTIZ C, MORALES L, LIMA E, CARVAL R. Evaluation of antioxidante capacity of Solanumsessiliflorum (Cubiu) Extract: Na In vitro assay. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

MATTEI, R.; DIAS, R.F.; ESPÍNOLA, E.B.; CARLINI, E.L.A.; BARROS, S.B.M. Guaraná (*Paullinia cupana*): behavioral and toxic effects on laboratory animals and in vitro antioxidant activity. **J Ethnopharmacol**, v. 60, p. 111-116, 1998.

MATOS, A.O. **Protocolo de extracción de ADN**. Red Biobancos. 2011.

MAUGERI F, HERNALSTEENS S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal of molecular catalysis**, v. 49, p. 43-49, 2007.

MAZUTTI, M.; BENDER, J. P.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Optimization of inulinase production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 56-59, 2006.

MEDINA, J, GARZÓN, F, MONTOYA, P, BARBOSA, J. Recopilación Bioinformática. (On line). < http://www.marcoregalia.com/STUFF/UDISTRITAL/B 46bioinformatica/Actividades/Libro%20Clases/Libro%20Bioinformatica.pdf>. 2012.

MELLADO O, M. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. **Revista para profesionales de la Salud**, v. 3, n. 30, p. 88-111, 2020.

METZKER, M. Sequencing technologies the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 31-46, 2010.

MEZA G, ULLOA J, URIBE A, GUTIERREZ M. Técnica no convencional de extracción de ADN a partir de tejido embebido en parafina para uso en la reacción en cadena de la polimerasa. **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**, v. 16, n. 1, p. 35-41, 2013.

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

MILLO, H., & WERMAN, M. J. Hepatic fructose-metabolizing enzymes and related metabolites: Role of dietary copper and gender. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, n. 1, p.374–381, 2000.

MORAES, C. C.; KALIL, S. J., Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract, **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 5312–5317, 2009.

MOREIRA, G. C.; CIPULLO, J. P.; CIORLIA, L. A.S.; CESARINO, C. B., VILELA-MARTIN, J.F. Prevalence of Metabolic Syndrome: Association with Risk Factors and Cardiovascular Complication in na Urban Population. **PLoS ONE**, v.9, n. 9, p. 1050-56, 2014.

MORIGUCHI, T, HU CG, HONDA C, KITA M, TSUDA T A. Simple protocol for RNA isolation from fruit treescontaining high levels of polisaccharides and polyphenol compounds. **Plant Molecular Biology Reporter**,v.20, p 69a-69g, 2002.

MSPS. República de Colombia., Ministerio de Salud y Protección Social. **Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021: La salud en Colombia la construyes tú**. Imprenta Nacional de Colombia ed. Bogotá.D.C.: MinSalud; 2013. 452 p.

MUTANDA, T.: WILHELMI, B.S.; WHITELEY, C.G. Response surfasse methodology: synthesis of inulooligosaccharides with an endoinulinase from *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol**., v.43, n. 1, p. 362–368, 2008.

NABOR-ROMERO O, SILVA-VALENZUELA M, ROJAS-MARTÍNEZ. Primer reporte de *Cladosporium cladosporioides* causando pudriciones en frutos de zapote mante em México. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v.20, p 356-362, 2018.

NAKAGAWA, T.; HU, H.; ZHARIKOV, S.; TUTTLE, K.R.; SHORT, R.A.; GLUSHAKOVA, O.; OUYANG, X.; FEIG, D.I.; BLOCK, E.R.; HERRERA-ACOSTA, J.; PATEL, J.M.; JOHNSON, R.J. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.290, n.1,p.625–631, 2006.

NAKAMURA, T.; OGATA, Y.; SHITARA, A.; NAKAMURA, A.; OHTA, K. Continuous production of frutose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 1, p. 164-169, 1995.

NAKAMURA, T.; SHITARA, A.; MATSUDA, S; MATSUO, T.; SUIKO, M.; OHTA, K. Production, purification and properties of an endoinulinase of Penicillium sp. TN-88 that liberates inulotriose, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n.4, 313-318, 1997.

NAM M, PARK M, KIM H, KIM T, KIM H. *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* cause blossom blight in Strawberry in Korea. **Mycobiology**,v.43, n. 3, p 354-359, 2015.

NATURAL-HISTORY-MUSEUM. Solanaceae Source Proyect. New York: **Natural History Museum**, vol. 2009, 2009.

NEAGU, C., BAHRIM, G. Inulinases – A versatile tool for biotechnology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 9, p. 1-11, 2011.

NEERGAARD JS, LAURSEN JM, HANSEN HB, CHRISTIANSEN C, BECK NIELSEN H, KARSDAL MA, BRIX S, HENRIKSEN K. Metabolic syndrome and subsequent risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in elderly women. **Medicine, v.** 95, n. 36, p.4806, 2016.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3.ed. New York: W. Publishers, 2000. p. 243-288.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E.; CARVALHO, J. E. de; RUIZ, A. L.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International, Barking**, v. 50, n. 1, p. 70-76, 2013.

NETO JCGL, XAVIER MA, BORGES JWP, ARAÚJO MFM, DAMASCENO MMC, FREITAS RWJF. Prevalence of Metabolic Syndrome in individuals with Type 2 Diabetes Mellitus. **Rev Bras Enferm**, v. 70, n. 2, p. 265-270, 2017.

NEWTON, S.M.C.; GRAHAM, *A Polymerase chain reation*. 2 ed., 1997.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; CZUKOR, B.; HOSCHKE, A. Continuos production of oligofructose syrupp from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase, **Process Biochemistry**, v. 46, n.1, 298-303, 2011.

NIELSEN K. F., MOGENSEN J. M., JOHANSEN M., LARSEN T. O., FRISVAD J. C. "Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group", **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 5. p. 1225-1242, 2009.

NIGHOJKAR, A.; SRIVASTAVAS, S.; KUMAR, A. Production of low methoxyl pectin using immobilized pectinesterase bioreactors. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v 80, n.4, p. 346-349, 1995.

NIU, C., KEBEDE, H., AULD, D. L., WOODWARD, J. E., BUROW, G. & WRIGHT, J. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 16, p. 2818-2822, 2008.

OCHIUZZI, M., CATALDI, S., GUELFAND, L.; MALDONADO, I., ARECHAVALA, A. Evaluación del Sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de leveduras del género *Candida*. **Revista Aregentina de microbiolgía**, CABA. 46, n. 2, p. 107-110, 2014.

OHTA, K., HAMADA, S., NAKAMURA, T. Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 59, n. 1, p. 729–733,1993.

OHTA, K.; SUETSUGU, N.; AND NAKAMUECA, T. Purification and Properties of an Extracellular Inulinase from *Rhizopus* sp. Strain TN-96. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 1, p. 78-80, 2002.

OJANSIVU, I.; FERREIRA, C.L. and SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 22, no. 1, p. 40-46, 2011.

OLIVEIRA, L.M.S. **Contribuição ao aproveitamento industrial do cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum)**, 1997. 72 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade Federal do Ceara, 1997.

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, n. 2, p. 131-140, 2004.

OLIVEIRA L, et al. Prevalência da Síndrome Metabólica e seus componentes na população adulta brasileira. **Ciências e Saúde Coletiva**, v. 25, n. 11, p. 4269-4280, 2020.

ÖNGEN-BAYSAL, G., SUHA SUKAN, S. Y VASSILEV N. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Lett***.,* v.16, n. (3), p. 275 -280, 1994.

OMS, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of a WHO Consultation. Geneva: Department of Noncommunicable Disease Surveillance, World Health Organization, 1999.

OMS, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Nota descriptiva No. 312 Noviembre de 2008. Consultado en fevereiro de 2019. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/print.html.

OSORIO, DAVID, E., RAMÍREZ, M., LÓPEZ, W. A., & MAMBUSCAY, L. A. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de leveduras. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. XI, n. 1, p. 25–131, 2009.

OSSA P, GIRALDO J, LÓPEZ G, DIAS L, RIVERA F. Colecciones bioógicas: Una alternativa para los estudios de diversidad genética. **Boletín científico centro de museos de historia natural**, v. 16, n. 1, p. 143-155, 2012.

OUYANG, X.; CIRILLO, P.; SAUTIN, Y.; MCCALL, S.; BRUCHETTE, J.L.; DIEHL, A.M.; JOHNSON, R.J.; ABDELMALEK, M.F. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v.48, n. 1, p. 993–999, 2008.

PALACIO-BARRERA, AM., AREIZA, D., ZAPATA, P., ATEHORTÚA, L., CORREA, C., PEÑUELA-VÁSQUEZ, M. Induction of pigment production through media composition, abiotic and biotic factors in two filamentous fungi. **Biotechnology Reports**, 2019.

PALMER JR, BOGGS DA, KRISHNAN S, HU FB, SINGER M, ROSENBERG L. Sugar sweetened beverages and incidence of type 2 diabetes mellitus in African American women. **Arch Intern Med**, v.168, n. 1; p.1487–1492, 2008.

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.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

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.

PAPON, N.; SAVINI, V.; LANOUE, A.; SIMKIN, A.J.; CRÈCHE J.; GIGLIOLI GUIVARC'H, N.; CLASTRE, M.; COURDAVAULT V.; SIBIRNY, A.A. *Candida guillermondii*: biotechnological applications, perspectives fos biological control, emerging clinical importance and recente advances in genetics. **Curr Genet,** Review, 2013.

PARIZA MW, JOHNSON EA. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. **Regul. Toxicol. Pharmacol**, v.33, p. 173-186, 2001.

PARKER, K.; SALAS, M.; NWOSU, V. C**.** High fructose corn syrup: production, uses and public health concerns. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 5, p. 71-78, Dec. 2010.

PARIPOORANI K, ASHWIN G, VENGATAPRIYA P, RANJITHA V, RUPASREE S, KUMAR V, KUMAR V. Insolubization of inulinase on magnetite chitosan microparticles an easily recoverable and reusable support. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 113, p. 47-55, 2015.

PASSOS L. M. L., PARK Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciencia Rural, Santa Maria**, v.33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PATEL S, CHOI S, KANG Y, LEE J. Eco-friendly composite of Fe3O4- Reduced Grapene oxide particles for efficient enzyme immobilization. **Applied materials & Interfaces**, v. 9, n. 3 p. 2213-2222, 2017.

PAULA, F. C. **Imobilização da Inulinase de Kluveromyces marxianus var. bulgaricus ATCC 16045: Caracterizacao e produção de açúcar invertido em biorreator**. 2007. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual de São Paulo. Instituto de Biocencias, São Paulo, 2007.

PEPATO, M.T.; OLIVEIRA, J.R.; KETTELHUT, E.C.; MIGLIORINI, R.H. Assessment of the antidiabetic activity of Myrcia uniflora extracts in streptozotocin diabetic rats. **Diabetes Res**., v. 22, p. 49-57, 1993.

PEREIRA, A., WERLE, C., GONÇALVES, T., HOFFMANN, F. Identificação e avaliação da resistência antimicrobiana de leveduras em vegetais minimamente processados. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 139-143, 2011.

PÉREZ- PÉREZ, J. **Extracción de ADN con DNeasy Blood & Tissue kit (QUIAGEN), modificado para insectos**. Sello Editorial Tecnológico de Antioquia. 2018

PESSELA C, MATEO C, CARRASCOSA A, VIAN A, GARCIA J, RIVAS G. One-Step Purification, Covalent Immobilization, and Additional Stabilization of a Thermophilic Poly-His-Tagged Galactosidase from Thermus sp. Strain T2 by using Novel Heterofunctional Chalate Epoxy Sepabeads. **Biomacromolecules**, v. 4, n.1, p. 107-13, 2012.

PESSOA A., VITOLO M. Downstream processing of inulinase – Comparison of diferente techniques, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70, n.72, p. 505-511, 1998.

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

PHAM T, CHOI B, LIM K, JEONG Y. A simple approach for immobilization of gold nanoparticles on graphene oxide sheets by covalent bonding. **Applied surface Science**, v.257, n. 1; p.3350-3357, 2011.

PILON-SMITS, E. A. H.; TERRY, N.; SEARS, T.; VAN DUN, K. Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. **Plant Physiology and Bichemestry**, v. 37, p. 313-317, 1999.

PINO J, QUIJANO C. Volatile compounds of arazá fruit (*Eugenia stipitata McVaught*). **Revista CENIC Ciencias Químicas**, v. 38, n. 3, p. 363-366, 2007.

PIRES, A.M.B., P.S. SILVA, P.M. NARDELLI, J.C. GOMES & A.M. RAMOS. Caracterização e processamento de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). **Revista Ceres**, v. 53, p. 309–316, 2006.

POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J.; SIMS, I.M.; HOUSLEY, T. L. **Fructan as Reserve Carbohydrates in Crop Plants**. In: ZAMSKI, E.; SHAFFER, A.A. (Ed.). Photoassimilate distribution in plants and crops: source-Sink relationships, New York: A.A Marcel Dekker, 1996. P. 97-113.

PORTILLO, M, FENOLL C, ESCOBAR C. Evaluation of different RNA extraction methods for small quantitiesof plant tissue. **Physiologia Plantarum**, v.128, p.1-7, 2006.

PORTO, T.S.; MEDEIROS e SILVA, G.M.; PORTO,C.S.; CAVALCANTI, M.T.H; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA-JR, A. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two- phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Instensification**, v. 7, n.1, p. 716-721, 2008.

POUYEZ, J. *et al*. First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity. **Biochimie**, v. 94, p. 2423-2430, 2012.

PRADELLA, J. G. et al. Reatores com células imobilizadas. In: SCHIMIDELL, W. *et al*. **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. cap. 16.

PRANGVISET K, SONGPIM M, YODSUWAN N, WANNAWILAI S, DEJSUNGKRANONT M, CHANGLEK P, SIRISANSANEEYAKUL. Fructose production from Jerusalem artichoke using mixed inulinases. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, p. 132-139, 2018.

PRETORIUS, I. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, John Wiley & Sons, Ltd, v. 16, p. 675-729, 2000.

QUAST L, LUCCAS V, ROTH T, KIECKBUSCH T. Influência da Incorporação de gordura de cupuaçu na temperagem da manteiga de cacau. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 130-136, 2007.

RAMAPRIYA R, THIRUMURUGAN A, SATHISHKUMAR T, MANIMARAN D.R. Partial purification and characterization of exo-inulinase produced from *Bacillus sp*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.16, n.2 p.363-367,2018.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ M, MARES, E, DÍAZ E, MARTÍNEZ J, ABRAHAM J. Aislamiento y caracterización de hongos en mango fresco y procesado. **Investigación y Desarrollo en Ciencia y tecnología de Alimentos**, v. 5, p. 1256-261, 2020.

RAMOS A. J. T. Achicoria: precursora de la inulina. Organo oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, v. 57, n. 4, p. 1-11, 2014.

RANGEL J, O; INFANTE-BETANCOUR. Aspectos generales sobre la amazonía de Colombia. **Fundación Natura Colombia,** Universidad Nacional, p. 21-45, 2018.

RATÓN, T. Métodos moleculares de identificación de leveduras de interés biotecnológico. **Rev Iberoam Micol**, CEBI, v. 21, p. 15-19, 2004.

RAVE L, et al. Estudio piloto de la prevalencia de syndrome metabólico en estudiantes de la institución universitaria Colegio Mayor de Antioquia en Medellín y la Universidad de Santander. Cúcuta, Colombia. **Revista Latinoamericana de Hipertensión**, v. 14, n. 2, p.173-179, 2019.

RAWAT HK, GANAIE MA, KANGO N. Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrose from fungi on low-value inulin-rich substrates and their use in generation of fructose and fructo-oligosaccharides. **A Van Leeuw**, v.107, p.799-811,2015.

RAWAT HK, SONI H, SURYAWANSHI R, CHOUKADE R, PRAJAPATI B, KANGO N. Exo-inulinase production from Aspergillus fumigatus NFCCI 2426: purification, characterization, and immobilization for continuous fructose production. **Food Science**, v.86, p.1778-1790,2021.

REAVEN, G. M. Role of Insulin Resistance in Human Disease. **Diabetes**. v.37; n. 1; p. 1595-607, 1988.

REBOUÇAS A, COSTA D, PRIULLI E, TELES J, PIRES C. Aproveitamento tecnológico das sementes de cupuaçu e de okarana na obtenção de cupulate. **Revista Desafios**, 2020.

REYES-OCAMPO, I., GONZÁLEZ, M., LÓPEZ-ISUNZA, F. Un análisis del metabolismo de Aspergillus niger creciendo sobre un sustrato sólido. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, A.C, v. 12, n. 1, p. 41-56, 2013.

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.

RÍOS, C.A. **Estandarización de una reacción em cadena de la polimerasa multiplex para la identificación de siete especies de importancia clínica de *Candida*.** 2019. Disertación previa a la obtención del título de Bioquímico Clínico. Pontificia Universidad católica del Ecuador. Facultad de Medicina, carrera de Bioquímica Clínica. Quito. 2019.

RÍOS-SANCHEZ E, CALLEROS E, GONZALES-ZAMORA A, RUBIO J, MARTINEZ O, MARTINEZ A, HERNANDEZ S, PÉREZ-MORALES R. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de geneotipicación en población mexicana. **Acta Universitaria**, v. 26, n. 4, p. 56-65, 2016.

RITSEMA, T.; SMEEKENS, S. C. M. Engineering fructan metabolismo in plants. **Journal of Plant Phisiology**, v. 160, p. 811-820, 2003.

ROBERFROID, M. B. Dietary fibre, inulin and oligofructose a review comparing their physiological effects. **Crit Rev Food Sci Technol**, v. 33, n. 1, p. 103-148, 1993.

ROBLEDO-LEAL, E., ZERTUCHE, E., TREVIÑO-RANGEL, R., GONZÁLEZ, G., LUNA, C., GONZÁLEZ, N. Isolation of killer yeasts from ants of the genus *Atta* and their effect on the red tomatos fungal pathogen *Geotrichum candidum*. **Revista Mexicana de fitopatología**, Fully bilingual, v. 34, n. 3, p. 258-269, 2016.

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

RODRIGUES, D.; MENDES, A.; ADRIANO, W.; GONÇALVES, L.R.B.; GIORDANO, R.L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.51, n. 3-4, p.100-9, 2008.

RODRÍGUEZ A, GOUARNALUSES M. Algunas consideraciones sobre la diabetes mellitus y su control en el nivel primario de salud. **Medisan**, v.19, n. 3, p.375, 2014.

RODRÍGUEZ J, LLANES L. Comportamiento clínico y enfoque terapéutico de los trastornos alimentarios en personas con diabetes mellitus tipo 1. **Revista Cubana de Medicina General Integral**, v.36, n. 2, p.1280, 2020.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: Araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insigni*s) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v.218, n.4, p. 380-384, 2004.

ROJAS L, PORTAL O, JIMENEZ E. Extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos. **Biotecnología Vegetal**, v. 11, n. 4, p. 213-222, 2011.

ROJAS E, MOLINA R, RODRIGUEZ C. Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. **Revista Venezolana de Endocrinologia y Metabolismo**, v.10, n. 1, p.7-12, 2012.

ROJAS M, VALENCIA J, MARTÌNEZ O. Género Aspergillus: fuente potencial de péptidos bioactivos. **Revista Facultad de Ciencias Básicas**, v. 17, n. 1, p. 73- 89, 2021.

ROS M, ARGUELLES J, GACTO M. Caracterización de la inulinasa e invertasa en *Candida Utilis.* **Anales de Biología**, v. 5, n. 1, p. 39-47, 1985.

ROSALES-LÓPEZ C, BERROCAL K, BONILLA V. Crecimiento dimórfico y caracterización molecular de *Candida guillermondi* aislado de *Pannicum maximun*. **Tecnología en Marcha**, v. 31, n. 1, p. 120-130, 2018.

ROYVARAN, M.; TAHERI-KAFRANI, A.; LANDARANI-ISFAHANI, A.; MOHAMMADI, S. Functionalized superparamagnetic graphene oxide

nanosheet in enzyme engineering: A highly dispersive, stable and robust biocatalyst. **Chemical Engineering Journal**, v. 288, n.1, p. 414-22, 2016.

SABER WIA, EL-NAGGAR NE. Optimization of fermentation conditions for the biosynthesis of inulinase by the new source; *Aspergillus tamarii* and hydrolysis of some inulin containing agro-wastes. **Biotechnol**; v. 8, p. 425-33, 2009.

SACRAMENTO C, BARRETTO W, FARIA J. Araçá-boi: uma alternativa para agroindústria. **Bahia Agríc**., v.8, n. 2, p. 22-24, 2008.

SAHA, B.C. Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with Lactobacillus intermedius NRRL B-3693. **Enzyme Microb. Technol**., v.39, n. 1, p. 991–995, 2006.

SALAROLI L, BARBOSA G, MILL J, MOLINA M. Prevalencia de syndrome metabolica em estudo de base populacional, Vitória, ES-Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab**., v.51, n. 7, p. 1143-1152, 2007.

SALAZAR, C., RUA, A. Características morfológicas microscópicas de especies de *Aspergillus* asociadas a infecciones em humanos. **Hechos Microbiol.**, UdeA, v. 3, n. 2, p. 93-96, 2012.

SALVADOR G., GARCÍA S., BEDOUT C., GARCÍA A. “Análisis del perfil proteico de aislamientos clínicos de *Candida guilliermondii* sensibles y resistentes al fluconazol”. **Asociación Colombiana de Infectología**. vol. 15, N.1, p. 20-24, 2011.

SAMPAIO I, FREIRE A, OGUSKO M, SALEM J, SOUZA J. Selection and optimization of PCR-based methods for the detection of Histoplasma capsulatum var, capsulatum. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 1, p. 34-39, 2012.

SAMUEL M, SUMAN S, VENKATESHKANNAN, SELVARAJAN E, MATHIMANI T, PUGAZHENDHI A. Immobilization of Cu3 (btc)2 on fraphene oxide.chitosan hybrid composite for the adsorption and photocatalytic degradation of methylene blue. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**., v.204, p. 111809, 2020.

SÁNCHEZ-LOZADA, L G.; MU, W.; RONCAL, C.; SAUTIN, Y. Y.; ABDELMALEK, M.; REUNGJUI, S.; LE, M.; NAKAGAWA, T.; LAN, H. Y.; YU, X.; JOHNSON, R. J. Comparison of free fructose and glicose to sucrose in the ability to cause fatty liver, **Eur j Nutr**. v.49, n. 1, p.1-9, 2010.

SÁNCHEZ C, CHACÓN J, CORTÉS H. Prevalencia del syndrome metabólico en consulta de medicina interna. **Repert.med.cir**. v.20, n. 2, p.93-102, 2011.

SANCHEZ, L. **Identificación y caracterización de hongos de interés para su uso industrial y, en especial, en la industria alimentaria mediante el uso de métodos moleculares.** 2016. Grado de Innovación en procesos y productos alimentarios. Universidad Pública de Navarra. 2016.

SÁNCHEZ L, DÍAZ J, BONILLA M. Prevalencia de Síndrome Metabòlico en estudiantes universitarios de Tunj, Boyacá, Colombia 2014. **Investig. Enferm. Imagen Desarr**. v.19, n. 1, p.81-93, 2017.

SANCHO, T.; GIMÉNEZ-JURADO, G.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Zymological indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates. **Food Microbiology**, Maryland Heights, v.17, n. 6, p. 613-624, 2000.

SANTA GLM, BERNARDINO SMSA, MAGALHÃES S, MENDES V, MARQUES MPC, FONSECA LP, FERNANDES P. From inulin to fructose syrups using sol-gel immobilized inulinase. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 165, p.1-12, 2011.

SANTOS, E. A.; OLIVEIRA, R. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 1, n. 27, p. 33-40, 1996.

SANTOS, M.; SAITO, C.; LINE, S. Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods. **Path. Res. Practice**, v. 204, n. 9, p. 633- 636, 2008.

SANTOS, A. F. dos. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SANTOS V, RAMOS J, TOSTES N, SILVA O, ALMEIDA L. Caracterizacao física e química de frutos de araca-boi (*Eugenia stipitata McVAugh*) em Lavras-MG. **Enciclopedia Biosfera**, v. 14, n. 26, p. 167, 2017.

SANTOS, A, SOBRINHO G, MESQUITA N, NOVAES Q, OLIVEIRA R, LUZ E, BEZERRA L. First report of *Cladosporium tenuissimum* causing blossom blight on strawberry in the Brazil. **Plant disease**, v. 104, n. 9, p. 633- 636, 2020.

SANTOS R, ZARAGOZA M, ALMAZÁN C. Purificación de proteínas. **Mensaje Bioquímico**, v. 45, p. 35-47, 2021.

SARTORIO, A.; DEL, C. A.; AGOSTI, F.; MAZZILLI, G.; BELLENTANI, S.; TIRIBELLI, C.; BEDOGNI, G. Predictors of nonalcoholic fatty liver disease in obese children. **Eur J Clin Nutr**, v.61, n. 1, p.877–883, 2007.

SCHMIEDER, R. AND EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n.6, p. 863–864, 2011.

SCHIMID, A.; DORDICK, J.S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, p. 258-268, 2001.

SCHNEIDER, A. L. S. ; GERN, R.M.M. ; JONAS, R. ; FURLAN, S.A. ; NINOW, J.L. Characterization of microbial inulinases. In: Rainer Jonas; Ashok Pandey; Gunter Tharun. (Org.). Biotechnological Advances and Applications in Bioconversion of **Renewable Raw Materials**. Braunschweig: Druckerei und Verlag GmbH, 2004, v.1, p.128-132.

SCHIRMER-MICHEL A., HICKMANN F., HERTZ F., ZÁCHIA M. “Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate”. **Journal Chemical Tecnoology and Biotechnology**, v.84, N. 2, p. 223-228, 2008.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W.; CONSORTIUM, F. B. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **PNAS,** v. 109, p. 6241–6246, 2012.

SCIDAA K, STEGE PW, HABYA G, MESSINA GA, GARCÍA CD. Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: critical review. **Anal Chim Acta,** v.691, p. 6–17, 2011.

SEDANO J, CARRASCAL C. “RNA-seq: herramienta transcriptômica útil para el studio de interacciones planta-patógeno. **Fitosanidad**, v.16, N. 2, p. 101-103, 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.

SEPÚLVEDA L., LARIOS-CRUZ R., LONDOÑO L., HERNÁNDEZ A., ÁLVAREZ B., RAMÍREZ N., TORRES C., NEIRA A., MARTÍNEZ J., VENTURA J., BOONE-VILLA D., AGUILAR C. En: **Production and Recovery of Enzymes for Functional Food Processing**. Functional Foods and Biotechnology. CRC Press, p. 227-228, 2020.

SHAMAILA, S.; SAJJAD, A.K.L.; IQBAL, A. Modifications in development of graphene oxide synthetic routes. **Chemical Engineering Journal**, v. 294, n.1, p.458-77, 2016.

SHAPLA U, SOLAYMAN MD, ALAM N, KHALIL MD, GAN S. 5-Hydoxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n.35, p.1-18, 2018.

SHARMA, A. D.; GILL, P. K.Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 1, p. 1172–1178, 2007.

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. **Appl Biochem Biotechnol,** v.144, n. 1, p.111–121, 2008.

SICILIA D-C., BERNARDO, G., RIVERA, M., NAVARRO, J. Métodos gráficos de análisis exploratorio de datos espaciales con variables espacialmente distribuidas. **Cuadernos Latinoamericanos de Administración**, Universidad El Bosque, v. XIII, n. 25 p. 92-104, 2017.

SILVA-FILHO, D.F., H. NODA, W.O. PAIVA, K. YUYAMA, C.R. BUENO & F.M. MACHADO. **Hortaliças não convencionais nativas e introduzidas na Amazônia**, p. 19–58. In: Noda, N., L.A.G. Souza & O.J.M. Fonseca (Eds.). Duas décadas de contribuições do INPA à pesquisa Agronômica no Trópico Úmido. Manaus, MCT-INPA, p. 332, 1997.

SILVA-FILHO, D.F. **Cocona (*Solanum sessiliflorum Dunal*): Cultivo y utilizacion**. Tratado de Cooperacion Amazônica, Secretaria Pro-Tempore, Caracas, Venezuela, p.105,1998.

SILVA FILHO, D.F.; ANDRADE, J.S.; CLEMENT, C.R.; MACHADO, F.M.; HIROSHI, N. Correlações fenotípicas, genéticas e ambientais entre descritores morfológicos e químicos em frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum Dunal*) da amazonia. **Acta Amazónica**, v. 29, n. 4, p. 503-511,1999.

SILVA J. O.; CANDIDO R.C. Avaliação do sistema API20 AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 261-263, 2005.

SILVA, A. T. C. R. ; MARTINEZ, K. C. L. ; BRITO, A. B. N. ; GIULIETTI, M. Separation of glicose and fructose by freezing crystallization. **Crystal Research and Technology**. v. 45, n. 1989, p. 1032-1034, 2010.

SILVA M, RIGO D, MOSSI V, GOLUNSKI S, KUHN G, LUCCIO M, DALLAGO R, OLIVEIRA D, OLIVEIRA J, TREICHEL H. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and *Kluveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic medium. **Food Chemistry,** v.138, p. 148-153, 2013.

SILVA M, RIGO D, MOSSI V, DALLAGO R, HENRICK P, KUHN G, ROSA C, OLIVEIRA D, OLIVEIRA J, TREICHEL H. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. **Food and Bioproducts processing,** v.91, p. 54-59, 2013b.

SILVA-JÚNIOR A, et al. Repercussoes da prevalencia da síndrome metábolica em adultos e idosos no contexto da atenção primária. **Ver. Salud Pública,** v. 20, n. 6, p. 735-740, 2018.

SINCHI-Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Universidad de la Amazonia. PRONATTA. **Bases técnicas para el desarrollo de la agroindustria de frutas nativas en la Amazonia Occidental Colombiana**. Florencia, Caquetá. Colombia, 2001.

SINCHI, HERNÁNDEZ M, BARRERA J, CARRILLO M. **Arazá (***Eugenia stipitata McVaugh*). Instituto amazónico de investigaciones científicas, p. 1-146, 2006.

SINCHI, GARCÍA J, GÓMEZ M, MELGAREJO L. **Cocona (*Solanum sessilliflorum*).** Instituto amazónico de investigaciones científicas, p. 1-116, 2011.

SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., SOCCOL, C. R., & PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SINGH, P. AND GILL, P. K. Production of inulinases: recent advances. **Food Technol. Biotechnol**. v.44, n. 1, p.151-162, 2006.

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

SINGH, R. S.; DHALIWAL, R.; PURI, M. Production of high fructose syrup from Asparagus inulin using immobilized exo-inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.34, n. 1, p. 649-655. 2007b.

SINGH, R.; BHERMI, H. Production of extracelular exo-inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-I using root tubers of *Asparagus officinalis*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p.7418–7423, 2008.

SINGH RS, SINGH RP. Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. Food Technol Biotechnol, v.48, p. 435-50, 2010.

SINGH RS, SAINI GK. Production of inulinase from raw *Dahlia* inulin by *Kluyveromyces marxianus* YS-1. **J Sci Ind Res**, v.72, p. 603-10, 2013.

SINGH R, CHAUHAN K, SINGH R. Enzymatic approaches for the synthesis of high fructose syrup, in: S.K. Gahlawat et al. (Eds), Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments, **Springer Nature Singapore**, p. 189-211. 2017.

SINGH R, CHAUHAN K. Production, purification, characterization and applications of fungal inulinases, **Current Biotechnology**, v. 7, p. 242-260. 2018.

SIQUEIRA, R. S. Manual de microbiologia de alimentos. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Brasília: EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, p. 159,1995.

SIRISANSANEEYAKUL,S. P.; WORAWUTHIYANAN, N.; VANICHSRIRATANA, W.; SRINOPHAKUN, P.; CHISTI, Y. Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guillermondii.* **World J. Microbiology Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 543-552, 2007.

SIRISANSANEEYAKUL S, SONGPIM M, VAITHANOMSAT P. Optimization of inulinase, invertase and β-fructofuranosidase production from *Aspergillus niger* TISTR 3570 by Taguchi Method*.* **Nat. Sci**, v. 46, p. 238-255, 2012.

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

SKOWRONEK M, FIEDUREK J. Optimisation of inulinase production by *Aspergillus niger* using simplex and classical method*.* **Food Technol. Biotechnol**, v. 42, n. 3, p. 141-146, 2004.

SOKOLOVSKY, V, KALDENHOFF R, RICCI M, RUSSO V. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from Neurospora crassa. **Fungal Genetics Reports**, v. 37, n. 27, p. 1-3 1990.

SOLTERO V, MACO M, VELA J, MERINO C, DÁVILA E, GARCÍA D. Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales Amazónicos de la familia *Sterculiaceae*. **Rev Soc Quím Perú**. v.77, n. 1, p. 66-74, 2011.

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.

STRICKLER, S.; A. BOMBARELY; L. MUELLER. Designing a Transcriptome Next- Generation Sequencing Project for a Nonmodel Plant Species. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 257-266, 2012.

SUÁREZ-CONTRERAS L, FIGUEREDO F. Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. **Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial**, v. 20, n. 2, p. 194-206, 2022.

SUÁREZ-LEPE J.A. "**Impacto de leveduras y bactérias en los aromas vínicos fermentativos**". I Encuentro internacional de Ciencias Sensoriales y de la Percepción, Madrid, España, p. 43-45, 2002

SUGITA C, MAKIMURA K, UCHIDA K, YAMAGUCHI H, NAGAI A. PCR identification system for the genus Aspergillus and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus and Aspergillus niger.* **Medical Micology**, v. 42, p. 433-437, 2004.

SURYAWANSHI, R., JANA, U., PRAJAPATI, B., & KANGO, N. Immobilization of *Aspergillus quadrilineatus* RSNK-1 multi-enzymatic system for fruit juice treatment and mannooligosaccharide generation. **Food Chemistry**, v. 289, p. 95–102, 2019.

SWARBRICK, M.M; STANHOPE, K.L; ELLIOTT, S.S.; GRAHAM, J.L.; KRAUSS, R.M.; CHRISTIANSEN, M.P.; GRIFFEN, S.C.; KEIM, N.L.; HAVEL P.J. Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks increases postprandial triacylglycerol and apolipoprotein-B concentrations in overweight and obese women. **Br J Nutr**, v.100, n. 1, p. 947–952, 2008.

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.

TEIXEIRA, T. R.; OLIVEIRA, A. N.; RAMOS, A. M.. Efeitos da temperatura e concentração nas propriedades físicas da polpa de araçá-boi. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 2, 2013.

TEMKOV M, STRINSKA H, DOBREV G, VELICKOVA E, MURESAN V, KRASTANOV A. Purification of bacterial inulinase in aqueous two-phase systems. **Engineering in life sciences**, v. 18, p. 840-850, 2018.

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.

THYAGARAJAN, B.; ANDERSON, E.; KONG, F.; SELK, F.; LYNCH, C.; GROSS, M. New approaches for genotyping paraffin wax embedded breast tissue from patients with cáncer: the Lowa women´s health study. **J.Clin. Pathol**, v.58, p. 955-961, 2005.

TOMOTANI, E.J.; VITOLO, M. Inverted sugar syrup attained from sucrose hydrolysis using a membrane reactor. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p.571-577, 2010.

TORRES, B. B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, W. *et al*. **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 1.cap. 5.

TORTORA, G. J. *et al.***Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TORABIZADEH H, MIKANI M, RAHMANIAN R. Inulin hydrolysis by immobilized inulinase on functionalized magnetic nanoparticles using soy protein isolate and bovine serum albumin. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 65, n. 6, p. 771–779, 2018.

TRAPALA J, BUSTOS-JAIMES I, MANZANARES P, BÁRZANA E, MONTIEL C. Purification and characterization of an inulinase produce by a *Kluveromyces marxianus* strain isolated from blue agave bagasse. **Protein Expression and Purification**, v. 176, p. 1-8, 2020.

TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados**. 2004. 111 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

TREICHEL, H., OLIVEIRA, D., LERIN, L., ASTOLFI, V., MAZZUTTI, M., LUCCIO, M., OLIVEIRA J. A review on the production and partial characterization of microbial inulinases. **Global journal of biochemistry**, v. 3, n. 7, p. 1-13, 2012.

TRITEK, M.; FLEDUREK, J.; PODKOSCIELNA, B.; GAWDZIK, B.; SKOWRONEK, M. Na eficiente method for the immobilization of inulinase using new types of polymers contaning epoxy groups. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 42, n. 1, p. 985-996, 2015.

TRIVEDI S, DIVECHA J, SHAH A. Optimization of inulinase production by a newly isolated Aspergillus tubingensis CR16 using low-cost substrates. **Carbohydr Polym**, v.90, p. 483-90, 2012.

TRIVEDI, S.; DIVECHA, J.; SHAH, T.; AMITA, S. Rapid and eficiente bioconversion of chicory inulin to fructose by immobilized thermostable inulinase from *Aspergillus tubingensis* CR16. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 32, p. 01-11, 2015.

TRUJILLO, L., HERNÁNDEZ, S. Aislamiento y caracterización de leveduras presents en el fruto del Syzygium malaccense (I.) Merr. &L.M Perry

(pomorroso) en la comuna 1 de la ciudad de Neiva-Huila. **Revista Ingeniería y Región**, v. 13, n. 1, p. 37-45, 2015.

URIBE, L. **Caracterización fisiológica de leveduras aisladas de la filósfera de la mora**. 2007. Trabajo de grado Microbiólogo Industrial. Bogotá D.C. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 2007.

VEGA, A., VALDÉS, L., RENDÓN, A. Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. **Rev. Universidad EAFIT.**, Eafit, v.28, p. 33-41, 2002.

VEGA, S.A. **Identificación molecular de aislados de hongos nematófagos asociados a *Meloidogyne hapla* Chitwood.** 2013. Trabajo presentado para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Austral de Chile. Chile. 2013.

VELHO, C. C.; WHIPKEY, A.; JANICK, J. Cupuassu: a new beverage crop for Brazil. In: J. Janick and J. E. Simons (eds), **Advances in New Crops**. Portland: Timber Press, 1990. p.372-375.

VERACHTERT, H.; DE MOT, R. **Yeast:** biotechnology and biocatalysis. New YorK: Marcel Decker, 1990. p. 257-296.

VEREYKEN, I. J., CHUPIN, V., DEMEL, R.A.; SMEEKENS, S. C. M.; KRUIJFF, B.D. Fructans insert between the headgroups of phospolipids. **Bioquimica et Biophysica Acta**, v. 1510, p. 3017-320, 2001.

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, Araraquara, 2000.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β-galactosidase de Kluyveromyces fragilis em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

VIJIN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? **Plant Physiology**, v. 120. P. 351-359, 1999.

VILLEGAS V.E, SANCHEZ M.C, CHUAIRE L. Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. **Colombia Médica**, v.40, n. 3, p. 347-352, 2009.

VILLENA, G., GUTIÉRREZ-CORREA, M. Biopelículas de *Aspergillus niger* para producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. **Rev. Peru. biol.**, UNMSM, v. 10, n.1, p. 78-87, 2003.

VILHENA, S. M. C. **Ciclo de cultivo e técnicas pós-colheita da yacón (*Polymnia sonchifolia* Poep. Endl) em função do conteúdo de frutose total nos órgãos subterrâneos**. 2001. 73 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

VITOLO, M.; **Imobilização de Enzimas**.IN: Lima, U.A.;Aquarone, E.;Borzani, W.;Schmidell, W.; Biotecnologia Industrial, Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo, SP: Edgard Blücher Ltda, v.3, p. 391-403, 2001.

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.

WANG, Z.; M. GERSTEIN; M. SNYDER. RNA-Seq: a Revolutionary Tool for Transcriptomics. **Nature Reviews, Genetics**, v.10, p. 57-63, 2009.

WARD, J., L. PONNALA, C. WEBER. Strategies for Transcriptome Analysis in Nonmodel Plants. **American Journal of Botany**, v.99, n.2, p. 267-276,2012.

WEI, W.; WAN, W.; LE, H.; WANG, S. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from Kluyveromyces sp. Y-85.**Process. Biochem**.,v.34, n.1, p. 643–646, 1999.

WENLING, W.; HUIYING, W.W.L.; SHIYUAN, W. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 643-646, 1999.

WHITE, T.; BRUNS, S. y TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics**. *In:* Innis, M.; White, T. y Sninsky, J. (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. EE.UU, Academic Press. pp: 315-322,1990.

WOLF, J. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: An RNA-seq tutorial. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 4, p. 559- 572, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Organization Report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneve: WHO, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global status report on noncommunicable diseases 2010. Disponível em: http://www.who.int/nmh/Públications/ncd_report2010. Acessado em 24 de fevereiro de 2017.

XIAO, R.; TANIDA, M.; TAKAO, S. Purification and characteristics of two exo-inulinases from *Chrysosporyum pannorum*, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.67, n.5, p.331-334, 1989.

XIE H, MA Q, WE D, WANG F. Tanscriptomic analysis of Aspergillus niger strains reveals the mechanism underlyin high citric acid productivity. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 21, p. 1-23, 2018.

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.

YAN W, GAO H, QIAN X, JIANG Y, ZHOU J, DONG W, XIN F, ZHANG W, JIANG M. Biotecnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guillermondii*. **Biotechnology Advances**, v.20, p. 1-47, 2020.

YEWALE T, SINGHAL RS, VAIDYA VA. **Biocat Agric Biotechnol**, v. 2, p. 96–101, 2013.

YUN, J.W.; KIM, K.H.; KIM, B.W.; SONG, S.K. Production of inulooligosaccharides from inulin by immobilized endoinulinase from *Pseudomonas* sp. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 369-371, 1997.

YUN, J.W.; SONG, C.H.; CHOI, J.W.; CHOI, Y.J.; SONG, S.K. Production of inulooligosaccharides from inulin by recombinant *E. coli* containing endoinulinase activity. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 101-106, 1999.

YUN, J.W.; PARK, J.P.; SONG, J.P.; LEE, C.Y.; KIM, J.H.; SONG, S.K. Continuous production of inulo-oligosaccharides from chicory juice by immobilized endoinulinase. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 189-194, 2000.

YUYAMA L, PEREIRA Z, AGUIAR J, SILVA-FILHO D, SOUZA R, TEIXEIRA A. Estudo da influência do cubiu (Solanum sessiliflorum Dunal) sobre a

concentração sérica de glicose. **Ver. Inst. Adolfo Lutz,** v. 64, n. 2, p. 232-236, 2005.

YUYAMA, L.K.O., S.H.M. MACEDO, J.P.L. AGUIAR, D.F. SILVA-FILHO, K. YUYAMA, D.I.T. FÁVARO & M.B.A. VASCONCELLOS. Quantificação de macro e micro nutrientes em algumas etnovariedades de cubiu (Solanum sessiliflorum Dunal). **Acta Amazónica,** v. 37, n. 3, p. 425–30, 2007.

ZAMBRANO C., MORENO C., SEQUEDA-CASTAÑEDA G., GARCÍA L.G., ALBARRACÍN A., BARRETO- CHARRY D. "Determining the effectiveness of *Candida guilliermondii* in the biological control of Rhizopus stolonifer in postharvest tomatoes". **Universitas Scientiarum**, v. 19, n. 1, p. 51-62, 2014.

ZAPATA, P., ROJAS, D., RAMÍREZ, D., FERNÁNDEZ, C., LUCÍA, A. Effect of different light-emitting diodes on mycelial biomass production of Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae). **Internacional Journal of medicinal Mushroom**, v. 11, n.1, p. 93-100, 2009.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on "yacón" *Polynmia sonchifolia* (Asteracea). **Economic Botany**, v. 45, p. 72-85, 1991.

ZHANG, L.; ZHAO, C.; ZHU, D.; OHTA,Y.; and WANGA, Y., Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 35, n. 1, p. 272–275, 2004.

ZHANG, T.; GONG, F.; PENG, Y.; CHI, Z. Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase**. Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p.1335-1339, 2009.

ZHANG J, ZHANG F, YANG H, HUANG X, LIU H, ZHANG J, GUO S. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. **Langmuir**, v. 26, n. 9, p. 6083-6085, 2010.

ZHANG Y, WU C, GUO S, ZHANG J. Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides. **Nanotechnol Ver**., v.2, n.1, p. 27–45, 2013.
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.

ZHAO, D., HAMILTON, JP., HARDIGAN, M., YIN, D., HE, T., VAILLANCOURT, B. *et al*. Analysis of Ribosome-Associated mRNAs in Rice Reveals the Importance of Transcript Size and GC Content in Translation. *G3:* **GENES, GENOMES, GENETICS**, v. 7, p. 203-219, 2017.

ZHOU L, JIANG Y, GAO J, ZHAO X, MA L, ZHOU Q. Oriented immobilization of glicose oxidase on graphene oxide. **Biochemical Engineering journal**, v. 69, p. 28-31, 2012.

ZULUAGA, A., ARANGO-BUSTAMANTE, K., CACERES, D., SANCHEZ, Z., VELASQUEZ, V., GÓMEZ, B., PARRA, C., MALDONADO, N., CANO, L., BEDOUT. C., RIVERA, R. Análisis de concordancia de diferentes metodologías para la identificación de aislamientos orales de especies de *Candida*. **Colombia Médica**, OM, v. 49, n.3, p. 193-200, 2018.

APÊNDICE- A

1/8/2019 apiweb™ - Resultado de identificación

laboratorio de salud publica Amazonas - leticia

apiweb

API 20 C AUX V5.0

-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH*
	2			6			4			2			7			7			2	

REFERENCIA **FECHA** 8/01/19

COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION

Galeria	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 6 4 2 7 7 2
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
Cryptococcus laurentii	99.1	0.28	2KG	92%	XLT	76%	INO	84%	MDG	76%
			MLZ	96%						

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
Cryptococcus albidus	0.4	0.0	2KG	98%	GAL	6%	NAG	1%	LAC	10%
			MLZ	81%						

Cerrar Imprimir

https://apiweb.biomerieux.com/servlet/identify 1/1

Figura A1 Resultado apiweb *Cryptococcus laurentii* (Morfotipo No. 1)

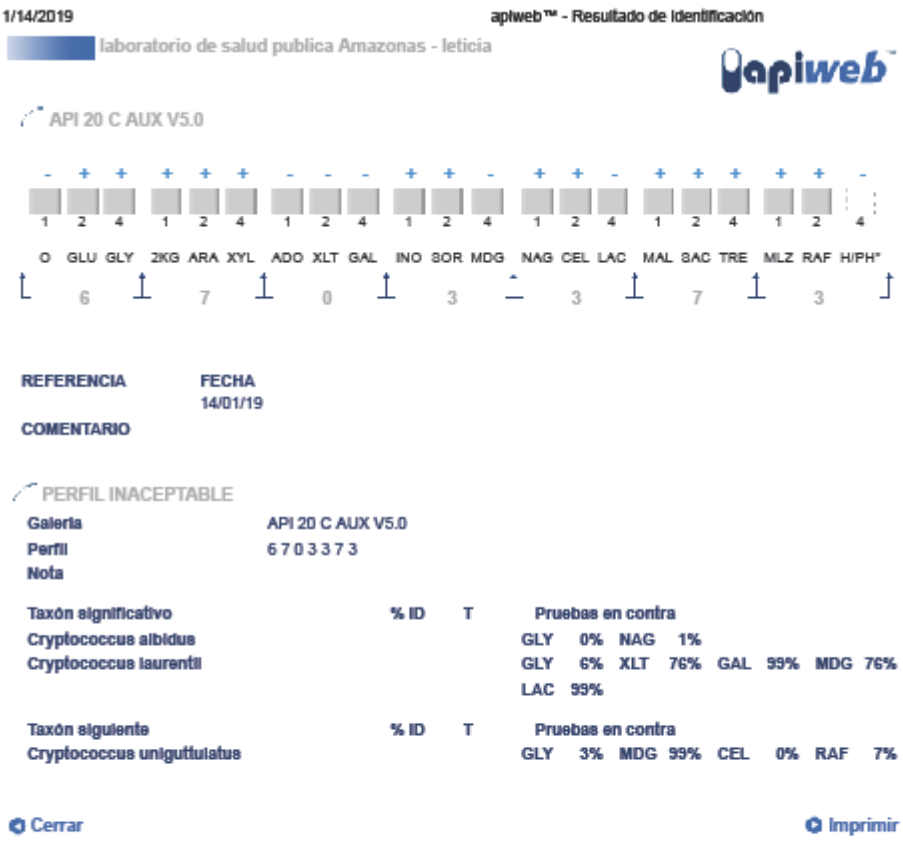
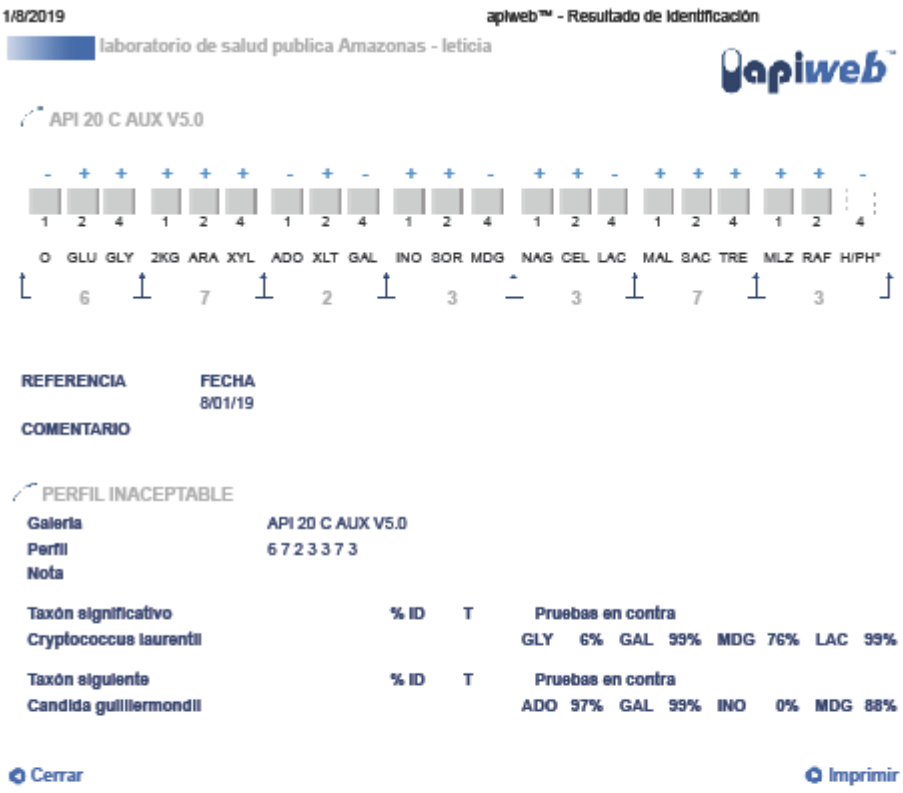


Figura A2 Resultado apiweb Perfil inaceitável (Morfotipo No. 3)


1/8/2019 apiweb™ - Resultado de Identificación

laboratorio de salud publica Amazonas - leticia

apiweb™

API 20 C AUX V5.0

-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH*
	6		7			2			3			3			7			3		

REFERENCIA **FECHA** 8/01/19

COMENTARIO

PERFIL INACEPTABLE

Galeria	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 7 2 3 3 7 3
Nota	

Taxón significativo	**% ID**	**T**	**Pruebas en contra**							
Cryptococcus laurentii			**GLY**	**6%**	**GAL**	**99%**	**MDG**	**76%**	**LAC**	**99%**
Taxón siguiente	**% ID**	**T**	**Pruebas en contra**							
Candida guilliermondii			**ADO**	**97%**	**GAL**	**99%**	**INO**	**0%**	**MDG**	**88%**

Cerrar Imprimir

https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify 1/1

Figura A3 Resultado apiweb Perfil inaceitável (Morfotipo No. 5)

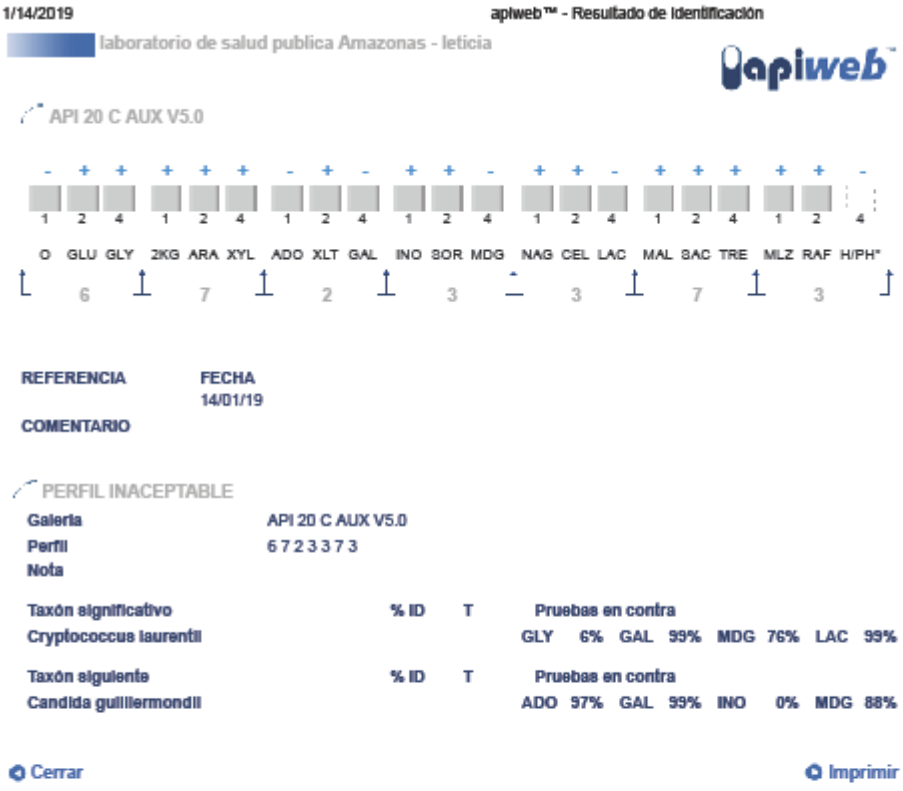


Figura A4 Resultado apiweb Perfil inaceitável (Morfotipo No. 10)

12/14/2018 apiweb™ - Resultado de Identificación

laboratorio de salud publica Amazonas - leticia

apiweb

API 20 C AUX V5.0

-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH*
	6			7			5			7			6			3			7	

REFERENCIA **FECHA** 14/12/18

COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION

Galeria API 20 C AUX V5.0
Perfil 6 7 5 7 6 3 7
Nota

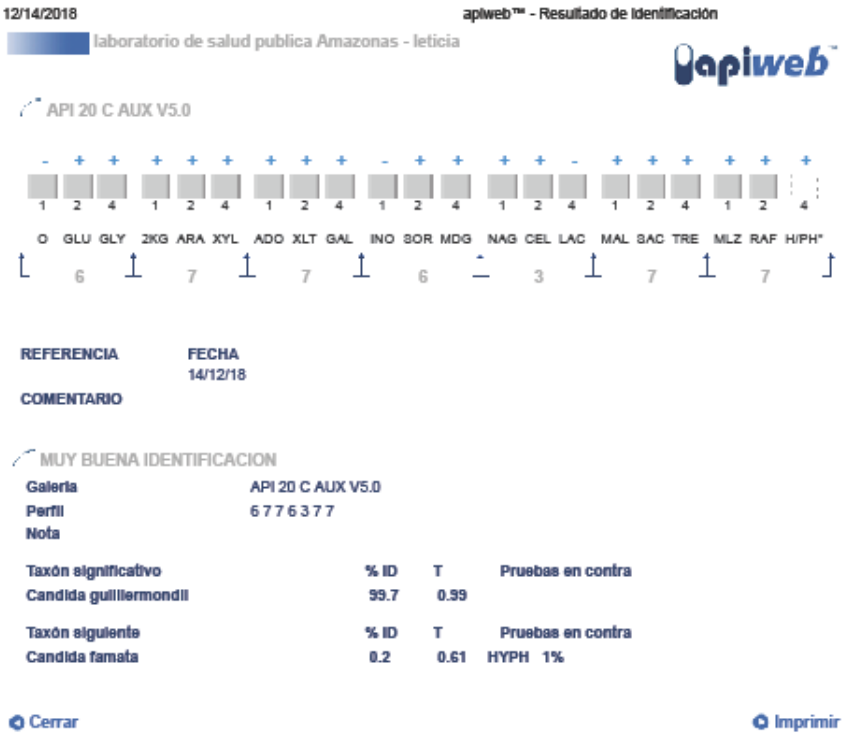
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Trichosporon mucoides	95.3	0.65	NAG 94% TRE 78%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Cryptococcus humicola	3.6	0.3	NAG 100% TRE 99%

Cerrar Imprimir

https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify 1/1

Figura A5 Resultado apiweb *Trichosporon mucoides* (Morfotipo No. 17)



12/14/2018 apiweb™ - Resultado de Identificación

laboratorio de salud publica Amazonas - leticia

apiweb

API 20 C AUX V5.0

-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4

O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH*
	6		7		7		6			3		7			7			7		

REFERENCIA **FECHA** 14/12/18

COMENTARIO

MUY BUENA IDENTIFICACION

Galeria	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 7 7 6 3 7 7
Nota	

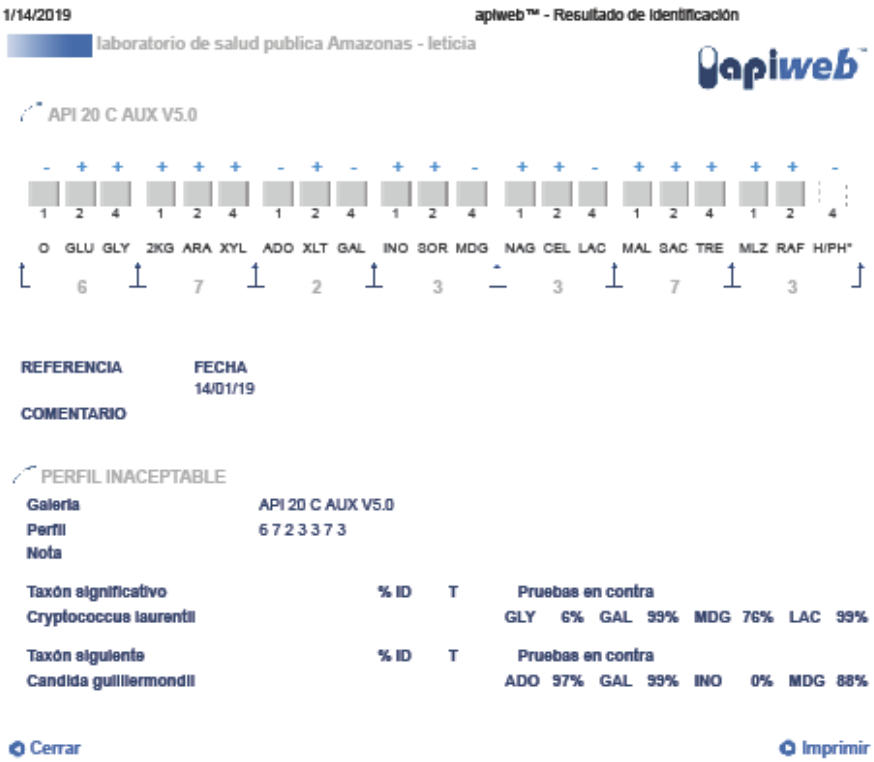
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Candida guilliermondii	99.7	0.99	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Candida famata	0.2	0.61	HYPH 1%

Cerrar Imprimir

https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify 1/1

Figura A6 Resultado apiweb *Candida guillermondii* (Morfotipo No. 21)



1/14/2019 apiweb™ - Resultado de Identificación

laboratorio de salud publica Amazonas - leticia

apiweb

API 20 C AUX V5.0

-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH*
	6		7		2		3		3			7			3					

REFERENCIA **FECHA** 14/01/19

COMENTARIO

PERFIL INACEPTABLE

Galeria	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 7 2 3 3 7 3
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
Cryptococcus laurentii			GLY	6%	GAL	99%	MDG	76%	LAC	99%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
Candida guilliermondii			ADO	97%	GAL	99%	INO	0%	MDG	88%

Cerrar Imprimir

https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify 1/1

Figura A7 Resultado apiweb Perfil inaceitável (Morfotipo No. 27)

APÊNDICE - B

Figura B1 Curva padrão da dosagem de açúcares redutores a 540 nm

Os açúcares redutores (frutose) foram determinados, usando frutose R.A como padrão, a partir da Figura A1 ─ curva padrão da frutose usando DNS.
A constante de proporcionalidade (A) entre a absorbância e a concentração de glicose e coeficiente linear da reta (B) foram calculadas por regressão linear (Figura A1). O valor de A foi significativo ($p \leq 0,01$) e com um coeficiente de extinção molar Ɛ540nm= 112,2 M^{-1} cm^{-1}.

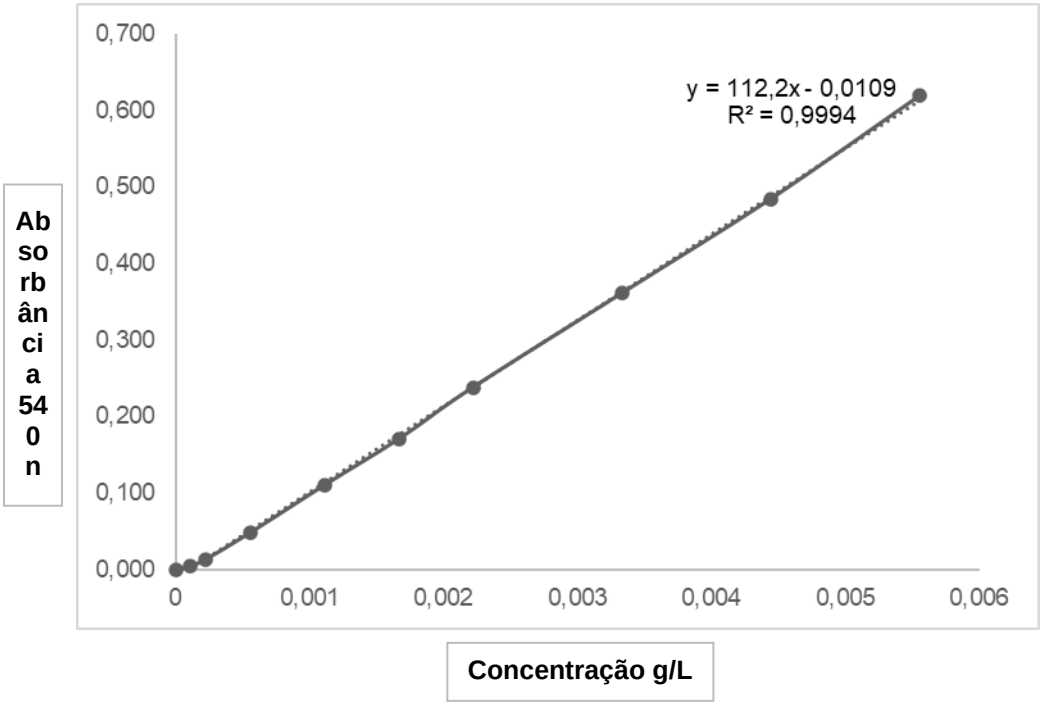


Figura B1. Curva padrão para açúcares redutores (frutose).

Figura B2 Curva padrão da dosagem de proteínas a 595 nm

Na figura A2 tem-se a curva de calibração para quantificação de proteínas pelo método Bradford usando Albumina de Soro Bovino (BSA) como padrão. A medida de absorbância foi realizada a 595 nm.

A constante de proporcionalidade (A) entre a absorbância e a concentração de BSA e coeficiente linear da reta (B) foram calculadas por regressão linear. O valor de A foi significativo ($p \leq 0,01$) e com um valor de absortividade de 2,72 $mg.mL^{-1}$.

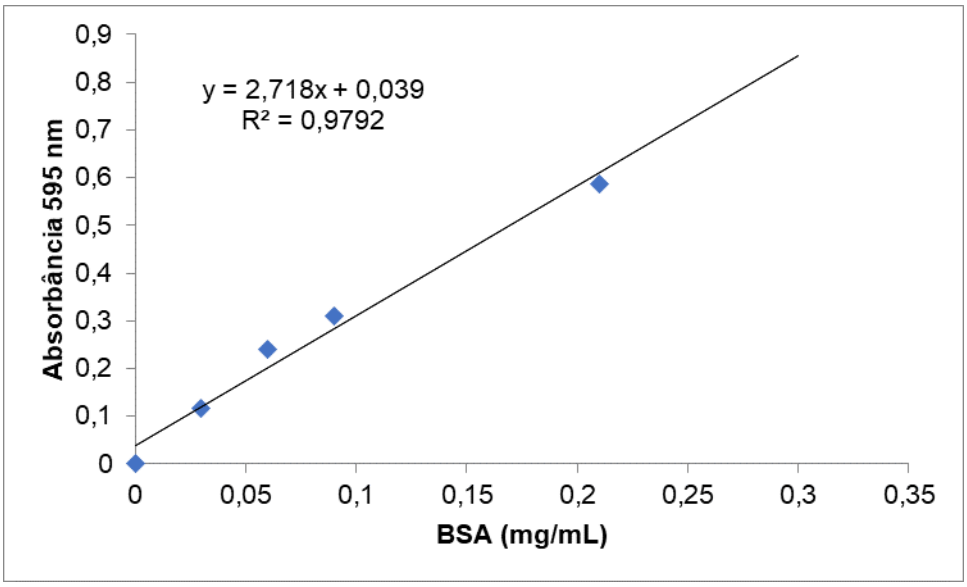


Figura B2. Curva padrão para proteínas método Bradford.

APÊNDICE - C

Tabela 1.11 Média e desvio padrão das atividades enzimáticas obtidas no tratamento 1.

Amostra	Temperatura de Hidrólise	TRATAMENTO 1 Atividade enzimática na fermentação submersa (Média ± dp)					
		24H	48H	72H	96H	120H	144H
1	20 °C	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,77 ± 0,09	0,07 ± 0,04	0,137 ± 0,065
	50 °C	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,36 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,257 ± 0,055
2	20 °C	0,234 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,251 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	20 °C	0,09 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,21 ± 0,06	0,32 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01
5	20 °C	0,204 ± 0,05	0,357 ± 0,16	0,04 ± 0,01	0,323 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01
	50 °C	0,127 ± 0,01	0,427 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,183 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03
6	20 °C	0,07 ± 0,004	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,32 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
8	20 °C	0,138 ± 0,03	0,052 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,473 ± 0,08	0,006 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
9	20 °C	0,29 ± 0,03	0,093 ± 0,01	0,167 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,313 ± 0,07	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,31 ± 0,04	0,093 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,253 ± 0,05	0,037 ± 0,03
10	20 °C	0,00 ± 0,00	0,210 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,00 ± 0,00	0,107 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,037 ± 0,03
17	20 °C	0,00 ± 0,00	1,01 ± 0,32	0,670 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01
	50 °C	0,00 ± 0,00	1,18 ± 0,18	0,507 ± 0,08	0,140 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
19	20 °C	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20	20 °C	0,00 ± 0,00	0,191 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,00 ± 0,00	0,459 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
21	20 °C	0,00 ± 0,00	0,087 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,200 ± 0,04	0,113 ± 0,04	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,168 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,333 ± 0,03	0,047 ± 0,02	0,00 ± 0,00
22	20 °C	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,01 ± 0,00	0,47 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
23	20 °C	0,00 ± 0,00	0,180 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,16 ± 0,02	0,099 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
24	20 °C	0,00 ± 0,00	0,069 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,108 ± 0,01	0,080 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
25	20 °C	0,046 ± 0,01	0,089 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,00 ± 0,00	0,046 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
26	20 °C	0,069 ± 0,01	0,123 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,00 ± 0,00	0,077 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
27	20 °C	0,009 ± 0,01	0,087 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 °C	0,064 ± 0,01	0,262 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Tabela 1.12 Média e desvio padrão das atividades específicas obtidas no tratamento 1.

TRATAMENTO 1							
Amostra	Temperatura de Hidrólise	Atividade específica na fermentação submersa (Média ± dp)					
		24H	48H	72H	96H	120H	144H
1	20 ºC	47,5 ± 10,6	13,4 ± 2,4	0,0 ± 0,0	130,4 ± 16,4	35,4 ± 18,5	9,5 ± 4,6
	50 ºC	10,8 ± 3,9	14,4 ± 4,3	0,0 ± 0,0	61,1 ± 5,9	0,0 ± 0,0	17,9 ± 3,8
2	20 ºC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
3	20 ºC	22,2 ± 0,6	180,9 ± 28,7	0,0 ± 0,0	1,33 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	51,7 ± 15,5	291,9 ± 3,4	0,0 ± 0,0	2,53 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,3
5	20 ºC	39,6 ± 9,8	193,8 ± 84,8	8,1 ± 2,6	23,1 ± 5,2	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,6
	50 ºC	25,1 ± 0,9	231 ± 23,8	0,0 ± 0,0	13,1 ± 5,3	0,0 ± 0,0	2,2 ± 1,7
6	20 ºC	27,1 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	125,3 ± 21,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
8	20 ºC	46,7 ± 17,0	23,2 ± 9,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	183,5 ± 32,6	2,7 ± 3,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
9	20 ºC	77,5 ± 8,8	4,9 ± 0,6	21,5 ± 9,9	0,0 ± 0,0	9,2 ± 1,9	0,0 ± 0,0
	50 ºC	84,5 ± 10,2	5,0 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,4 ± 1,6	3,8 ± 2,5
10	20 ºC	0,0 ± 0,0	28,8 ± 5,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,0 ± 0,0
	50 ºC	0,0 ± 0,0	14,3± 8,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,8 ± 2,5
17	20 ºC	0,0 ± 0,0	392,7 ± 124,2	53,5 ± 3,5	11,1 ± 1,9	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,7
	50 ºC	0,0 ± 0,0	456,4 ± 67,2	40,4 ± 6,1	14,3 ± 4,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
19	20 ºC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
20	20 ºC	0,0 ± 0,0	56,8 ± 13,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	0,0 ± 0,0	138,6 ± 14,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
21	20 ºC	0,0 ± 0,0	15,5 ± 4,4	0,0 ± 0,0	6,6 ± 1,2	2,4 ± 0,9	0,0 ± 0,0
	50 ºC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	11,2 ± 0,8	1,0 ± 0,3	0,0 ± 0,0
22	20 ºC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	29,6 ± 0,06	45,6 ± 1,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
23	20 ºC	0,0 ± 0,0	23,2 ± 3,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	53,6 ± 8,1	12,8 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
24	20 ºC	0,0 ± 0,0	93,7 ± 6,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	48,8 ± 3,7	108,2 ± 27,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
25	20 ºC	0,0 ± 0,0	40,2 ± 10,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	0,0 ± 0,0	21,2 ± 5,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
26	20 ºC	47,1 ± 7,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
27	20 ºC	2,1 ± 0,9	21,6 ± 7,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	50 ºC	12,4 ± 1,1	64,8 ± 11,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Tabela 1.13 Análise de variância do tratamento 1 para teor de açúcar redutor e proteína usando o *software* R.

```
res.aov1 <- Data_Marcela2 %>% anova_test(ActEnz ~ Temperatura*Tiempo*Muestra)

Anova Table (Type II tests)

Response: ActEnz
                     Sum Sq  Df F value    Pr(>F)
Temperatura             0.0222   1  18.386 2.227e-05 ***
Tiempo                 2.0672   5 341.844 < 2.2e-16 ***
Muestra                3.2295  17 157.073 < 2.2e-16 ***
Temperatura:Tiempo:Muestra 10.8510 192  46.729 < 2.2e-16 ***
Residuals               0.5225 432
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1
```


```
res.aov1 <- Data_Marcela2 %>% anova_test(ActEnz ~ Temperatura*Tiempo*Muestra)

Anova Table (Type II tests)

Response: ActEnz
                     Sum Sq  Df F value    Pr(>F)
Temperatura             0.0222   1  18.386 2.227e-05 ***
Tiempo                 2.0672   5 341.844 < 2.2e-16 ***
Muestra                3.2295  17 157.073 < 2.2e-16 ***
Temperatura:Tiempo:Muestra 10.8510 192  46.729 < 2.2e-16 ***
Residuals               0.5225 432
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1
```

Tabela 1.14 Média e desvio padrão das atividades enzimáticas obtidas no tratamento 2.

Amostra	Temperatura de Hidrólise	Atividade enzimática na fermentação submersa (Média ± dp)				
		24H	48H	72H	96H	120H
1	50 ℃	0,586 ± 0,023	0,167 ± 0,021	0,138 ± 0,029	0,034 ± 0,007	0,037 ± 0,002
2	50 ℃	0,127 ± 0,015	0,148 ± 0,029	0,131 ± 0,04	0,056 ± 0,04	0,039 ± 0,025
3	50 ℃	0,393 ± 0,016	0,814 ± 0,02	0,155 ± 0,006	0,380 ± 0,004	0,006 ± 0,011
5	50 ℃	0,424 ± 0,005	0,303 ± 0,015	0,276 ± 0,002	0,277 ± 0,003	0,045 ± 0,006
6	50 ℃	0,151 ± 0,006	0,159 ± 0,067	0,108 ± 0,032	0,075 ± 0,012	0,062 ± 0,021
8	50 ℃	0,035 ± 0,031	0,174 ± 0,058	0,055 ± 0,028	0,109 ± 0,034	0,056 ± 0,006
9	50 ℃	0,125 ± 0,044	0,220 ± 0,189	0,124 ± 0,039	0,077 ± 0,037	0,04 ± 0,027
10	50 ℃	0,366 ± 0,009	0,941 ± 0,085	0,302 ± 0,004	0,271 ± 0,004	0,00 ± 0,000
17	50 ℃	0,482 ± 0,036	0,113 ± 0,01	0,098 ± 0,014	0,066 ± 0,02	0,03 ± 0,007
19	50 ℃	0,412 ± 0,031	0,09 ± 0,007	0,002± 0,003	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
20	50 ℃	0,037 ± 0,018	0,141 ± 0,077	0,023 ± 0,004	0,104 ± 0,023	0,071 ± 0,02
21	50 ℃	0,122 ± 0,03	0,274 ± 0,027	0,081 ± 0,009	0,06 ± 0,004	0,048 ± 0,06
22	50 ℃	0,215 ± 0,014	0,128 ± 0,026	0,073 ± 0,039	0,003 ± 0,006	0,003 ± 0,006
23	50 ℃	0,168 ± 0,121	0,095 ± 0,005	0,004 ± 0,004	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,000
24	50 ℃	0,122 ± 0,026	0,058 ± 0,002	0,002 ± 0,002	0,001 ± 0,001	0,00 ± 0,000
25	50 ℃	0,089 ± 0,012	0,033 ± 0,015	0,003 ± 0,004	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
26	50 ℃	0,095 ± 0,04	0,079 ± 0,017	0,002 ± 0,003	0,001± 0,002	0,00 ± 0,000
27	50 ℃	0,323 ± 0,025	0,296 ± 0,087	0,017 ± 0,021	0,043 ± 0,034	0,006 ± 0,007

Tabela 1.15 Média e desvio padrão das atividades específicas obtidas no tratamento 2.

Amostra	Temperatura de Hidrólise	Atividade enzimática na fermentação submersa (Média ± dp)				
		24H	48H	72H	96H	120H
1	50 ℃	10,4 ± 0,4	10,6 ± 1,3	17,9 ± 3,8	31,1 ± 5,9	33,4 ± 1,3
2	50 ℃	0,0 ± 0,0	161,3 ± 31,5	237,4 ± 71,4	2,03 ± 1,41	1,4 ± 0,92
3	50 ℃	27,3 ± 1,1	107,9 ± 2,7	35,2 ± 1,4	12,9 ± 0,1	0,9 ± 1,5
5	50 ℃	52,4 ± 0,5	61,2 ± 3,1	12,6 ± 0,06	12,1 ± 0,12	2,1 ± 0,29
6	50 ℃	274,2 ± 9,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
8	50 ℃	0,0 ± 0,0	33,8 ± 11,2	5,3 ± 2,8	2,6 ± 0,8	1,3 ± 0,2
9	50 ℃	169,8 ± 59,3	13,3 ± 11,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
10	50 ℃	15,2 ± 0,42	39,4 ± 3,56	14,8 ± 0,17	15,0± 0,21	0,0 ± 0,0
17	50 ℃	10,8 ± 0,79	2,03 ± 0,15	1,73 ± 0,29	5,53 ± 8,03	0,5 ± 0,1
19	50 ℃	620,1 ± 95,7	27,2 ± 1,91	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
20	50 ℃	7,43 ± 3,53	42,47 ± 23,1	1,97 ± 0,35	141,2 ± 31,1	96,5 ± 25,8
21	50 ℃	33,3 ± 8,21	248,1 ± 24,4	1,0 ± 0,1	0,77 ± 0,058	0,63 ± 0,06
22	50 ℃	24,89 ± 1,67	86,9 ± 17,3	3,2 ± 1,68	4,4 ± 7,62	0,0 ± 0,0
23	50 ℃	85,33 ± 86,4	12,3 ± 0,65	10,8 ± 18,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
24	50 ℃	66,33 ± 30,7	78,2 ± 1,9	1,8 ± 3,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
25	50 ℃	48,2 ± 6,32	15,2 ± 6,8	1,8 ± 3,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
26	50 ℃	70,6 ± 49,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
27	50 ℃	1753,5 ± 139,9	94,7 ± 27,8	92,4 ± 116,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Tabela 1.16 Análise de variância do tratamento 2 para teor de açúcar redutor e proteína usando o *software* R.

```
Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.enzimatica
                Sum Sq  Df F value    Pr(>F)
Amostra       2.63002  17 126.239 < 2.2e-16 ***
Tempo         2.00807   4 409.641 < 2.2e-16 ***
Amostra:Tempo 3.00281  68  36.033 < 2.2e-16 ***
Residuals     0.22059 180
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1
```

```
Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.especifica
                Sum Sq  Df F value    Pr(>F)
Amostra       1980951  17  158.21 < 2.2e-16 ***
Tempo         1134642   4  385.14 < 2.2e-16 ***
Amostra:Tempo 7470984  68  149.17 < 2.2e-16 ***
Residuals      132572 180
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1
```

Tabela 1.17 Média e desvio padrão da influência de luzes LED para teor de açúcar redutor usando o *software* R.

Amostra	Tempo	Atividade enzimática na fermentação submersa vs cor de luzes (Média ± dp)			
		Azul	Branca	Verde	Vermelha
1	24H	0,13 ± 0,05	0,01 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,16 ± 0,04
	48H	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,03 ± 0,02
3	24H	0,35 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,07 ± 0,06
	48H	0,31 ± 0,08	0,25 ± 0,03	0,38 ± 0,06	0,00 ± 0,00
17	24H	0,22 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,02	0,24 ± 0,04
	48H	0,24 ± 0,07	0,59 ± 0,06	0,12 ± 0,03	0,00 ± 0,00
21	24H	0,41 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,33 ± 0,09	0,25 ± 0,07
	48H	0,08 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,38 ± 0,05	0,29 ± 0,02
27	24H	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,21 ± 0,00
	48H	0,27 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,38 ± 0,19	0,16 ± 0,08

Tabela 1.18 Média e desvio padrão da influência de luzes LED para atividade específica usando o *software* R.

Amostra	Tempo	Atividade enzimática na fermentação submersa com cor de luzes (Média ± dp)			
		Azul	Branca	Verde	Vermelha
1	24H	11,8 ± 4,23	0,00 ± 0,00	23,9 ± 0,17	22,9 ± 5,70
	48H	0,00 ± 0,00	10,7 ± 3,55	14,1 ± 5,28	7,04 ± 3,96
3	24H	18,9 ± 2,01	36,2 ± 6,96	1,76 ± 3,05	10,1 ± 8,18
	48H	93,3 ± 22,1	222,5 ± 20,2	63,1 ± 8,9	0,00 ± 0,00
17	24H	2,39 ± 0,36	0,00 ± 0,00	0,65 ± 0,20	2,58 ± 0,43
	48H	5,54 ± 1,57	18,8 ± 1,87	2,42 ± 0,58	0,00 ± 0,00
21	24H	5,36 ± 0,02	30,3 ± 0,66	3,86 ± 1,66	3,20 ± 0,93
	48H	0,94 ± 0,40	0,00 ± 0,00	5,08 ± 0,61	5,98 ± 0,38
27	24H	0,19 ± 0,34	3,01 ± 1,73	0,07 ± 0,12	5,56 ± 0,03
	48H	36,4 ± 7,04	5,12 ± 5,28	15,11 ± 14,2	13,6 ± 7,98

Tabela 1.19 Análise de variância da influência de luzes LED para teor de açúcar redutor e proteína usando o *software* R.

```
Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.enzimatica
                Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Luz             0.11661  3  16.881 1.380e-08 ***
Tempo           0.04641  1  20.158 2.368e-05 ***
Amostra         0.41351  4  44.898 < 2.2e-16 ***
Luz:Tempo:Amostra 2.08601 31  29.225 < 2.2e-16 ***
Residuals       0.18420 80
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.especifica
                Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Luz             10762  3  91.342 < 2.2e-16 ***
Tempo            8508  1 216.626 < 2.2e-16 ***
Amostra         44474  4 283.104 < 2.2e-16 ***
Luz:Tempo:Amostra 105685 31  86.805 < 2.2e-16 ***
Residuals        3142 80
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Tabela 3.13 Média e desvio padrão da concentração de substrato e tampão para teor de açúcar redutor usando o *software* R.

Amostra	**Tampão**	**Atividade enzimática vs concentração de inulina (Média ± dp)**			
		0,5%	**1,0%**	**1,5%**	**2,0%**
No.3	Fosfato	0,22 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,067 ± 0,01	0,007 ± 0,01
	McLlvaine	0,27 ± 0,05	0,83 ± 0,06	0,79 ± 0,03	0,50 ± 0,09
ATCC	Fosfato	0,18 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	McLlvaine	0,26 ± 0,01	0,39 ± 0,09	0,42 ± 0,05	0,29 ± 0,01

Tabela 3.14 Média e desvio padrão da concentração de substrato e tampão para atividade específica usando o *software* R.

Amostra	**Tampão**	**Atividade específica vs concentração de inulina (Média ± dp)**			
		0,5%	**1,0%**	**1,5%**	**2,0%**
No.3	Fosfato	50,7 ± 0,8	59,7 ± 3,9	14,7 ± 2,1	1,7 ± 3,0
	McLlvaine	61,1 ± 10,8	187,7 ± 12,0	178,5 ± 7,1	112,6 ± 21,1
ATCC	Fosfato	43,2 ± 2,2	31,8 ± 3,2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	McLlvaine	63,4 ± 3,6	97,5 ± 22,9	103,8 ± 13,4	93,6 ± 38,4

Tabela 3.15 Análise de variância da concentração de substrato e tampão para teor de açúcar redutor e proteína usando o *software* R.

```
Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.enzimatica
                    Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Inulina             0.30934  3  60.804 2.594e-13 ***
Tampao              1.54801  1 912.831 < 2.2e-16 ***
Amostra             0.30720  1 181.150 1.006e-14 ***
Inulina:Tampao:Amostra 0.69138 10  40.769 2.260e-15 ***
Residuals           0.05427 32
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1
Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.especifica
                    Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Inulina             13900  3  24.747 1.794e-08 ***
Tampao              90917  1 485.570 < 2.2e-16 ***
Amostra             10226  1  54.617 2.087e-08 ***
Inulina:Tampao:Amostra  35497 10  18.958 9.673e-11 ***
Residuals            5992 32
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1
```

Tabela 3.16 Média e desvio padrão da IE para teor de açúcar redutor usando o *software* R.

					Atividade enzimática						
Amostra	**Meio cultura**	**Tampão**	***Shaker***	**Hidrólise**	**Média ± dp**	**Amostra**	**Meio cultura**	**Tampão**	***Shaker***	**Hidrólise**	**Média ± dp**
No.3	M2	Fosfato	Aberto	1hora	0,482 ± 0,04	ATCC	M2	Fosfato	Aberto	1hora	0,218 ± 0,02
	M2	Fosfato	Aberto	2horas	0,123 ± 0,01		M2	Fosfato	Aberto	2horas	0,075 ± 0,01
	M2	Fosfato	Fechado	1hora	0,408 ± 0,05		M2	Fosfato	Fechado	1hora	0,23 ± 0,02
	M2	Fosfato	Fechado	2horas	0,192 ± 0,01		M2	Fosfato	Fechado	2horas	0,093 ± 0,01
	M3	Fosfato	Aberto	1hora	0,72 ± 0,01		M3	Fosfato	Aberto	1hora	0,818 ± 0,04
	M3	Fosfato	Aberto	2horas	0,03 ± 0,05		M3	Fosfato	Aberto	2horas	0,038 ± 0,01
	M3	Fosfato	Fechado	1hora	0,211 ± 0,03		M3	Fosfato	Fechado	1hora	0,205 ± 0,01
	M3	Fosfato	Fechado	2horas	0,027 ± 0,01		M3	Fosfato	Fechado	2horas	0,046 ± 0,02
	M6	Fosfato	Aberto	1hora	0,551 ± 0,07		M6	Fosfato	Aberto	1hora	0,453 ± 0,08
	M6	Fosfato	Aberto	2horas	0,021 ± 0,01		M6	Fosfato	Aberto	2horas	0,018 ± 0,01
	M6	Fosfato	Fechado	1hora	0,083 ± 0,02		M6	Fosfato	Fechado	1hora	0,061 ± 0,01
	M6	Fosfato	Fechado	2horas	0,016 ± 0,01		M6	Fosfato	Fechado	2horas	0,022 ± 0,01
	M2	McLlvaine	Aberto	1hora	1,027 ± 0,06		M2	McLlvaine	Aberto	1hora	0,581 ± 0,06
	M2	McLlvaine	Aberto	2horas	0,143 ± 0,01		M2	McLlvaine	Aberto	2horas	0,076 ± 0,01
	M2	McLlvaine	Fechado	1hora	0,316 ± 0,02		M2	McLlvaine	Fechado	1hora	0,245 ± 0,01
	M2	McLlvaine	Fechado	2horas	0,215 ± 0,01		M2	McLlvaine	Fechado	2horas	0,094 ± 0,01
	M3	McLlvaine	Aberto	1hora	0,649 ± 0,02		M3	McLlvaine	Aberto	1hora	0,631 ± 0,02
	M3	McLlvaine	Aberto	2horas	0,043 ± 0,01		M3	McLlvaine	Aberto	2horas	0,045 ± 0,01
	M3	McLlvaine	Fechado	1hora	0,214 ± 0,01		M3	McLlvaine	Fechado	1hora	0,211 ± 0,01
	M3	McLlvaine	Fechado	2horas	0,033 ± 0,01		M3	McLlvaine	Fechado	2horas	0,044 ± 0,02
	M6	McLlvaine	Aberto	1hora	0,384 ± 0,01		M6	McLlvaine	Aberto	1hora	0,272 ± 0,01
	M6	McLlvaine	Aberto	2horas	0,025 ± 0,01		M6	McLlvaine	Aberto	2horas	0,018 ± 0,01
	M6	McLlvaine	Fechado	1hora	0,125 ± 0,01		M6	McLlvaine	Fechado	1hora	0,08 ± 0,01
	M6	McLlvaine	Fechado	2horas	0,02 ± 0,00		M6	McLlvaine	Fechado	2horas	0,029 ± 0,01

Tabela 3.17 Média e desvio padrão da IE para atividade específica usando o software R.

Atividade específica											
Amostra	**Meio de cultura**	**Tampão**	***Shaker***	**Hidrólise**	**Média ± dp**	**Amostra**	**Meio de cultura**	**Tampão**	***Shaker***	**Hidrólise**	**Média ± dp**
No.3	M2	Fosfato	Aberto	1hora	109,1 ± 8,4	ATCC	M2	Fosfato	Aberto	1hora	53,8 ± 4,88
	M2	Fosfato	Aberto	2horas	27,8 ± 0,5		M2	Fosfato	Aberto	2horas	18,5 ± 1,78
	M2	Fosfato	Fechado	1hora	92,3 ± 0,7		M2	Fosfato	Fechado	1hora	56,7 ± 4,85
	M2	Fosfato	Fechado	2horas	43,5 ± 0,01		M2	Fosfato	Fechado	2horas	23,1 ± 0,85
	M3	Fosfato	Aberto	1hora	139,8 ± 2,7		M3	Fosfato	Aberto	1hora	103,4 ± 5,4
	M3	Fosfato	Aberto	2horas	5,9 ± 0,9		M3	Fosfato	Aberto	2horas	4,8 ± 0,79
	M3	Fosfato	Fechado	1hora	40,9 ± 6,5		M3	Fosfato	Fechado	1hora	25,9 ± 0,93
	M3	Fosfato	Fechado	2horas	5,3 ± 0,3		M3	Fosfato	Fechado	2horas	5,87 ± 2,12
	M6	Fosfato	Aberto	1hora	68,1 ± 8,9		M6	Fosfato	Aberto	1hora	107,1 ± 18,9
	M6	Fosfato	Aberto	2horas	2,6 ± 0,3		M6	Fosfato	Aberto	2horas	4,3 ± 0,61
	M6	Fosfato	Fechado	1hora	10,2 ± 2,8		M6	Fosfato	Fechado	1hora	14,5 ± 2,43
	M6	Fosfato	Fechado	2horas	1,9 ± 0,06		M6	Fosfato	Fechado	2horas	5,3 ± 1,43
	M2	McLlvaine	Aberto	1hora	232,5 ± 15,2		M2	McLlvaine	Aberto	1hora	143,6 ± 15,7
	M2	McLlvaine	Aberto	2horas	32,5 ± 0,7		M2	McLlvaine	Aberto	2horas	18,9 ± 1,61
	M2	McLlvaine	Fechado	1hora	73,7 ± 6,7		M2	McLlvaine	Fechado	1hora	60,4 ± 2,91
	M2	McLlvaine	Fechado	2horas	48,7 ± 0,9		M2	McLlvaine	Fechado	2horas	23,4 ± 0,59
	M3	McLlvaine	Aberto	1hora	126,1 ±4,6		M3	McLlvaine	Aberto	1hora	79,8 ± 2,96
	M3	McLlvaine	Aberto	2horas	8,4 ± 0,9		M3	McLlvaine	Aberto	2horas	5,73 ± 0,45
	M3	McLlvaine	Fechado	1hora	36,8 ± 8,7		M3	McLlvaine	Fechado	1hora	26,6 ± 0,27
	M3	McLlvaine	Fechado	2horas	6,4 ± 0,2		M3	McLlvaine	Fechado	2horas	5,57 ± 2,04
	M6	McLlvaine	Aberto	1hora	47,5 ± 1,1		M6	McLlvaine	Aberto	1hora	64,2 ± 1,55
	M6	McLlvaine	Aberto	2horas	3,1 ± 0,3		M6	McLlvaine	Aberto	2horas	4,2 ± 0,46
	M6	McLlvaine	Fechado	1hora	19,9 ± 6,7		M6	McLlvaine	Fechado	1hora	18,9 ± 1,11
	M6	McLlvaine	Fechado	2horas	2,5 ± 0,06		M6	McLlvaine	Fechado	2horas	6,9 ± 1,84

Tabela 3.18 Análise de variância da IE para teor de açúcar redutor e proteína usando o software R.

```
Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.enzimatica
                                                                    Sum Sq Df  F value    Pr(>F)
Amostra.Extracelular                                                0.1323  1  204.744 < 2.2e-16 ***
Meio.de.cultura                                                     0.5600  2  433.483 < 2.2e-16 ***
Tampao                                                              0.0091  1   14.119 0.0002945 ***
Shaker                                                              1.1123  1 1722.008 < 2.2e-16 ***
Hidrolise                                                           3.6902  1 5712.939 < 2.2e-16 ***
Amostra.Extracelular:Meio.de.cultura:Tampao:Shaker:Hidrolise 2.8700 41  108.369 < 2.2e-16 ***
Residuals                                                           0.0620 96
Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.especifica
                                                                    Sum Sq Df  F value    Pr(>F)
Amostra.Extracelular                                                 5772  1  187.416 < 2.2e-16 ***
Meio.de.cultura                                                     44066  2  715.378 < 2.2e-16 ***
Tampao                                                                986  1   32.030 1.571e-07 ***
Shaker                                                              35730  1 1160.124 < 2.2e-16 ***
Hidrolise                                                          129031  1 4189.467 < 2.2e-16 ***
Amostra.Extracelular:Meio.de.cultura:Tampao:Shaker:Hidrolise 114491 41   90.668 < 2.2e-16 ***
Residuals                                                           2957 96
```

Tabela 3.19 Média e desvio padrão da II para teor de açúcar redutor usando o software R.

Amostra Intracelular	**Tampão**	**Atividade enzimática vs meios de cultura (Média ± dp)**			
		M1	**M2**	**M3**	**M6**
No. 3	McLlvaine	0,36 ± 0,00	0,91 ± 0,02	0,26 ± 0,00	0,21 ± 0,00
ATCC	McLlvaine	0,17 ± 0,01	0,33 ± 0,05	0,05 ± 0,07	0,02 ± 0,00

Tabela 3.20 Média e desvio padrão da II para atividade específica usando o software R.

Amostra Intracelular	**Tampão**	**Atividade específica vs meios de cultura (Média ± dp)**			
		M1	**M2**	**M3**	**M6**
No. 3	McLlvaine	33,9 ± 0,36	91,5 ± 1,6	42,4 ± 0,51	49,6 ± 0,64
ATCC	McLlvaine	25,4 ± 1,6	30,7 ± 4,7	9,2 ± 1,3	3,9 ± 0,74

Tabela 3.21 Análise de variância II para teor de açúcar redutor e proteína usando o software R.

```
Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.enzimatica
                                Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Amostra.Intracelular             0.50721  1 1303.75 < 2.2e-16 ***
Meio.de.cultura                 0.95818  3  820.98 < 2.2e-16 ***
Amostra.Intracelular:Meio.de.cultura 0.16281  3  139.50  1.11e-11 ***
Residuals                       0.00622 16
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.especifica
                                Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Amostra.Intracelular             8228.8  1 2177.17 < 2.2e-16 ***
Meio.de.cultura                 5165.6  3  455.57 1.068e-15 ***
Amostra.Intracelular:Meio.de.cultura 2202.7  3  194.27 8.571e-13 ***
Residuals                       60.5 16
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Tabela 3.22 Média e desvio padrão da IE e II para teor de açúcar redutor usando o software R.

Amostra	**Inulinase**	**Atividade enzimática vs meios de cultura (Média ± dp)**			
		M1	**M2**	**M3**	**M6**
No.3	Intracelular	0,36 ± 0,01	0,91 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,21 ± 0,01
	Extracelular	0,00 ± 0,00	1,03 ± 0,07	0,65 ± 0,02	0,38 ± 0,01
ATCC	Intracelular	0,17± 0,01	0,33± 0,05	0,05± 0,01	0,02± 0,01
	Extracelular	0,00 ± 0,00	0,58 ± 0,06	0,63 ± 0,02	0,27 ± 0,01

Tabela 3.23 Média e desvio padrão da IE e II para atividade específica usando o software R.

Amostra	**Inulinase**	**Atividade específica vs meios de cultura (Média ± dp)**			
		M1	**M2**	**M3**	**M6**
No.3	Intracelular	33,9 ± 0,36	91,5 ± 1,63	42,4 ± 0,51	49,6 ± 0,64
	Extracelular	0,00 ± 0,00	232,5 ± 15,3	126,1 ± 4,2	47,5 ± 1,1
ATCC	Intracelular	25,4± 1,6	30,7± 4,7	9,2± 1,3	3,9± 0,7
	Extracelular	0,00 ± 0,00	143,6 ± 15,7	79,8 ± 2,9	64,2 ± 1,6

Tabela 3.24 Análise de variância da IE e II para teor de açúcar redutor e proteína usando o software R.

```
Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.enzimatica
                                        Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Amostra                                0.56702  1  700.30 < 2.2e-16 ***
Meio.de.cultura                         2.35067  3  967.73 < 2.2e-16 ***
Inulinase                              0.28352  1  350.15 < 2.2e-16 ***
Amostra:Meio.de.cultura:Inulinase 1.29899 10  160.43 < 2.2e-16 ***
Residuals                              0.02591 32
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anova Table (Type II tests)

Response: Atividade.especifica
                                        Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Amostra                                 13317  1  391.55 < 2.2e-16 ***
Meio.de.cultura                          78877  3  773.07 < 2.2e-16 ***
Inulinase                              31044  1  912.79 < 2.2e-16 ***
Amostra:Meio.de.cultura:Inulinase  52886 10  155.50 < 2.2e-16 ***
Residuals                               1088 32
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

APÊNDICE - D

Método de extração de DNA de amostras de tecidos usando o kit de extração comercial DNEASY BLOOD & TISSUE QUIAGEN

1. Pegue e adicione 20 µl de proteinase K (fornecida pelo kit) em um frasco de 1,5 mL limpo e estéril.

2. Adicione 180 µl de ATL

3. Adicione 30 mg da amostra (*Pellet*) ao frasco de proteinase K. Pipete suavemente várias vezes para homogeneizar completamente as misturas.

4. Adicione 200 µl de tampão AL à mistura anterior, vortex por 15 segundos. Para uma lise celular eficiente, é necessário misturar bem as soluções.

5. Incubar a mistura anterior por 3-4 h a 56 ºC em bloco seco (banho de água opcional).

6. Após a incubação, gire para remover as gotículas aderidas às paredes do tubo.

7. Adicione 200 µl de etanol absoluto (96-100%) não desnaturante à mistura e vortex por 15 segundos. Faça um giro para que todo o conteúdo caia no fundo do tubo.

8. Transfira cuidadosamente a mistura acima para uma coluna QIAamp (com o respectivo tubo de coleta). Tome cuidado para não molhar as bordas. Feche a tampa e centrifugue a 8.000 rpm por 1 minuto.

9. Transfira a coluna para um novo tubo de coleta de 2,0 mL (fornecido pelo kirt) e descarte o tubo de coleta antigo com o filtrado.

10. Abra a coluna e adicione 500 µl de tampão AW1 sem molhar as bordas, feche a coluna e centrifugue a 8000 rpm por 1 minuto. Transfira a coluna para um novo tubo de coleta de 2,0 mL (fornecido pelo kit) e descarte o tubo antigo com o filtrado.

11. Abra a coluna e adicione 500 µl de tampão AW2 sem molhar as bordas, centrifugue a 13.000 rpm por 3 minutos.

12. Transfira a coluna para um frasco de 1,5 mL (não fornecido no kit), descarte o tubo de coleta antigo e centrifugue a 13.000 rpm por 1 minuto.

13. Transfira a coluna para um frasco de 1,5 mL (limpo, estéril, não fornecido no kit) e descarte o tubo coletor antigo com o filtrado. Adiciona 70 µl de tampão AE e fecha a tampa. Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto.

14. Descarte a coluna e armazene o frasco de 1,5 mL com o DNA extraído a –20°C.

15. Quantifique o DNA em Nanodrop tomando uma alíquota de 2 µl.

Método de extração de dna de amostras de tecido usando reagente TRIZOL

1. Adicione 1000 µl de TRIZOL em um frasco de 1,5 mL.

2. Adicione 500 mg de amostra. Homogeneizar com vortex e macerador de plástico.

3. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente.

4. Adicionar 200 µl de clorofórmio. Vortex 15 segundos.

5. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 ºC.

6. Remova a fase aquosa (superior/RNA). O DNA é o precipitado visto na interface e as proteínas no fundo do tubo.

7. Adicione 300 µl de etanol 100%. Mix por investimento.

8. Incube a amostra por 3 minutos em temperatura ambiente.

9. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 ºC.

10. Remova a fase superior (Trizol/etanol). Descarte para investimento.

11. Lave o *pellet* com 1000 µl de solução de citrato de sódio 0,1 M. Vortex por 15 segundos.

12. Incubar por 30 minutos (Vortex a cada 10 minutos por 5 segundos).

13. Centrifugue a 6.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Descarte o sobrenadante por inversão.

14. Repita o procedimento: Etapas 11-13

15. Ressuspender o *pellet* em 1,5 mL de etanol a 75%

16. Incubar por 20 minutos (Vortex a cada 5 minutos por 5 segundos) em temperatura ambiente.

17. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 ºC.

18. Remova o sobrenadante

19. Coloque os frascos na câmara de fluxo com a tampa aberta por 15 minutos.

20. Incubar os frascos a 60 ºC por 15 minutos para melhorar a solubilização do DNA.

21. Ressuspender o DNA extraído em 60 µl de NaOH 8 mM, uma vez homogeneizado, deve ser centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 ºC.

22. Transfira o sobrenadante para um novo frasco e adicione 20 µl de Hepes (Comercial).

23. Armazenar a -20ºC

24. Quantifique o DNA em Nanodrop tomando uma alíquota de 2 µl.

Método de extração de RNA de amostras de tecido usando reagente TRIZOL

1. Homogeneizar 100 mg em 1000 µl de TRIZOL em um frasco de 1,5 mL.

2. Incubar 5 minutos a 55ºC

3. Adicionar 100 µl de clorofórmio, agitar em vórtice por 15 segundos.

4. Incubar 10 minutos no gelo

5. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 ºC.

6. Recupere a fase aquosa superior em um novo tubo.

7. Adicione 20 µl de solução de glicogênio (1mg/mL). Adicionado lentamente e em um círculo.

8. Adicione 600 µl de isopropanol frio

9. Incubar a -20 ºC por 1 hora.

10. Centrifugar a 12.000 rpm por 45 minutos a 4 ºC.

11. Descarte o sobrenadante

12. Lave o *pellet* com 800 µl de etanol 75% frio, vortex por 10 segundos. Repita o procedimento 3 vezes e deixe durante a noite.

13. Centrifugar a 12.000 rpm por 45 minutos a 4 ºC.

14. Descarte o sobrenadante

15. Seque o *pellet* à temperatura ambiente por 10 minutos na câmara de fluxo.

16. Incubar o *pellet* por 10 minutos a 55 ºC

17. Dissolva o *pellet* em 30 µl de água sem nuclease/40 µl de inibidor de RNase.

18. Armazenar a -70ºC

19. Quantifique o RNA em Nanodrop tomando uma alíquota de 2 µl.