

FRANCISCO SINGULANI CASTANON

**ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE  
INULINASES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Castanon, Francisco Singulani, 1989-

C346i  
2013

Isolamento de fungos filamentosos produtores de inulinases  
/ Francisco Singulani Castanon. – Viçosa, MG, 2013.

vi, 47 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Denise Mara Soares Bazzoli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Inulina. 2. Enzimas de fungos. 3. *Fusarium oxysporum*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.5

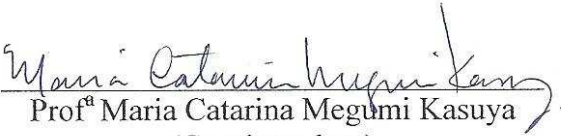
FRANCISCO SINGULANI CASTANON

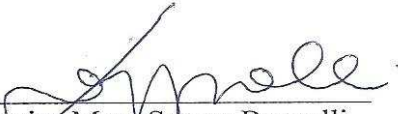
**ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE  
INULINASES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de setembro de 2013.

  
Profª Andréa de Oliveira Barros Ribon

  
Profª Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Coorientadora)

  
Profª Denise Mara Soares Bazzolli  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso e por toda a estrutura oferecida para que eu pudesse avançar em minha formação como pesquisador.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa, fundamental para a condução deste trabalho.

À professora Denise Mara Soares Bazzoli, que com sua orientação e conselhos tornou a realização deste trabalho possível.

Às professoras Maria Catarina Megumi Kasuya e Marisa Vieira de Queiroz, pelo acompanhamento e pelas orientações na condução do trabalho.

À doutora Virginia Maria Chaves Alves, pelo auxílio fundamental para o início da realização deste trabalho.

À Fátima e Ely Freitas e família, por gentilmente ceder os tubérculos de yacon utilizados nesse trabalho.

Ao Hugo Leonardo André Genier, pelo auxílio nos experimentos de superfície de resposta, estando à disposição sempre que precisei.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, por todo auxílio e apoio.

A todos os meus professores ao longo destes seis anos de formação acadêmica na UFV, pelos valiosos ensinamentos e exemplos de profissionalismo.

Ao pessoal do laboratório, por tornarem a rotina de trabalho mais agradável e pela troca de informações e experiências, que me ajudaram a crescer como profissional e na realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, por tornarem meu período em Viçosa uma experiência única, com muita diversão e cheio de boas histórias. Em especial, ao Moço e ao Paraguaçu, por estarem comigo em todos os momentos.

Aos meus familiares, pela confiança e apoio constantes, mesmo com o obstáculo da distância.

Ao meu irmão, pelo companheirismo desde sempre e pelas experiências que contribuíram para minha formação como pessoa.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu tivesse uma boa formação, pelo apoio, carinho e amor incondicionais.

A Deus, por uma vida cheia de bênçãos.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Inulina: características estruturais, fontes e aplicação .....	2
2.2. Inulinases: classificação e aplicação .....	4
2.3. Fontes microbianas e características das inulinases.....	5
2.4. Caracterização molecular das inulinases.....	7
2.5. Determinação das condições ótimas para a produção de inulinase.....	8
3. OBJETIVOS .....	11
3.1. Objetivo geral.....	11
3.2. Objetivos específicos .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
4.1. Triagem de fungos produtores de inulinase .....	12
4.1.1. Isolamento de fungos a partir da rizosfera de yacon ( <i>Polymnia sanchifolia</i> ) .....	12
4.1.2. Purificação dos isolados fúngicos .....	12
4.1.3. Análise enzimática .....	13
4.1.4. Estimativa do crescimento micelial .....	13
4.1.5. Análise da formação de halo de degradação de inulina .....	14
4.2. Identificação molecular e cultural dos fungos selecionados .....	14
4.2.1. Extração de DNA total.....	14
4.2.2. Identificação molecular dos fungos selecionados .....	14
4.2.3. Análise dos conídios por microscopia óptica.....	15
4.3. Estudo da produção de inulinase por <i>Fusarium oxysporum</i> F6.....	15
4.3.1. Análise do tempo de cultivo ótimo para a produção da inulinase.....	15
4.3.2. Otimização da produção de inulinase utilizando modelos estatísticos .....	15

4.4. Caracterização da enzima.....	18
4.4.1. Identificação do tipo de inulinase produzida por <i>Fusarium oxysporum</i> F6.....	18
4.4.2. Efeito da temperatura e do pH na atividade da inulinase produzida por <i>Fusarium oxysporum</i> F6.....	18
4.5. Análise comparativa da sequência de aminoácidos da inulinase de <i>F. oxysporum</i> f. sp. cubense 4 com outras sequências de inulinase.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
5.1. Triagem dos fungos produtores de inulinase a partir da rizosfera de yacon .....	21
5.1.1. Análise do crescimento micelial .....	21
5.1.2. Análise da atividade de inulinase .....	21
5.1.3. Formação de halo de degradação de inulina .....	23
5.2. Identificação dos fungos selecionados .....	25
5.2.1. Identificação molecular.....	25
5.2.2. Observação dos conídios sob microscopia óptica.....	26
5.3. Estudo da produção de inulinase por <i>Fusarium oxysporum</i> F6.....	27
5.3.1. Determinação do melhor período de tempo para a produção de inulinase por <i>Fusarium oxysporum</i> F6 .....	28
5.3.2. Otimização das condições de produção de inulinase por <i>Fusarium oxysporum</i> F6..	29
5.4. Caracterização da enzima.....	34
5.4.1. Cromatografia de camada delgada .....	34
5.4.2. Temperatura e pH ótimos para a atividade da enzima .....	35
5.5. Análise comparativa da sequência de aminoácidos de <i>Fusarium oxysporum</i> com outras sequências de inulinase fúngicas disponíveis nos bancos de dados.....	36
5.5.1. Comparação das sequências conservadas de algumas inulinases fúngicas.....	36
5.5.2. Análise filogenética de inulinases.....	39
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## RESUMO

CASTANON, Francisco Singulani, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2013. **Isolamento de fungos filamentosos produtores de inulinase.** Orientadora: Denise Mara Soares Bazzoli. Coorientadoras: Maria Catarina Megumi Kasuya e Marisa Vieira de Queiroz.

As inulinases apresentam uma variedade de aplicações, como a produção de xarope de frutose, bioetanol e frutooligossarídeos. A versatilidade industrial apresentada por estas enzimas impulsiona a descoberta de novas fontes de inulinases microbianas. Neste estudo, 48 fungos foram isolados a partir da rizosfera do tubérculo yacon (*Polymnia sanchifolia*). Os isolados passaram por uma triagem, em que os critérios avaliados foram o crescimento em meio mínimo contendo 1% de inulina como única fonte de carbono e a atividade enzimática pelo método de DNS. Os seis fungos mais promissores foram selecionados para a análise da formação de halo de hidrólise da inulina e identificação molecular utilizando a região ITS rDNA. Para os estudos seguintes, o fungo *Fusarium oxysporum* F6 foi selecionado por apresentar a melhor produção de inulinase e as condições de produção de inulinase por esse fungo foram estudadas. A melhor produção da enzima ocorreu em 72 h de crescimento em meio mínimo e em 2% de inulina. Através da metodologia de superfície de resposta, utilizando a fermentação em estado sólido, foi possível verificar que o aumento na concentração de inulina afetou positivamente a produção de inulinase por esse fungo, alcançando uma produção de até 2,2 U/mL de inulinase. A atividade ótima foi verificada na temperatura de 50 °C e pH 5,5. A cromatografia de camada delgada mostrou que a enzima apresenta atividade de endo-inulinase. Comparações de uma sequência de aminoácidos de *F. oxysporum* f. sp. cubense 4 com outras inulinases fúngicas reforçaram essa característica, devido à presença de regiões conservadas com as sequências de outras endo-inulinases. A análise filogenética também demonstrou a proximidade entre as sequências de aminoácidos que codificam endo-inulinases fúngicas. Este trabalho demonstrou que o tubérculo yacon é uma boa fonte para o isolamento de fungos produtores de inulinase, pois um razoável número de isolados foi obtido nas triagens utilizando essa fonte. O fungo *Fusarium oxysporum* F6 apresentou o maior potencial de produção de inulinase, principalmente em fermentação no estado sólido. O fungo *Staphylotrichum boninense* também foi isolado e a produção de inulinase desse fungo ainda será estudada mais detalhadamente, devido aos relatos de sua produção diferenciada de metabólitos secundários.

## ABSTRACT

CASTANON, Francisco Singulani, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2013. **Isolation of filamentous fungi producing inulinase.** Adviser: Denise Mara Soares Bazzoli. Co-advisers: Maria Catarina Megumi Kasuya and Marisa Vieira de Queiroz.

The inulinases present a great variety of applications, such as the production of fructose syrup, bioethanol and fructooligosaccharides. The industrial versatility presented by these enzymes drives the discovery of new sources of microbial inulinase. In this study, 48 fungi were isolated from the rhizosphere of yacon tuber (*Polymnia sanchifolia*). The criteria to screening the fungi producers of inulinase were: growth in inulin as unique carbon source and enzyme activity by the DNS method. Six promising fungi were selected for the analysis of halo formation by inulin hydrolysis and molecular identification using the ITS rDNA region. For the following studies, the fungus *Fusarium oxysporum* F6 was selected for having the best production of inulinase and the conditions of inulinase production by this fungus were studied. The best enzyme production occurred at 72 h of growth in minimal medium with 2% inulin. Through the response surface methodology using solid-state fermentation, it was possible to estimate that the increase of the inulin concentration affected the inulinase production by this fungus, reaching a production of up to 2.2 U/ml of inulinase. Optimal activity was observed at 50 °C and pH 5.5. The thin layer chromatography showed that the enzyme has endo-inulinase activity. Comparison of the amino acid sequence of *F. oxysporum* f. sp. cubense 4 with other fungal inulinases reinforce this characteristic, given the presence of conserved regions with the sequences of other endo-inulinase. The phylogenetic analysis also showed a similarity between the amino acid sequences encoding fungal endo-inulinase. This study demonstrated that the yacon tuber is a good source for the isolation of fungal inulinase producers because a reasonable number of isolates were obtained in trials using this source. The fungus *Fusarium oxysporum* F6 showed the greatest potential for inulinase production, mainly in solid state fermentation. The fungus *Staphylotrichum boninense* was also isolated and inulinase production of this fungus will be studied in more detail, due to the reports of their differential production of secondary metabolites by this fungus.

## 1. INTRODUÇÃO

A inulina é um polissacarídeo formado por uma cadeia linear de moléculas de D-frutose e uma molécula de D-glicose terminal, sendo encontrada na natureza como reserva de energia em raízes e tubérculos de algumas plantas.

A frutose é um monossacarídeo que possui maior poder adoçante que a glicose e a sacarose e, diferentemente desses açúcares, pode ser usada também por diabéticos, com moderação. Devido a esta característica, sua utilização na indústria de alimentos tem aumentado cada vez mais. Atualmente, a maior parte da produção industrial de frutose é obtida a partir do amido de milho, por hidrólise enzimática, seguido pela isomerização da glicose e subsequente separação da frutose. Uma alternativa a esse processo é a obtenção direta da frutose pela hidrólise da inulina pela enzima inulinase, que por ser um processo muito mais simples e não poluente, pode se tornar competitivo na indústria e ambientalmente amigável. Outros produtos obtidos pela hidrólise parcial da inulina são os frutooligossacarídeos. Estes são utilizados como fibras dietéticas no enriquecimento de produtos alimentares como cereais, preparações de frutas para iogurtes, sobremesas congeladas, biscoitos e produtos lácteos nutricionais e em dietas enterais.

As enzimas que degradam inulina foram inicialmente purificadas a partir de plantas, mas as quantidades obtidas eram insuficientes para serem exploradas comercialmente. Por esse motivo, inulinases produzidas por micro-organismos têm recebido atenção especial nos últimos anos, já que os micro-organismos são passíveis de serem cultivados em grande escala em laboratório e podem produzir quantidades significativas da enzima.

No contexto atual de sustentabilidade, a utilização de processos biológicos para produção de compostos e obtenção de novos produtos tem atraído muitas pesquisas. A vantagem da utilização desses processos deve-se ao fato de já existirem as reações para a produção dos compostos naturalmente, tornando o processo menos oneroso e evitando o risco de afetar o meio ambiente com substâncias químicas poluentes.

Este trabalho teve como objetivo isolar fungos produtores de inulinase, a partir da rizosfera do tubérculo yacon (*Polymnia sanchifolia*), visando futuramente a utilização desses fungos na indústria.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Inulina: características estruturais, fontes e aplicação

A inulina é um polifrutano composto por uma cadeia principal de unidades de frutose, unidas por ligações  $\beta$ -2,1 frutofuranosídicas, com uma unidade de glicose terminal (CHI *et al.*, 2009). Este polissacarídeo é um importante carboidrato de reserva, normalmente presente nas raízes e tubérculos de plantas como alcachofra de Jerusalém, chicória, dália, alho-poró, alho, cebola, trigo, aspargo, banana e yacon, portanto fazendo parte da dieta diária do homem há vários séculos (FRANCK & LEENHEER, 2005).

A concentração de inulina em cada planta depende muito das condições de estocagem, do tempo decorrido desde a colheita até a sua utilização e da idade da planta (FRANCK & LEENHEER, 2005). Para a maioria das fontes (por exemplo: alho, cebola e aspargo) as concentrações de inulina e frutooligossacarídeos estão entre 0,3 a 6% da massa fresca. Entretanto, para alcachofra de Jerusalém, chicória, dália e yacon, as concentrações de inulina e frutooligossacarídeos chegam até 20% da matéria fresca, fazendo destes vegetais importantes fontes de inulina (VORAGEN, 1998).

A família Asteraceae é composta por várias plantas que possuem inulina. O yacon (*Polymnia sanchifolia*) é uma espécie herbácea perene, com altura variando de 1,5 a 3,0 m e apresenta um sistema radicular formado por 4 a 20 tubérculos, onde armazena 3 a 10% de inulina e frutooligossacarídeos (CAZETTA *et al.*, 2005). A chicória (*Cichorium intybus* L.) é uma planta nativa da Europa, que pode ser cultivada em, praticamente, todo o mundo. As variedades cultiváveis de chicória adaptam-se bem ao clima temperado ou frio. Em nossa região, podem ser plantadas, durante o ano todo, porém desenvolvem-se melhor no inverno. As plantas são colhidas no outono e na primavera (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A presença de inulina também foi relatada em uma espécie herbácea do cerrado brasileiro, chamada *Vernonia herbacea* (Asteraceae), em que a inulina constitui até 80% da matéria seca da raiz (PESSONI *et al.*, 1999). Outra planta da mesma família, que também possui inulina (12-15% da massa fresca) e oligofrutanos em suas raízes pivotantes é o dente-de-leão (*Taraxacum officinale*), que é uma planta herbácea bienal, nativa de regiões de clima temperado (KANGO, 2008).

A inulina pura é um pó e sua cor varia do branco ao cinza, dependendo do grau de pureza, não possui cheiro e é praticamente sem sabor. No entanto, se a amostra for

impura pode apresentar sabor levemente amargo. Ela pode atuar como substituto da gordura em alguns produtos devido justamente a não influência no sabor do alimento e pelo fato de sua textura, quando dissolvida em água, ser semelhante a da gordura, com a vantagem de não resultar em incremento calórico (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A inulina tem atraído considerável atenção de pesquisadores por ser um substrato relativamente mais acessível e abundante para a produção de xaropes de frutose, assim como fonte para a produção de frutooligossacarídeos, que são utilizados nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (YUAN *et al.*, 2006). A frutose vem conquistando cada vez mais espaço como adoçante, pois adoça cerca de 70% a mais que a sacarose. Além disso, não possui problemas de cristalização como a sacarose e é tolerada por diabéticos.

Ela apresenta, também, algumas propriedades funcionais. Atua no organismo de maneira similar às fibras dietéticas, contribuindo para melhorar o funcionamento do sistema gastrointestinal. Após a ingestão, a inulina não é quebrada no trato digestório humano, devido à resistência à hidrólise oferecida pelas ligações  $\beta$ -2,1 entre as moléculas de frutose. Por esse motivo, não resulta em contribuição calórica nesse processo. Apenas no cólon, ocorre a utilização da inulina por fermentação bacteriana e, conseqüentemente, baixa contribuição calórica indireta (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Quando incorporado na dieta, atua como prebiótico, promovendo o desenvolvimento seletivo de micro-organismos benéficos, os considerados probióticos (ROBERFROID *et al.*, 1998).

A inulina pode ser utilizada em produtos de panificação e produtos de cereais, com os objetivos de: a) controle de umidade, baseado na capacidade de ligação de água da inulina, aumentando a vida de prateleira do produto; b) controle da viscosidade em bolos e pudins, particularmente, em massas com baixos teores de gordura. A dose diária aceitável (ADI) para inulina é estabelecida em 40 g, pois não existem evidências de toxicidade ou distúrbios gastrointestinais associados ao consumo de inulina nesta dosagem (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Estudos com indivíduos de diferentes idades têm fornecido resultados que garantem a inocuidade da inulina e dos frutooligossacarídeos (ROBERFROID, 1991).

## 2.2. Inulinases: classificação e aplicação

As inulinases podem ser classificadas como exo-inulinases ( $\beta$ -D-frutanofrutohidrolase; EC3.2.1.80) e endo-inulinases (2,1- $\beta$ -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). As enzimas que modificam a inulina estão agrupadas na família 32 das hidrolases glicosídicas (GH32). Membros da família GH32 dividem assinaturas de aminoácidos conservadas e possuem estrutura protéica tridimensional similar (YUAN *et al.*, 2006).

Uma das principais aplicações das inulinases está relacionada a sua utilização para a produção de xarope de frutose. A obtenção de frutose a partir do amido precisa de pelo menos três etapas enzimáticas envolvendo  $\alpha$ -amilase, amiloglicosidase e glicose isomerase, resultando na produção de uma mistura constituída de oligossacarídeos (8%), frutose (45%) e glicose (50%). No entanto, a separação da frutose a partir desta mistura é desfavorável economicamente. O melhor procedimento seria a hidrólise enzimática da inulina utilizando inulinases microbianas, com rendimento de 95% de frutose (GONG *et al.*, 2007).

As inulinases podem ser usadas também na produção de etanol. Atualmente, os combustíveis fósseis, que são combustíveis não renováveis, são as principais fontes utilizadas. No entanto, devido ao eminente esgotamento dessas fontes, além dos diversos problemas causados pela queima desses combustíveis, biocombustíveis gerados por fontes renováveis tem despertado um grande interesse. O etanol tem sido utilizado como combustível líquido ou aditivo a gasolina em vários países, tais como Brasil, EUA, China e Índia (SANCHEZ & CARDONA, 2008). A principal matéria-prima para a produção de etanol continua sendo a cana-de-açúcar ou o amido obtido por culturas agrícolas e a sua utilização principal é como mistura da gasolina (5-90%) (NEAGU & BAHRIM, 2011). Porém, a utilização dessas fontes é complicada, pois afeta diretamente a disponibilidade e o preço dessas matérias-primas muito utilizadas na alimentação, além disso, a hidrólise enzimática desses compostos é complexa. Exo-inulinases, produzidas por micro-organismos, podem remover os resíduos terminais de frutose do final não redutor da molécula de inulina em somente um passo, produzindo glicose e frutose, que podem ser fermentadas facilmente em etanol por *Saccharomyces*

*cerevisiae*. Algumas linhagens de leveduras podem realizar simultaneamente a hidrólise e a fermentação da inulina, como *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces spp.*, o que pode facilitar ainda mais o processo caso um grande rendimento seja alcançado (CHI *et al.*, 2011).

A ação de endo-inulinases a partir da molécula de inulina produz frutoligossacarídeos. Os frutoligossacarídeos são componentes dos alimentos funcionais, muito populares devido às suas propriedades bifidogênicas 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 & 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.*, 2011).

### **2.3. Fontes microbianas e características das inulinases**

Inulinases podem ser produzidas por muitos micro-organismos, fungos ou bactérias, tais como espécies dos gêneros *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas*. A temperatura ótima das inulinases da maioria dos micro-organismos terrestres está entre 30 °C e 55 °C (CHI *et al.*, 2009). O pH ótimo para a atividade de inulinases purificadas de fungos filamentosos e leveduras está na faixa de 4,5 a 6 (PANDEY *et al.*, 1999; GONG *et al.*, 2007; SHENG *et al.*, 2008) e a maioria das inulinases fúngicas tem mais de 50,0 kDa de massa molecular (PANDEY *et al.*, 1999; CHI *et al.*, 2009).

Algumas leveduras podem produzir maior quantidade de inulinase do que fungos filamentosos e bactérias, porém as enzimas das leveduras possuem menor termoestabilidade (SINGH & GILL, 2006). Pela capacidade de reunir alto rendimento e termoestabilidade, as inulinases de fungos filamentosos tem atraído muita atenção. Algumas características de inulinases de fungos filamentosos estão reunidas na Tabela 1.

**Tabela 1 – Características das inulinases produzidas por diferentes fungos filamentosos.**

Fonte	Atividade enzimática	Temperatura ótima	pH ótimo	M (kDa)	Ref.
<i>Aspergillus ficuum</i>	ND	45 °C	4,5	70	CHEN <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus niger</i>	176 U/mL	ND	ND	ND	KUMAR <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus niger</i>	52,3 IU/mL	50 °C	5,0	ND	KANGO, 2008
<i>Aspergillus niveus</i>	ND	45 °C	4,0 e 4,8	ND	SOUZA-MOTTA <i>et al.</i> , 2005
<i>Fusarium oxysporum</i>	ND	34-45 °C	5,5-6,5	ND	PANDEY <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium janczewskii</i>	ND	55 °C	4,8 e 5,0	48 e 66	PESSONI <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium sp.</i>	743 U/mg	55 °C	4,0	81	MORIYAMA <i>et al.</i> , 2002
<i>Penicillium subrubescens</i>	7,7 U/mL	ND	ND	ND	MANSOURI <i>et al.</i> , 2013
<i>Rhizoctonia solani</i>	5,43 U/mg	35 °C	5,0	ND	ERTAN <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhizopus sp.</i>	17 U/mg	40 °C	5,5	83	OHTA <i>et al.</i> , 2002

ND – não determinado.

A temperatura ótima elevada apresentada por algumas inulinases é um fator extremamente desejável e importante para a aplicação destas enzimas na produção comercial de frutose a partir de inulina e frutooligossacarídeos, em altas temperaturas é garantida a solubilidade adequada da inulina e também a redução da contaminação por outros micro-organismos. Entre as leveduras e os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, que são as fontes mais versáteis de inulinases, as inulinases de linhagens de *Aspergillus* são as mais adequadas à produção comercial devido a sua maior termoestabilidade. A bactéria termófila *Thermotoga maritima* produz inulinases termoestáveis, no entanto sua baixa produção é um fator limitante para sua aplicação industrial (SINGH & GILL, 2006).

## 2.4. Caracterização molecular das inulinas

A primeira sequência completa de nucleotídeos codificando uma inulinase foi publicada pela primeira vez em 1996 e foi obtida a partir de *Penicillium purpurogenum* (HOK-01, FERM P-8701) (ONODERA *et al.*, 1996). Muitos genes que codificam inulinas foram clonados a partir de várias linhagens de fungos e bactérias, destes o gene que codifica uma endo-inulinase em *Arthrobacter* sp. S37 apresenta a maior sequência aberta de leitura (ORF) de 2438 pb (KANG & KIM, 1999). A sequência de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense 4 possui 1536 pb (Genbank KB726277.1), tamanho este na média de tamanho das ORFs de inulinas em geral, que é de 1500 pb (SINGH & GILL, 2006; CHI *et al.*, 2009).

Apesar de dois terços dos genes fúngicos sequenciados até agora conterem íntrons curtos (SINGH & GILL, 2006), algumas inulinas como as de *P. guilliermondii* 1 (ZHANG *et al.*, 2009) e *A. ficuum* ATCC 16882 (UHM *et al.*, 1998) não apresentam íntrons.

As inulinas caracterizadas apresentam as assinaturas consenso Arg-Asp-Pro-Lys-Val-Phe-Trp-His (RDPKVF) e Trp-Met-Asn-(Asp/Glu)-Pro-Asn-Gly (WMN(D/E)PNG) (NAGEM *et al.*, 2004; CHI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009). Estudos confirmam que a assinatura consenso (WMN(D/E)PNGL) de inulinas atua como um nucleófilo, enquanto que a assinatura consenso (RDPKVF) tem papel essencial na atividade catalítica (NAGEM *et al.*, 2004). A sequência de 20-350 aminoácidos na região N-terminal de inulinas de leveduras, fungos filamentosos e bactérias contém também o domínio conservado da família 32 das hidrolases glicosídicas (ZHANG *et al.*, 2009).

As exo-inulinas caracterizadas contêm a sequência de aminoácidos Phe-Ser-Gly-Ser (FSGS), as endo-inulinas apresentam divergência entre os fungos e bactérias nessa assinatura. As endo-inulinas de fungos são caracterizadas pela presença de Phe-Thr-Thr-Gly (FTGT) como sequência conservada, ao contrário das endo-inulinas bacterianas (*Pseudomonas mucidolens* e *Arthrobacter* sp.), que mantêm apenas Gly como resíduo conservado nessa assinatura. A significância funcional exata desta sequência ainda não foi estudada (SINGH & GILL, 2006).

A assinatura conservada, Ser-Val-Glu-Val-Phe (SVEVF), presente na metade C-terminal da maioria das inulinas, (tanto exo-inulinase, quanto endo-inulinase), está relacionada à ligação em frutanos com elevado peso molecular (SINGH & GILL, 2006).

Para a comparação dos genes de inulinase clonados a partir de diferentes micro-organismos, algumas características destes encontram-se resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2 - Algumas características de genes que codificam inulinases em diferentes micro-organismos**

Genes	Produtores	Tamanho	Tipo	Número de acesso	Ref.
<i>INU1</i>	<i>P. guilliermondii</i>	1542	Exo	EU195799	ZHANG <i>et al.</i> , 2009
<i>inuD</i>	<i>Penicillium sp.</i> TN-88	2106	Exo	BAC16218	MORIYAMA <i>et al.</i> , 2002
<i>InuE</i>	<i>Aspergillus niger</i>	1674	Exo	DQ233222	YUAN <i>et al.</i> , 2006
<i>INU1</i>	<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	1557	Exo	EU596421	SHENG <i>et al.</i> , 2008
<i>Inu1</i>	<i>Arthrobacter sp.</i>	2439	Endo	AJ131562	KANG & KIM, 1999
<i>Inu2</i>	<i>A. ficuum</i>	1550	Endo	AJ006951	UHM <i>et al.</i> , 1998
<i>inuA</i>	<i>Aspergillus niger</i>	1548	Endo	BAA33797	OHTA <i>et al.</i> , 1998
<i>inuB</i>	<i>A. niger</i>	1551	Endo	BAA33798	OHTA <i>et al.</i> , 1998
<i>Endoinu1</i>	<i>Penicillium purpurogenum</i>	1545	Endo	BAA12321	ONODERA <i>et al.</i> , 1996

## 2.5. Determinação das condições ótimas para a produção de inulinase

A abordagem convencional de testar um fator de cada vez é normalmente utilizada para aperfeiçoar meios de cultura, porém demanda um longo período de tempo, além de ser muito trabalhosa. A metodologia de superfície de resposta (MSR) pode superar os inconvenientes do método convencional e tem sido amplamente utilizada na otimização dos meios de cultura para produção de enzimas (CHEN *et al.*, 2011). A MSR fornece informações importantes sobre o nível ideal de cada variável, juntamente com suas interações com outras variáveis e seus efeitos sobre o rendimento do produto. Esta técnica reduz o número de experimentos, sem negligenciar as interações entre os parâmetros. Esta abordagem multivariada também melhora as possibilidades de interpretação estatística e avalia a importância relativa dos vários fatores, mesmo na presença de interações complexas (SHENG *et al.*, 2009; DILIPKUMAR *et al.*, 2011; BONCIU *et al.*, 2012).

Nesse contexto, muitos trabalhos têm sido realizados utilizando os métodos estatísticos para analisar os componentes do meio de cultura na fermentação em estado sólido. O método de Plackett-Burman é muito utilizado para descobrir quais das variáveis testadas são realmente significativas para a produção da enzima. ABDAL-

AZIZ *et al.*, (2012) testaram a influência de 10 fatores na produção de inulinase do fungo *Aspergillus tamaritii* AR-IN9, isolado do tubérculo de *Helianthus tuberosus* e verificaram que as variáveis pH, inóculo,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (fonte de nitrogênio) e  $\text{MgSO}_4$  (fonte de magnésio) foram significantes na produção de inulinase (ABDAL-AZIZ *et al.*, 2012).

Outros pesquisadores utilizaram além do modelo de Plackett-Burman, uma das técnicas da metodologia de superfície de resposta (MSR) para identificar a melhor combinação entre as variáveis mais significativas para a melhor produção de inulinase. DILIPKUMAR *et al.*, (2013) testaram 18 variáveis pelo método de Plackett-Burman para a produção de inulinase por *Streptomyces* sp. e selecionou três destas variáveis para utilizar o delineamento composto central (DCC), identificando que a melhor produção de inulinase, 131 U/gds, ocorreu nas seguintes concentrações dessas variáveis: torrão de soja (0,05711 g/gds),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,00063 g/gds) e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,00772 g/gds) (DILIPKUMAR *et al.*, 2013). CHEN *et al.*, (2011) testaram oito variáveis e selecionaram três para analisar utilizando o modelo Box-Behnken, identificando que a melhor produção de inulinase por *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 durante a fermentação em estado sólido, foi de 205,63 U/g, encontrada em meio com 11,47% de inulina, 0,76% de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e 5,71% de maceração de milho, empregando farelo de trigo como substrato sólido (CHEN *et al.*, 2011).

Outros trabalhos utilizaram diretamente o delineamento composto central (DCC) para analisar a interação entre variáveis escolhidas por trabalhos anteriores ou descritas na literatura como significativas. BONCIU *et al.*, (2012) identificaram que a melhor produção de inulinase por *Rhizoctonia* ssp., 1,87 UI/mL, foi obtida em meio contendo 5,82% de extrato de levedura e 6% de trigo sarraceno, crescendo em temperatura de 20 °C (BONCIU *et al.*, 2012). Já SHENG *et al.*, 2009 testaram 5 variáveis e encontraram a melhor produção de inulinase por *Cryptococcus aureus* G7a, 420,9 U/g, durante a fermentação em estado sólido, com umidade inicial de 61,5%, 2,75% de inóculo, a relação entre farelo de trigo por casca de arroz de 0,42, temperatura de 29 °C, e pH 5,5. Esta foi a maior atividade de inulinase produzida por linhagens de levedura relatadas até agora (SHENG *et al.*, 2009).

Avanços no entendimento da produção de inulinases microbianas e na caracterização e clonagem de genes relacionados a essa enzima têm sido feitos nos

últimos 10 anos. Muitas pesquisas têm como foco a inulina, oligossacarídeos, bioetanol, produção de frutose a partir da inulina e materiais contendo inulina. Os resultados mostram que alguns micro-organismos podem produzir inulinase com rendimento significativo, mostrando um caminho promissor para novas descobertas. (CHI *et al.*, 2009). Certamente, nos dias atuais, o investimento na identificação de novas fontes renováveis de enzimas com promissora aplicação industrial é extremamente relevante e essencial, o que justifica sempre mais estudos científicos com este propósito.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Isolar e identificar fungos produtores de inulinase oriundos da rizosfera do yacon (*Polymnia sanchifolia*).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Isolar fungos produtores de inulinase a partir da rizosfera do yacon.
- Identificar os fungos selecionados por técnicas culturais e moleculares (rDNA ITS).
- Caracterizar o tipo de inulinase produzida pelo fungo selecionado como o mais promissor produtor desta enzima.
- Avaliar os melhores parâmetros para a produção e atividade da inulinase do fungo selecionado.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

### **4.1. Triagem de fungos produtores de inulinase**

#### **4.1.1. Isolamento de fungos a partir da rizosfera de yacon (*Polymnia sanchifolia*)**

O yacon foi escolhido para o isolamento de fungos produtores de inulinase devido aos relatos na literatura sobre a presença de grande quantidade de inulina em seus tubérculos (3-10%), substrato este usado principalmente por fungos produtores de inulinase (CAZETTA *et al.*, 2005; FRANCK & LEENHEER, 2005; CHI *et al.*, 2011).

Com o propósito de isolar fungos potencialmente produtores de inulinases, foram realizadas duas triagens independentes identificadas como A (a partir da rizosfera de plantas de yacon provenientes da plantação na fazenda Machado, em Córrego Fundo, Viçosa-MG) e B (a partir da rizosfera de tubérculos de yacon enterrados por 10 dias na Mata da Biologia (20°45'23.3"S/042°51'36.3"W) no Campus da UFV). O solo aderido aos tubérculos de yacon em ambas as estratégias (10g) foram suspensos em 100 mL de solução salina esterilizada (diluição 1:10) e em seguida, foram realizadas diluições seriadas até 10<sup>-4</sup>.

As diluições 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> foram plaqueadas, em triplicata, em placas contendo meio de cultura preparado com 200 g de yacon para cada litro de água destilada (CASTANON, 2011), suplementado com cloranfenicol (100 mg/L) e rosa bengala (50 mg/L).

As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 25 °C e depois de 5 dias, os fungos que cresceram foram transferidos para um meio mínimo (1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g de NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g de KCl, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>, 0,001 g de FeSO<sub>4</sub> e 0,001 g de ZnSO<sub>4</sub> em 1 litro de água destilada de acordo com PONTECORVO *et al.*, 1953) contendo inulina (1%) (Sigma® - I2255) como única fonte de carbono.

#### **4.1.2. Purificação dos isolados fúngicos**

A purificação foi realizada pela semeadura de 100 µL de diferentes diluições seriadas de conídios ou células fúngicas em meio mínimo e transferência de uma

colônia isolada, para uma nova placa de Petri contendo meio mínimo contendo inulina (1%) como única fonte de carbono.

#### **4.1.3. Análise enzimática**

Para avaliar a produção de inulinase de cada isolado obtido, foi realizada a atividade enzimática pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), com modificações de acordo com o descrito por SOUZA-MOTTA *et al.*, (2005).

A obtenção do extrato enzimático bruto utilizado nesta análise foi feita a partir da inoculação de um disco de micélio de 8 mm de cada fungo em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 30 mL de meio mínimo contendo inulina 1% como única fonte de carbono. Os fungos foram cultivados por 72 h, período de tempo que resultou na maior produção de inulinase em testes anteriores (SOUZA, 2012), a uma temperatura de 28 °C (dentro da média ótima de crescimento para a maioria dos fungos de solo) e rotação de 150 rpm. Após esse período de crescimento, o meio foi filtrado e o sobrenadante, considerado extrato bruto da enzima, armazenado a -20 °C (CALAM, 1969).

Para o ensaio enzimático, a mistura de reação foi composta de 100 µL do extrato bruto da enzima e 400 µL do substrato inulina (Sigma® - I2255) à 1% em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Após 20 min a 50 °C, foram adicionados 500 µL de DNS à reação. A mistura de reação foi fervida por 5 min e logo após, foram adicionados 9 mL de água. Após esse processo, a densidade óptica foi lida em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz um µmol de açúcar redutor por minuto sob condições de ensaio padrão.

A solução utilizada para interromper o ensaio enzimático foi composta por 10 g de DNS, 300 mL de NaOH (2M) e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio para 1L. Antes de ser utilizada, foram adicionados 70 µL de metabissulfito 35% e 200 µL de fenol 50%, para cada 50 mL de DNS. Uma solução de frutose (Sigma®) de 5 mM foi utilizada para elaboração da curva padrão.

#### **4.1.4. Estimativa do crescimento micelial**

Esta análise foi realizada apenas com os isolados de fungos filamentosos. Os discos de micélio dos fungos foram transferidos para placas contendo meio mínimo com

inulina 1% e ágar 15 g/L (Merck) e incubados por 5 dias em câmara de crescimento a 25 °C. O diâmetro do micélio foi medido diariamente e foram realizadas triplicatas biológicas.

#### **4.1.5. Análise da formação de halo de degradação de inulina**

A partir dos fungos isolados e analisados pela técnica do DNS, seis fungos foram selecionados e inoculados em placas contendo meio mínimo sólido (composição descrita na seção 4.1.1), contendo inulina 1% e incubado à temperatura de 27 °C por 7 dias.

Após esse período, as placas foram cobertas com 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. Depois desse processo, as placas foram deixadas abertas em temperatura ambiente por 15 a 60 min. Halos claros ao redor dos micélios foram considerados resultado positivo (LI *et al.*, 2011).

## **4.2. Identificação molecular e cultural dos fungos selecionados**

### **4.2.1. Extração de DNA total**

O DNA total dos fungos selecionados foi obtido utilizando o kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation (MOBIO), de acordo com as instruções do fabricante.

### **4.2.2. Identificação molecular dos fungos selecionados**

Para a identificação molecular dos isolados fúngicos selecionados, a região ITS (ITS1-5,8S-ITS2) correspondente à sequência parcial do gene que codifica o rDNA foi obtida pela técnica de PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram o ITS1F (5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3') (GARDES & BRUNS, 1993) e o ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE *et al.*, 1990) utilizando o termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany).

O termociclador foi programado para realizar uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 39 ciclos a 95 °C por 1 min (desnaturação), 50 °C por 1 min (anelamento) e 72 °C por 1 min (extensão) e uma etapa de extensão final a 72 °C por 7 min.

A reação foi realizada para um volume final de 25 µL, contendo 1X do tampão Colorless Go Taq® Flexi Buffer [5X] (Promega, Madison USA); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> [25

mM]; 0,2 mM de cada dNTP [10 mM de dNTP]; 0,2 µM do oligonucleotídeo ITS1F; 0,2 µM do oligonucleotídeo ITS4; 1,25 U de Go Taq® DNA Polymerase (Promega, Madison USA) e 20 ng/µL de DNA genômico em um volume final com água ultrapura autoclavada. Um controle negativo (sem o DNA) foi incluído. Após a amplificação, os amplicons correspondentes foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### **4.2.3. Análise dos conídios por microscopia óptica**

Os fungos analisados foram cultivados em meio de cultura Corn Meal Agar (HIMEDIA) para estimular a esporulação e lâminas com o micélio de cada fungo foram preparadas. Os conídios foram analisados e fotografados em microscópio óptico com câmera embutida (Olympus BX50).

A partir das técnicas descritas apenas um fungo filamentosos foi selecionado para os ensaios descritos abaixo.

### **4.3. Estudo da produção de inulinase por *Fusarium oxysporum* F6**

#### **4.3.1. Análise do tempo de cultivo ótimo para a produção da inulinase**

O fungo selecionado como melhor produtor de inulinase a partir da triagem realizada foi cultivado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio mínimo (composição descrita na seção 4.1.3) com três diferentes concentrações de inulina (1,0%, 1,5% e 2,0%), na temperatura de 28 °C e rotação de 150 rpm, pelos períodos de tempo de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, todos em triplicata. Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos pela filtração do meio onde o micélio estava presente.

As atividades de inulinase a partir desses extratos enzimáticos foram obtidas pelo método de DNS (seguindo o mesmo protocolo da seção 4.1.3), para determinar qual tempo de cultivo mais apropriado para uma produção otimizada de inulinase por esse fungo.

#### **4.3.2. Otimização da produção de inulinase utilizando modelos estatísticos**

Para identificar as melhores condições para a produção de inulinase pelo fungo selecionado foi utilizada a fermentação no estado sólido e a otimização dos parâmetros foi feita utilizando o delineamento composto central (DCC), uma das metodologias de superfície de resposta (MSR) já descrita em diversos trabalhos (SHENG *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011; DILIPKUMAR *et al.*, 2011; BONCIU *et al.*, 2012).

#### 4.3.2.1. Preparo do pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado em um meio contendo 10 g de extrato de malte, 20 g de peptona e 10 g de inulina em um litro. Uma alçada de esporos foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura e incubado sob agitação com rotação de 200 rpm e 28 °C por 24h.

#### 4.3.2.2. Fermentação em estado sólido

Farelo de trigo adquirido em um mercado local foi utilizado como substrato sólido para a produção de inulinase. Dez gramas do farelo de trigo foram colocados em frasco Erlenmeyer de 250 mL e suplementados com 12 mL de água destilada contendo o meio base com 0,6% de NaNO<sub>3</sub>, 0,15% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% de KCl, 0,05% de MgSO<sub>4</sub>, 0,001% de ZnSO<sub>4</sub> e 0,001% de FeSO<sub>4</sub> na base do substrato sólido seco. A concentração de inulina, pH e a suplementação com extrato de levedura foram as variáveis do meio base que foram testadas de acordo com a Tabela 3.

**Tabela 3 - Faixa de valores das variáveis independentes no delineamento composto central.**

Variáveis	Código	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Inulina (%)	X <sub>1</sub>	1,6	5	10	15	18,4
pH	X <sub>2</sub>	3,8	4,5	5,5	6,5	7,2
Extrato de levedura (%)	X <sub>3</sub>	0	1	3	5	6,36

Os frascos Erlenmeyer de 250 mL com o substrato e o meio de cultura base foram autoclavados a 121 °C por 30 min e resfriados. Em seguida, 1,2 mL do pré-inóculo foram adicionados a cada frasco em condições assépticas e incubados a 28 °C por 72 h em modo estático.

#### 4.3.2.3. Extração da inulinase

Depois de terminado o período de fermentação, 10 volumes de água destilada foram adicionados aos frascos e a mistura foi agitada a 150 rpm em temperatura ambiente por 60 min. Após esse tempo, a mistura foi filtrada e centrifugada a 10.000 rpm por 20 min e o sobrenadante foi coletado e este caracterizado como o extrato enzimático bruto. Uma alíquota desse extrato enzimático bruto foi analisada pelo método de DNS, seguindo o mesmo protocolo do tópico 4.1.3.

#### 4.3.2.4. Análises estatísticas

O delineamento composto central (DCC) foi utilizado para otimizar três variáveis consideradas significativas na produção de inulinas (concentração de inulina, pH e suplementação com extrato de levedura). O modelo consiste de três conjuntos distintos de ensaios experimentais: um desenho fatorial dos fatores estudados, um conjunto de pontos centrais (ensaios experimentais cujos valores de cada um dos fatores são os valores médios utilizados na porção fatorial) e um conjunto de pontos axiais, ou amostras de estrela. O modelo investiga, portanto, cinco níveis de cada variável independente. Uma distância do ponto estrela de  $\pm 1,68$  foi utilizado no presente estudo de otimização. As experiências foram realizadas de forma aleatória para estabelecer as influências externas em relação aos valores medidos. A Tabela 4 mostra a gama de fatores estudados e os níveis correspondentes codificados, num total de 20 experimentos realizados. A análise estatística do modelo foi representada como uma análise de variância (ANOVA).

**Tabela 4 - Delineamento composto central (CCD) dos fatores em níveis codificados.**

Ordem	[ ] inulina	pH	Extrato de levedura
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

#### **4.4. Caracterização da enzima**

##### **4.4.1. Identificação do tipo de inulinase produzida por *Fusarium oxysporum* F6**

Um ensaio de cromatografia de camada delgada (CCD) foi realizado para a identificação do tipo de inulinase (endo ou exo-inulinase) produzida pelo *F. oxysporum* F6.

Uma alíquota de 100 µL do extrato bruto da enzima (equivalente ao filtrado do sobrenadante da cultura) e o substrato inulina na concentração de 1% (preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0) em um volume final de 500 µL foram incubados a 50 °C por 30 min. Após esse período, a reação foi interrompida pela imersão dos tubos em água fervente por 5 min (banho-Maria). Em seguida, 20 µL dos produtos da hidrólise foram aplicados em placas cromatográficas de 20 cm (Merck®, folhas de alumínio para TLC, gel de sílica 60 F<sub>254</sub>) (AZHARI *et al.*, 1989). Além dos produtos da hidrólise enzimática, foram aplicados nos outros pontos os controles: inulina (Sigma®), sacarose (Merck®), glicose (Merck®) e frutose (Sigma®), todos na concentração de 1% e os produtos da hidrólise da inulina pela endo-inulinase de *Aspergillus niger* (Sigma®- I6285), com espaços de 3 cm entre cada ponto, 1 cm das bordas e 3 cm da base. O sistema solvente utilizado foi composto de ácido acético, clorofórmio e água (35:30:5, v/v/v, respectivamente) e a solução reveladora pela solução A com 2 mL de anilina e 2 g de difenilamina em 100 mL de acetona e pela solução B com 10 mL de ácido fosfórico 85%, misturados no momento da utilização. A revelação foi realizada por aquecimento durante 15 min a 105 °C (ERTAN *et al.*, 2003).

##### **4.4.2. Efeito da temperatura e do pH na atividade da inulinase produzida por *Fusarium oxysporum* F6**

A temperatura ótima para a atividade da inulinase de *F. oxysporum* F6 foi determinada incubando cada mistura enzima (extrato bruto) e substrato por 20 min nas temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C em tampão acetato (pH 5,0) e os açúcares redutores liberados foram medidos da mesma forma como foi descrito no tópico 4.1.3. (CHEN *et al.*, 2009).

O efeito do pH na atividade da inulinase foi determinado nos pHs 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 8,0 usando 0,1 M de tampão acetato (pH 3,0 - 5,0) ou 0,1 M de

tampão fosfato (pH 5,5 – 8,0) no substrato com 1% de inulina e extrato bruto da enzima a 50 °C por 20 min de acordo com CHEN *et al.* (2009).

#### **4.5. Análise comparativa da sequência de aminoácidos da inulinase de *F. oxysporum* f. sp. cubense 4 com outras sequências de inulinase**

As sequências das exo-inulinases de *Penicillium* sp. TN-88 (MORIYAMA *et al.*, 2002) e *Aspergillus awamori* (ARAND *et al.*, 2002) e das endo-inulinases de *Aspergillus ficuum* (UHM *et al.*, 1998) e *Penicillium purpurogenum* (ONODERA *et al.*, 1996) foram utilizadas na comparação das regiões conservadas, utilizando o programa BLAST. Além destas sequências, outras sequências de aminoácidos de fungos e bactérias foram escolhidas para que fosse possível realizar uma análise filogenética. Todas as sequências foram retiradas do GenBank e EMBL Nucleotide Sequence Database (Tabela 5). A determinação do ponto isoelétrico (pI) e da massa molecular teóricos foi realizada pelo programa ExPASy ([http://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool](http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool)). O alinhamento dos aminoácidos foi realizado pelo programa Clustal W e editados com o auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor. A análise filogenética foi realizada utilizando o software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (versão 5) (ADAWIYAH *et al.*, 2011).

**Tabela 5 – Sequências utilizadas nas análises *in silico*.**

Sequências de aminoácidos	Tipo	Número de acesso (NCBI)
<i>Aspergillus ficuum</i>	Endo	CAA07345
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	Endo	XP_748286
<i>Aspergillus niger</i>	Endo	AAL34524
<i>Aspergillus niger</i> inuB	Endo	BAA33798
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	Endo	AAF24999
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Endo	BAA12321
<i>Fusarium oxysporum</i>	ND	EMT72224
<i>Aspergillus awamori</i>	Exo	CAC44220
<i>Aspergillus niger</i> inu1	Exo	XP001395879
<i>Aspergillus niger</i> inuF	Exo	AAR31730
<i>Bacillus subtilis</i>	Exo	AAK00768
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Exo	BAC45010
<i>Penicillium</i> sp. TN-88	Exo	BAC16218

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Triagem dos fungos produtores de inulinase a partir da rizosfera de yacon**

Nas triagens realizadas (A e B) foram selecionados 48 fungos a partir do crescimento em placas contendo meio de cultura contendo extrato de yacon como única fonte de carbono (o extrato de yacon apresenta 0,8% de inulina de acordo com as análises realizadas por CASTANON, 2011). Dos 48 fungos isolados, seis (12,5%) foram caracterizados como sendo fungos unicelulares (leveduras) e 42 correspondentes a fungos filamentosos (87,5%). Embora na literatura seja evidente a importância de leveduras na produção de inulinases promissoras (CHI *et al.*, 2009), o nosso trabalho teve como foco isolar fungos filamentosos, por causa do melhor desempenho na secreção e pela possibilidade de usarmos a linhagem hospedeira *Penicillium griseoroseum* PG63 (PEREIRA *et al.*, 2004) para a produção de proteínas heterólogas.

#### **5.1.1. Análise do crescimento micelial**

Os fungos filamentosos isolados foram analisados quanto à capacidade de crescimento em meio mínimo contendo inulina pura (1%) como única fonte de carbono, em um período de sete dias a 25 °C. Os maiores diâmetros de crescimento estão destacados em negrito (Tabela 6).

#### **5.1.2. Análise da atividade de inulinase**

O método do DNS é amplamente utilizado na literatura para a detecção da produção de inulinase (KUMAR *et al.*, 2005; SOUZA-MOTTA *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2006; KANGO, 2008). Apenas seis fungos apresentaram razoáveis atividades de inulinase nas condições testadas e estão destacados em negrito (Tabela 6), cinco deles também estão entre os que mais cresceram em placas com meio de cultivo sólido com inulina 1% como única fonte de carbono (Tabela 6). O fungo 25, apesar de não estar entre os que mais cresceram em meio mínimo com inulina 1%, apresentou uma das melhores atividades de inulinase, por isso este fungo também foi selecionado para as análises posteriores. Desta forma as demais análises foram realizadas apenas com os seis fungos filamentosos que apresentaram promissoras características em relação à produção de inulinases.

**Tabela 6 - Diâmetro de crescimento, atividade enzimática e estratégia de triagem dos dos fungos analisados.**

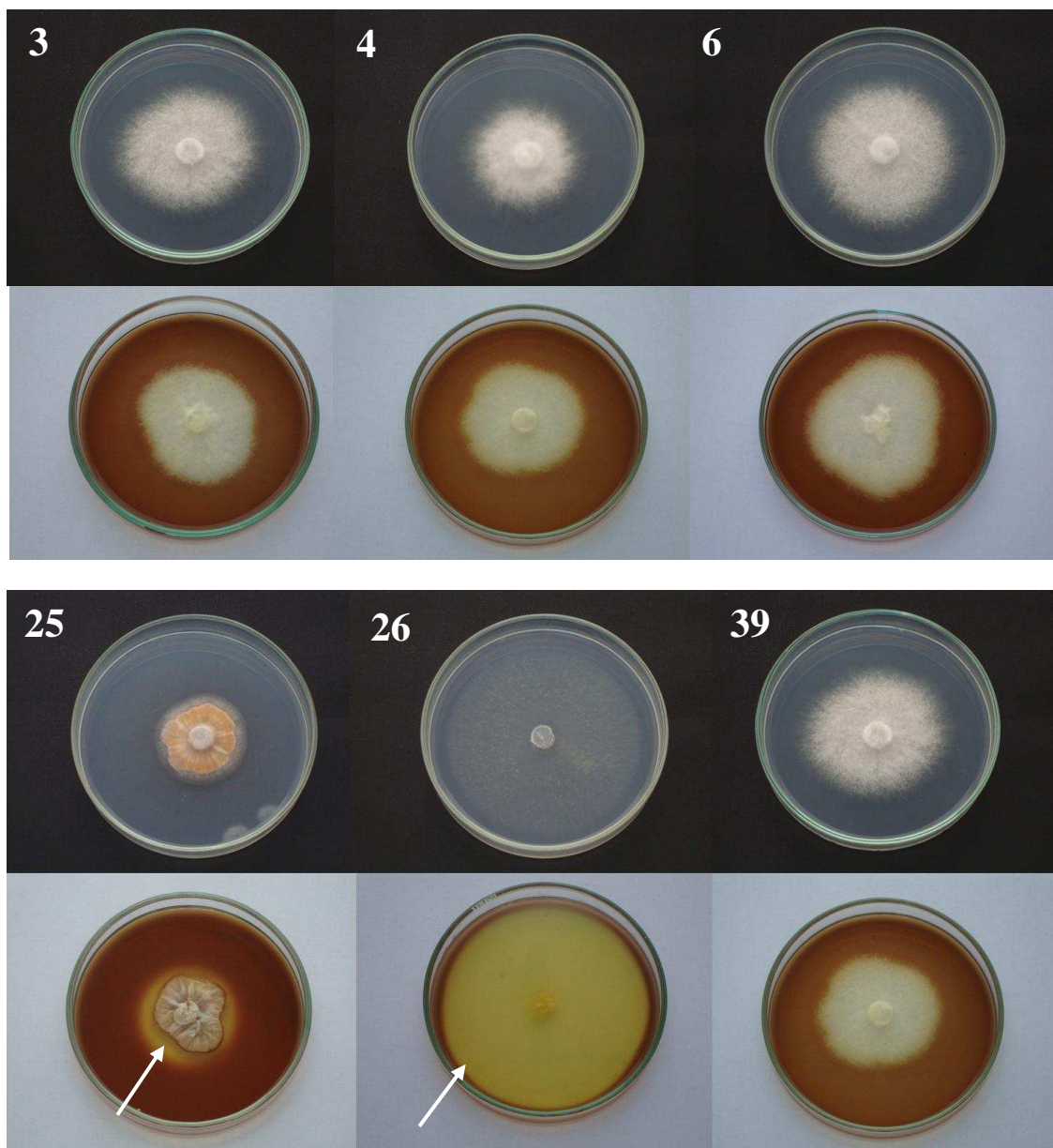
Fungo	Diâmetro do fungo (cm)	Atividade enzimática (U/mL)	Estratégia usada para a realização da triagem
1	1,8	0,285	A
2	1,0	0,302	A
3	<b>5,4</b>	<b>0,955</b>	A
4	<b>5,8</b>	<b>0,717</b>	A
5	1,1	0,116	A
6	<b>6,3</b>	<b>1,932</b>	A
7	ND	ND	A
8	ND	ND	A
9	1,2	0,064	A
10	0,6	0,044	A
11	1,1	0,070	A
12	1,2	0,155	A
13	<b>4,7</b>	0,273	A
14	1,5	ND	A
15	1,5	0,096	A
16	1,6	0,065	A
17	2,1	0,012	A
18	1,4	0,344	A
19	2,3	0,287	A
20	2,8	0,351	A
21	2,8	0,254	A
22	<b>4,9</b>	0,256	B
23	3,2	0,109	B
24	0,7	0,199	B
25	3,0	<b>1,701</b>	B
26	<b>4,8</b>	<b>0,477</b>	B
27	<b>5,4</b>	0,098	B
28	0,5	0,112	B
29	2,0	0,136	B
30	2,1	ND	B
31	3,3	0,221	B
32	Levedura*	0,046	B
33	Levedura*	0,187	B
34	Levedura*	0,064	B
35	Levedura*	0,091	B
36	1,9	ND	B
37	1,8	0,264	B
38	1,4	0,079	B
39	<b>7,4</b>	<b>0,502</b>	B
40	4,0	0,228	B
41	3,2	0,305	B
42	1,1	ND	B
43	Levedura*	0,041	B
44	2,0	0,078	B
45	1,9	0,017	B
46	2,5	0,018	B
47	1,5	0,005	B
48	Levedura*	ND	B

\* Diâmetro não avaliado porque se trata de um fungo unicelular (levedura).

ND - atividade de inulinase não detectada pelo método empregado nas condições avaliadas.

### **5.1.3. Formação de halo de degradação de inulina**

Dos seis fungos escolhidos, somente os fungos 25 e 26 formaram halos de degradação, identificados pelas setas brancas (Figura 1). É possível que nas condições utilizadas, a inulinase de *F. oxysporum* esteja aderida à superfície das células fúngicas presentes no micélio e com isso, o halo tenha se formado somente sob o micélio, já que foi observada a presença de halo nos outros fungos do mesmo gênero com micélios menos desenvolvidos. Existe relato na literatura que somente cerca de 14% da inulinase produzida por *F. oxysporum* é secretada para o meio de cultura utilizado, a maioria permanece aderida à célula fúngica, sendo portanto, obtida a partir do micélio (PANDEY *et al.*, 1999), o que reforça o resultado obtido em nosso trabalho.



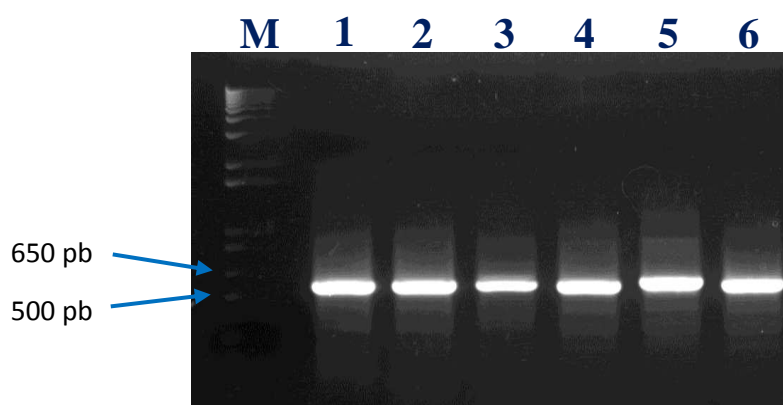
**Figura 1 – Identificação da produção de inulinase pelos fungos 3, 4, 6, 25, 26 e 39, isolados a partir da rizosfera do yacon (a seta branca indica o halo de degradação de inulina).**

## 5.2. Identificação dos fungos selecionados

### 5.2.1. Identificação molecular

A região espaçadora interna transcrita (ITS) do DNA ribossomomomol foi escolhida para a identificação molecular dos fungos selecionados. A região ITS tem a maior probabilidade de sucesso na identificação da mais ampla variedade de fungos e apresenta as diferenças mais claramente definidas em relação à variação inter e intra-específica (SCHOCH *et al.*, 2012).

Sequências de aproximadamente 600 pb, que correspondem a região ITS de cada fungo, foram amplificadas (Figura 2). Após o sequenciamento, estas sequências foram comparadas às sequências ITS depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), para identificar quais espécies de fungos possuíam maior identidade com cada fungo analisado (Tabela 7).



**Figura 2 – Amplicons correspondentes à sequência ITS rDNA obtidos pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). M:** marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). **1:** Fungo 3; **2:** Fungo 4; **3:** Fungo 6; **4:** Fungo 25; **5:** Fungo 26; **6:** Fungo 39.

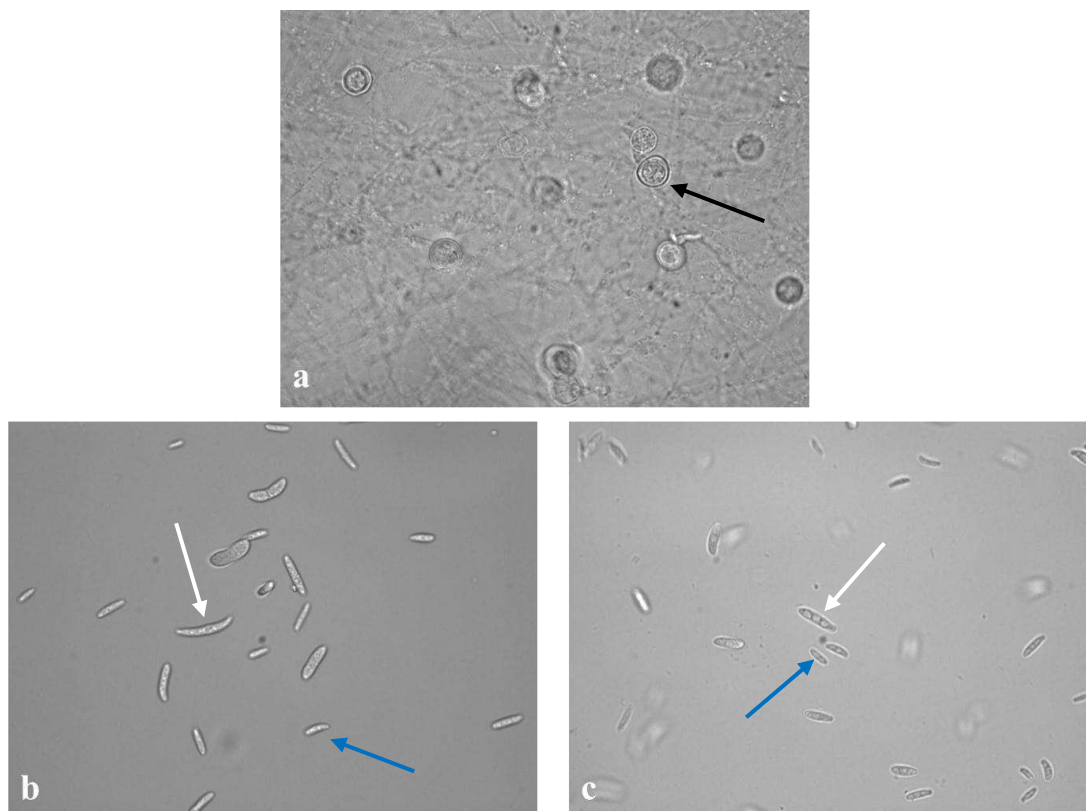
**Tabela 7 – Identificação molecular dos fungos filamentosos isolados a partir de comparação com o banco de dados Genbank (NCBI).**

Isolado	Espécie fúngica identificada	Identidade da sequência (%)	E-value	Número de acesso (NCBI)
Fungo 3	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate 857, internal transcribed spacer 1	99	0.0	JN232190.1
Fungo 4	<i>Fusarium oxysporum</i> strain FuO139, internal transcribed spacer 1	100	0.0	KC196121.1
Fungo 6	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate FOFB62, internal transcribed spacer 1	100	0.0	HQ651161.1
Fungo 25	<i>Staphylotrichum boninense</i> genes for ITS1, strain: JCM 17910	99	0.0	AB625582.1
Fungo 26	<i>Fusarium solani</i> , ITS1, strain FMR 8030	100	0.0	AM412613.1
Fungo 39	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate REF213, internal transcribed spacer 1	100	0.0	JN859433.1

### 5.2.2. Observação dos conídios sob microscopia óptica

A análise molecular indicou que quatro dos seis fungos analisados foram espécies de *F. oxysporum*. As colônias de fungos do gênero *Fusarium* apresentam coloração predominantemente branca, sendo que em *F. oxysporum* é possível observar uma coloração levemente avermelhada no centro do micélio, quando o fungo é cultivado em meio BDA (Batata Dextrose Ágar). A produção de macroconídios e microconídios é uma característica importante do gênero *Fusarium* e algumas diferenças nestes conídios ajudam a separar algumas espécies (GUPTA *et al.*, 2010; GRÄFENHAN *et al.*, 2011).

Sobre o fungo *S. boninense* existe pouca informação. Esta espécie caracteriza-se morfológicamente pela produção de colônias amarelo-laranja e conídios subglobosos (NONAKA *et al.*, 2011). Os conídios identificados em *F. oxysporum* F6, *F. solani* e *S. boninense* estão demonstrados na Figura 3.



**Figura 3 – Caracterização dos conídios produzidos pelos fungos *Staphylotrichum boninense* (a); *Fusarium oxysporum* (b) e *Fusarium solani* (c). A seta preta indica o conídio de *Staphylotrichum boninense*, as setas brancas indicam os macroconídios e as setas azuis os microconídios encontrados em espécies de *Fusarium*.**

### **5.3. Estudo da produção de inulinase por *Fusarium oxysporum* F6**

Para selecionar somente um dos seis fungos identificados para as análises de otimização da produção da enzima, análises de atividade enzimática (réplicas biológicas) foram realizadas. Os testes de determinação do melhor período de tempo para a produção de inulinase por fermentação submersa e de otimização de condições para a produção de inulinase por fermentação no estado sólido (FES) foram realizados somente com o fungo *F. oxysporum* F6 (Tabela 8).

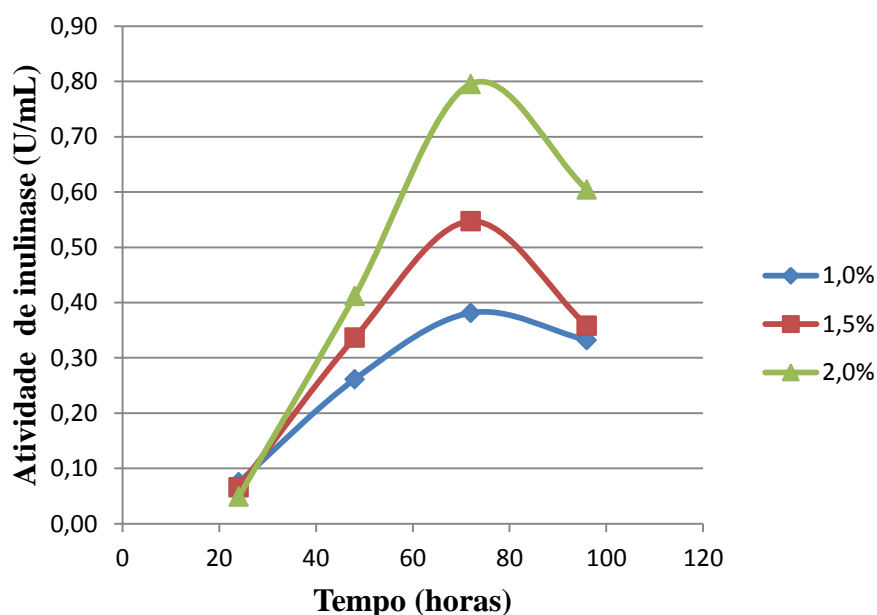
Pelas médias das atividades enzimáticas dos fungos selecionados, o fungo *Fusarium oxysporum* F6 foi escolhido como melhor produtor de inulinase e os experimentos seguintes foram realizados somente com este isolado (Tabela 8).

**Tabela 8 – Atividade de inulinase apresentada pelos fungos filamentosos selecionados.**

	Atividade de inulinase (U/mL)			
	1	2	3	Média
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	0,955	0,813	0,787	<b>0,852</b>
<i>Fusarium oxysporum</i> F4	0,717	0,772	0,699	<b>0,729</b>
<i>Fusarium oxysporum</i> F6	1,932	0,974	1,213	<b>1,373</b>
<i>Staphylotrichum boninense</i> F25	1,701	0,640	0,844	<b>1,062</b>
<i>Fusarium solani</i> F26	0,477	0,337	0,295	<b>0,370</b>
<i>Fusarium oxysporum</i> F39	0,502	0,491	0,526	<b>0,506</b>

### **5.3.1. Determinação do melhor período de tempo para a produção de inulinase por *Fusarium oxysporum* F6**

As concentrações de 1,0%, 1,5% e 2,0% de inulina foram utilizadas para verificar o melhor período de tempo para a produção de inulinase por *F. oxysporum* F6 por serem as concentrações mais utilizadas em trabalhos anteriores envolvendo a fermentação submersa (PESSONI *et al.*, 1999; JING *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2011; MANSOURI *et al.*, 2013). A maior produção de inulinase por *F. oxysporum* F6 ocorreu na concentração de 2% de inulina em 72 h (Figura 4), que é o mesmo período e concentração de inulina ótimos encontrados para *Aspergillus niveus* 4128URM (SOUZA-MOTTA *et al.*, 2005). Em outros fungos filamentosos, como *Aspergillus niger* ATCC 20611 a melhor produção de inulinase ocorreu em 96 h de crescimento e na presença de inulina na concentração de 1% (DINARVAND *et al.*, 2012). O período de tempo e a concentração de inulina ótimos variam entre as espécies de fungos, o que justifica ensaios desta natureza.



**Figura 4 – Produção de inulinase por *Fusarium oxysporum* F6 em função do tempo de crescimento e concentração de inulina.**

### 5.3.2. Otimização das condições de produção de inulinase por *Fusarium oxysporum* F6

Baseado em trabalhos anteriores, que demonstraram a relevância da concentração de inulina (CHEN *et al.*, 2011), pH (SHENG *et al.*, 2009) e suplementação com extrato de levedura (DILIPKUMAR *et al.*, 2011; BONCIU *et al.*, 2012) na produção de inulinases em fermentação no estado sólido, estas três variáveis foram selecionadas para a realização da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

Um total de 20 combinações dos parâmetros supracitados foram utilizadas para o experimento. A função linear para a resposta final que prevê a atividade de inulinase após a eliminação dos termos referentes às variáveis não significantes ( $p > 0.05$ ) foi a seguinte:

$$Y = 0,874134 + 0,0328197 I$$

Onde Y é o valor da resposta, que é a atividade de inulinase e I é o nível codificado de concentração de inulina.

Na Tabela 9, estão representados os resultados do ensaio experimental fatorial completo empregado para determinar os níveis ótimos dos três fatores selecionados (concentração de inulina, pH e suplementação com extrato de levedura).

**Tabela 9 - Design experimental utilizado para a realização do DCC.**

Ordem	[ ] inulina	pH	Extrato de levedura	Atividade de inulinase (U/mL)
1	-1	-1	-1	0,866
2	1	-1	-1	1,427
3	-1	1	-1	1,493
4	1	1	-1	1,224
5	-1	-1	1	1,320
6	1	-1	1	2,192
7	-1	1	1	1,314
8	1	1	1	1,457
9	-1,68	0	0	0,854
10	1,68	0	0	1,409
11	0	-1,68	0	1,320
12	0	1,68	0	1,146
13	0	0	-1,68	1,289
14	0	0	1,68	0,662
15	0	0	0	1,082
16	0	0	0	0,944
17	0	0	0	1,036
18	0	0	0	0,946
19	0	0	0	0,985
20	0	0	0	1,082

Os resultados da significância estatística do modelo de regressão verificada pelo teste F, e a ANOVA estão demonstrados na Tabela 10. O ponto central foi repetido seis vezes para a estimativa do erro.

**Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de superfície de resposta para a produção de inulinase.**

Fonte	S Q	GL	MQ	Valor- F	Prob > F
Modelo	1,345834	9	0,149537	2,167456	0,1220
A-Inulina	0,367755	1	0,367755	5,330402	0,0436
B-pH	0,027207	1	0,027207	0,39435	0,5441
C-Extrato de levedura	0,003464	1	0,003464	0,050214	0,8272
Residual	0,68992	10	0,068992		
Erro	0,02012	5	0,004024		
Total	2,035754	19			

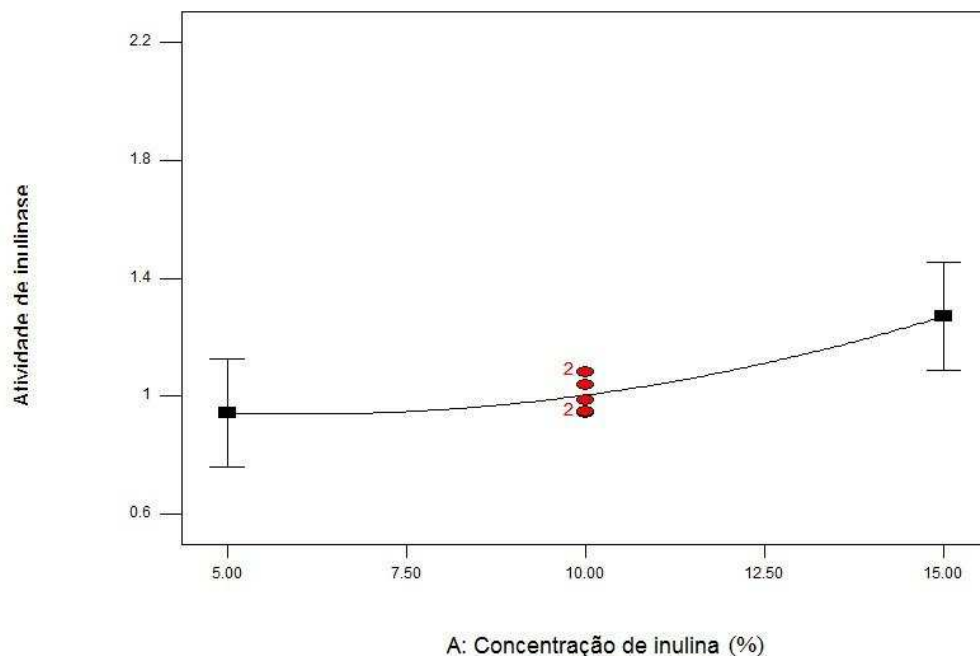
R<sup>2</sup>: 0,66 R<sup>2</sup> (adj): 0,356. SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Média dos quadrados.

De acordo com a Tabela 10, observa-se que a variável concentração de inulina foi significativa ( $p < 0,05$ ). O mesmo não foi verificado para as variáveis pH e extrato de levedura. Como a variação do pH e a suplementação com extrato de levedura não influenciaram a produção de inulinase nessa faixa de valores e condições de produção, a análise da interação entre os três fatores analisados (concentração de inulina, pH e suplementação com extrato de levedura) na produção de inulinase não pôde ser realizada. Porém foi possível observar, que o aumento da concentração de inulina levou ao aumento na produção de inulinase (Figura 5), demonstrando a influência direta da concentração de inulina na produção de inulinase por *F. oxysporum* F6. CHEN *et al.* (2011) também observaram que a concentração de inulina foi o fator que mais influenciou na atividade de inulinase de *Aspergillus ficuum* JNSP5-06, alcançando sua atividade máxima com 11,47% de inulina. Devido ao fato da inulina ter um preço elevado, estes resultados reforçam que a busca por substratos alternativos para a produção de inulinase em maior escala é de grande importância para a indústria.

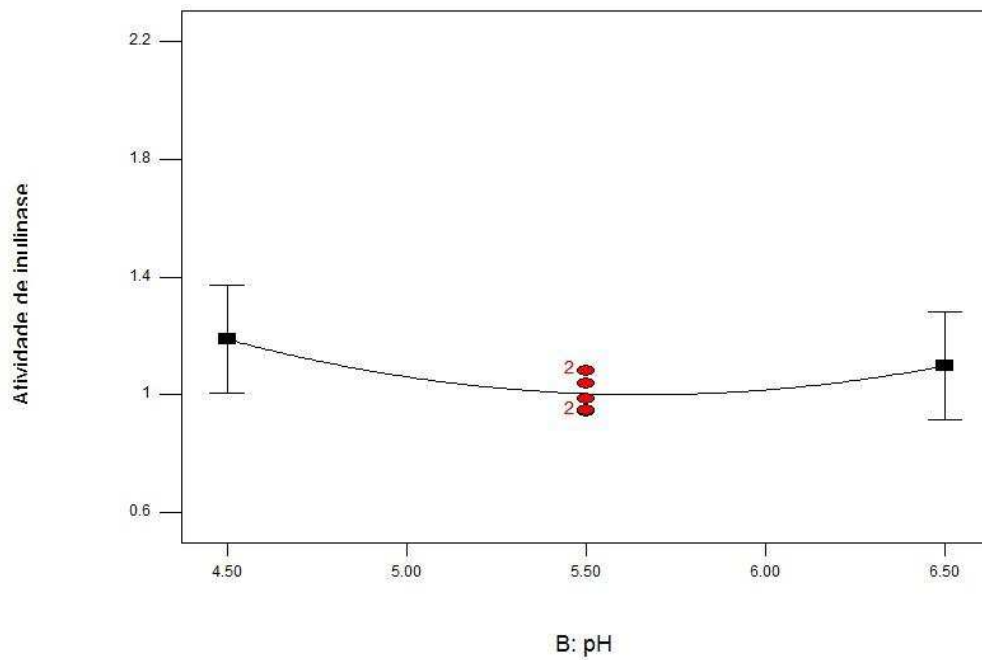
Um fato que reforça a utilização da fermentação em estado sólido foi a obtenção da produção de mais de 2,0 U/mL de enzima em uma das condições testadas (Tabela 9), valor que ainda não havia sido obtido nos ensaios anteriores. Para a produção de enzimas, a fermentação em estado sólido (FES) oferece inúmeras vantagens comparada à fermentação submersa (FS), como a utilização de substratos de baixo custo, um ambiente que facilita o crescimento dos fungos, redução da exigência de energia e produção de águas residuais, alto rendimento dos produtos da fermentação, alta

produtividade volumétrica e o aumento na recuperação dos produtos e com isso, vem sendo cada vez mais utilizada (PANDEY, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009).

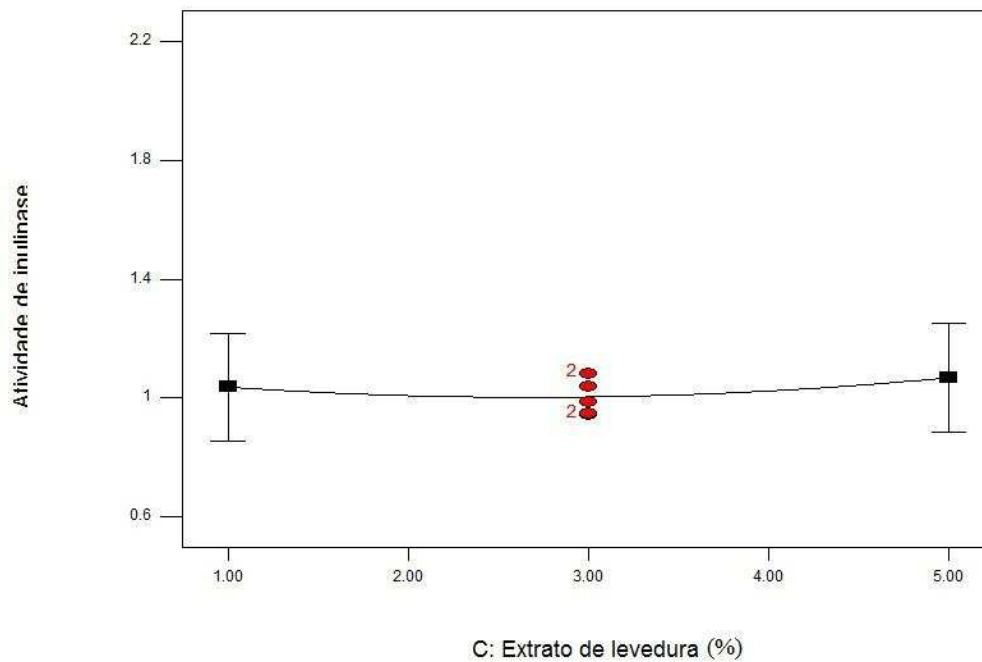
Nas figuras 5, 6 e 7 é possível observar a relação entre a atividade de inulinase (resposta) em função das variáveis avaliadas.



**Figura 5 – Atividade de inulinase em função da concentração de inulina.** Os extremos representam os valores -1 e +1 da variável, enquanto que os pontos no centro representam o resultado da repetição dos valores centrais. Nesse gráfico, pH e extrato de levedura têm valores constantes equivalentes aos valores centrais dessas variáveis.



**Figura 6 – Atividade de inulinase em função do pH.** Os extremos representam os valores -1 e +1 da variável, enquanto que os pontos no centro representam o resultado da repetição dos valores centrais. Nesse gráfico, concentração de inulina e extrato de levedura têm valores constantes equivalentes aos valores centrais dessas variáveis.

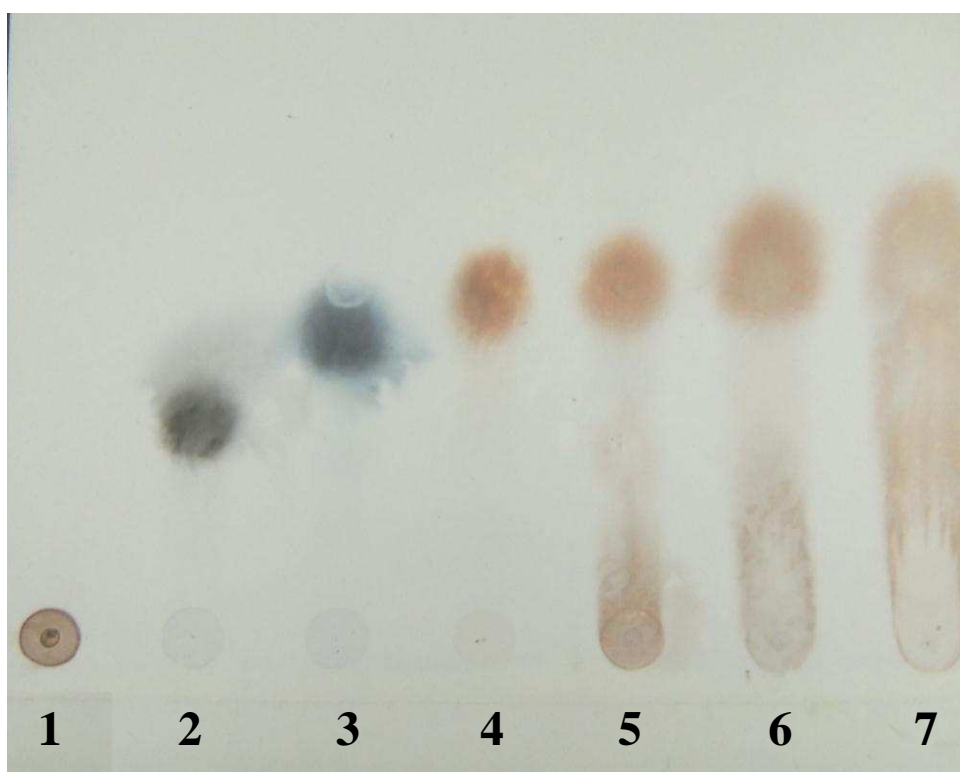


**Figura 7 – Atividade de inulinase em função da suplementação com extrato de levedura.** Os extremos representam os valores -1 e +1 da variável, enquanto que os pontos no centro representam o resultado da repetição dos valores centrais. Nesse gráfico, concentração de inulina e pH têm valores constantes equivalentes aos valores centrais dessas variáveis.

## 5.4. Caracterização da enzima

### 5.4.1. Cromatografia de camada delgada

Os produtos de hidrólise da inulina por 30 min e 60 min pela inulinase do fungo *F. oxysporum* F6 foram analisados por cromatografia de camada delgada (CCD), comparando com o padrão de uma endo-inulinase de *Aspergillus niger* (Sigma®-I6285) (Figura 8). A avaliação dos resultados da CCD foi realizada de acordo com ERTAN *et al.* (2003). O padrão das manchas demonstra que há a produção de frutooligossacarídeos nas reações de hidrólise da mesma forma que a endo-inulinase de *Aspergillus niger*, produção indicada pelas manchas produzidas entre a inulina e a frutose. Isso nos permite inferir que o fungo *F. oxysporum* F6 produz endo-inulinase, assim como a inulinase de *Trichoderma viridae* (ERTAN *et al.*, 2003), pois clivam a inulina em vários fragmentos menores, ao contrário das exo-inulinases de *Penicillium* sp. TN-88 (MORIYAMA *et al.*, 2002), *Pichia pastoris* (ZHANG *et al.*, 2009), *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium spinulosum* (ERTAN *et al.*, 2003), que produzem somente frutose livre.



**Figura 8 - Determinação dos produtos de hidrólise gerados pela ação da inulinase de *F. oxysporum* F6.** 1: Inulina [1%], 2: Sacarose [1%], 3: Glicose [1%], 4: Frutose [1%], 5: 30 minutos de hidrólise pela inulinase de *F. oxysporum* F6, 6: 60 minutos de hidrólise pela inulinase de *F. oxysporum* F6 e 7: Perfil de produtos liberados por uma endoinulinase *A.niger* (Sigma®- I6285) em inulina 1%.

#### 5.4.2. Temperatura e pH ótimos para a atividade da enzima

A temperatura ótima para a atividade da inulinase de *F. oxysporum* F6 é de 50 °C (Figura 9). Esta é a mesma temperatura ótima de atividade das inulinasas de *Aspergillus niger* NK-126 (KANGO, 2008) e *Cryptococcus aureus* G7a (SHENG *et al.*, 2008), que está dentro da faixa de temperatura ótima das inulinasas da maioria dos micro-organismos terrestres, que é de 30 °C a 55 °C (CHI *et al.*, 2009). Esta temperatura é mais elevada que as temperaturas já relatadas na literatura para a atividade das inulinasas de *F. oxysporum*, que estão entre 34-45 °C (SINGH & GILL, 2006), um ponto positivo para sua utilização na indústria, que necessita de enzimas termotolerantes em seus processos.

O pH ótimo de atividade da inulinase de *F. oxysporum* F6 foi de 5,5 (Figura 10), valores semelhantes ao pH ótimo encontrado para a inulinase de *Rhizopus* TN-96 (OHTA *et al.*, 2002). Esse valor está dentro da faixa de pH descrita tanto para as inulinasas de *F. oxysporum* 5,5-6,5 (SINGH & GILL, 2006), quanto para as inulinasas dos fungos em geral 4,5-6,0 (CHI *et al.*, 2009).

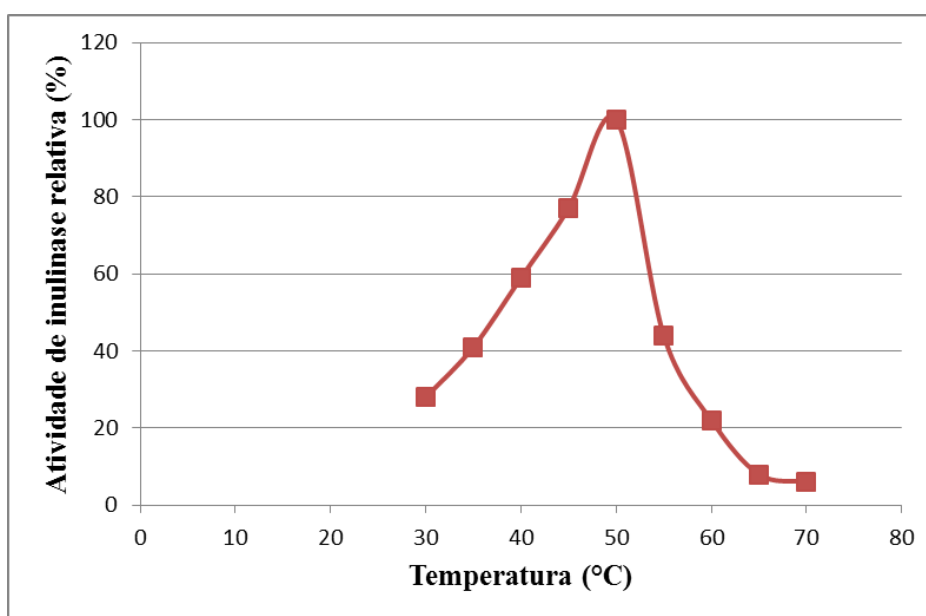
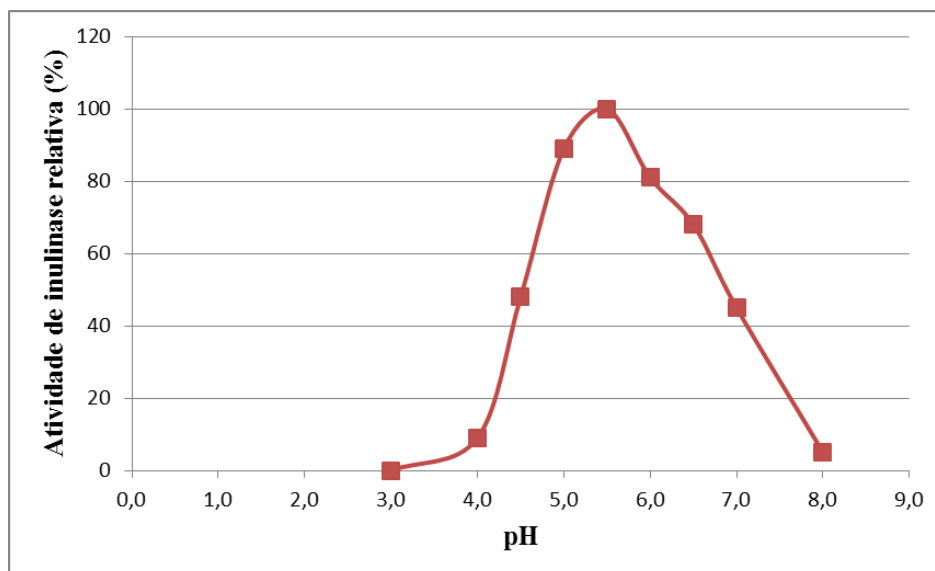


Figura 9 – Efeito da temperatura na atividade da inulinase de *F. oxysporum* F6.



**Figura 10 – Efeito do pH na atividade da inulinase de *F. oxysporum* F6.**

### **5.5. Análise comparativa da sequência de aminoácidos de *Fusarium oxysporum* com outras sequências de inulinase fúngicas disponíveis nos bancos de dados**

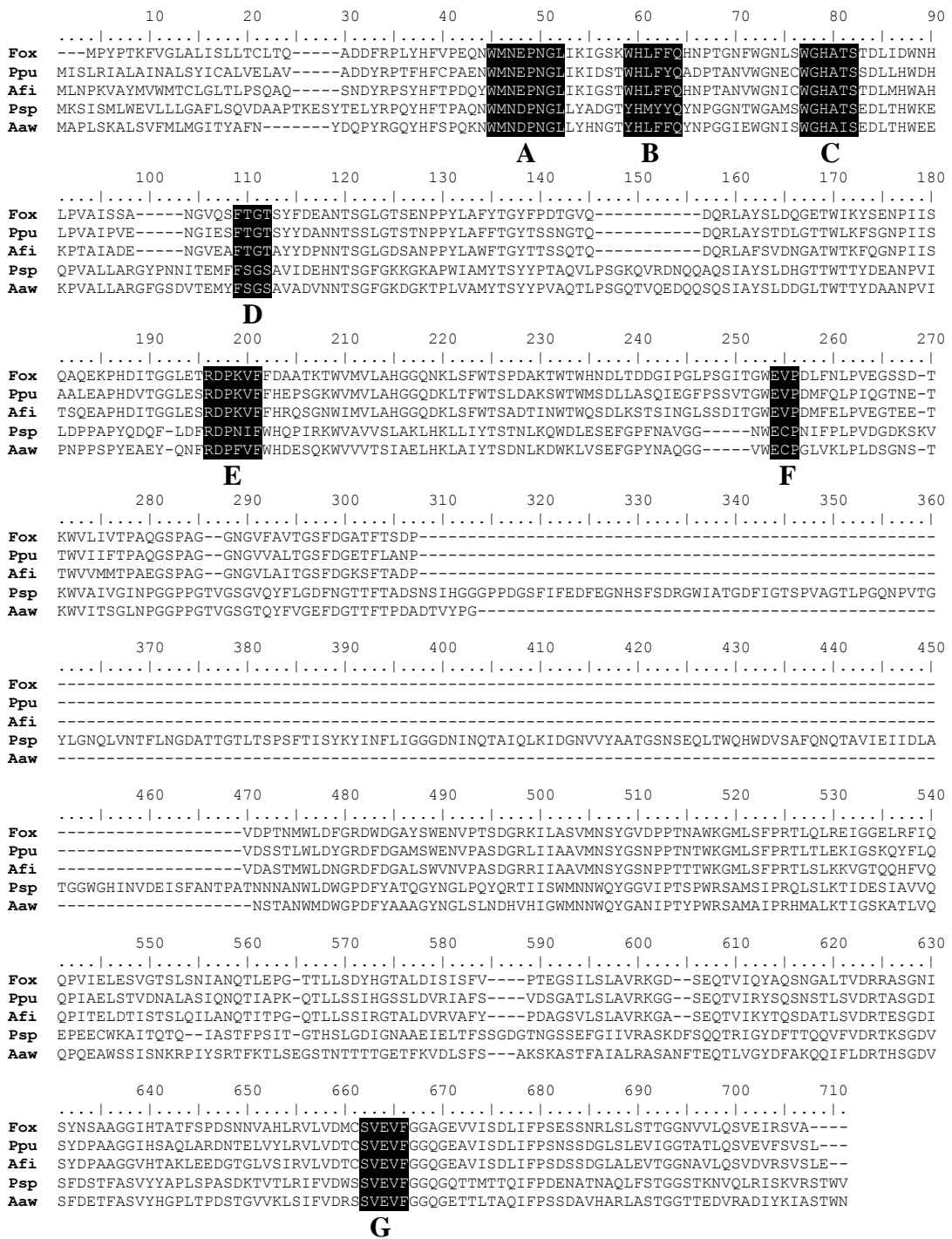
No banco de dados GenBank do NCBI, existe uma única sequência de nucleotídeos e aminoácidos de inulinase de *F. oxysporum* completa depositada: Inulinase [*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4] [EMT72224.1]. Com esta sequência foi possível deduzir que o pI é de 4,59, enquanto a massa molecular é de 55,46 kDa, que está dentro do que foi relatado para inulinasas até agora, que são massas moleculares acima de 50 kDa (CHI *et al.*, 2009). No genoma completo de *F. oxysporum* depositado, somente esta cópia do gene que codifica inulinase foi encontrada, o que sugere que o fungo *F. oxysporum* F6, selecionado neste trabalho, apresente uma inulinase com as mesmas características mencionadas acima.

#### **5.5.1. Comparação das sequências conservadas de algumas inulinasas fúngicas**

Sete regiões conservadas foram encontradas na análise e pela comparação destas regiões, é possível inferir que a inulinase de *F. oxysporum* f. sp. cubense 4 é uma endo-inulinase, pois todas as regiões conservadas foram idênticas às encontradas nas endo-inulinasas analisadas (Figura 11). A sequência WMN(E/D)PNG (Bloco A) que atua como nucleófilo, as endo-inulinasas apresentam o resíduo de glutamato (E), ao invés do resíduo de aspartato (D) presente nas exo-inulinasas. Outras duas regiões que mostram diferenças entre endo-inulinasas e exo-inulinasas fúngicas são F(T/S)G(T/S) (Bloco D)

e E(V/C)P (Bloco F). As endo-inulinases apresentam a sequência FTGT, enquanto que as exo-inulinases apresentam a sequência FSGS, já na sequência ECP, as endo-inulinases possuem uma valina (V) no lugar da cisteína (C) (SINGH & GILL, 2006).

A presença da sequência SVEVF (Bloco G) em todas as inulinases analisadas indicam que estas enzimas atuam em inulina, mas não em sacarose e rafinose, pois há relatos de que essa sequência só esteja presente em inulinases com estas características, demonstrando que esta sequência deve ser importante para a ligação em frutanos de elevada massa molecular (SINGH & GILL, 2006).

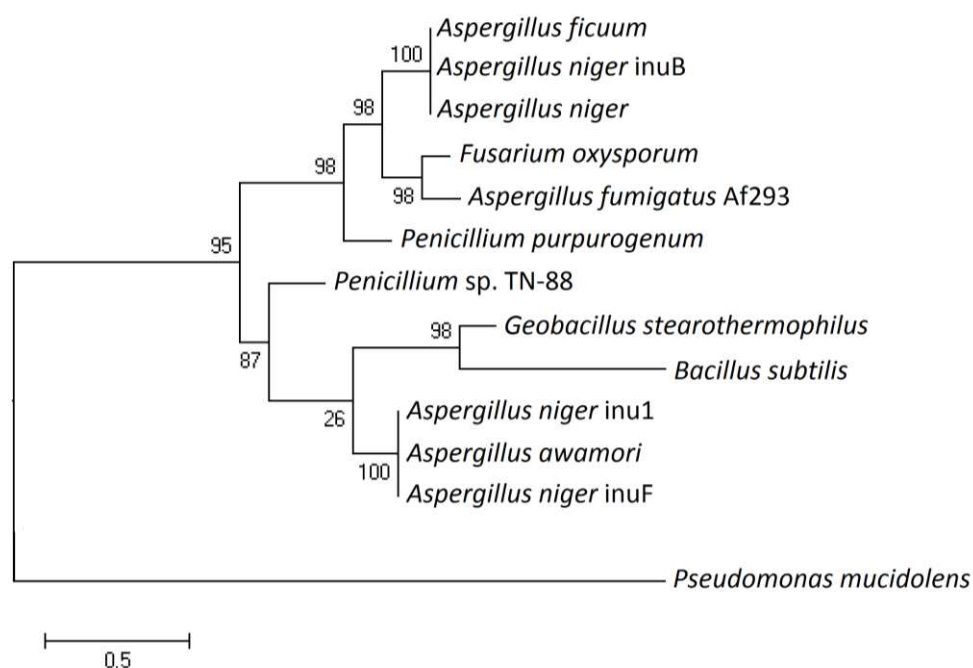


**Figura 11 – Comparação da sequência de aminoácidos de *F. oxysporum* f. sp. cubense 4 com outras sequências de inulinasas fúngicas. Fox: *Fusarium oxysporum* (EMT72224.1); Ppu: endo-inulinase de *Penicillium purpurogenum* (BAA12321); Afi: endo-inulinase de *Aspergillus ficuum* (CAA07345); Psp: exo-inulinase de *Penicillium* sp. (BAC16218) e Aaw: exo-inulinase de *Aspergillus awamori* (CAC44220).**

### 5.5.2. Análise filogenética de inulinases

A inulinase de *F. oxysporum* f. sp. cubense 4 foi agrupada junto com as endo-inulinases fúngicas (Figura 12), reforçando que esta enzima deve ter a atuação de clivagem interna na molécula de inulina, assim como observamos na comparação das sequências conservadas de aminoácidos e na cromatografia de camada delgada realizada anteriormente. A inulinase mais próxima da inulinase de *F. oxysporum* f. sp. cubense 4 foi a inulinase de *A. fumigatus* Af293 (XP\_748286), com 69% de identidade entre elas. As outras inulinases mais relacionadas foram as de *A. ficuum* (CAA07345), *A. niger* inuB (BAA33798) e *A. niger* (AAL34524), que apresentaram identidade de 66%, 64% e 63%, respectivamente.

A endo-inulinase da bactéria *P. mucidolens* (AAF24999) foi agrupada bem separada das endo-inulinases fúngicas, o que demonstra origens diferentes para o modo de hidrólise entre fungos e bactérias. Enquanto que as exo-inulinases bacterianas de *B. subtilis* (AAK00768) e *G. stearothermophilus* (BAC45010) foram agrupadas mais próximas das exo-inulinases fúngicas. Os agrupamentos formados nesta árvore filogenética foram semelhantes aos da análise de ADAWIYAH *et al.*, (2011).



**Figura 12 - Árvore filogenética de inulinases microbianas.** A árvore filogenética de máxima verossimilhança foi obtida com base nas sequências de aminoácidos deduzidas de diferentes inulinases microbianas. Os números escritos nos nós internos representam os valores de confiança de *bootstrap* (%) em 500 repetições. A barra de escala corresponde a 0,5 substituições de aminoácido por sítio. Fonte de dados das sequências utilizadas (os números entre parênteses são os números de acesso para as sequências de referência): endo-inulinases de *A. niger* (AAL34524); *A. niger inuB* (BAA33798); *A. ficuum* (CAA07345); *A. fumigatus Af293* (XP\_748286); *P. purpurogenum* (BAA12321); *F. oxysporum* (EMT72224); *P. mucidolens* (AAF24999); exo-inulinases de *A. awamori* (CAC44220); *A. niger inu1* (XP001395879); *A. niger inuF* (AAR31730); *B. subtilis* (AAK00768); *G. stearothermophilus* (BAC45010) e *Penicillium sp. TN-88* (BAC16218).

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O tubérculo yacon é uma boa fonte para o isolamento de fungos produtores de inulinase, pois um número razoável de isolados foi obtido nas triagens utilizando essa fonte. O fungo *Fusarium oxysporum* F6 apresenta um maior potencial de produção de inulinase quando em fermentação no estado sólido, alcançando até 2,2 U/mL de inulinase. Segundo a metodologia de superfície de resposta (MSR), somente a concentração de inulina afeta diretamente a produção de inulinase nas faixas de valores e condições de produção utilizadas neste trabalho. O período de crescimento ótimo para a produção da enzima em fermentação submersa é de 72h de crescimento em meio mínimo com 2% de inulina. A partir dos resultados obtidos por análises *in silico* e pela cromatografia de camada delgada (CCD), a inulinase produzida por *F. oxysporum* F6 é uma endo-inulinase. O pH e a temperatura ótimos para a atividade desta enzima são de 5,5 e 50 °C, respectivamente. Para confirmarmos as informações das análises *in silico*, *primers* específicos para a sequência de *F. oxysporum* deverão ser desenhados, para que seja possível obter o gene de inulinase de *F. oxysporum* F6. Além disso, com a sequência do gene de inulinase de *F. oxysporum* F6, poderemos cloná-lo e inseri-lo em *Penicillium griseoroseum* PG63, com o objetivo de aumentarmos a produção dessa enzima. O fungo pouco estudado *Staphylotrichum boninense* também foi isolado e a produção de inulinase desse fungo ainda será estudada detalhadamente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDAL-AZIZ, S. A. A.; EL-METWALLY, M. M.; SABER, W. E. I. A. **Molecular identification of a novel inulinolytic fungus isolated from and grown on tubers of *Helianthus tuberosus* and statistical screening of medium components.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, p. 3245–3254, 2012.

ADAWIYAH, S. R.; SHUHAIMI, M.; YAZID, A. M. M.; MANAF, A. A.; ROSLI, N.; SREERAMANAN, S. **Molecular cloning and sequence analysis of an inulinase gene from an *Aspergillus* sp.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 27, p. 2173-2185, 2011.

ARAND, M.; GOLUBEV, A. M.; NETO, J. R. B.; POLIKARPOV, I.; WATTIEZ, R.; KORNEEVA, O. S.; ENEYSKAYA, E. V.; KULMINSKAYA, A. A.; SHABALIN, K. A.; SHISHLIANNIKOV, S. M.; CHEPURNAYA, O. V.; NEUSTROEV, K. N. **Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*.** Biochemical Journal, v. 362, p. 131–135, 2002.

AZHARI, R.; SZLAK, A. M.; ILAN, E.; SIDEMAN, S.; LOTAN, N. **Purification and characterization of endo- and exo-inulinase.** Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 11, p. 105–117, 1989.

BONCIU, C. N.; CONSTANTIN, O.; BAHRIM, G. **Increase in extracellular inulinase production for a new *Rhizoctonia* ssp. strain by using buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) flour as a single carbon source.** Letters in Applied Microbiology, v. 55, p. 195–201, 2012.

CALAM, C. T. The evaluation of micelial growth. In: MOURANCHE, A. (Ed.); COSTES, C. (Ed.). **Methods in Microbiology.** London: Academic Press, 1969. p. 567-591.

CASTANON, F. S. **Seleção de fungos produtores de inulinas visando a produção industrial de frutose.** 2011. 36 f. Monografia – Universidade de Federal de Viçosa, Viçosa. 2011.

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

CHEN, H.Q.; CHEN, X.M.; LI, Y.; CHEN, T. X.; XU, X. M.; JIN, Z. Y. **Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology.** Carbohydrate Polymers, v. 86, p. 249–254, 2011.

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 Chemistry, v. 115, p. 1206–1212, 2009.

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

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

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOCHAN, N. **Application of statistical design for the production of inulinase by *Streptomyces* sp. using pressmud.** Frontiers of Chemical Science and Engineering, v. 5, p. 463–470, 2011.

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOCHAN, N. **Enhanced inulinase production by *Streptomyces* sp. in solid state fermentation through statistical designs.** 3 Biotech, v. 3, p. 1-7, 2013.

DINARVAND, M.; ARIFF, A. B.; MOEINI, H.; MASOMIAN, M.; MOUSAVI, S. S.; NAHAVANDI, R.; MUSTAFA, S. **Effect of extrinsic and intrinsic parameters on inulinase production by *Aspergillus niger* ATCC 20611.** Electronic Journal of Biotechnology, v. 15, p. 1–9, 2012.

ERTAN, F.; EKINSI, F.; AKTAÇ, T. **Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 and *Trichoderma viridae*.** Pakistan Journal of Biological Sciences, v. 6, p. 1332-1335, 2003.

ERTAN, F.; SANAL, F. E.; KABOGLU, A. Ç.; AKTAÇ, T.; BAKAR, E. **Some properties of inulinase form *Rhizoctonia solani*.** Journal of Biological Sciences, v. 5, p. 330-334, 2005.

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

GARDES, M.; BRUNS, T. D. **ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts.** Molecular Ecology, v. 2, p. 113-118, 1993.

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

- GRÄFENHAN, T.; SCHROERS, H. J.; NIRENBERG, H. I.; SEIFERT, K. A. **An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*.** *Studies in Mycology*, v. 68, p. 79–113, 2011.
- GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; GAUR, R. K. **Growth characteristics of *Fusarium* spp. causing wilt disease in *Psidium guajava* l. in India.** *Journal of Plant Protection Research*, v. 50, p. 452-462, 2010.
- JING, W.; ZHENGYU, J.; BO, J.; AUGUSTINE, A. **Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*.** *Process Biochemistry*, v. 39, p. 5-11, 2003.
- KANGO, N. **Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*.** *Journal of Food Engineering*, v. 85, p. 473–478, 2008.
- KANG, S.; KIM, S. **Molecular cloning and sequence analysis of an endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp.** *Biotechnology Letters*, v. 21, p. 569–574, 1999.
- KAUR, N.; GUPTA, A. K. **Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition.** *Journal of Biosciences*, v. 27, p. 703–714, 2002.
- KUMAR, G. P.; KUNAMNENI, A.; PRABHAKAR, T.; ELLAIAH, P. **Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 1359–1361, 2005.
- 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*, v. 10, p. 9518-9521, 2011.
- MANSOURI, S.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C.; CHRISTENSEN, M.; TUTHILL, D. E.; KOUTANIEMI, S.; HATAKKA, A.; LANKINEN, P. ***Penicillium subrubescens*, a new species efficiently producing inulinase.** *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 103, p. 1343–1357, 2013.
- MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MORIYAMA, S.; AKIMOTO, H.; SUETSUGU, N.; KAWASAKI, S.; NAKAMURA, T.; OHTA, K. **Purification and properties of an extracellular exoinulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 and sequence analysis of the encoding gene.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, p. 1887–1896, 2002.

- NAGEM, R. A. P.; ROJAS, A.L.; GOLUBEV, A. M.; KORNEEVA, O. S.; ENEYSKAYA, E. V.; KULMINSKAYA, A. A.; NEUSTROEV, K. N.; POLIKARPOV, I. **Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: The enzyme fold and structural determinants of substrate recognition.** Journal of Molecular Biology, v. 344, p. 471–480, 2004.
- NEAGU, C.; BAHRIM, G. **Inulinases - a versatile tool for biotechnology.** Innovative Romanian Food Biotechnology, v. 9, p. 1-11, 2011.
- NONAKA, K.; MIYAZAKI, H.; IWATSUKI, M.; SHIOMI, K.; TOMODA, H.; OMURA, S.; MASUMA, R. ***Staphylotrichum boninense*, a new hyphomycete (Chaetomiaceae) from soils in the Bonin Islands, Japan.** Mycoscience, v. 53, p. 312–318, 2012.
- OHTA, K.; AKIMOTO, H.; MATSUDA, S.; TOSHIMITSU, D.; NAKAMURA, T. **Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from *Aspergillus niger*.** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 62, p. 1731–1738, 1998.
- OHTA, K.; SUETSUGU, N.; NAKAMUECA, T. **Purification and properties of an extracellular inulinase from *Rhizopus* sp. strain TN-96.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 94, p. 78-80, 2002.
- OLIVEIRA, R. A.; PARK, K. J.; CHIORATO, M.; PARK, K. J. B.; NOGUEIRA, R. I. **Otimização de extração de inulina de raízes de chicória.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 6, p. 131-140, 2004.
- ONODERA, S.; MURAKAMI, T.; ITO, H.; MORI, H.; MATSUI, H.; HONMA, M.; CHIBA, S.; SHIOMI, N. **Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNA and gene encoding endo-inulinase from *Penicillium purpurogenum*.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 60, p. 1780–1785, 1996.
- PANDEY, A. **Solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 81–84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, V. T.; KRIEGER, N.; FONTANA, J. D. **Recent developments in microbial inulinases.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 81, p. 35–52, 1999.
- PEREIRA, J. F.; QUEIROZ, M. V.; LOPES, F. J. F.; ROCHA, R. B.; DABOUSSI, M. J.; ARAÚJO, E. F. **Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation.** Canadian Journal of Microbiology, v. 50, p. 891-900, 2004.

- PESSONI, R. A. B.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; BRAGA, M. R. **Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae).** Journal of Applied Microbiology, v. 87, p. 141–147, 1999.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A.W.J. **The genetics of *Aspergillus nidulans*.** Advances in Genetics, v. 5, p. 141-238, 1953.
- ROBERFROID, M. B. **Dietary modulation of experimental neoplastic development: role of fat and fibre content and caloric intake.** Mutation Research, v.259, p.351-362, 1991.
- ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J.; GIBSON, G. R. **The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products.** Journal of Nutrition, v. 128, p. 11-19, 1998.
- SANCHEZ, O. J., CARDONA, C. A. **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks.** Bioresource Technology, v. 99, p. 5270–5295, 2008.
- SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHDORF, 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.
- SHENG, J.; CHI, Z.; GONG, F.; LI, J. **Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 144, p. 111–121, 2008.
- SHENG, J.; CHI, Z.; YAN, K; WANG, X.; GONG, F.; LI, J. **Use of response surface methodology for optimizing process parameters for high inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a in solid-state fermentation and hydrolysis of inulin.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 32, p. 333–339, 2009.
- SINGH, P.; GILL, P. K. **Production of inulinases: recent advances.** Food Technology and Biotechnology, v. 44, p. 151–162, 2006.
- SINGH, R. S.; DHALIWAL, R.; PURI, M. **Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*.** Process Biochemistry, v. 41, p. 1703–1707, 2006.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. **Recent advances in solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 44, p. 13–18, 2009.

SOUZA, D. T. **Obtenção de linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum* visando à alta produção de inulinases.** 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A.; FILHO, J. L. L. ***Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48, p. 343-350, 2005.

UHM, T. B.; CHAE, K. S.; LEE, D. W.; KIM, H. S.; CASSART, J. P.; VANDENHAUTE, J. **Cloning and nucleotide sequence of the endoinulinase-encoding gene, *inu2*, from *Aspergillus ficcum*.** Biotechnology Letters, v. 20, p. 809-812, 1998.

VORAGEN, A. G. J. **Technological aspects of functional food-related carbohydrates.** Trends in Food Science & Technology, v. 9, p. 328-335, 1998.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, USA, v. 1, p. 315–322, 1990.

YUAN, X. L.; GOOSEN, C.; KOOLS, H.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; DIJKHUIZEN, L.; RAM, A. F. J. **Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger*.** Microbiology, v. 152, p. 3061–3073, 2006.

ZHANG, T.; GONG, F.; CHI, Z.; LIU, G.; CHI, Z.; SHENG, J.; LI, J.; WANG, X. **Cloning and characterization of the inulinase gene from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and its expression in *Pichia pastoris*.** Antonie van Leeuwenhoek, v. 95, p. 13–22, 2009.