



Estudo da produção de inulinase por
Yarrowia lipolytica

Ully Siqueira de Souza

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca, D. Sc

Jully Lacerda Fraga, D. Sc

Março de 2022

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR YARROWIA LIPOLYTICA

Ully Siqueira de Souza

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química,
como partedos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenharia Química.

Aprovado por:

Adejanildo da Silva Pereira, D.Sc.

Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc.

Adriana dos Anjos Silva, D.Sc.

Orientado por:

Prof. Priscilla Filomena Fonseca Amanaral Secca, D.Sc.

Jully Lacerda Fraga, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Março de 2022

Dedico este trabalho aos meus pais, Zélia e Sérgio, por todo amor e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora da Penha que me permitiram chegar até aqui e me deram força em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais, Zélia e Sérgio por todo carinho e suporte. Por terem me proporcionado o estudo, terem me apoiado e não medirem esforços em me proporcionar todo o apoio para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

Aos meus filhos de quatro patinhas, Frederico e Téo, que me acompanham na rotina de estudos desde o primeiro período da faculdade e me trouxeram leveza, amor e me ensinaram o que é resiliência nos momentos difíceis que passamos.

Obrigada ao Gabriel Paganoti, por todo o apoio durante esses anos, por ouvir minhas reclamações e trazer leveza, amor e cuidado para a minha vida.

Ao grupo Biose por terem me recebido tão bem no laboratório, por todo o conhecimento e suporte durante os anos de iniciação científica. Obrigada pelas conversas, conselhos, bons momentos e amizades que sei que levarei para a vida.

Agradeço aos meus orientadores Priscilla Amaral e Jully Fraga, pela incansável orientação durante esse trabalho.

À Escola de Química da UFRJ e ao seu corpo docente, pela formação acadêmica de excelência que fornecem a seus alunos, mesmo enfrentando as dificuldades de uma instituição de educação pública no Brasil. Agradeço também a todos os funcionários da Seção de Ensino, em especial ao Fábio Rocha, pelo suporte durante todos os períodos da faculdade, pela gentileza em ajudar e pelas conversas e risadas que tivemos.

Ao CEFETQ, hoje IFRJ, por todo desenvolvimento como profissional e principalmente como cidadã.

A todos que passaram na minha vida e me ajudaram chegar até aqui!

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheira Química.

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR *YARROWIA LIPOLYTICA*

Ully Siqueira de Souza

Orientadores: Prof. DSc Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca.

DSc Jully Lacerda Fraga.

RESUMO

A enzima inulinase (2,1- β -D frutano-hidrolase) pode ser aplicada na produção de xaropes com alto teor de frutose, pois realiza a hidrólise enzimática da inulina, produzindo frutose e frutooligossacarídeos (FOS). Esta enzima pode ser obtida a partir de plantas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras. A hidrólise da inulina apresenta grande importância na indústria de alimentos e também para a produção de etanol e acetona. O presente trabalho teve como objetivo principal investigar a utilização da inulina, polímero de reserva vegetal, como fonte de carbono por *Yarrowia lipolytica*, avaliar a produção de inulinase por esta levedura em diferentes condições e analisar a incidência do assunto na base de dados Scopus (Elsevier) através de busca por palavras-chaves. Para tal, a levedura foi inoculada no meio ME (meio mineral com extrato de lêvedo) contendo inulina, glicerol ou glicose como fontes de carbono. As células foram cultivadas a 28°C, 250 rpm. A biomassa celular e a concentração de substrato foram monitoradas ao longo do cultivo. Os resultados mostram que glicose e glicerol são fontes de carbono melhores para essa levedura. Em inulina houve crescimento lento, mas detectou-se atividade da inulinase.

Palavras-chave: inulina, inulinase, *Yarrowia lipolytica*

ABSTRACT

The enzyme inulinase (2,1-β-D fructanohydrolase) can be applied in the production of syrups with high fructose content, as it performs the enzymatic hydrolysis of inulin, producing fructose and fructooligosaccharides (FOS). This enzyme can be obtained from plants, bacteria, filamentous fungi and yeasts. The hydrolysis of inulin is of great importance in the food industry and also for the production of ethanol and acetone. The main objective of this work was to investigate the use of inulin, a plant reserve polymer, as a carbon source by *Yarrowia lipolytica*, to evaluate the production of inulinase by this yeast under different conditions and to analyze the incidence of the subject in the Scopus database (Elsevier) by searching for keywords. Therefore, the yeast was inoculated in ME medium (mineral medium with yeast extract) containing inulin, glycerol or glucose as carbon sources. Cells were grown at 28°C, 250 rpm. Cell biomass and substrate concentration were monitored throughout the cultivation. The results show that glucose and glycerol are better carbon sources for this yeast. In inulin there was slow growth, but inulinase activity was detected.

Keywords: inulin, inulinase, *Yarrowia lipolytica*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	3
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo geral.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. Inulina.....	11
3.2. Inulinase.....	12
3.3. Produção de inulinase por microrganismos	14
3.4. <i>Yarrowia lipolytica</i>	15
3.5. Cultivo em sistema miniaturizado	16
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
5.1. Microrganismo	17
5.2. Obtenção do pré-inóculo.....	17
5.3. Cultivo de <i>Yarrowia lipolytica</i> em Erlenmeyer.....	17
5.4. Cultivo de <i>Yarrowia lipolytica</i> em sistema miniaturizado	18
5.5. Crescimento celular	18
5.6. Atividade enzimática	18
5.7. Análise mercadológica.....	19
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6.1. Crescimento celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> em inulina	19
6.2. Produção de inulinase por <i>Yarrowia lipolytica</i>	21
6.3. Análise Mercadológica	22
7. CONCLUSÕES	32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da inulina.....	12
Figura 2: Classificação da inulinase em endoinulinase e exoinulinase de acordo com seu modo de ação.....	13
Figura 3: Microscopia ótica de cepa de <i>Yarrowia lipolytica</i>	16
Figura 4: Imagens das microplacas utilizadas na cultura.....	18
Figura 5: Cinética de crescimento celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> na presença de glicose, glicerol e inulina como fontes de carbono em meio ME cultivada em frascos Erlenmeyer.....	29
Figura 6: Cinética de produção de inulinase por <i>Yarrowia lipolytica</i> em meio ME com 4% Inulina em frascos Erlenmeyer.....	31
Figura 7: Número de artigos publicados por ano com a palavra-chave “inulinase”.....	22
Figura 8: Número de patentes registradas por ano com a palavra-chave “inulinase”.....	23
Figura 9: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “inulinase”.....	24
Figura 10: Número de patentes registradas por escritório com a palavra-chave “inulinase”.....	24
Figura 11: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “yarrowia + lipolytica”.....	25
Figura 12: Número de patentes registradas por ano com a palavra-chave “yarrowia+lipolytica”.....	25
Figura 13: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “yarrowia+lipolytica”.....	26
Figura 14: Número de patentes registradas por escritório com a palavra-chave “yarrowia+lipolytica”.....	27
Figura 15: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “inulinase+yarrowia + lipolytica”.....	28
Figura 16: Número de patentes registradas por ano com a palavra-chave “inulinase+yarrowia+lipolytica”.....	29
Figura 17: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “inulinase+yarrowia+lipolytica”.....	30
Figura 18: Número de patentes registradas por escritório com a palavra-chave “inulinase+yarrowia+lipolytica”.....	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Microrganismo produtores de inulinases.....	14
Tabela 2: Taxa específica de crescimento celular (μ) e variação de biomassa (ΔX) de <i>Yarrowia lipolytica</i> , na presença de diferentes fontes de carbono.....	30

1. INTRODUÇÃO

A inulina é um polímero constituído de cadeias lineares de frutose com ligação do tipo β -2,1-D-frutofuranose terminadas com resíduos de glicose (TRIVEDI et al., 2012). É muito utilizada na indústria de alimentos, pois sua composição confere sabor ligeiramente doce sem alterar o produto final. Este polímero também apresenta características peculiares, como a baixa solubilidade em água e capacidade de aumentar a viscosidade do meio, podendo ser incorporada a barras de cereais e substituir a gordura em determinados produtos alimentícios (PIMENTEL et al., 2012). A inulina é uma fonte potencial de frutose.

Este açúcar possui um poder adoçante superior aos açúcares comumente utilizados pela indústria de alimentos e bebidas, como a sacarose e a glicose. Sua utilização vem crescendo, pois, a frutose não apresenta problemas de cristalização como a sacarose e por ser tolerada por pacientes diabéticos porque promove diminuição do nível de glicose plasmática (AKGUN et al., 1985) e pode ser metabolizada independentemente da insulina (BLAKELY et al., 1995).

A produção industrial convencional de frutose a partir de amido envolve pelo menos três etapas enzimáticas e possui conversão aproximada de 45%. Uma alternativa viável para esse processo é a hidrólise de inulina, que ocorre em apenas uma etapa enzimática e converte cerca de 95% em frutose (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

Inulinasas (2,1- β -D-frutanos fructanohidrolases, CE 3.2.1.7) catalisam a hidrólise da inulina, produzindo inulo-oligossacarídeos, frutose e glicose como principais produtos (NEAGU & BAHRIM, 2011). Entre as enzimas industriais, a inulinase tem recebido muita atenção por poder ser amplamente aplicada na produção de etanol e por ser muito eficiente no preparo de xarope de frutose a partir de inulina (DILIPKUMAR et al., 2011). Diferentes micro-organismos são capazes de produzir inulinasas, entre eles, as leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia guilliermondii* (GONG et al., 2007) e os fungos filamentosos *Penicillium janczewskii* e *Aspergillus niveus* (SOUZA-MOTTA et al., 2005).

Outros microrganismos, tal como *Yarrowia lipolytica*, também vem sendo estudados na produção desta levedura. Este é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, dimórfico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetes, subclasse Hemiascomicetes. Esta levedura possui capacidade de produzir um amplo espectro de moléculas. É considerada não patogênica, e vários processos baseados neste organismo

foram classificados como GRAS (Generally Recognized as Safe) pela USA Food and Drug Administration (FDA) (BARTH et al., 1977). Além disso, secreta várias enzimas, como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (NICAUD et al., 2002). *Yarrowia lipolytica* é uma espécie que possui diversas vantagens biotecnológicas e é comumente utilizada como plataforma de modificação genética.

A produção da enzima inulinase já vem sendo estudada com diversos microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (CHI et al., 2009). Dentre as leveduras, estudos já foram realizados com espécies pertencentes aos gêneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Debaryomyces* e *Schizosaccharomyces* (PASSADOR-GURGEL, 1996). Além das leveduras terem apresentado bom desempenho na produção de inulinase, critérios como acessibilidade genética e características fisiológicas também são importantes.

Como exposto acima, *Yarrowia lipolytica* é capaz de utilizar diversas fontes de carbono no seu crescimento celular e produção de enzimas, desta forma, o estudo do meio de cultivo mais eficaz quando realizado em sistemas tradicionais de frascos agitados oneram os experimentos, pela quantidade de matérias primas utilizadas e tempo demandado. Atualmente, um inovador sistema para desenvolvimento, otimização e que proporciona alto rendimento em experimentos vem sendo utilizado. Deste modo, a tecnologia de biorreatores miniaturizados atende a esta demanda, que também reduz os custos experimentais. Estes biorreatores são utilizados em diversos campos, como microbiologia, toxicologia, a engenharia genética e no desenvolvimento de experimentos em bioprocessos (HILTON, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho se propôs a avaliar o estado da arte da produção de inulinase, verificar a capacidade de *Yarrowia lipolytica* em utilizar a inulina como fonte de carbono para crescimento celular e investigar a produção da enzima inulinase durante o cultivo em diferentes condições.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* utilizando inulina como fonte de carbono, comparativamente à glicose e glicerol;
- Avaliar a produção de inulinase por *Yarrowia lipolytica* em diferentes meios de cultivo;
- Avaliar o crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* em sistema miniaturizado;
- Elaborar um panorama geral dos artigos científicos e patentes abordando as palavras chaves do tema (inulinase e *Yarrowia lipolytica*), utilizando a base de dados SCOPUS.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Inulina

A inulina e seus produtos hidrolisados são legalmente classificados como alimentos ou ingredientes alimentares em todos os países onde são utilizados (COUSSEMENT, 1999). A inulina também é o substrato mais utilizado para a produção de inulinases (K. VIJAYARAGKAVAN et al., 2009).

A inulina é um carboidrato pertencente ao grupo de polissacarídeos chamados frutanas, composto por uma cadeia principal de unidades de frutose, unidas por ligações - (2,1)-frutofuranosídicas, com uma unidade de glicose terminal (Figura 1). Sua fórmula pode ser descrita como GF_n, onde G representa a molécula de glicose, F a molécula de frutose e n o número de unidades de frutose (SILVA, 1996; VAN LOO et al., 1995; ROBINSON, 1995).

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são definidos como polímeros de D-frutose, terminando com uma molécula de glicose, de forma que a inulina pode ser classificada como um fruto-oligossacarídeo (SILVA, 1996). Lorenzo et al. (1999) e Silva (1996) definem a inulina como um FOS composto por uma mistura de oligômeros de diferentes graus de polimerização (GP) que ocorre, naturalmente, em alguns produtos vegetais.

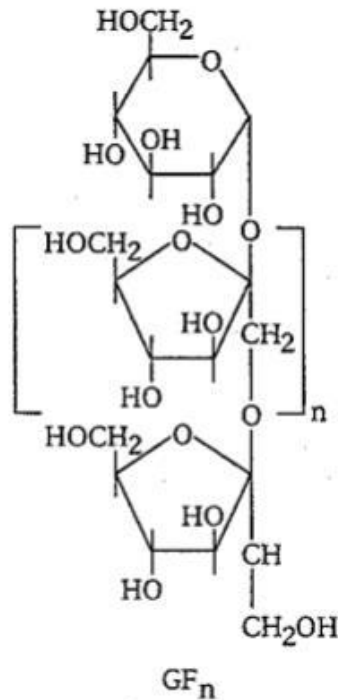


Figura 1: Estrutura química da inulina. Fonte: Roberfroid, 1993.

A inulina está amplamente distribuída na natureza em várias plantas e em algumas bactérias e fungos (FRANCK, 2002). Pode ser encontrada em: alcachofra de Jerusalém, alho, arroz, aspargo, banana, cebola, centeio, cevada, dente de leão, trigo, yacon e outros vegetais (TUNGLAND, 2000; KELLY, 2008). A produção comercial ocorre a partir da extração de raízes de chicória (*Cichoriumintybus*), preferida por conter altas concentrações de inulina (15-20%), utilizando-se água quente mediante processo semelhante ao da extração de açúcar da beterraba (NINESS, 1999; FRANCK, 2002; ROBERFROID, 2005a; KELLY, 2008). O extrato bruto é, então, refinado, evaporado e liofilizado (ROBERFROID, 2005a).

Para a hidrólise enzimática parcial da inulina utilizam-se inulinases.

3.2. Inulinase

A formação de frutose a partir da hidrólise completa de inulina ocorre em uma única etapa e essa reação produz até 95% de frutose. Enquanto isso, a produção convencional de frutose a partir de amido ocorre em pelo menos 3 etapas de reações enzimáticas e produz 45% de frutose (VANDAMME AND DERYCKE, 1983; PANDEY et al., 1999).

A enzima inulinase pertence à classe das hidrolases, sendo classificada como uma frutanohidrolase 2,1-β-D-frutano (BONCIU et al., 2011). Fazem parte de uma importante classe de enzimas para produção de frutose e frutooligossacarídeos, que são amplamente utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia (ERDAL et al., 2011; NGUYEN et al., 2012). Estas enzimas podem ser classificadas em endo e exoinulinases, dependendo do seu modo de ação (Figura 2) (BONCIU et al., 2010).

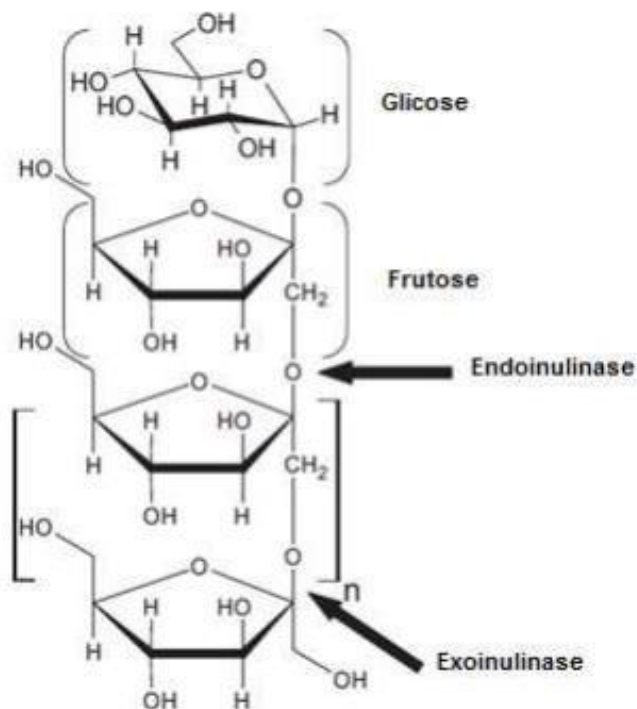


Figura 2: Classificação da inulinase em endoinulinase e exoinulinase de acordo com seu modo de ação. Fonte: Singh e Singh (2010).

As exoinulinases (EC 3.2.1.80) catalisam a hidrólise de ligações β-2,1 sequencialmente iniciando da extremidade não redutora da inulina e separando unidades de frutose terminais, liberando frutose com uma molécula de glicose, enquanto as endoinulinases (EC 3.2.1.7) atuam aleatoriamente e hidrolisam as ligações internas da inulina para produzir frutooligossacarídeos (FLEMING; GROOTWASSINK, 1979).

As inulinases são encontradas em plantas e microrganismos. No entanto, é difícil

isolar essa enzima a partir de plantas e em quantidade suficiente. Portanto, as inulinases microbianas, que podem ser induzidas por microrganismos em crescimento, têm potencial para uso industrial na produção de frutose a partir da inulina. De acordo com Contiero (2004), a inulinase é produzida por muitos microrganismos como *Aspergillus niger* A42 (GUPTA et al., 1994), *Penicillium* sp., *Kluyveromyces marxianus* (ROUWENHORST et al., 1990), e *Pseudomonas* sp. (BARTHOMEUF et al., 1991). Além da frutose, glicose e frutoligossacarídeos, as inulinases podem ser utilizadas na produção de produtos de alto valor agregado, como bioetanol, óleos e proteínas unicelulares, ácido cítrico, ácido glucônico, butanol e sorbitol (SINGH; SINGH, 2010).

Devido à importância das inulinases, existe um interesse crescente no isolamento, caracterização e produção dessas enzimas a partir de fontes microbianas.

3.3. Produção de inulinase por microrganismos

Diversos microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras são descritos na literatura como produtores da enzima inulinase (Tabela 1). Dentre os microrganismos já estudados, as leveduras do gênero *Kluyveromyces*, são descritas como as melhores produtoras da enzima em questão (DILIPKUMAR et al., 2011; JAIN et al., 2012; TRIVEDI et al., 2012; YUAN et al., 2012; BONCIU et al., 2012; NARAYANAN et al., 2013).

Tabela 1: Microrganismo produtores de inulinases

Microrganismo	Atividade Enzimática (U/ml)	Referência
Bactérias		
<i>Arthrobacter</i> sp.	NE; 0,84 U/mg ^c	Kang et al., 1998
<i>Bacillus smithii</i>	135,2	Gao et al., 2007
<i>Paenibacillus</i> sp.	NE	Gern et al., 2001
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	NE	Singh et al., 2007
<i>Pseudomonas</i> sp.	NE	Kim et al., 1997, Yun et al., 1996
<i>Streptomyces rochei</i>	1	Yokota et al., 1995
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. phaseoli mutant KM 24	9,24	Naidoo et al., 2009
<i>Xanthomonas</i> sp.	11	Park et al., 2001
Fungos		
<i>Aspergillus ficuum</i> ^a	NE	Jing et al., 2003

<i>Aspergillus fumigatus</i>	NE	Singh et al., 2007
<i>Aspergillus niger</i>	55	Kango et al., 2008
<i>A. niger</i> mutant strain	40	Nakamura et al., 1994
<i>Chaetomium</i> sp.	NE	Zhang et al., 2004
<i>Chrysosporium pannorum</i> ^a	115	Xiao et al., 1989
<i>Penicillium purpurogenum</i> var. <i>rubisclerotium</i>	3,74	Onodera et al., 1995
<i>Penicillium</i> sp.	9,9	Nakamura et al., 1994
<i>Rhizoctonia solani</i>	NE; 0,25 U/mg ^c	Ertan et al., 2005
<i>Rhizopus</i> sp.	NE; 1,4 U/mg ^c	Ohta et al., 2002
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,75	Ertan et al., 2002
<i>Trichoderma viride</i>	94	Ertan et al., 2003
Leveduras		
<i>Kluyveromyces</i> sp. Y-85 ^{a,b}	NE	Wei et al., 1997
<i>Yarrowia lipolytica</i>	62,85	Gao et al., 2007

^aproduz endo e exo-inulinases

^benzimas intracelulares

^c atividade específica (unidades/mg de proteína) da enzima no extrato bruto

NE – não especificado

De acordo com Gao et al. (2007) uma cepa identificada como sendo da espécie *Yarrowia lipolytica*, coletada de amostras de água do mar chinês, obteve uma atividade de inulinase de 62,85 (U/mL) em pH 5,0 e 60°C. Para a identificação das cepas, o DNA das leveduras foi isolado e realizado o sequenciamento genético, em que obteve 93% de correspondência com *Yarrowia lipolytica*.

3.4. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é uma das leveduras não convencionais mais extensivamente estudadas, sendo um microrganismo estritamente aeróbico capaz de produzir metabólitos importantes e ter uma intensa atividade secretora, o que justifica os esforços para usá-la na indústria (como um biocatalisador), em biologia molecular e em estudos genéticos (COELHO et al., 2010).

Esta levedura é considerada não patogênica, provavelmente devido à sua incapacidade de sobreviver acima de 35°C (Pérez-Campos & Dominguez, 2001).

Yarrowia lipolytica é capaz de utilizar uma gama de substratos que inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glicose). Apesar de alguns trabalhos terem reportado a inclusão de sacarose nessa gama de substratos (NICAUD et al., 1989), algumas cepas não apresentam atividade invertásica detectável (PEREIRA-MEIRELLES et al., 1997).

Além disso, esta levedura é capaz de gerar diversos produtos, sendo a lipase um dos seus metabólitos mais importantes, que possui potencial de aplicação em diversos setores industriais (detergentes, fármacos, alimentos). *Yarrowia lipolytica* também vem sendo estudada por produzir ácido cítrico a partir de diferentes fontes de carbono, como glicose, alcanos, óleos vegetais, amido hidrolisado, etanol e glicerol bruto (COELHO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2014)

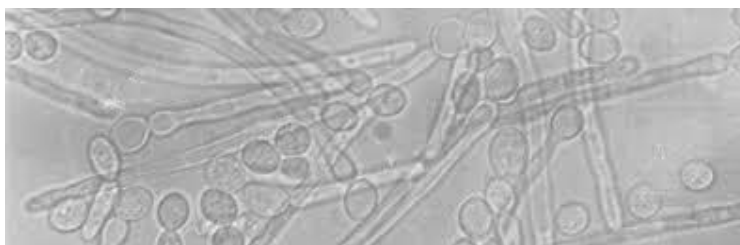


Figura 3: Microscopia ótica de cepa de *Yarrowia lipolytica*. Fonte: Dutra (2010)

Gao et al. (2007) selecionaram 4 leveduras entre mais de 400 leveduras marinhas como boas produtoras de inulinase, incluindo uma cepa de *Yarrowia lipolytica*. No entanto, alguns autores relatam que cepas do tipo selvagem de *Yarrowia lipolytica* não possuem a enzima de clivagem de polissacarídeos, como a exo-inulinase (LIU et al., 2010; WANG, WANG, LIU e CHI, 2013).

3.5. Cultivo em sistema miniaturizado

Sistemas biológicos miniaturizados têm ganhado papel de destaque no desenvolvimento de fármacos terapêuticos, bioprospecção, formulação de meios de cultura, entre outros, pois possuem a vantagem de avaliar diferentes condições experimentais, gerando agilidade e economia aos experimentos (TOTARO et al., 2020).

Cultivo em escala miniaturizada, tais como frascos agitados de volume reduzido e ainda as microplacas de poços redondos ou quadrados (DUETZ; WITHOLT, 2004)

apresentam vantagens quanto a realização de diversos ensaios em paralelo, além de representarem redução de tempo de trabalho e custos (KUMAR; WITTMANN; HEINZLE, 2004).

De acordo com Santos (2018), o cultivo miniaturizado favoreceu o crescimento e produção de lipase e ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* quando comparados com frascos agitados de escala convencional.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Microrganismo

A levedura utilizada no presente trabalho foi uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 isolada da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, cuja composição química consiste de um complexo polissacarídeo-proteína com baixo teor lipídico. As células são conservadas por repiques regulares em tubo de ensaio com meio YPD (“Yeast Extract, Peptone, Dextrose”) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e solidificado com agar-agar 2%. Após incubação a 28°C por 48 horas na estufa, as culturas são refrigeradas a 4°C.

5.2. Obtenção do pré-inóculo

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (2% glicose; 2% peptona; 1% extrato de lêvedo; 3% agar, m/v) inoculou-se 200 mL de meio de cultivo YPD líquido (sem agar) contidos em Erlenmeyer de 500 mL. As células foram cultivadas em um incubador rotatório a 28°C e 160 rpm.

5.3. Cultivo de *Yarrowia lipolytica* em Erlenmeyer

Após 48 horas, as células do pré-inóculo foram centrifugadas e inoculadas em Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio mineral com extrato de lêvedo (ME: extrato de lêvedo 5g/L; K₂HPO₄ 12 g/L, Na₂HPO₄ 12 g/L, MgSO₄.7H₂O 1,5 g/L, CaCl₂.2H₂O 0,15 g/L, FeCl₃.6H₂O 0,15 g/L, ZnSO₄.7H₂O 0,02 g/L, MnSO₄.H₂O 0,06 g/L) contendo inulina (4%), glicerol (2%) ou glicose (2%) como fontes de carbono. As células foram inoculadas em quantidade suficiente para obter uma concentração inicial de células de 1 g/L e incubadas em incubador rotatório a 28°C e 250 rpm.

5.4. Cultivo de *Yarrowia lipolytica* em sistema miniaturizado

A avaliação do crescimento celular e produção de enzimas por *Yarrowia lipolytica* foi também testada em sistemas miniaturizados utilizando microplacas contendo 24 poços, com capacidade de 10 mL, com 2 mL de meio de produção (Figura 4). Foram testadas duas concentrações de inulina: meios ME com inulina 2% e meio ME com inulina 4%.

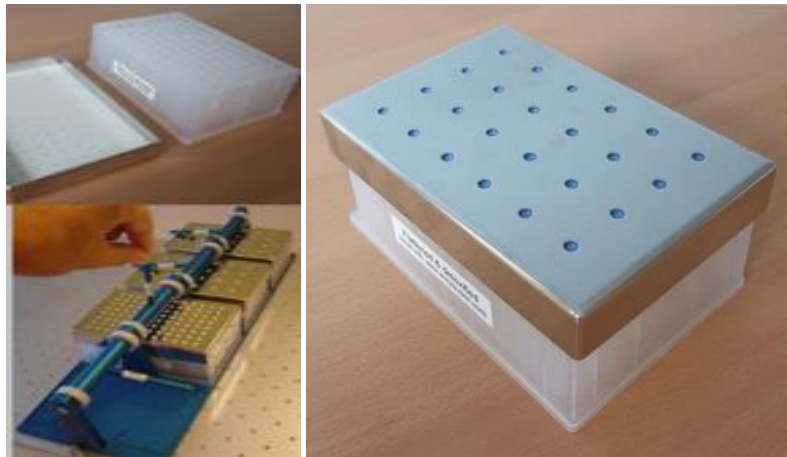


Figura 4: Imagens das microplacas utilizadas na cultura. Fonte: Nunes (2015).

5.5. Crescimento celular

O crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* foi monitorado por medidas de densidade óptica a 570 nm e em espectrofotômetro UV-Vis Bel Photonics e esses valores convertidos para mg p.s. cé /mL utilizando um fator de conversão previamente determinado em curva de peso seco.

5.6. Atividade enzimática

As amostras retiradas ao longo do experimento foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática de acordo com Pessoa Junior (1995). Para isso, 0,20 mL de solução contendo a enzima foi misturada em um tubo de ensaio com 0,8 mL de inulina 2%, tampão citrato-fosfato (pH 4,0) e foi incubada a 50°C durante 10 minutos, utilizando o reagente ácido 3,5-dinitrosílico (DNS), com método adaptado de Miller (1959) e Kameda (2007). A leitura foi realizada a 540 nm. Uma unidade de atividade da inulinase (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para

catalisar a hidrólise da inulina, com a formação de um micromol (μmol) de frutose por minuto, nas condições do teste segundo Pessoa Junior (1995).

5.7. Análise mercadológica

A metodologia de busca de artigos científicos e patentes foi baseada na busca de palavras-chave na base de dados Scopus, um produto da Editora Elsevier. É o maior banco de resumos e citações da literatura revisado por pares, oferecendo um panorama abrangente sobre o tema estudado (<https://www.elsevier.com/pt-br/research-platforms>). Por meio dos mecanismos de busca, é possível encontrar as publicações realizadas segundo o autor, título ou assunto escolhido durante um período selecionado. Desta maneira, esta base de dados foi selecionada devido ao seu grande alcance, ser de fácil manuseio e gerar indicadores baseados na busca realizada. As palavras-chave (inulinase, *Yarrowia lipolytica*) que compõe o tema do estudo foram utilizadas na prospecção de artigos e patentes.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* em inulina

Na avaliação do comportamento para produção de biomassa celular e enzimas por *Yarrowia lipolytica* utilizando inulina como substrato, esta foi comparada a outras duas fontes de carbono. O crescimento de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 utilizando glicerol e glicose já foi avaliado em estudos anteriores (AMARAL, 2003). No entanto, o comportamento da levedura frente à inulina ainda é desconhecido. A Figura 5 apresenta os perfis de crescimento da levedura cultivada em frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura com glicose, glicerol e inulina como fonte de carbono em meio mineral.

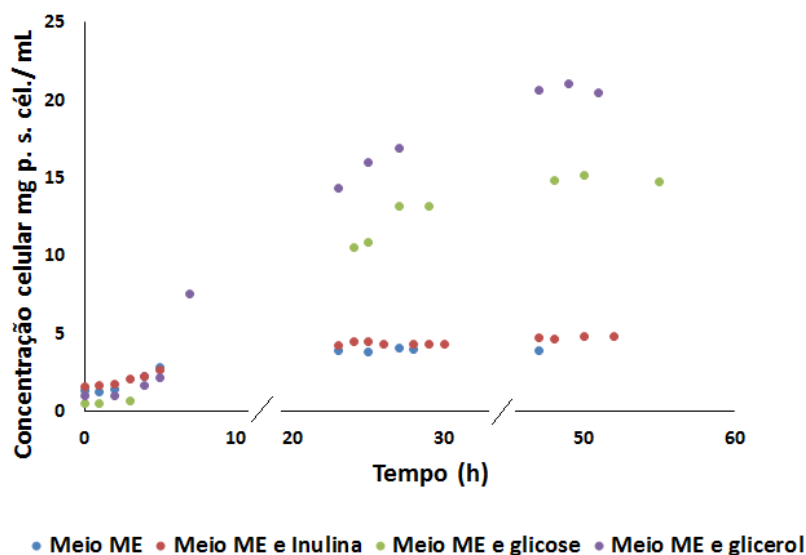


Figura 5. Cinética de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* na presença de glicose, glicerol e inulina como fontes de carbono em meio mineral com extrato de lêvedo (ME) cultivada em frascos Erlenmeyer

As cinéticas de crescimento celular apresentadas na Figura 5 mostram que os meios contendo glicose e glicerol favoreceram o crescimento da levedura, com uma maior produção de biomassa em 50 h de cultivo. Isso também é evidenciado na Tabela 2, que apresenta os parâmetros cinéticos dos cultivos. Em meio ME e meio ME com inulina, o crescimento celular foi discreto, sendo ligeiramente maior no segundo. Portanto, os meios de cultura contendo inulina e extrato de lêvedo não favoreceram o crescimento celular em comparação com as fontes de carbono mais utilizadas pela levedura (glicose e glicerol).

Tabela 2. Taxa específica de crescimento celular (μ) e variação de biomassa (ΔX) de *Yarrowia lipolytica*, na presença de diferentes fontes de carbono; Valores obtidos através da média de pelo menos três cinéticas de crescimento para cada formulação de meio de cultura

Substrato	Δx_{24h} (mg p s cél./mL)	μ (h^{-1})
Extrato de lêvedo	1,251	0,188
Inulina 4%	1,437	0,178
Glicerol 2%	9,815	0,298
Glicose 2%	7,278	0,449

Observando-se as taxas específicas de crescimento celular (μ) também

apresentadas na Tabela 2, calculadas na fase exponencial de crescimento celular para as cinéticas realizadas na presença das diferentes fontes de carbono testadas, é possível observar que os cultivos que apresentaram maior μ foram os que continham glicose e glicerol. E apesar da inulina ter sido menos eficiente na produção de células, houve crescimento celular até 52 h de cultivo, o que indica que a *Yarrowia lipolytica* pode ter utilizado esta fonte de carbono como nutriente e que inulinases extracelulares poderiam estar sendo produzidas.

Gong e colaboradores (2007) estudaram as condições de produção de inulinase pela levedura marinha *Pichia guilliermondii* e observaram que as melhores condições para o crescimento das células e produção da enzima foram observadas quando extrato de levedura e peptona foram utilizadas como fonte de nitrogênio.

Na avaliação da produção de biomassa celular pela cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em sistema miniaturizado, foram testadas duas concentrações de inulina como fonte de carbono em meio mineral com extrato de lêvedo. Foi detectada uma produção de biomassa celular (ΔX) igual a 11,08 mg p s cél./mL em meio contendo 2% de inulina e 20,51 mg p s cél./mL em meio contendo 4% de inulina. Deste modo, o aumento da concentração de inulina no meio favoreceu a produção de biomassa por *Yarrowia lipolytica*, indicando mais uma vez que a levedura utilizou a inulina como fonte de carbono. O potencial aumento no crescimento celular da levedura corrobora com dados da literatura que demonstram a escalabilidade da microplaca, e, por conseguinte, seu potencial uso como um dispositivo de cultura de células em miniatura de alto rendimento em aplicações microbiológicas (KONDRAGUNTA et al., 2010).

6.2. Produção de inulinase por *Yarrowia lipolytica*

A produção de inulinase por *Yarrowia lipolytica* em Erlenmeyer ocorreu durante todo o cultivo, associada ao discreto crescimento celular, comparado às outras fontes de carbono. O máximo de atividade de inulinase detectado foi de 540 U/L em 5 h de cultivo. Foi detectado atividade enzimática produzida por *Yarrowia lipolytica* (Figura 6), e, considerando que trabalhos anteriores relatam que esta levedura não produz invertase (PEREIRA-MEIRELLES et al., 1997) conferiu-se a atividade detectada à presença de inulinases.

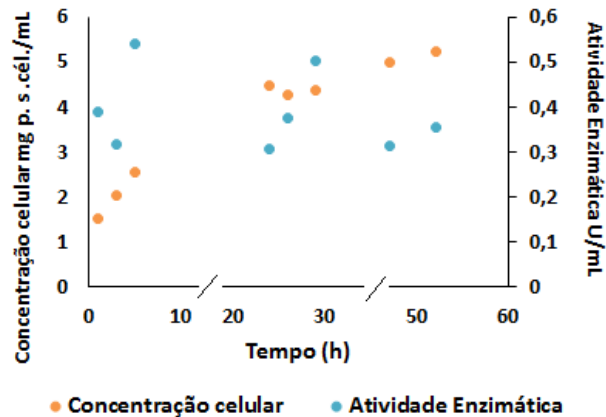


Figura 6. Cinética de produção de inulinase por *Yarrowia lipolytica* em meio ME com 4% Inulina em frascos Erlenmeyer.

Portanto, o aumento da produção de biomassa celular e consequente aumento da produção enzimática por *Yarrowia lipolytica* obtidos com o uso de extrato de lêvedo no meio de cultura corroboram com a literatura. Meios de fermentação contendo compostos nitrogenados, como extrato de levedura, aminoácidos e uréia, aumentam as taxas de produção da enzima.

O valor encontrado é baixo em relação ao encontrado por Gao et al. (2007) (62,85 U/mL) com uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica*, porém próximo ao valor encontrado para outros microrganismos como o fungo *Trichoderma harzianum* (Ertan et al., 2002).

6.3. Análise Mercadológica

Foi realizado o mapeamento de artigos e patentes na base Scopus (Elsevier) com o propósito de analisar a incidência de artigos e patentes publicados sobre os temas abordados no presente trabalho. Foi analisado o número de artigos e patentes publicados por ano, assim como os países que publicaram os artigos e escritórios responsáveis pelas patentes.

Ao realizar a busca pela palavra-chave “inulinase” nos campos resumo, título e palavras-chave, foram encontrados 1004 artigos e 6390 patentes, distribuídas ao longo dos anos conforme as Figuras 5 e 6.

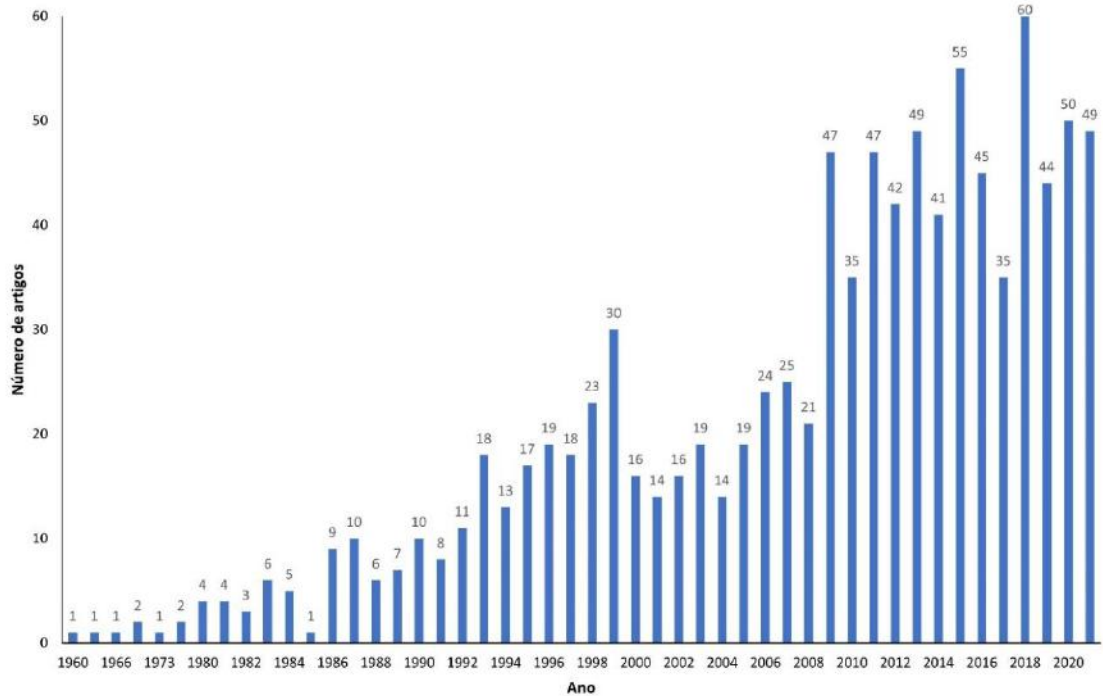


Figura 7: Número de artigos publicados por ano com a palavra-chave “inulinase” (nos campos: título, resumo e palavra-chave) segundo a base de dados Scopus.

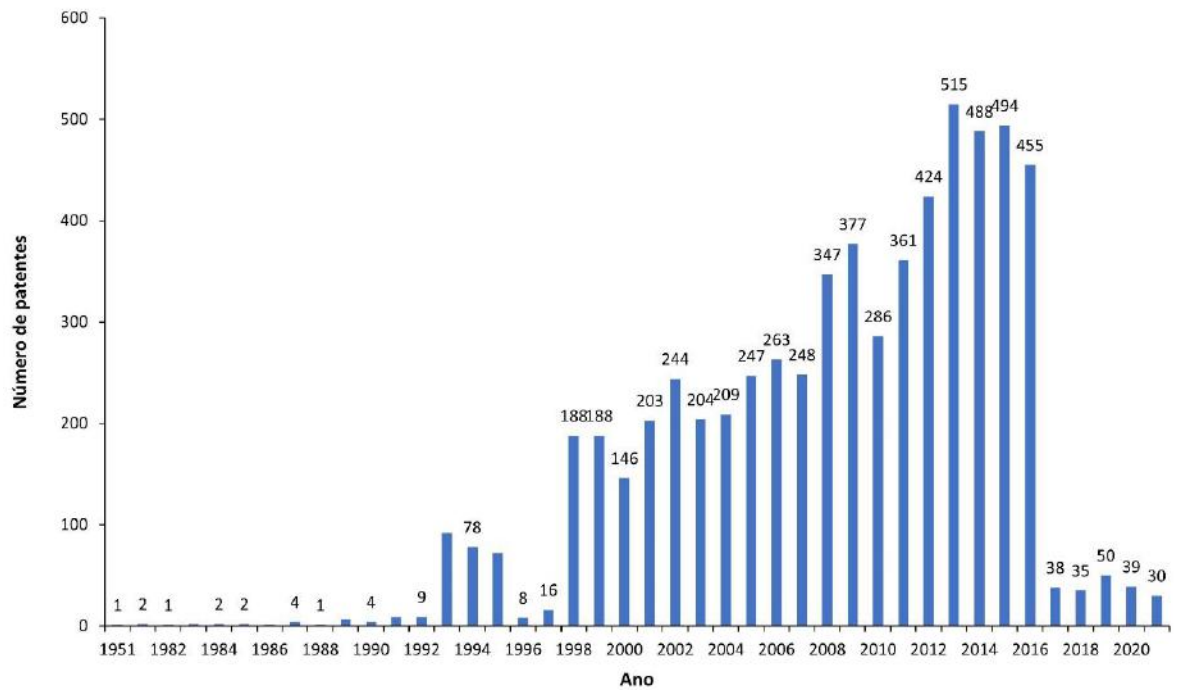


Figura 8: Número de patentes registradas por ano com a palavra-chave “inulinase”.

É possível observar que o número de artigos publicados sobre o tema começa a ter uma ascensão na década de 90, entra em declínio nos anos 2000 e volta a crescer próximo ao ano de 2010. As patentes sobre o tema começam a ser publicadas nos anos 2000, cerca de 10 anos depois do crescimento do número de artigos publicados, e apresentam uma grande ascensão por volta de 2007, atingindo o pico em 2013 (515 patentes).

É importante observar que há uma queda expressiva no número de artigos publicados a partir de 2017. Isto pode ter relação com um desafio criado pela Coca-Cola, maior fabricante de refrigerantes do mundo, que objetivava encontrar um composto natural com bom poder adoçante, o que provavelmente retirou o foco dos pesquisadores e instituições da geração de frutose, que já era muito utilizada pela indústria de bebidas e alimentos.

Geograficamente, China, Índia e Brasil lideram o ranking de países em termos de artigos publicados (Figura 9). É importante observar que, apesar de estar na sétima posição em relação ao número de artigos publicados sobre o tema, os Estados Unidos aparecem como o segundo país emissor de patentes (Figura 10), demonstrando uma alta capacidade de converter as pesquisas realizadas em tecnologias de processo efetivas.

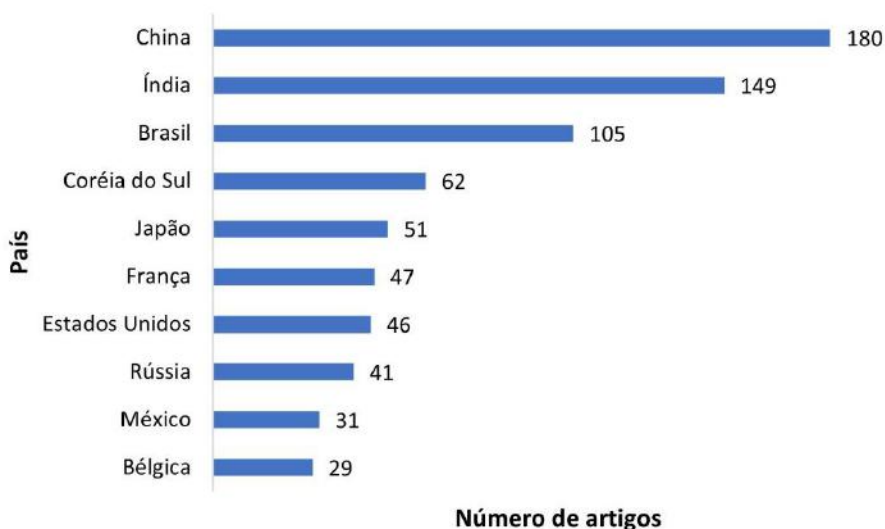


Figura 9: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “inulinase”

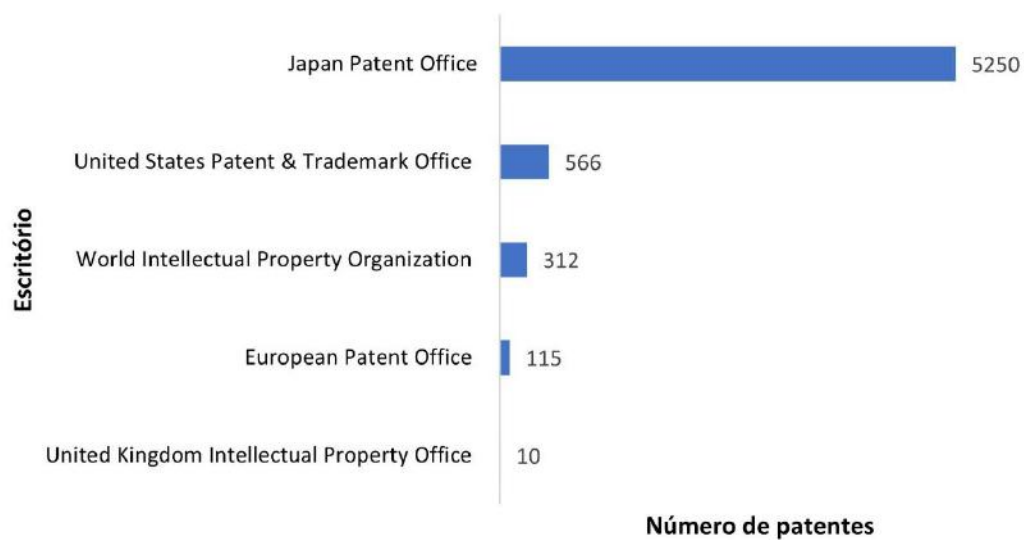


Figura 10: Número de patentes registradas por escritório com a palavra-chave “inulinase”

Ao realizar a busca pelas palavras “*Yarrowia + lipolityca*”, foram encontrados 3754 artigos e 13458 patentes, distribuídos ao longo dos anos conforme as Figuras 11 e 12.

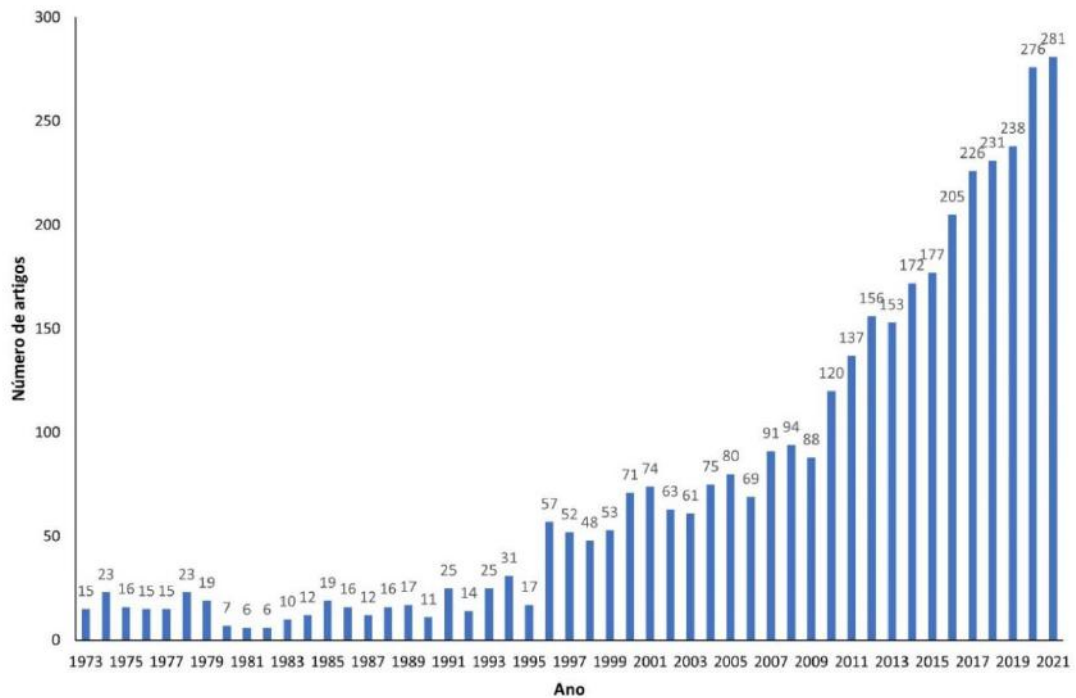


Figura 11: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “*Yarrowia + lipolytica*”

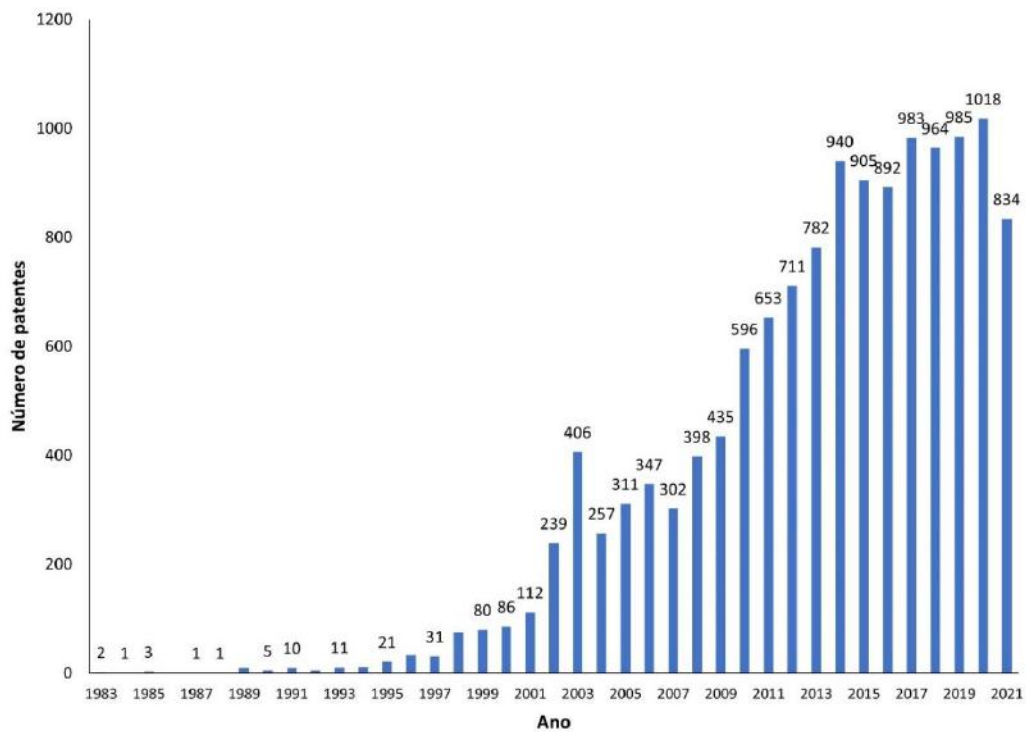


Figura 12: Número de patentes registradas por ano com a palavra-chave “*Yarrowia+lipolytica*”

Ao pesquisar pelas palavras “*Yarrowia + lipolytica*”, foi observado um aumento no número de artigos publicados sobre o tema nos anos 90, seguido pela curva de patentes, que apresenta crescimento do número de documentos nos anos 2000. É importante observar que tanto para “inulinase” quanto para “*Yarrowia lipolytica*”, o aumento do número de patentes tem início cerca de dez anos após o aumento do número de artigos. Isto demonstra que os estudos realizados foram convertidos em práticas industriais e de pesquisa.

China, França e Estados Unidos lideram o ranking de número de artigos, enquanto o Brasil ocupa a décima posição, com 142 publicações. Em relação às patentes, os Estados Unidos (por meio do United States Patent & Trademark Office) apresentam grande vantagem em relação aos demais, com número de patentes 5 vezes maior que o segundo colocado Japan Patent Office.

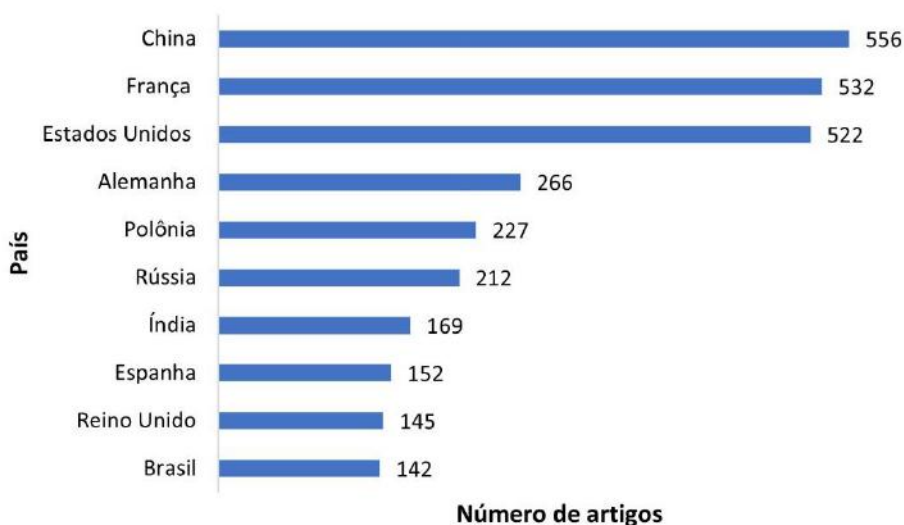


Figura 13: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “*Yarrowia+lipolytica*”

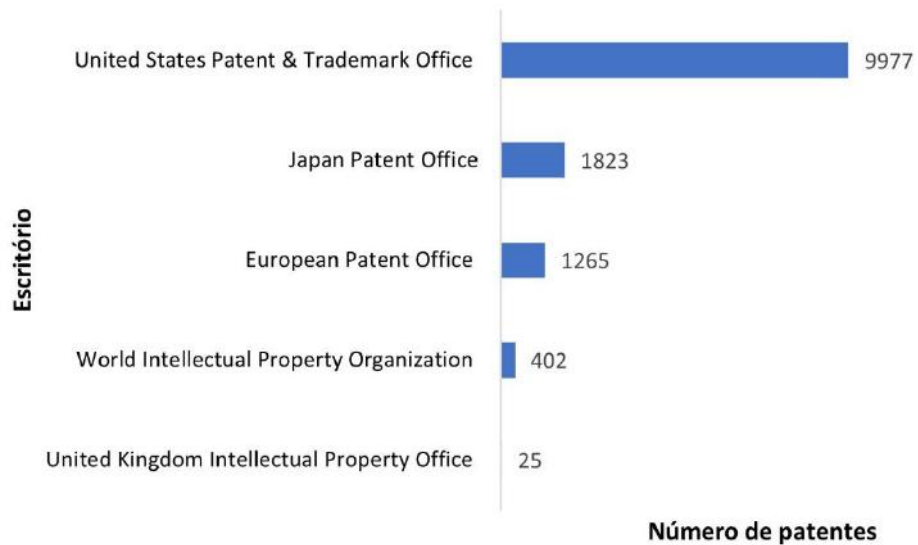


Figura 14: Número de patentes registradas por escritório com a palavra-chave “*Yarrowia+lipolytica*”

Ao realizar a busca pelas palavras “inulinase + *yarrowia* + *lipolytica*”, foram encontrados apenas 18 artigos e 151 patentes, distribuídos ao longo dos anos conforme as figuras 15 e 16:

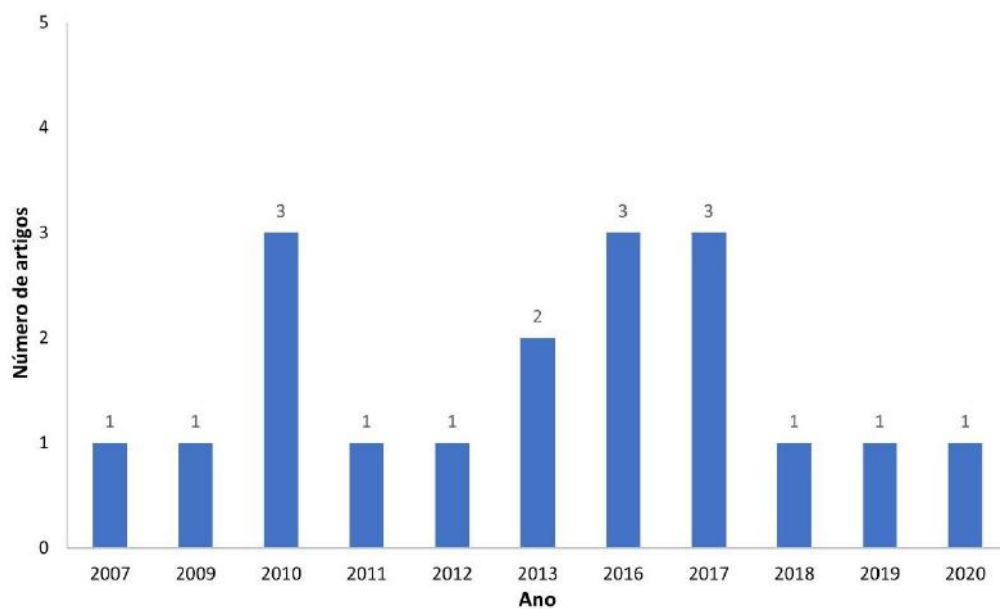


Figura 15: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “inulinase+Yarrowia+lipolityca”

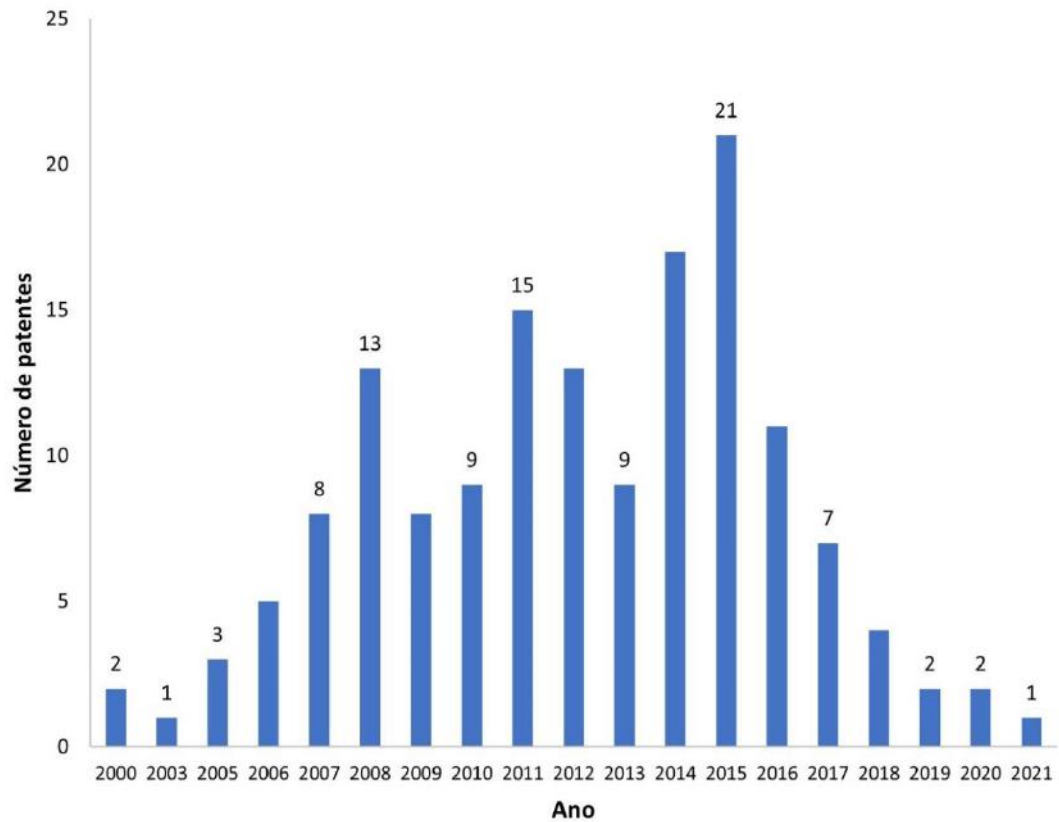


Figura 16: Número de patentes registradas por ano com a palavra-chave “inulinase+Yarrowia+lipolytica”

Observa-se um número muito menor de patentes e artigos publicados em relação às pesquisas anteriores. Isto mostra que estudo de produção de inulinases por *Yarrowia lipolytica* ainda é um assunto pouco explorado.

A China lidera o ranking de publicação de artigos sobre o tema com apenas 11 artigos, porém ainda é 5 vezes maior que o segundo colocado, Estados Unidos. Estes continuam como o maior país emissor, mesmo tendo poucos artigos sobre o tema.

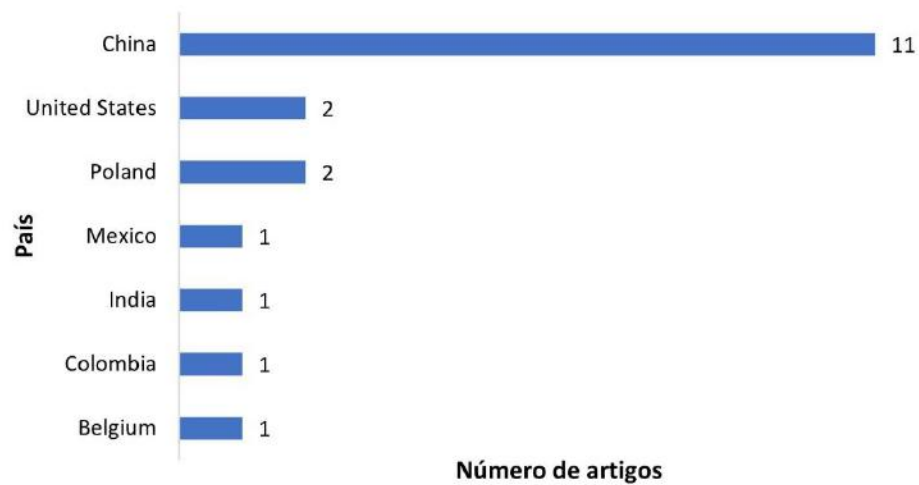


Figura 17: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “inulinase+ *Yarrowia*+lipolytica”

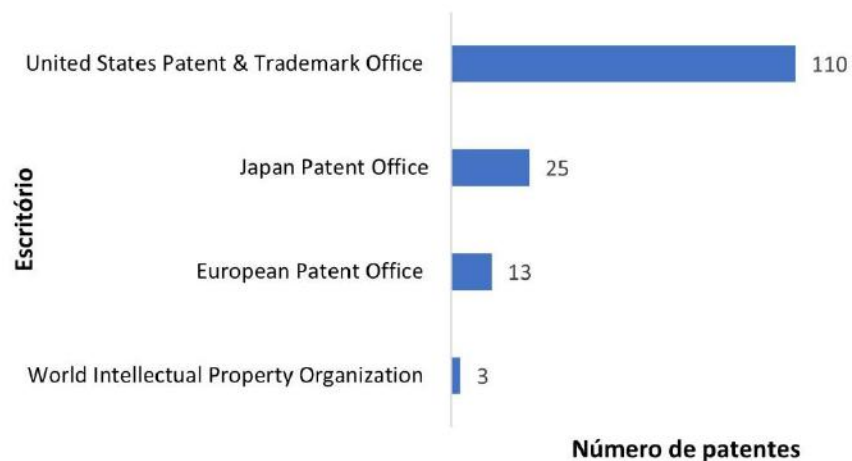


Figura 18: Número de patentes registradas por escritório com a palavra-chave “inulinase+ *Yarrowia*+lipolytica”

Dentre os artigos obtidos a partir da busca pela palavra chave “inulinase+*yarrowia*+*lipolytica*” na base Scopus, apenas Gao et al. (2007) citou a produção de inulinases por cepa de *Yarrowia lipolytica* selvagem. Os demais artigos são de estudos

realizados com cepas de *Yarrowia lipolytica* geneticamente modificadas com genes de outros microrganismo produtores de inulinase como *Aspergillus niger* e *Kluyveromyces marxianus*. Nesses casos, a *Yarrowia lipolytica*, uma levedura não convencional, foi utilizada como hospedeira eucariótica por causa de seus fenótipos desejáveis como termotolerância, assimilação de diversas fontes de carbono e alta secreção de proteínas.

As patentes, em sua maioria, também são sobre a utilização de *Yarrowia lipolytica* como um vetor eucariótico para expressão de genes de outros microrganismos produtores de inulinases.

7. CONCLUSÕES

Em face aos resultados apresentados, conclui-se que *Yarrowia lipolytica* foi capaz de produzir inulinases em boa quantidade devido ao estudo do meio de cultura com a utilização do meio ME, sendo este favorável à produção de biomassa celular e produção enzimática. Cabe ainda ressaltar que a utilização da microplaca foi eficiente no crescimento celular no meio ME contendo inulina nas concentrações 2% e 4%.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, P.F.F. (2003). Emprego de carreador de oxigênio na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, Dissertação (Mestre em Ciências), Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

AKGÜN, S.; ERTEL, N.H. The effects of sucrose, fructose, and high-fructose corn syrup meals on plasma glucose and insulin in non-insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes Care*, v. 8, p. 279-283, 1985.

BARTH, Gerold; GAILLARDIN, Claude. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS microbiology reviews*, v. 19, n. 4, p. 219-237, 1997.
BARTH, Wilmar Luiz. Engenharia genética e bioética. *Teocomunicação*, v. 35, n. 149, 2005.

BARTHOMEUF C., REGERAT F., POURRAT H., Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*, J. Ferment. Bioeng. 72 (1991) 491–494.

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

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

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

COELHO, M.A.Z.; AMARAL, P.F.F.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: “An industrial workhorse”. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol. 2010, 2, 930–944.

COUSSEMENT, P.A.A. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. Journal of Nutrition, v. 129, n. 7, p. 1412-1417, 1999.

BLAKELY, S.T.; MISLO, B.L.; BASI, N.S.E.; PAINTER, R.H. Dietary fructose alters the inulin-like effects of dietary vanadate in adipocytes from rats. Nutr. Res, v. 15, p. 25-35, 1995.

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

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

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

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOHAN, N. Optimization of inulinase production from garlic by *Streptomyces* sp, in solid state fermentation using statistical designs. *Biotechnol. Res. Int.*, v, 2011, p 7, 2011.

DUETZ, W. A.; WITHOLT, B. Oxygen transfer by orbital shaking of square vessels and deepwell microtiter plates of various dimensions. *Biochemical Engineering Journal*, v. 17, n. 3, p. 181–185, 2004.

DUTRA, Keilla dos Reis. *Transição Dimórfica em *Yarrowia lipolytica*: ação da auxina e óxido nítrico*, 2010.

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

ERTAN F., EKINCI F., The production of inulinase from *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum*, *J. Marmara Pure Appl. Sci.* 18 (2002) 7–15.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, v. 87, n. 2, p.287-291, 2002.

FLEMING, S. E.; GROOTWASSINK, J. W. Preparation of high-fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke *Helianthus tuberosus* L. CRC critical reviews in food science and nutrition, v. 12, n. 1, p. 1–28, nov. 1979.

GAO L., CHI Z., SHENG J., WANG L., LI J., GONG F., Inulinase-producing marine yeasts: Evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes, *Microbial Ecol.* 54 (2007) 722–729.

GONÇALVES, F. A. G.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. v. 2014, 2014.

GONG, F., SHENG, J., CHI, Z., LI, J. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *J ind Microbial Biotechnol.*, v. 34(3), p. 179-185, 2007.

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

KAMEDA, E.; LANGONE, M.A.P.; COELHO, M.A.Z.; Removal of Polymeric Filter Cake in Petroleum Wells: a Study of Commercial Amylase Stability. *J. Petrol. Sci. Eng.*, 59(3), 263-270, 2007.

KONDRAGUNTA B, DREW JL, BRORSON KA, MOREIRA AR, RAO G. Advances in clone selection using high-throughput bioreactors. *Biotechnol Prog.* 2010;26:1095–103.

KELLY, G. Inulin-type prebiotics – a review. Part 1. *Alternative Medicine Review*, v.13, n.4, p.315-329, 2008.

KUMAR, S.; WITTMANN, C.; HEINZLE, E. Minibioreactors. *Biotechnology Letters*, v. 26, n. 1, p. 1–10, 2004.

LAURENZO, K.S.; Navia, J.L.; Neiditch; D.S. Preparation of inulin products. USA Patent number 5,968,365. Oct. 19, 1999.

LIU, W.; PAN, X.; JIA, B.; ZHAO, H.; XU, L.; LIU, Y.; YAN, Y. Surface display of active lipases Lip7 and Lip8 from *Yarrowia lipolytica* on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 88: 885–891, 2010.

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

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

NEAGU, C., & BAHRIM, G. Inulinases - a versatile tool for biotechnology. *Innovat Rom Food Biotechnol.*, v.9(1), p.1-11, 2011.

NGUYEN, Q. D.; SUJTÓ, N. M.; BUJNA, E.; HOSCHKE, A.; REZESSYSZABÓ, J. M. Effects of Medium Composition and Process Parameters on the Production of

Extracellular Inulinase by *Thermomyces lanuginosus*. *Food Technology Biotechnology*, v. 51 (1) p. 36–44, 2013.

NICAUD, J-M., MADZAK, C., BROEK, P.V.D, GYSLER, C., DUBOC, P., NIEDERBERGER, P. e GAILLARDIAN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia Lipolytica*". *FEMS Yeast Res.*, v.2, n.3, p. 371-379; 2002.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? *Journal of Nutrition*, v.129. n.7, p. 1402-1406, 1999.

NUNES, PMB. Produção de lipases associadas às células de *Yarrowia lipolytica* usando óleo de fritura residual. Tese (Doutorado). – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2015.

PANDEY A, Soccol CR, Selvakumar P, Soccol VT, Krieger N, Fontana JD. 1999. Recent developments in microbial inulinases. *Appl. Biochem. Biotechn.*, v. 81, p. 35-52.

PASSADOR-GURGEL, G.; FURLAN, S.A.; MELLER, J.K.; JONAS, R. Application of a Microtitre Reader System to the Screening of Inulinase Producing Yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.45, p. 158-161,1996.

PEREIRA-MEIRELLES, Fatima Ventura; ROCHA-LEÃO, Maria Helena Miguez; SANT'ANNA, Geraldo Lippel. A stable lipase from *Candida lipolytica*. In: *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, p. 73-85, 1997.

PESSOA JUNIOR, A. Obtenção de inulinase: recuperação e ampliação de escala. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

PIMENTEL, T.C., Garcia, S., Prudencio, S. H. Aspectos funcionais, de saúde e tecnológicos de frutanos tipo inulina. Bol. Centro Pesqui Process Aliment., v. 30(1), 2012.

ROBERFROID MB (2005) Introducing inulin-type fructans. Brit J Nutr 93: S13-S25.

ROBINSON, R. K. The potential of inulin as a functional ingredient. British Food Journal. Bradford., v.97, n.4, p.30-32, 1995.

ROUWENHORST, R. et al. Localization of inulinase and invertase in *Kluyvermyces* species. Applied and environmental microbiology, v. 56, p. 3329–36, 1 dez. 1990.

SANTOS, Ariane Gaspar. Fermentação extrativa para produção de lipase e ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica*. Rio de Janeiro, 2018. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

SILVA, R.F. Use of inulin as a natural texture modifier. Cereal Foods World. St. Paul. v.41, n.10, p.792-795, 1996.

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

SOUZA-MOTTA, C. M. D., CAVALCANTI, M. A. D. Q., PORTO, A. L. F., MOREIRA, K. A., & LIMA FILHO, J. L. D. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: New source for inulinase production. *Bras Arch Biol Technol.*, v. 48(3), 3. 43-350, 2005.

STROH, W.H. Industrial enzymes market. *Gen Engineering News*, New York, v. 18, n. 5, p. 11-38, 1998.

TOTARO D., ROTHBAUER M. Downscaling screening cultures in a multifunctional bioreactor array-on-a-chip for speeding up optimization of yeast-based lactic acid bioproduction. *Biotechnol.Bioeng.*117(7), 2046–2057, 2020.

TRIVEDI, S.; Divecha, J.; Shah, A. Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates. *Carb Polyme.*, v, 90, p, 483– 490, 2012.

TUNGLAND, C. Inulin: a comprehensive scientific review. 2000. Online.

VAN LOO J., COUSSEMENT P., LEENHEER L., HORBREGS H., SMITH G., On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35 (1995) 525–552.

VANDAMME, E. J. and DERYCKE, D. G. (1983), *Adv. Appl. Microbiol.* 29, 139–176.