

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

## **ESTUDO DE PRÉ-TRATAMENTO DE SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA VISANDO À UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DA INULINASE**

**Gabriela Boni, Giovani Leone Zobot, Aline Fátima Skowronski, Helen Treichel\***

*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada – URI Campus de Erechim*

*\*Email: [helen@uricer.edu.br](mailto:helen@uricer.edu.br)*

### **RESUMO**

A inulinase é uma enzima importante na produção de frutose através da hidrólise enzimática da inulina e principalmente para a obtenção de frutooligossacarídeos, produto utilizado como novo ingrediente funcional em alimentos, sendo considerado um alimento prebiótico. Hoje a obtenção desta enzima no mercado exterior é realizada principalmente através da inulina como fonte de substrato, sendo esta de alto custo. No Brasil, a produção desta enzima a partir de resíduos de cana-de-açúcar e de milho (bagaço de cana, MEL e AMM) poderá ter grande apelo econômico devido à abundância de matéria-prima e ao baixo custo destes subprodutos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo o estudo da produção da inulinase em meios industriais pré-tratados por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Foram estudadas as variáveis água de maceração de milho e concentração de melaço. Após a análise dos efeitos de cada variável estudada na atividade enzimática, realizou-se um planejamento experimental completo, no qual as variáveis independentes foram a concentração de melaço e a água de maceração de milho.

Palavras-chave: planejamento experimental, bagaço de cana, melaço, água de maceração de milho.

### **1 INTRODUÇÃO**

A produção de enzimas é uma área da biotecnologia em expansão. Os meios industriais utilizados em processos biotecnológicos são bastante complexos, e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção de enzimas, polissacarídeos, entre outros, ou ainda, dificultar sua posterior recuperação e purificação. Assim, um pré-tratamento destes substratos surge como alternativa de forma a clarificar o meio sem provocar prejuízos na fermentação, garantindo maior facilidade na extração e purificação do produto formado. Neste contexto encontram-se a água de maceração de milho (AMM) e o melaço de cana (MEL), que são substratos ricos em nutrientes, porém possuem substâncias inibidoras ou responsáveis pela dificuldade da posterior recuperação do produto.

Estudos com microrganismos da linhagem *Kluyveromyces* sp. (*Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis*) mostraram que a enzima inulinase apresentava tanto atividade hidrolítica quanto atividade de transfrutossilação.

A vantagem de utilizar microrganismos do gênero *Kluyveromyces* sp. consiste na alta produtividade da enzima inulinase, tanto em meio sintético (KALIL, 2001; SANTOS et al., 2002) quanto em meio industrial (TREICHEL, 2001; MAKINO et al., 2002).

Sendo o Brasil um grande produtor de cana-de-açúcar e de milho, o objetivo deste trabalho foi estudar metodologias de pré-tratamento para os meios industriais melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para posteriormente utilizá-los na produção de inulinase através de fermentação submersa usando *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 agregando valor a estes subprodutos.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Material e métodos

Nos últimos anos o interesse pelo uso de uma metodologia sistemática que avalie cada variável com confiabilidade estatística vem aumentando em todas as linhas de pesquisa. Em processos bioquímicos vem sendo amplamente utilizada, reduzindo os ensaios e conseqüentemente os custos, além de melhorar sensivelmente os resultados obtidos. Assim, a metodologia do planejamento experimental foi utilizada no estudo do pré-tratamento ácido do melaço e água de maceração de milho.

Os substratos industriais utilizados foram melaço, adquirido na Usina Éster na região da Grande Campinas e água de maceração de milho, cedida pela Corn Products – Mogi Guaçu.

Os meios industriais (melaço e água de maceração de milho) utilizados para produção de enzima são bastante complexos, e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção da inulinase, ou ainda, dificultar sua posterior purificação devido à formação de precipitados no meio de fermentação. Como o meio de cultivo consiste em resíduos industriais como fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais, para que este possa ser purificado em coluna de leito expandido, a utilização do meio clarificado é indispensável para não comprometer a recuperação e purificação da enzima na coluna.

O melaço e a água de maceração de milho tiveram o pH ajustado com ácido (sulfúrico ou fosfórico) e após foram deixados em repouso a uma temperatura de 24 °C. Após este período o meio foi submetido a uma centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos, e o pH foi novamente ajustado com hidróxido de sódio 10 N (Treichel, 2004). Os níveis de pH de ajuste com ácido, tempo de repouso e pH de ajuste com soda foram as variáveis estudadas. As respostas foram à leitura da densidade ótica do meio a 600nm. Os dados foram tratados no *software* Statistica 5.0.

### 2.2 Resultados e discussão

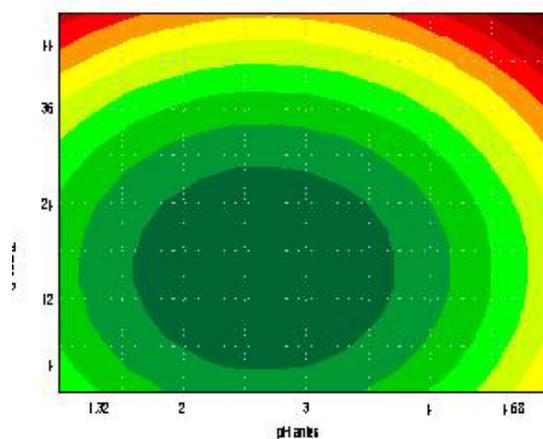
A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento experimental, onde se verifica que os ensaios 15, 16 e 17 apresentaram as menores densidades óticas, mostrando que a água de maceração de milho ficou mais clarificada nos ensaios correspondentes aos pontos centrais. A densidade ótica antes do pré-tratamento era de 0,835.

A equação 1 apresenta o modelo codificado otimizado para o pré-tratamento da água de maceração de milho com ácido fosfórico, o qual foi validado pela análise de variância. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,87) e o teste F permitiram a construção da curva de contorno apresentada na Figura 1, que mostra que o pré-tratamento da água de maceração de milho com ácido fosfórico foi otimizada dentro da faixa estudada.

$$DO = 0,23 + 0,07.pHantes + 0,11.pHantes^2 + 0,14.tempo + 0,13.tempo^2 + 0,03.pHdepois + 0,15.pHdepois^2 + 0,03.tempo.pHdepois \quad (\text{Equação 1})$$

**Tabela 1** - Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais), adicionando os pontos axiais, com a respectiva resposta em densidade ótica

Ensaio	pH antes	Tempo (h)	pH depois	DO
1	-1 (2,0)	-1 (12)	-1 (5,0)	0,304
2	1 (4,0)	-1 (12)	-1 (5,0)	0,433
3	-1 (2,0)	1 (36)	-1 (5,0)	0,552
4	1 (4,0)	1 (36)	-1 (5,0)	0,970
5	-1 (2,0)	-1 (12)	1 (6,0)	0,345
6	1 (4,0)	-1 (12)	1 (6,0)	0,506
7	-1 (2,0)	1 (36)	1 (6,0)	0,888
8	1 (4,0)	1 (36)	1 (6,0)	1,016
9	-1,68 (1,32)	0 (24)	0 (5,5)	0,450
10	1,68 (4,68)	0 (24)	0 (5,5)	0,540
11	0 (3,0)	-1,68 (4)	0 (5,5)	0,458
12	0 (3,0)	1,68 (44)	0 (5,5)	0,517
13	0 (3,0)	0 (24)	-1,68 (4,66)	0,650
14	0	0 (24)	1,68 (6,34)	0,620
15	0 (3,0)	0 (24)	0 (5,5)	0,251
16	0 (3,0)	0 (24)	0 (5,5)	0,214
17	0 (3,0)	0 (24)	0 (5,5)	0,252



**Figura 1** - Curva de contorno para a densidade ótica em função do tempo e pH antes do repouso

No caso do melão os melhores resultados foram obtidos com ácido sulfúrico, que apresentou resultados de DO inferiores. A matriz do planejamento experimental usando o melão realizado com o ácido sulfúrico encontra-se na Tabela 2, onde se verifica que os ensaios 1 e 2 apresentaram as menores densidades óticas, mostrando que o meio ficou mais clarificado nestes pontos. A densidade ótica antes do pré-tratamento era de 0,749.

A equação 2 apresenta o modelo codificado otimizado para o pré-tratamento do melão com ácido sulfúrico, o qual foi validado pela análise de variância.

$$DO = 0,49 + 0,14.Tempo + 0,09.pHdepois \quad (\text{Equação 2})$$

**Tabela 2** - Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) com a respectiva resposta em densidade ótica

Ensaio	pH antes	Tempo(h)	pH depois	DO
1	-1 (3,0)	-1 (24)	-1 (4,0)	0,23
2	1 (5,0)	-1 (24)	-1 (4,0)	0,22
3	-1 (3,0)	1 (48)	-1 (4,0)	0,486
4	1 (5,0)	1 (48)	-1 (4,0)	0,63
5	-1 (3,0)	-1 (24)	1 (6,0)	0,394
6	1 (5,0)	-1 (24)	1 (6,0)	0,5
7	-1 (3,0)	1 (48)	1 (6,0)	0,687
8	1 (5,0)	1 (48)	1 (6,0)	0,69
9	0 (4,0)	0 (36)	0 (5,0)	0,509
10	0 (4,0)	0 (36)	0 (5,0)	0,529
11	0 (4,0)	0 (36)	0 (5,0)	0,571

### 3 CONCLUSÃO

No presente trabalho, propôs-se o estudo de pré-tratamentos de meios industriais para posterior utilização na produção da inulinase. Foram realizados estudos para definir as condições de pré-tratamento ácido mais adequado para a clarificação dos meios, sem causar danos aos meios, para posterior produção da enzima.

O pré-tratamento ácido para os meios industriais foi otimizado, e as condições utilizadas foram de pH igual a 3 antes do repouso para ambos os meios e pH após o repouso igual a 4 para a água de maceração de milho e 5,5 para o melaço, sendo que o primeiro foi tratado com ácido sulfúrico e o segundo com ácido fosfórico.

### 4 REFERÊNCIAS

KALIL, S. J. **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

MAKINO, Y. et al. Otimização de meio industrial para produção de inulinase por *Kluyveromyces*. **Anais do 14<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 25-28 de outubro, Natal - RN, 2002.

SANTOS, A. M. P.; SMIGIC, N.; MAUGERI, F. Production and purification of inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, ESBES4, Delft, Netherlands, p. 28-30, august, 2002.

TREICHEL, H. **Estudo de meios industriais para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045**. Tese (Mestrado) - FEA, Unicamp, 2001.

TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados**. Tese (Doutorado) - FEA, Unicamp, 2004.