

ESTUDO DA PRODUÇÃO DA INULINASE EM MEIOS INDUSTRIAIS PRÉ-TRATADOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

**Aline F. Skovronski, Giovani L. Zabot, Gabriela Boni, Marcio Mazutti, Helen Treichel*,
Débora de Oliveira, Marco Di Lucio**

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

**e-mail: helen@uricer.edu.br*

RESUMO

O objetivo do estudo foi produzir a enzima inulinase através de subprodutos da agroindústria da cana-de-açúcar e de milho visando um baixo custo na produção já que estes se encontram em grande quantidade. O microrganismo utilizado foi o *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, sendo que as fermentações foram conduzidas em erlenmeyers submetidos à agitação orbital com controle de temperatura por 72h. A atividade enzimática foi determinada através da concentração de açúcares redutores pelo método de DNS. Pode-se concluir que as concentrações dos substratos afetaram a atividade enzimática. A produção da enzima utilizando os meios pré-tratados foi otimizada em concentração de 100g/L de água de maceração de milho, 100g/L de melaço e 6g/L de Prodex Lac, onde obteve-se a maior produtividade desta. A utilização de resíduos industriais para a produção da enzima inulinase, juntamente com a substituição do extrato de levedura por Prodex Lac, torna a produção da enzima bastante interessante comercialmente, pois reduz o custo de produção.

Palavras-chave: inulinase, fermentações, *Kluyveromyces marxianus*.

1 INTRODUÇÃO

As inulinases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose, utilizando-se a inulina como matéria-prima. As inulinases também têm sido utilizadas na produção de frutooligossacarídeos, os quais têm atraído especial atenção pelo aumento da demanda no consumo de alimentos saudáveis ou ingredientes de alimentos considerados saudáveis, como estes são designados.

O custo de produção da inulinase pode ser drasticamente reduzido através do uso de subprodutos da agroindústria da cana de açúcar e milho. Hoje a obtenção desta enzima no mercado exterior é realizada principalmente através da inulina como substrato, sendo esta relativamente cara. No Brasil, a produção desta enzima a partir de resíduos de cana de açúcar (bagaço de cana e melaço) e de milho (água de maceração de milho) poderá ter grande apelo econômico, devido à abundância e ao baixo custo destes subprodutos. Na área de biotecnologia, a tendência atual é ver os processos de forma integrada, para que a otimização seja realizada desde as etapas iniciais do preparo do meio e condições de cultura (“upstream”) até a fase de purificação (“downstream”) dos produtos formados.

Sendo o Brasil um grande produtor de cana de açúcar e de milho o objetivo deste trabalho é estudar a produção de inulinase através de fermentação submersa usando *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a partir de resíduos industriais pré-tratados com ácido, agregando valor a estes subprodutos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi produzir a enzima inulinase através de produtos das agroindústrias da cana de açúcar e do milho utilizando o microrganismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

O microrganismo utilizado para a produção da enzima inulinase foi *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, cedido pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (DEA/FEA/UNICAMP), mantido em refrigeração, em meio YM (Yeast Malt). A produção de células para o pré-inóculo foi realizada em 10 mL de meio YM líquido em tubo de ensaio de 50 mL inoculado com uma alçada de cultura estoque e incubado a 30°C, durante 24h.

Cada tudo de ensaio com o meio YM líquido foi repassado para um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de inóculo. Cada frasco contendo o pré-inóculo foi mantido a 30°C e 150 rpm por 24 horas.

O meio para obtenção do inóculo continha 20g/L de sacarose, 5g/L de extrato de levedura, 5g/L K₂HPO₄, 1,5g/l de NH₄Cl, 1,15g/L de KCl e 0,65g/L MgSO₄. 7H₂O. Os componentes do meio foram solubilizados, sendo feito o ajuste do pH a 6,8. Após o ajuste do pH, realizou-se a autoclavagem destes erlenmeyers durante 15 minutos a 121°C.

O substrato utilizado em todos os experimentos consistiu nos meios pré-tratados de água de maceração de milho e melação otimizados na primeira etapa deste projeto.

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de vidro de 500 mL. Os experimentos foram realizados em duplicata sendo o ponto central realizado em triplicata. Os erlenmeyers de cada ponto experimental continham 50mL de melação pré-tratado, 50mL de água de maceração pré-tratada e extrato de levedura ou Prodex Lac[®] (Hidrolizado de Levedura cedido pela Prodesa S.A. – Mogi Mirim/SP), todos em concentrações definidas no planejamento experimental.

Todos os erlenmeyers com o meio foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Cada erlenmeyer foi inoculado com 10mL de suspensão de células e submetidos à agitação orbital com controle de temperatura durante o tempo total de 72 horas.

A atividade enzimática foi determinada pela medida da velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas pelo método de DNS (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (UI) é definida como sendo a capacidade da enzima hidrolisar 1 µmol de sacarose por minuto.

2.2 Resultados e discussão

A Tabela 1 apresenta a matriz do primeiro planejamento completo realizado com as respectivas respostas de atividade enzimática de inulinase (AI), onde se observa que em 72 horas de fermentação a maior atividade foi obtida no ensaio 4, o qual continha as maiores concentrações de melação e AMM e a menor concentração de extrato de levedura.

A análise estatística foi realizada Através da análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido (0,93) e o valor de F (7 vezes maior que o F tabelado) permitiram a validação do modelo (Equação 1).

$$AI = 9,52 + 8,77.Melacao + 9,79.AMM + 9,79.Melacao.AMM \quad (Eq. 1)$$

Pode-se observar que a análise de efeitos das concentrações dos substratos deram todas positivas, indicando que, se aumentarmos a concentração da AMM e do melação a atividade enzimática deverá aumentar consideravelmente. Este comportamento pode ser explicado pelo fato do pré-tratamento retirar nutrientes indispensáveis para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571 (Treichel,2004). Em vista disso, o

próximo passo será utilizar faixas maiores de concentração para o melão e para a AMM.

Convém salientar que o extrato de levedura não apresentou efeito significativo sobre a atividade enzimática em 72 horas de fermentação dentro da faixa estudada, inclusive os efeitos de interação deste substrato com o melão e a água de maceração de milho também não se mostraram significativos.

A matriz do segundo planejamento realizado com a inclusão dos pontos axiais é apresentada na Tabela 2.

Tabela 1 Matriz do primeiro planejamento experimental (valores codificados e reais), com a respectiva atividade enzimática (AI) em 72 horas de fermentação

Ensaio	Melão (g/L)	AMM (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	AI 72 h (U/mL)
1	100 (-1)	25 (-1)	4 (-1)	0,2
2	200 (1)	25 (-1)	4 (-1)	4,1
3	100 (-1)	75 (1)	4(-1)	0,1
4	200 (1)	75 (1)	4(-1)	38,6
5	100 (-1)	25 (-1)	8 (1)	0,5
6	200 (1)	25 (-1)	8 (1)	0,7
7	100 (-1)	75 (1)	8 (1)	8,8
8	200 (1)	75 (1)	8 (1)	36,3
9	150 (0)	50 (0)	6 (0)	7,3
10	150 (0)	50 (0)	6 (0)	3,1
11	150 (0)	50 (0)	6 (0)	4,5

Neste segundo planejamento houve um incremento na atividade enzimática, tendo no ensaio 3 o maior valor obtido, onde a concentração de melão era menor e a concentração de AMM era maior, onde foi alcançada uma produtividade de 209,9 U/mL. Nota-se que a concentração de melão quadrática apresenta influência positiva sobre a produção da enzima, já o efeito linear apresenta-se significativamente negativo. Convém salientar que foi obtido com $p < 0,1$, visto que, com 95 % de confiança nenhuma variável independente estudada apresentou-se significativa.

Com a realização destes dois primeiros planejamentos foram obtidos índices de atividade enzimática baixos, quando comparados a (Treichel, 2004) e (Bender e Mazzuti, 2005). Por isso foram realizados testes intermediários visando atingir um aumento na

atividade enzimática. A concentração de AMM utilizada foi de 100 g/L e de Prodex Lac foi de 6 g/L, as concentrações de melão foram de 100 g/L e 150 g/L, no Teste 1 e Teste 2, respectivamente.

Tabela 2 Matriz do segundo planejamento experimental realizado (valores codificados e reais), com a respectiva atividade enzimática (U/mL) em 72 horas de fermentação

Ensaio	Melão (g/L)	AMM (g/L)	AI 72 h (U/mL)
1	200 (-1)	50 (-1)	162,9
2	300 (1)	50 (-1)	158,9
3	200 (-1)	150 (1)	209,9
4	300 (1)	150 (1)	140,1
5	179,5 (-1,41)	100 (0)	113,7
6	320,5(1,41)	100 (0)	104,7
7	250 (0)	29,5 (-1,41)	94,9
8	250 (0)	170,5 (1,41)	110,7
9	250 (0)	100 (0)	102,3
10	250 (0)	100 (0)	119,6
11	250 (0)	100 (0)	117,5

Analogamente aos planejamentos anteriores, a maior atividade enzimática foi encontrada em 72 horas de fermentação, o qual continha 100g/L de melão e AMM, e a concentração de Prodex Lac igual a 6g/L. A substituição do extrato de levedura por Prodex Lac, torna o meio bastante interessante comercialmente, pois reduz o custo de produção da enzima.

Com esse resultado partiu-se para a realização de um terceiro planejamento experimental onde a matriz com inclusão dos pontos axiais, encontra-se na Tabela 3.

Avaliando os resultados obtidos neste planejamento observa-se que o pico de atividade enzimática ocorreu nos pontos centrais do planejamento experimental realizado.

O modelo empírico otimizado (Eq. 2) para a atividade de inulinase foi validado pela análise de variância (ANOVA). Observa-se que o coeficiente de correlação obtido (0,86) e o valor de F permitiram a validação do modelo. O modelo validado permitiu construir a superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 1.

Tabela 3 Matriz do terceiro planejamento experimental (valores codificados e reais) completa, com suas respectivas atividades enzimática em 72 horas de fermentação

Melaço (g/L)	AMM (g/L)	Prodex Lac (g/L)	AI (U/mL)72h
-1(50)	-1(50)	-1(4)	830,2
1(150)	-1(50)	-1(4)	450,0
-1(50)	1(150)	-1(4)	900,4
1(150)	1(150)	-1(4)	635,3
-1(50)	-1(50)	1(8)	750,3
1(150)	-1(50)	1(8)	305,6
-1(50)	1(150)	1(8)	760,2
1(150)	1(150)	1(8)	656,9
-1,68(16)	0(100)	0(6)	681,2
1,68(184)	0(100)	0(6)	178,0
0(100)	-1,68(16)	0(6)	239,8
0(100)	1,68(184)	0(6)	562,3
0(100)	0(100)	-1,68(2,64)	156,9
0(100)	0(100)	1,68(9,36)	397,6
0(100)	0(100)	0(6)	1180,6
0(100)	0(100)	0(6)	1013,4
0(100)	0(100)	0(6)	1222,5

$$AI = 1116,15 - 149,4.Melaço - 175,4.Melaço^2 - 185,5.AMM^2 - 229,3.Prodex Lac^2 \quad (Eq. 2)$$

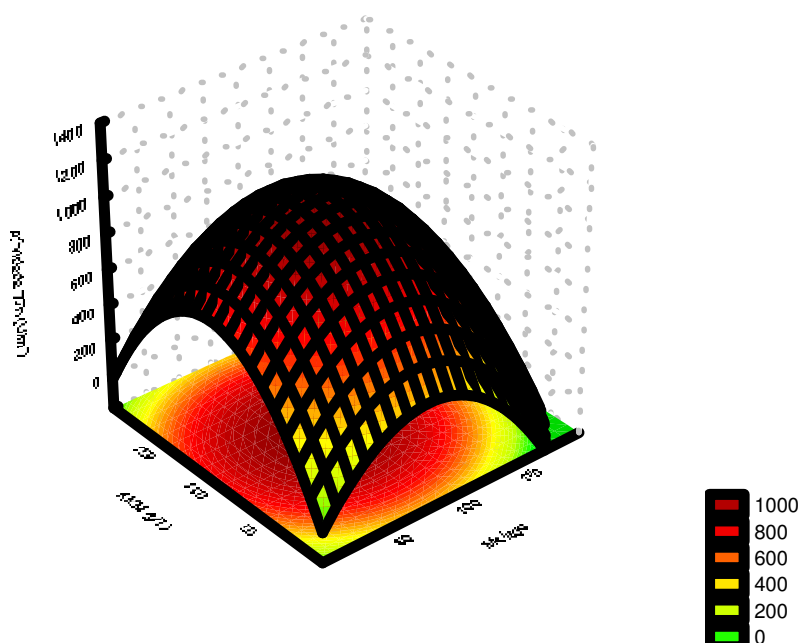


Figura 1 Superfície de resposta para a atividade enzimática de inulinase em fermentação submersa

3 CONCLUSÃO

A produção da enzima utilizando os meios pré-tratados foi otimizada em concentração de 100g/L de água de maceração de milho, 100g/L de melação e 6g/L de Prodex Lac, onde obteve-se a maior produtividade desta.

A utilização de resíduos industriais para a produção da enzima inulinase, juntamente com a substituição do extrato de levedura por Prodex Lac, torna a produção da enzima bastante interessante comercialmente, pois reduz o custo de produção.

REFERÊNCIAS

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

TREICHEL, H. **Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados, para viabilidade econômica da etapa de recuperação e purificação da enzima.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.