

Área: Engenharia de Alimentos

IMOBILIZAÇÃO DE INULINASE MICROBIANA EM SUPORTE INORGÂNICO

**Débora de Oliveira, Marcell Fernandes Silva, Simone Maria Golunski, Helen Treichel,
José Vladimir de Oliveira, Marco Di Luccio, Graciele Kuhn, Chaline Caren Coghetto***

*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de
Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Campus de
Erechim*

**E-mail: chaline_coghetto@hotmail.com*

RESUMO

As enzimas são advindas de células animais, de plantas, bem como de micro-organismos, tendo como papel funcional catalisar reações em micro-organismos bem como aumentar a velocidade de uma reação química em relação a uma reação não catalisada. A enzima inulinase possui aptidão em hidrolisar polímeros como a inulina, levando a produção de fruto-oligossacarídeos. A imobilização de enzimas em suportes inertes que não causem danos à atividade enzimática, pode assegurar seu uso em diversas bateladas, resultando em economia para processos industriais. O objetivo deste estudo consistiu na imobilização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em suporte inorgânico montmorillonita poço A. A metodologia de imobilização foi realizada com 2g de suporte e com uma variação da relação enzima/tampão acetato de sódio pH 4,8 de 1:10; 2:10; 3:10; 4:10 e 5:10 e os tempos de imobilização foram 0, 10, 30, 50, 60, 90 e 120 minutos, em seguida foram determinadas a atividade enzimática e específica, o teor de proteína, o rendimento de imobilização e a retenção. Como resultado obteve-se a melhor atividade enzimática específica com a diluição 3:10 com um valor de 975,07 U/mg, bem como o maior percentual de retenção da enzima (42,08%) nesta mesma relação. Por fim através dos testes realizados foi obtida a melhor condição de imobilização de inulinase não comercial em suporte inorgânico.

Palavras-chave: *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, inulinase, suporte inorgânico, imobilização.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em micro-organismos. Todas as enzimas são proteínas tendo como papel funcional catalisar reações em micro-organismos bem como aumentar a velocidade de uma reação química em relação a uma reação não catalisada (Voet et al., 2000). Devido ao aprimoramento das técnicas de produção, extração e purificação houve um aumento significativo da utilização de enzimas microbianas, sendo altamente empregadas nas indústrias química, farmacêutica, cosmética e alimentícia.

As enzimas de origem microbiana têm a capacidade de sintetizar compostos, realizar bioconversão, e hidrolisar polímeros de interesse econômico. A enzima inulinase, de interesse este estudo, possui aptidão em hidrolisar polímeros como a inulina, levando a produção de oligômeros de frutose denominados fruto-oligossacarídeos (Roberfroid et al., 1998). Esta enzima é termoestável e comercialmente viável para aplicações industriais. Entretanto, uma produção contínua de frutose requer a utilização de uma inulinase imobilizada. As inulinases de levedura mais investigadas são aquelas do gênero *Kluyveromyces* (*K. marxianus* var. *marxianus*, entre os quais são incluídos *K. marxianus* e *K. fragilis* se estendendo a *K. marxianus* var. *lactis* e *K. marxianus* var. *bulgaricus*). Essas leveduras são consideradas ideais na produção de inulinases, pois crescem rapidamente em altas concentrações celulares e produzem grandes quantidades desta enzima (Verachtert; Mot, 1990).

A estabilização das enzimas representa uma característica importante do ponto de vista econômico, onde na forma solúvel podem perder sua capacidade catalítica em uma batelada, tornando difícil seu reuso. Além disso, a presença de enzima residual no meio reacional pode se constituir em contaminação indesejável (Sebrão et al., 2007).

A imobilização de enzimas em suportes inertes que não causem danos à atividade enzimática, pode assegurar seu uso em diversas bateladas, resultando em economia para processos industriais (Dalla-Vecchia et al., 2004). Os métodos utilizados para a imobilização enzimática são classificados em métodos químicos (adsorção, ligação covalente, *crosslinking*) e métodos físicos (deposição física para uso em meios orgânicos, aprisionamento em géis ou microcápsulas, membranas ou sistemas de fases orgânico/aquoso ou aquoso/aquoso) (Adlercreutz, 1993). A utilização destes métodos depende de fatores essenciais do processo,

como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, necessitando um projeto adequado para atender às necessidades da reação. Selecionar um suporte adequado é o principal fator, sendo definido como a parte não-catalítica da imobilização, na qual a parte catalítica é construída. Desta forma, o método escolhido deve atender às duas necessidades, a catalítica, expressa em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a processos de controle e separação (Dalla-Vecchia et al., 2004).

A metodologia de imobilização por adsorção de enzimas é um processo simples e de fácil execução. Onde a fixação da proteína é puramente física, ou seja, a proteína adere à superfície de um suporte inerte, por meio de ligações hidrofóbicas, ligações eletrostáticas e força de Van der Waals (Kennedy et al, 1988).

Os suportes são classificados quanto à composição química em: orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados). Os suportes inorgânicos são os mais apropriados para uso industrial por apresentarem elevada resistência mecânica, boa estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque por micro-organismos. Eles são de fácil regeneração por pirólise e apresentam boa rigidez da matriz, sendo estáveis em uma ampla faixa de pressão, temperatura e pH. No entanto, a maioria das enzimas comerciais imobilizadas são obtidas de matrizes orgânicas devido, provavelmente, à variedade de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos nesses suportes (Rodrigues et al., 2008).

A literatura é relativamente escassa em relação à imobilização de inulinase em argilas, justificando o objetivo do estudo que foi encontrar uma melhor condição para o processo de imobilização com inulinase não comercial de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Processo de imobilização

O processo de imobilização foi realizado pesando-se 2g do suporte, com adição de 60 mL de uma solução enzimática contendo extrato enzimático e tampão acetato pH 4,8 nas diluições 1:10; 2:10; 3:10; 4:10 e 5:10. Esta solução foi mantida sob agitação magnética em

temperatura de 4°C (banho de gelo). Durante o processo de imobilização foram retiradas alíquotas de 1 mL nos tempos 0, 10, 30, 50, 60, 90, 120 minutos e na solução de saída (solução filtrada na bomba de vácuo). Com as alíquotas coletadas foram realizadas as medidas do teor de proteína e atividade enzimática, para verificar se o tempo influenciava no processo de imobilização. Após o término do processo de adsorção, as amostras foram filtradas a vácuo e permaneceram por 48 horas em dessecador. Em seguida com o pó dessecado foi realizada a medição da atividade e proteína, seguindo metodologia descrita a seguir.

2.1.2 Determinação da proteína

Para a determinação da proteína foi utilizado o aparelho Qubit Fluorimeter (Kit Quant-iT Protein Assay), seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante.

2.1.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada adicionando-se 0,5g de enzima imobilizada dessecada em um tubo de ensaio, completando-se a mesma com uma solução de 4,5 mL de tampão acetato 0,1M, pH 4,8 com 2% (p/v) de sacarose. Após a solução foi mantida a 50°C, por 10 minutos. A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959), onde 0,5 mL da amostra anterior foram diluídos em 0,5 mL de DNS e mantidos por 5 minutos em água em ponto de ebulição. Cessado o tempo reacional, foram adicionados 8 mL de tartarato de sódio e potássio em banho de gelo. As amostras foram lidas em triplicata, em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidade de atividade (U) da inulinase, definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um micromol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

2.1.4 Determinação do rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização foi calculado de acordo com a equação 1, onde P_s é a quantidade de proteína absorvida (diferença entre a inicial e a estável) e P_o é a quantidade de proteína utilizada na imobilização (solução de entrada).

2.1.5 Determinação da atividade específica

A atividade específica foi determinada dividindo-se a atividade do extrato enzimático bruto pela proteína determinada. Para a enzima imobilizada, o mesmo procedimento foi

utilizado. A atividade específica (AE) foi expressa em unidade de atividade (U) por mililitro (mL) de proteína para o extrato bruto e em unidade de atividade (u) por miligrama (mg) para a enzima imobilizada.

2.1.6 Determinação da retenção

A retenção foi calculada pela equação 2, onde AR é a Atividade Real (atividade da enzima imobilizada) (U) e Ar representa a Atividade Teórica (U):

$$\text{Equação 1} \quad \eta(\%) = \frac{Ps}{Po} \times 100$$

$$\text{Equação 2} \quad Ra(\%) = \frac{AR \times 100}{Ar}$$

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio dos resultados encontrados nas análises de avaliação da relação enzima/tampão, foi verificado que a relação 1:10 não obteve atividade enzimática, sendo desprezada essa relação. Dentre as demais relações a 2:10 e a 3:10 apresentaram as melhores atividades específicas como pode-se verificar na tabela 1.

Os resultados encontrados foram interessantes porque mostraram que não só o tempo é importante no processo, mas também a concentração da solução de enzima. No entanto, há que se considerar que o suporte apresenta uma capacidade de carga que deve ser respeitada, de forma a não utilizar um excesso de enzima que possa causar problemas estéricos ou mesmo impedir a estabilização da enzima (Goulart, 2007).

Tabela 1 - Atividade enzimática específica da enzima livre e imobilizada.

Enzima livre		Enzima imobilizada	
Diluição	Ativ. Específica (U/mg)	Diluição	Ativ. Específica (U/mg)
02:10	325,24	02:10	643,78
03:10	307,52	03:10	975,07
04:10	201,16	04:10	350,92
05:10	211,36	05:10	491,85

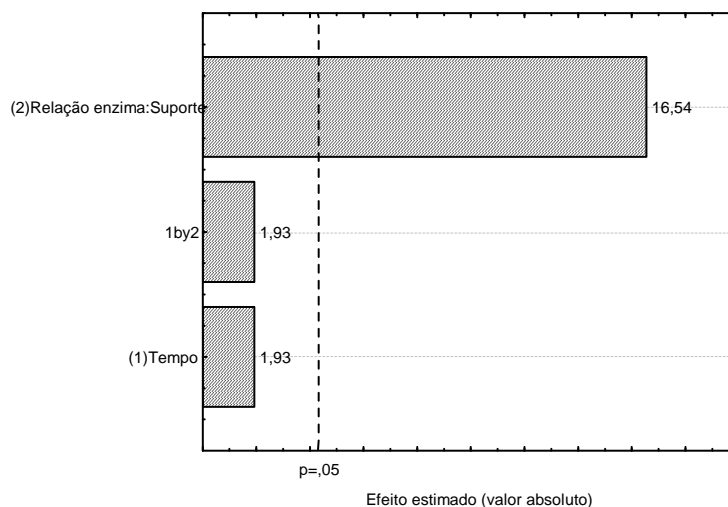


Figura 1 – Efeito das variáveis manipuladas para imobilização da enzima de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Munaretto (2011), imobilizando inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado, obteve uma atividade específica de 2063,52 U/mL. Paula (2007), por meio do microrganismo *var. bulgaricus* imobilizou inulinase em carvão ativado, atingindo atividade específica de 0,34 UA/mg de proteína. Gaspari et al. (1999) estudaram a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em diferentes suportes, como quitina, alginato de sódio, pectina, membrana de diálise e sílica de porosidade controlada (SPC), o qual obteve a maior taxa de imobilização de 73U/g utilizando quitina com glutaraldeído.

Na avaliação do tempo de imobilização foi realizado tratamento dos dados obtendo-se um gráfico de Pareto o qual demonstrou que o tempo não influencia significativamente no processo de imobilização, desta forma 10 minutos foi o suficiente para a adsorção da enzima no suporte. A comparação de valores de atividade específica verificados na tabela 2, confirmam que não há necessidade de um tempo de 120 minutos para a adsorção da enzima no suporte.

Como pode-se observar na tabela 3, apesar do rendimento de imobilização da relação 2:10 ter sido melhor, no entanto verificou-se pela tabela 1, que a atividade específica da diluição 3:10 foi superior, ou seja, no decorrer do processo de imobilização as proteínas que se ligaram ao suporte possuem maior especificidade na hidrólise das moléculas de sacarose.

Tabela 2 – Atividade específica em diferentes tempos de imobilização

Diluição	Atividade específica (U/mg)	
	10 minutos de imobilização	120 minutos de imobilização
2:10	304,49	142,99
3:10	329,64	203,57

Tabela 3 – Rendimento e retenção nas diferentes diluições

Diluição	Rendimento (%)	Retenção (%)
2:10	75,48	21,56
3:10	63,73	42,08

No estudo de Scherer (2010), utilizando diferentes suportes foi observado que o processo de imobilização foi mais eficiente para as argilas KSF, Poço A e K-10, com rendimentos de imobilização superiores e próximos a 50% em relação à quantidade de enzima utilizada no início do processo. Segundo o autor, isto provavelmente se deve à maior afinidade da enzima por estes suportes. Segundo Li et al. (2009), os grupos hidroxilas livres presentes na superfície destes suportes podem formar ligações pontes de hidrogênio com os grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos da enzima, promovendo maior eficiência no processo de imobilização. Além destas forças, uma fraca interação de forças de Van der Waals também pode auxiliar na adsorção da enzima na superfície do suporte.

Kochhar et al. (1998), ao imobilizar a inulinase de *A. versicolor*, obtiveram 56% de retenção da atividade enzimática em quitina e 10% em caseína. Yesiloglu (2005) utilizou argila bentonita para imobilização de lipase de *Candida rugosa* por processo de adsorção, apresentando atividade enzimática de 30% após imobilização. Spagna et al. (1995) imobilizaram uma pectiniliase comercial em bentonita obtendo um rendimento de imobilização de 16% e atividade enzimática de 67U/g.

3 CONCLUSÃO

Por meio do estudo realizado foi encontrada a melhor condição para o processo de imobilização com inulinase não comercial, obtendo a maior atividade enzimática específica com a diluição 3:10 com um valor de 975,07 U/mg, bem como o maior percentual de retenção da enzima (42,08%) no suporte estudado.

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P. Immobilized enzymes. In: Nagodawithana, T e Reed, G. Enzymes in food processing. San Diego: Academic Press, cap. 5, p. 103-119, 1993.
- DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- GASPARI, J. W.; GOMES, L.H.; TAVARES, F. C.A.; Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L. *Scientia Agrícola*, v.56, n.4, p. 1135-1140, 1999.
- GOULART, A. J. Imobilização multipontual de invertase e inulinase em Suportes sólidos: caracterização físico-cinética dos derivados estabilizados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brasil, 2007.
- KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A.; MELLO, E. H. M. The immobilization of enzyme and cells. *Chimicaoggi*, p. 21-29, 1988.
- KOCHHAR, A.; KAUR, N.; GUPTA, A.K. Inulinase from *Aspergillus versicolor*. A potent enzyme for producing fructose from inulin. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 56, p. 721-726, 1998.
- LI, Y., ZHOU, G., LI, C., QIN, D., QIAO, W., CHU, B. Adsorption and catalytic activity of porcine pancreatic lipase on Rod-like SBA-15 mesoporous material. *Colloids and Surfaces. Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 341, p. 79-85, 2009.
- MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*, v. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.
- MUNARETO, C. B. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em carvão ativado e alginato de sódio. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Brasil.
- PAULA, F. C. Imobilização da Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045: Caracterização e Produção de Açúcar Invertido em Biorretor. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2007.
- ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J.; GIBSON, G. R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition*, v. 128, n. 1, p.11-19, 1998.
- RODRIGUES, S. D.; MENDES, A. A.; ADRIANO, S. W.; GONÇALVES, B. R. L e GIORDANO, C. L. R. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on agarose

activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 51, p. 100-109, 2008.

SCHERER, R. P. Estudo da imobilização de lipase comercial de pâncreas suíno em diferentes suportes inorgânicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Brasil, 2010.

SEBRÃO, D.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. G e MOREIRA, M. A. Imobilização de Lipases em filme de caseinato de sódio/Glicerol: Aplicação na síntese de ésteres. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1182-1187, 2007.

SPAGNA, G., PIFFERI, P. G., GILIOLI, E. Immobilization of a pectinlyase from *Aspergillus niger* for application in food technology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 729-738, 1995.

VERACHTERT, H.; DE MOT, R. Yeast: biotechnology and biocatalysis. New York: Marcel Decker, Inc, p. 257-296, 1990.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, 1040p.

YESILOGLU, Y. (2005), Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2155-2159.