

IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* PARA A HIDRÓLISE DE EXTRATOS DE *Helianthus tuberosus* L.

Jefferson Willians de Gaspari^{1,3}; Luiz Humberto Gomes¹; Flavio Cesar Almeida Tavares^{2*}

¹Pós-Graduando do Depto. de Genética - ESALQ/USP.

²Depto. de Genética - ESALQ/USP, C.P. 83 - CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP.

³Bolsista do CNPq.

*e-mail: fcatavar@carpa.ciagri.usp.br

RESUMO: Este trabalho estudou a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em diferentes suportes, com a finalidade de promover a bioconversão da inulina de *Helianthus tuberosus*. A inulina de *H. tuberosus* foi extraída dos tubérculos, desproteinizada e concentrada a 25% de açúcares redutores totais (ART). A inulinase de *K. marxianus* foi concentrada em evaporador rotativo e imobilizada em quitina (com e sem glutaraldeído), alginato sódico (concentrações de 2 e 4%), pectina, membrana de diálise e sílica de porosidade controlada (SPC). Em quitina obteve-se taxas de imobilização de 73 Unidades/g com glutaraldeído e 48 U/g sem glutaraldeído, mas a hidrólise foi baixa em ambos os tratamentos, o equivalente a 2,4% por hora. Em gel de alginato sódico, nas concentrações de 2 e 4%, converteram-se, respectivamente, 12% e 26%, em 1h. A imobilização em pectina foi impossibilitada devido à presença de pectinase no extrato enzimático. A contenção da enzima com o substrato em membrana de diálise proporcionou uma recuperação de 50% do ART em 6h. A SPC apresentou taxa de imobilização de 43 U/g sílica, proporcionando a hidrólise de 43% em 1h, entretanto sua atividade foi se exaurindo rapidamente durante o processo devido à inativação natural da enzima e a conformação dos poros da SPC.

Palavras-chave: *Helianthus tuberosus*, enzima, inulinase, inulina

IMMOBILIZATION OF INULINASE OF *Kluyveromyces marxianus* FOR THE HYDROLYSIS OF EXTRACTS OF *Helianthus tuberosus* L.

ABSTRACT: This experiment studied the immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* in different supports to bioconvert the inulin from *Helianthus tuberosus*. Inulin was extracted from *H. tuberosus* tubers, desproteinized and concentrated to 25% total reducing sugars. Inulinase from *K. marxianus* was concentrated in a rotative evaporator and immobilized onto chitin (with and without glutaraldehyde), sodium alginate (2 and 4%), pectin, a dialysis membrane or controlled-porosity silicate. On chitin, with or without glutaraldehyde, the immobilization rate was 73 and 48 U g⁻¹ respectively. However the hydrolysis of 1g L⁻¹ inulin was very low in both treatments (2.4 % per hour). In sodium alginate gel of 2% and 4% concentration, the conversion was 12% and 26% per hour, respectively. Immobilization onto pectin was not possible due to a high activity pectinase in the enzyme extract. Binding of the enzyme onto dialysis membrane provided recovery of 50% total reducing sugars (42g) in 6h of operation. The controlled-porosity silicate showed an immobilization rate of 43 U g⁻¹ silicate, hydrolyzing 43% of substrate per hour. This activity was, however, exhausted quickly during the process.

Key words: *Helianthus tuberosus*, enzyme, inulinase, inulin

INTRODUÇÃO

Em 1984, nos EUA, os produtores dos refrigerantes Pepsi-cola e Coca-cola, substituíram a sacarose por xarope de frutose de milho de alta concentração (HFCS) (Milcent, 1989; Teague & Arnold, 1983). Várias fontes de adoçantes naturais e sintéticos vêm sendo pesquisadas, cabendo salientar que a hidrólise simples e direta

da inulina de tubérculos de *Helianthus tuberosus* resulta em xaropes com média de 75% de frutose, porcentagem consideravelmente mais elevada do que aquelas obtidas a partir da isomerização de glicose de amido de milho.

A inulina é uma glicofrutana de reserva presente nos tubérculos de alguns membros da família Compositae, notadamente em *H. tuberosus*. É um polissacarídeo linear formado

por aproximadamente 35 resíduos β - D-frutofuranose unidos por ligações β -2,1 com uma terminação de α - D-glucopirranose idêntica à da sacarose (Shallenberg, 1982).

Os tubérculos de *H. tuberosus* apresentam 20 a 26% de matéria seca, da qual 75 a 82% são carboidratos solúveis, sendo 75 a 98% dos açúcares redutores totais (ART) correspondentes a frutose e o restante glicose (Mullin et al., 1994).

A levedura *Kluyveromyces marxianus*, dentre outras avaliadas, mostrou-se eficiente na hidrólise da inulina de *H. tuberosus* (Laguna, 1986), tanto na produção de inulinase como na capacidade fermentativa. Ainda nesta citação, como em outras (Gaspari, 1995; Pereira, 1989; Laguna, 1986), foram estudadas a seleção de leveduras para a hidrólise da inulina; a base genética dos caracteres associados; a produção de álcool; a obtenção de xarope de alta densidade em frutose; a ração animal; a identificação e caracterização das enzimas envolvidas no processo; a determinação dos fatores genéticos e ambientais que influenciam a fermentação e o melhoramento para o aumento da atividade inulinolítica. Contudo, faltou estudar a hidrólise com a inulinase imobilizada, o que se pretende neste trabalho, onde foram considerados os aspectos da produção, extração da enzima e utilização de suportes atóxicos para imobilização, não contaminantes do hidrolizado, de fácil obtenção e manuseio.

MATERIAL E MÉTODOS

A inulinase foi produzida a partir da linhagem MMIII-41 da levedura *K. marxianus*, obtida por Laguna (1986), a qual foi cultivada em meio de cultura YEPS (1% extrato de levedura, 1% peptona e 2% sacarose), mantido a 30°C sob agitação de 180 rpm. O meio fermentado foi centrifugado e o sobrenadante concentrado em 30 vezes em evaporador rotativo, sob pressão de 750 mm Hg a 45 - 48°C, sendo submetido à uma diálise para eliminação de sais e açúcares.

A avaliação da atividade inulinolítica foi feita quantificando-se o açúcar redutor formado pela hidrólise enzimática da inulina, pelo método de Somogy & Nelson, modificado por Laguna (1986).

Imobilização em Quitina

A quitina foi preparada para a imobilização segundo método descrito por

Synowiecki et al. (1987) e esta realizada com 1 g de quitina incubada sob agitação durante 24 horas em 5 mL de solução enzimática pH 7,0, com um total de 178 U da enzima, equivalente a 178 μ mol AR/min. Com ativação da quitina com 2% de glutaraldeído em tampão citrato-fosfato pH 4,5 durante 1 hora, seguido de 3 lavagens com água destilada, foi avaliado o grau de imobilização medindo-se a atividade enzimática do sobrenadante em relação a atividade inicial. A quitina foi acondicionada em uma coluna de 0,5 cm de diâmetro interno, em jaqueta com circulação de água e temperatura controlada de 45°C (Figura 1). A velocidade de passagem do substrato foi de 200 μ L/min, controlada por uma bomba peristáltica. O material hidrolizado foi coletado em intervalos de 30 minutos em tubos de ensaio e ao atingir 1 mL de hidrolizado este era transferido para um tubo com 1 mL do reagente de Nelson, visando interromper a reação, caso houvesse desprendimento da enzima do suporte.

Imobilização em Alginato de Sódio

Alginato de sódio nas concentrações de 2 e 4% foram adicionados em 20 mL de solução enzimática, totalizando 712 U da inulinase. Em seguida, com uma micropipeta, gotejou-se esta suspensão em uma solução de 4% de CaCl_2 sob agitação, obtendo-se pérolas de alginato de aproximadamente 3 mm de diâmetro. Foram realizadas sucessivas lavagens com tampão citrato-fosfato pH 7,0 para eliminar o excesso de enzima do gel, até não mais ser detectada atividade enzimática no tampão de lavagem. A avaliação da imobilização foi feita com 20 g de suporte cataliticamente ativo em 50 mL de 1g/L inulina a 45°C sob agitação.

Imobilização em Pectina

A preparação do gel de pectina seguiu os mesmos procedimentos aplicados ao alginato de sódio, entretanto, não foi possível a obtenção de um gel de pectina com a solução enzimática devido à presença de pectinase no extrato enzimático.

Contenção da Inulinase em Membrana de Diálise

A enzima inulinase foi contida em uma membrana de diálise, utilizando-se 8 metros de membrana de diálise de 1/4" de diâmetro, a qual foi acondicionada na forma de uma espiral em um tubo feito com tela, colocado no interior de um

tubo de acrílico com 4.000mL de água para proporcionar a diálise. Em um banho-maria a 45°C procedeu-se a reação de hidrólise da inulina, com auxílio de uma bomba peristáltica para bombear a solução através do tubo de membrana por toda sua extensão (Figura 2). Assim foram utilizados 500 mL de extrato de *H. tuberosus* com 17% de açúcar redutor total (ART) e 1 mL de solução enzimática com 50 U da enzima.

Imobilização em Sílica de Porosidade Controlada (SPC)

Foi utilizada sílica de porosidade de 180-250 µm, cedida pelo Prof. Dr. Henrique Celso Trevisan, do Instituto de Química da Unesp – Araraquara. Efetuando-se a limpeza, silanização, e ativação da SPC com glutaraldeído. A imobilização da inulinase foi realizada segundo Florêncio (1995), utilizando-se 200mg de SPC e 500µL de solução enzimática, totalizando 9,3 U da enzima.

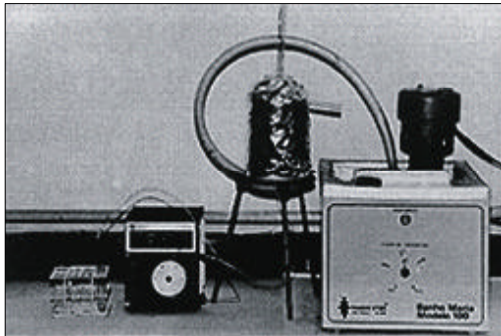


Figura 1 - Coluna de imobilização em quitina.



Figura 2 - Contenção da inulinase em membrana de diálise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a concentração do extrato enzimático em evaporador rotativo, houve uma diminuição em sua atividade enzimática em 13%, devido ao longo tempo (4 horas) de exposição da enzima em temperatura de 45 a 48°C. Essa perda de atividade, apesar de não ter sido considerada alta, pode ser reduzida com equipamentos que suportem pressões maiores, diminuindo a temperatura e o tempo do processo.

Imobilização em Quitina

A imobilização da inulinase em quitina pôde ser confirmada através da análise enzimática do sobrenadante da mistura quitina e extrato enzimático. Após o processo de imobilização, o sobrenadante apresentou 130 U da enzima, das 178 U utilizadas na imobilização, sendo 48 U da inulinase imobilizadas durante o processo. Dessa forma, a taxa de imobilização foi de 48 U/g de quitina.

Foram realizadas cinco coletas, em intervalos de 30 min, obtendo-se: 20, 15, 18, 18 e 17 µg/L de AR gerados pela hidrólise enzimática da inulina. Como o tampão de inulina utilizado tinha a concentração de 100mg/L, considera-se o desempenho da coluna muito baixo, visto que, com um tempo de 5 min de residência do substrato com a enzima, somente 0,2% da inulina foi hidrolizada.

A imobilização com quitina tratada com glutaraldeído apresentou na análise do sobrenadante, 95 U da enzima, das 178 U usadas, indicando uma maior imobilização quando comparada com o tratamento sem glutaraldeído, sendo a taxa de imobilização de 73 U/g de quitina. Entretanto, a avaliação do desempenho da coluna resultou nos seguintes valores: 14, 17, 11, 15 e 19 µg/L AR. O desempenho de ambas as colunas foi considerado muito baixo, sendo a quitina descartada como suporte para imobilização da inulinase de *K. marxianus*.

A inulinase de *Aspergillus ficuum* foi imobilizada em quitina tratada com glutaraldeído (Kim & Rhee, 1989). Em um reator de batelada, a hidrólise foi de 80% em 4 horas e de 90% em 10 horas com 400 mL de extrato de *H. tuberosus* contendo 100 g/L de carboidratos, com 20 g de quitina ativa. A hidrólise completa não foi atingida em 24 horas.

Imobilização em Alginato de Sódio

A avaliação da imobilização em alginato, para ambas as concentrações testadas, pode ser observada na Figura 3.

A eficiência da coluna aumentou consideravelmente com o aumento da concentração do gel, indicando um melhor aprisionamento da enzima. Entretanto, a eficiência desse sistema foi baixa, pois com 20g de suporte em 50mL de substrato após 1 hora de incubação, apenas 12% do substrato foi convertido no gel sem glutaraldeído e 26% no gel com glutaraldeído. As retas de regressão linear foram $y=1,931x-3,5$ e $y=4,307x-3,281$, para as concentrações 2 e 4%, respectivamente. Desse modo, o gel de alginato de sódio foi, nesse trabalho, descartado como suporte da inulinase.

Florêncio (1995) imobilizou a inulinase em alginato de cálcio, com um rendimento de 25% de imobilização, obtendo uma conversão de 28,9% de 8mg AR/mL em 3-6 h de incubação.

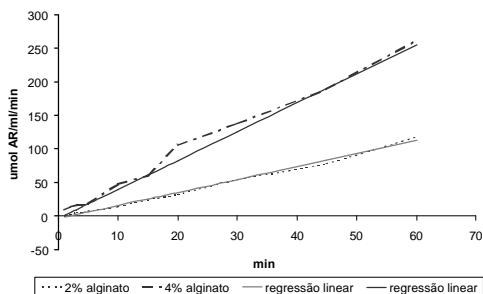


Figura 3 - Tempo de incubação da inulinase imobilizada em alginato, em duas concentrações, pela formação de AR resultante da hidrólise enzimática da inulina, em duas concentrações de alginato.

Contenção da Inulinase em Membrana de Diálise

Na figura 4 observa-se a quantidade de AR recuperado por diálise em função do tempo.

Em 6 horas de funcionamento, 42 g de AR foram recuperados, num total de 85 g (500 mL com 17% ART) em 8 metros de membrana de diálise. A reta de regressão linear foi calculada em $y=7,177x-0,26$ ($r=0,994$). Entretanto, o principal fator que desestimula o desenvolvimento desse reator é a sua dificuldade de manejo, pois a membrana está sujeita a se romper dificultando o seu reparo.

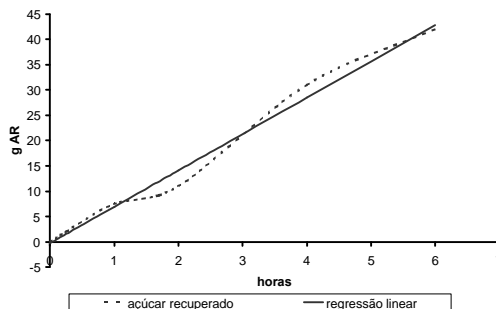


Figura 4 - Quantidade de AR recuperado por diálise em função do tempo.

Imobilização em Sílica de Porosidade Controlada (SPC)

Após a imobilização em SPC, foi feita a avaliação do processo pela análise do sobrenadante. Foram usadas 9,3 U da enzima para a imobilização, sendo que no sobrenadante foi detectado 0,7 U. Portanto, 8,6 U da inulinase foram imobilizadas em 200 mg de SPC. Dessa forma a taxa de imobilização foi de 43 U/g de SPC.

Como a atividade da inulinase imobilizada em sílica demonstrou ser alta e devido às dificuldades em se trabalhar com uma quantidade muito pequena desse material, a avaliação desse suporte foi feita com um tampão de inulina 1%, ao invés de 0,1%.

Após a lavagem da sílica, foi feita a avaliação em 50 mL de tampão 1% de inulina com 200 mg de peso seco de SPC cataliticamente ativa. Foram realizados 3 ensaios em batelada sucessivos com o mesmo suporte para verificar se a atividade mantinha-se ou se exauria-se (Figura 5). Entre um ensaio e outro, foi feita uma lavagem da sílica com tampão sem inulina, e renovado.

Pode se observar pela Figura 5 que vai ocorrendo uma diminuição da atividade da enzima nas bateladas subsequentes. Apesar da enzima não estar se desprendendo do suporte, a atividade enzimática vai diminuindo, indicando inativação da inulinase. O terceiro ciclo de hidrólise teve uma redução média de 37% em relação ao primeiro ciclo. Essa diminuição de atividade é devida a inativação natural da enzima e à conformação dos poros da SPC, que se apresentam em forma cônica, onde as enzimas

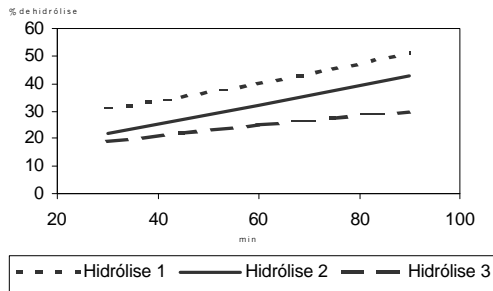


Figura 5 - Avaliação da imobilização da inulinase em SPC em três ensaios consecutivos, em substrato 10g/L inulina a temperatura de 45°C e pH 7,0, com 200 mg de suporte.

mais próximas à superfície vão sendo inativadas, criando uma dificuldade maior para que o substrato penetre no interior dos poros para que ocorra a hidrólise. As retas de regressão linear para as três hidrólises realizadas foram: $y=0,33x+20,6$; $y=0,35x+11,3$ e $y=0,18x+13,6$, respectivamente.

Devido ao sucesso da imobilização da inulinase em SPC, os parâmetros determinados para a enzima na forma livre foram reavaliados para a enzima imobilizada, e os resultados estão na TABELA 1.

A melhor temperatura de reação enzimática é de 45°C e o melhor pH é de 7,0 para a inulinase em sua forma livre. Esses valores contrastam com os dados obtidos por Laguna (1986), o qual determinou valores de temperatura ótima de 40°C e pH ótimo de 4,5, para a inulinase

de *K. marxianus*. Jia & Zhao (1997) determinaram temperatura ótima entre 55-60°C em pH 4,5 para a inulinase de *Aspergillus niger*.

O pH e a temperatura ótimos não sofreram grandes alterações com o processo de imobilização em SPC. A curva de temperatura para a enzima imobilizada sofreu uma ampliação de sua faixa ótima, o que, do ponto de vista operacional é uma vantagem pois o seu controle não precisa ser tão rígido.

Florêncio (1995) imobilizou a inulinase em SPC, notando uma alteração no pH ótimo da enzima para 5,4. A conversão em 2 h de incubação foi de 44,1% (12,2mg AR/mL), com 3,6 mg de suporte ativo por mL.

CONCLUSÕES

O método utilizado proporcionou facilidade para a produção do extrato enzimático, imobilização da enzima em SPC e hidrólise da inulina, realizada em uma única etapa.

A imobilização em SPC proporcionou os melhores resultados dentre outros suportes avaliados embora com perda rápida da atividade enzimática, o que requer avaliar outros processos para a retenção da atividade por mais tempo, nas temperaturas ótimas obtidas.

Os resultados aqui obtidos diferem dos da literatura por apresentar a inulinase uma grande diversidade entre os microrganismos (Laguna, 1986), desse modo, os resultados seriam melhor comparados com organismos do gênero *Kluyveromyces*.

TABELA 1 - Comparação entre as atividades da inulinase em sua forma livre e imobilizada em SPC em função da temperatura e pH.

Temperatura (°C)	Atividade Enz. Livre $\mu\text{mol/AR/mL/min}$	Atividade Enz. Imobil. $\mu\text{mol/AR/mL/min}$	pH	Atividade Enz. Livre $\mu\text{mol/AR/mL/min}$	Atividade Enz. Livre $\mu\text{mol/AR/mL/min}$
25	33,33 a	10,5 a	3	2,551 a	0,5 a
30	76,19 b	17,0 b	4	6,037 b	1,3 b
35	85,71 c	21,6 c	5	9,438 c	3,9 c
40	90,48 c	34,6 d	6	21,171 d	6,6 d
45	119,05 d	34,4 d	7	34,945 e	16,2 e
50	95,24 c	34,1 d	8	15,654 f	8,8 f

* Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes segundo teste F ao nível de 5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FLORÊNCIO, J.A. Imobilização de inulinase I fúngica e inulinase II bacteriana utilizando vários suportes. Curitiba, 1995. 79p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
- GASPARI, J.W. Seleção e melhoramento de linhagens de *Kluyveromyces marxianus* quanto à atividade inulinolítica. Piracicaba, 1995. 36p. Monografia (Graduação) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- JIA, Y.M.; ZHAO, X.H. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger* M89. **Journal of Hebei Agricultural University**, v.20, n.1, p.46-50, 1997.
- KIM, C.H.; RHEE, S.K. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. **Biotechnology Letters**, v.11, n.3, p.201-206, 1989.
- LAGUNA, S.E. Genética e melhoramento de leveduras para a bioconversão de extratos de *Helianthus tuberosus* L. Piracicaba, 1986. 173p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MILCENT, P.F. Contribuição ao estudo da hidrólise contínua da sacarose por catálise heterogênea em leito de resina trocadora de íons. Curitiba, 1989. 262p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
- MULLIN, W.J.; MODLER, H.W.; FARNWORTH, E.R.; PAYNE, A. The macronutrient content of fractions from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*). **Food Chemistry**, v.51, n.3, p.263-269, 1994.
- PEREIRA, G.A.G. Atividade inulinolítica extracelular em *Kluyveromyces marxianus*. Piracicaba, 1989. 152p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SHALLENBERGER, R.S. **Advanced sugar chemistry**: principles of sugar stereochemistry. Connecticut: AVI Publishing, 1982. 323p.
- SYNOWIECKI, J.; SIKORSKA-SIONDALSKA, A.; EL-BEDAWAY, A.E. Adsorption of enzymes on krill chitin modified with carbon disulfide. **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, p.352-354, 1987.
- TEAGUE, J.R.; ARNOLD, E.C. UOP technology for the production of fructose sweeteners. **Sugar y Azucar**, v.78, n.8, p.18-19, 1983

Recebido para publicação em 30.03.99

Aceito para publicação em 23.08.99