

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

Jefferson Willians de Gaspari<sup>1,3</sup>; Luiz Humberto Gomes<sup>1</sup>; Flavio Cesar Almeida Tavares<sup>2\*</sup>

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

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

<sup>3</sup>Bolsista 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<sup>-1</sup> respectively. However the hydrolysis of 1g L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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  $\beta$  - D-frutofuranose unidos por ligações  $\beta$ -2,1 com uma terminação de  $\alpha$  - 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\text{CaCl}_2$  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.

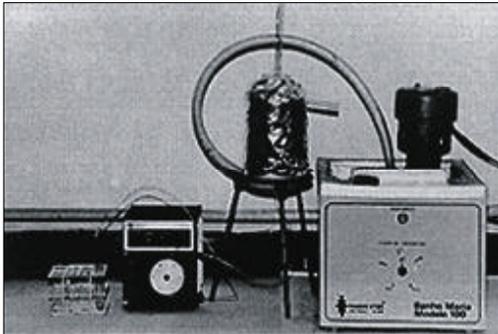


Figura 1 - Coluna de imobilização em quitina.

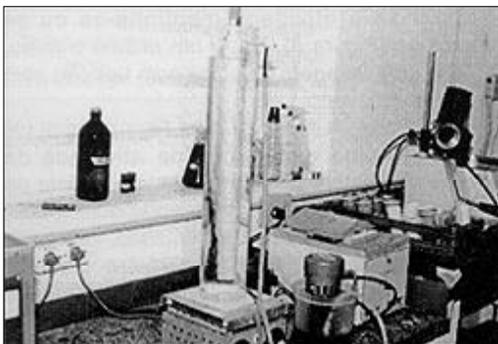


Figura 2 - Contenção da inulinase em membrana de diálise.

## 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.

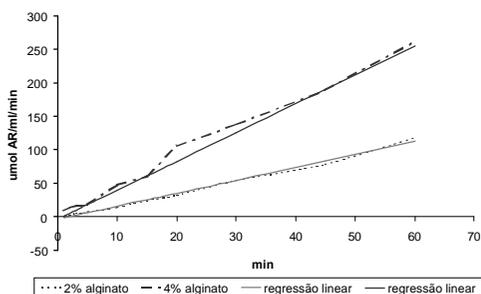


Figura 3 - Tempo de incubação da inulinase imobilizada em alginato, em duas concentrações, pela formação de AR resultante da hidrólise enzimática da inulina, em duas concentrações de alginato.

### 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.

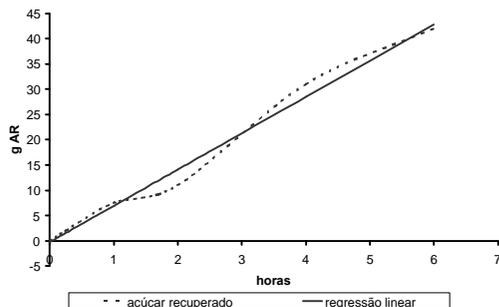


Figura 4 - Quantidade de AR recuperado por diálise em função do tempo.

### 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

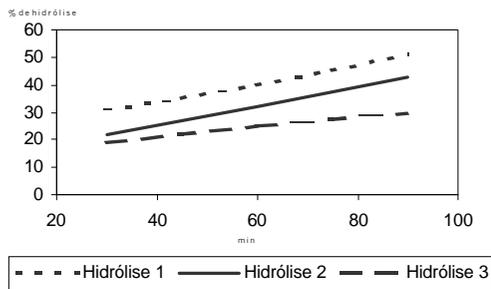


Figura 5 - Avaliação da imobilização da inulinase em SPC em três ensaios consecutivos, em substrato 10g/L inulina a temperatura de 45°C e pH 7,0, com 200 mg de suporte.

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