

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA INULINASE PRODUZIDA PELA LEVEDURA *PSEUDOZYMA SP* (CCMB 300)

**Geise Camila de Araújo Ribeiro<sup>1</sup>, Sandra Aparecida de Assis<sup>2</sup>, Diego Sampaio Nascimento<sup>3</sup>, Gildomar Lima Valasques Junior<sup>4</sup>**

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [gkmila\\_ribeiro@yahoo.com.br](mailto:gkmila_ribeiro@yahoo.com.br)
2. Orientadora, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [sandrinhaassis@yahoo.com.br](mailto:sandrinhaassis@yahoo.com.br)
3. Aluno de mestrado do Programa de pós graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [diegouefs@hotmail.com](mailto:diegouefs@hotmail.com)
4. Aluno de mestrado do Programa de pós graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [jrvalasques@gmail.com](mailto:jrvalasques@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** inulinase, leveduras, otimização.

### INTRODUÇÃO

A exploração de espécies da região semi-árida, como a aplicação de inulinases produzidas por leveduras do semi-árido baiano para obtenção de frutose, se torna uma alternativa viável para a indústria, podendo contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico, bem como a sustentabilidade da região.

As enzimas inulinases (endoinulinases ou exoinulinases) são secretadas, em condições ótimas, por leveduras (fungos unicelulares) e possuem a capacidade de hidrolisar a inulina, um carboidrato do grupo de polissacarídeos chamado frutanas, cuja cadeia principal é composta por unidades de frutose com uma unidade terminal de glicose. A inulina é, portanto, uma fonte potencial para a produção industrial de concentrados de frutose.

Segundo Gern et al (2000, p. 73) “As endoinulinases quebram a molécula de inulina em diferentes pontos da cadeia, em uma única etapa enzimática, produzindo inulo-oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização [...]”. Já as exoinulinases podem hidrolisar completamente a inulina, produzindo concentrado de frutose com cerca de 95% de pureza, em uma única etapa enzimática (KATO et al, 1999 apud PESSONI et al, 2004).

A enzima inulinase também possui características físico-químicas que a torna atrativa para a indústria, como, por exemplo, sua estabilidade em valores de pH baixo e a altas temperaturas, características essas que proporcionam um menor risco de contaminação microbiana (MAKINO, 2004).

As reações enzimáticas se modificam com a temperatura e com o pH. Com o aumento da temperatura ocorre o aumento da velocidade de reação em função da maior energia das moléculas, o resultado destas interações é um perfil com uma velocidade máxima a uma temperatura denominada de temperatura ótima e em seguida a desnaturação da enzima. Em relação ao pH, observa-se o mesmo comportamento que a temperatura em função de três fenômenos independentes: desnaturação irreversível das enzimas em valores extremos de pH, em função da perda da estrutura pela ruptura; a ionização do substrato ou o estado de ionização da enzima. Assim como na temperatura, existe um determinado valor de pH em que a concentração da forma ativa é máxima, acarretando uma atividade máxima, denominado pH ótimo. (TREICHEL, 2004).

Em estudos que visam à determinação dos valores ótimos de temperatura e pH de enzimas, podem-se empregar planejamentos experimentais como o Doehlert ou Matriz Doehlert. Para duas variáveis, o planejamento Doehlert é formado por um ponto central e seis

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

pontos adicionais, formando um hexágono regular, sendo o ponto central repetido 3 vezes, totalizando o número de 9 experimentos, conforme Doehlert (1970).

O objetivo do presente trabalho foi a otimização dos processos de produção e de atividade enzimática da enzima inulinase produzida pela levedura *Pseudozyma sp* (CCMB 300).

## METODOLOGIA

A levedura *Pseudozyma sp* (CCMB 300), isolada de flor da região semi-árida da Bahia, Brasil, foi obtida na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB) da UEFS. A levedura foi crescida em meio ágar YM, diluída em solução salina estéril e 10% (v/v) do crescimento diluído inoculado em frascos contendo o meio mineral (extrato de levedura, 1 g; glicose, 10 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,5g;  $\text{MgSO}_4$ , 0,25g;  $\text{CaCl}_2$ , 0,25 g;  $\text{H}_2\text{O}$  1 L, pH 5,0) para a fermentação.

A fermentação foi realizada utilizando-se uma incubadora do tipo shaker, sob agitação de 150 rpm, 28° C, por 48 h obtido conforme Oliveira (2007). O fermentado foi então centrifugado (10000 rpm, 10 min, a 4° C) e o sobrenadante foi armazenado em tampão acetato 0,05M, pH 5,5.

A otimização da produção enzimática foi realizada variando-se a quantidade de glicose e extrato de levedura no meio de cultura do micro-organismo. No planejamento Doehlert realizado, a variável glicose foi estudada em 5 níveis e a variável extrato de levedura em 3 níveis, sendo os valores no ponto central de 1,0 g/L de glicose e 0,1 g/L de extrato de levedura.

A otimização da caracterização enzimática foi realizada variando-se os valores de pH e temperatura da atividade da enzima sobre o substrato inulina, sendo os valores no ponto central de pH 7,0 e temperatura 50 °C. A faixa de pH e temperatura estudada teve como base resultados da literatura.

A determinação da atividade da enzima sobre o substrato em ambas as otimizações foi realizada pelo método do DNS descrito por Miller (1959). Os resultados obtidos nas atividades enzimáticas foram comparados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gráfico de superfície resposta da Figura 1 mostra a influência da glicose e do extrato de levedura na produção de inulinase.

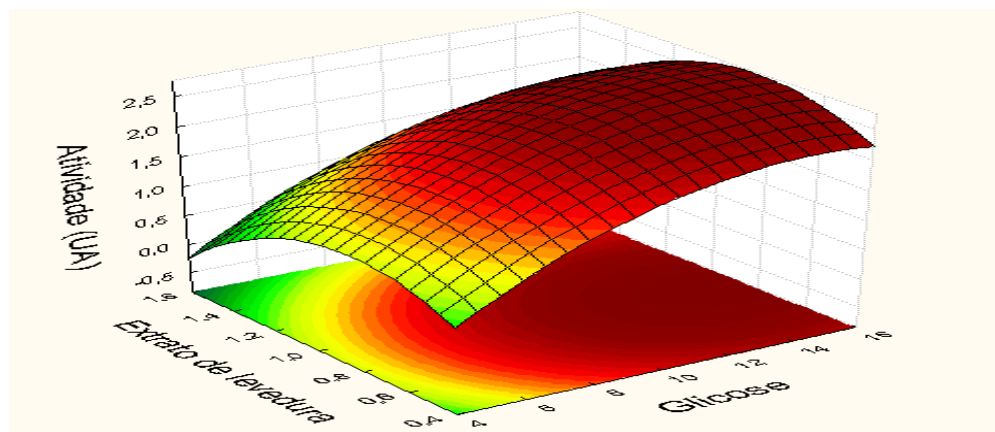


Figura 1: Superfície de resposta da influência da glicose e do extrato de levedura na produção de inulinase por *Pseudozyma sp* (CCMB 300).

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

A partir dos resultados obtidos pode-se observar na Figura 2 que a região na qual a produção de inulinase foi máxima compreende concentrações maiores que 10 g/L de glicose e entre 0,4 a 1,2 g/L de extrato de levedura.

A análise de variância demonstra que o modelo foi bem ajustado, obtendo-se um valor de  $r^2$  igual a 0,99. O valor de F calculado (348,3) foi maior que o F tabelado (9,01), demonstrando que a função está bem ajustada às respostas obtidas.

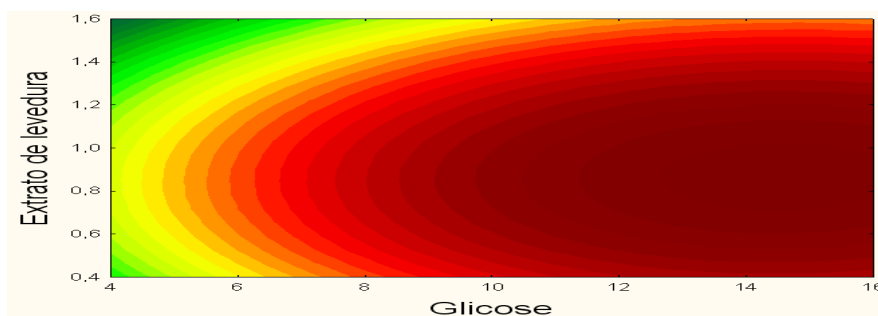


Figura 2: Gráfico de área – influência da glicose e do extrato de levedura na produção de inulinase por *Pseudozyma sp* (CCMB 300).

Na Figura 3 tem-se o gráfico superfície de resposta obtido na otimização da caracterização enzimática de inulinase no qual se verifica a influência da temperatura e do pH sobre a atividade da enzima.

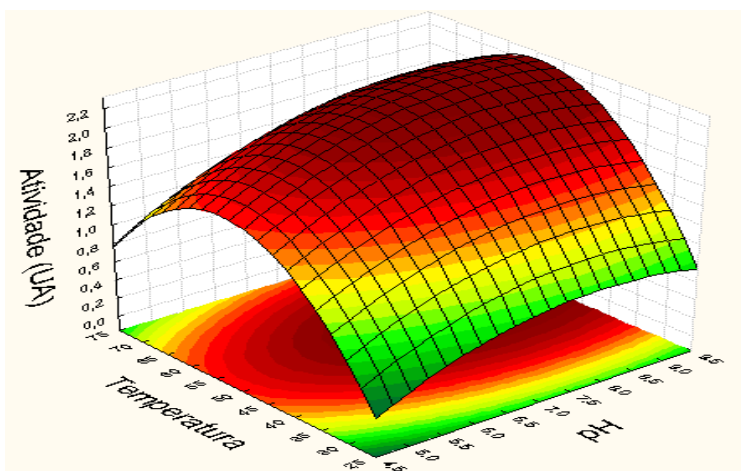
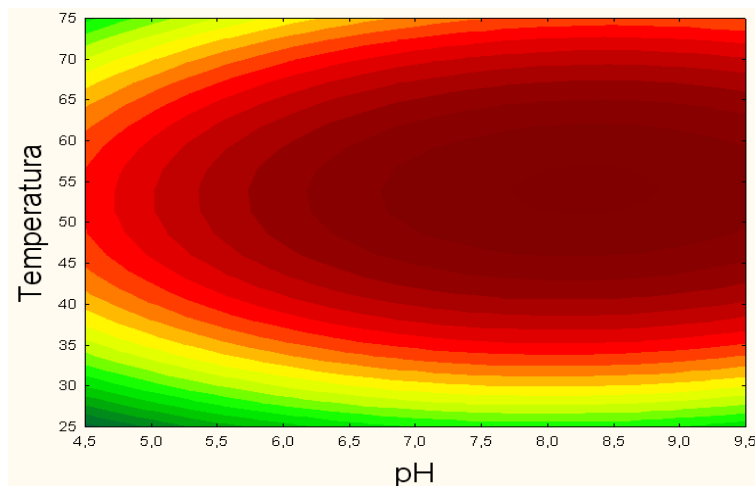


Figura 3: Gráfico superfície de resposta – caracterização enzimática da inulinase produzida por *Pseudozyma sp* (CCMB 300).

A partir dos resultados obtidos pode-se observar (Figura 4) que os valores ótimos nos quais houve maior atividade da enzima são a temperatura entre 45 e 60 °C e pH em torno de 7,0.



Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

Figura 4: Gráfico de área – caracterização enzimática da inulinase produzida por *Pseudozyma sp* (CCMB 300).

A validade dos modelos obtidos através do planejamento experimental pode ser observada pela análise de variância (ANOVA), obtendo um valor de  $r^2$  igual a 0,95.

O presente trabalho demonstrou que há influência tanto da concentração de glicose quanto da concentração do extrato de levedura na produção de inulinase por *Pseudozyma sp* (CCMB 300), bem como há influência da temperatura e do pH na atividade enzimática da inulinase sobre a inulina. Conforme o exposto, a região na qual houve otimização da produção e da atividade de inulinase pode ser explorada propiciando o uso industrial de produtos obtidos de recursos da região semi-árida, a fim de contribuir para o conhecimento da biodiversidade e o aproveitamento do potencial biotecnológico, com o incentivo da aplicação desses recursos no desenvolvimento de novos processos industriais.

## REFERÊNCIAS

- DOEHLERT, D. H. 1970. *Applied Statistical Science*, [s. l.], v. 19, p. 231.
- GERN, R. M. et al. 2000. Utilização do extrato de chicória na produção de endo-inulinas por *Paenibacillus sp*. *Revista Saúde e Ambiente*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 73-76, nov.
- MAKINO, Y. 2004. Seleção de linhagens de *Kluyveromyces* produtoras de inulinase visando a obtenção de frutooligossacarídeos: caracterização na enzima e otimização das etapas de produção e purificação. 194 f. Universidade Estadual de Campinas, Tese.
- MILLER, G. L. 1959. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. *Analytical Chemistry*, [s.l], v.31, n. 3, p. 426-428.
- NOGUEIRA, R. I. 2002. *Processo de obtenção de inulina de chicória (Cichorium intybus) em pó*. 151 f. Universidade Estadual de Campinas, Tese.
- OLIVEIRA, R.Q. 2007. *Bioprospecção de microrganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do Semi-árido baiano*. Univ Estadual de Feira de Santana, MSc diss.
- PESSONI, R. A. B. et al. 2004. Produção de concentrados de frutose por inulinas de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. *Ciência e tecnologia de alimentos*, Campinas, v. 24, n. 3, p. 373-377.
- TREICHEL, H. 2004. Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados. 111 f. Universidade Estadual de Campinas, Tese.