

# ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E DA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA INULINASE PRODUZIDA PELA LEVEDURA *RHODOTHUROLA MUCILAGINOSA* (CCMB 33d1)

**Geise Camila de Araújo Ribeiro<sup>1</sup>, Sandra Aparecida de Assis<sup>2</sup>, Gildomar Lima Valasques Junior<sup>3</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: [jrvalasques@gmail.com](mailto:jrvalasques@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** inulinases, leveduras, imobilização.

## INTRODUÇÃO

A região semi-árida baiana possui uma grande variedade de micro-organismos que podem ser empregados em processos industriais, destacando-se as leveduras, fungos unicelulares secretores de enzimas como as inulinases, usadas na hidrólise do carboidrato inulina para obtenção de concentrados de frutose.

A inulinase possui condições físico-químicas que a torna atrativa para a indústria, no entanto, como toda enzima está sujeita à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos havendo a necessidade de protegê-las da interação com o meio no qual é realizada a reação (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos tem sido amplamente empregada para proteger e obter estabilidade da amostra enzimática durante o processo catalisado pela mesma (VIEIRA, 2009). A imobilização tem como principal característica o uso de alguma estrutura física de confinamento, forçando a enzima a permanecer em uma região particular de um biorreator e apresentando vantagens como a possibilidade de uso em processos contínuos, o aumento da estabilidade da enzima, redução do volume de reação, a regeneração e o reaproveitamento da enzima, e, conseqüentemente, a redução dos custos (Borzani et al., 2001).

A imobilização pode ser realizada através da ligação da enzima a suportes sólidos insolúveis, seja por adsorção ou da ligação da enzima ao suporte, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, ou por confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (Santos, 2010).

Em estudos que visam à otimização de parâmetros em procedimentos biotecnológicos, podem-se empregar planejamentos experimentais como Doehlert ou Matriz Doehlert, que para duas variáveis é formado por um ponto central e seis pontos adicionais, formando um hexágono regular, sendo o ponto central repetido 3 vezes, totalizando o número de 9 experimentos (Doehlert, 1970).

O objetivo do presente trabalho foi otimizar o meio mineral de produção da inulinase produzida pela levedura *Rhodothurola mucilaginosa* (CCMB 33d1) e utilizar a enzima otimizada no estudo da imobilização, comparando a atividade dessa enzima livre e imobilizada.

## METODOLOGIA

A levedura *Rhodothurola mucilaginosa* (CCMB 33d1) foi obtida na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB) da UEFS. As leveduras foram crescidas em meio ágar YM, diluídas em solução salina estéril e 10% (v/v) do crescimento diluído inoculado em frascos contendo o meio mineral (extrato de levedura; glicose; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,5g; MgSO<sub>4</sub>, 0,25g; CaCl<sub>2</sub>, 0,25 g; H<sub>2</sub>O 1 L, pH 5,0) para a fermentação. 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 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 enzima inulinase otimizada foi, então, imobilizada nos suportes sólidos sílica e celite. Para realização do procedimento, utilizou-se a massa de 0,5 g de cada suporte sólido. Ao suporte foi adicionado 2 mL de extrato enzimático, deixando a mistura sob agitação constante de 60 rpm, a 25 °C, por 1,5 h. Em seguida, coletou-se o sobrenadante e lavou-se o suporte com 3 mL de água destilada por 5 vezes, para retirar o excesso de extrato enzimático que não se ligou ao suporte. Após secagem, adicionou-se a enzima imobilizada a quantidade de 2 mL de substrato enzimático (inulina), deixando-se a mistura sob agitação constante de 60 rpm, a 50°C, por 15 min. Após o completado o tempo de reação, coletou-se 1 mL do sobrenadante e ao mesmo foi adicionado 1 mL de reagente ácido DNS para realização da dosagem de açúcar redutor, Miller (1959). Para cálculo da atividade da enzima imobilizada foi realizada a dosagem de açúcar redutor da enzima livre, em UA, também pelo método DNS, e obteve-se a atividade imobilizada através da equação 1. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

$$\text{Atividade imobilizada} = \frac{\text{Atividade (UA)}}{\text{Massa do suporte sólido (g)}} \quad (\text{equação 1})$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No planejamento realizado para otimização da produção da enzima inulinase por levedura da linhagem *Rhodothurola mucilaginoso* (CCMB 33d1), obteve-se as maiores atividades nos pontos em que a concentração de glicose e de extrato de levedura foi, respectivamente, 1,25 g/L e 0,05 g/L, como pode ser observado nas Figuras 1 e 2.

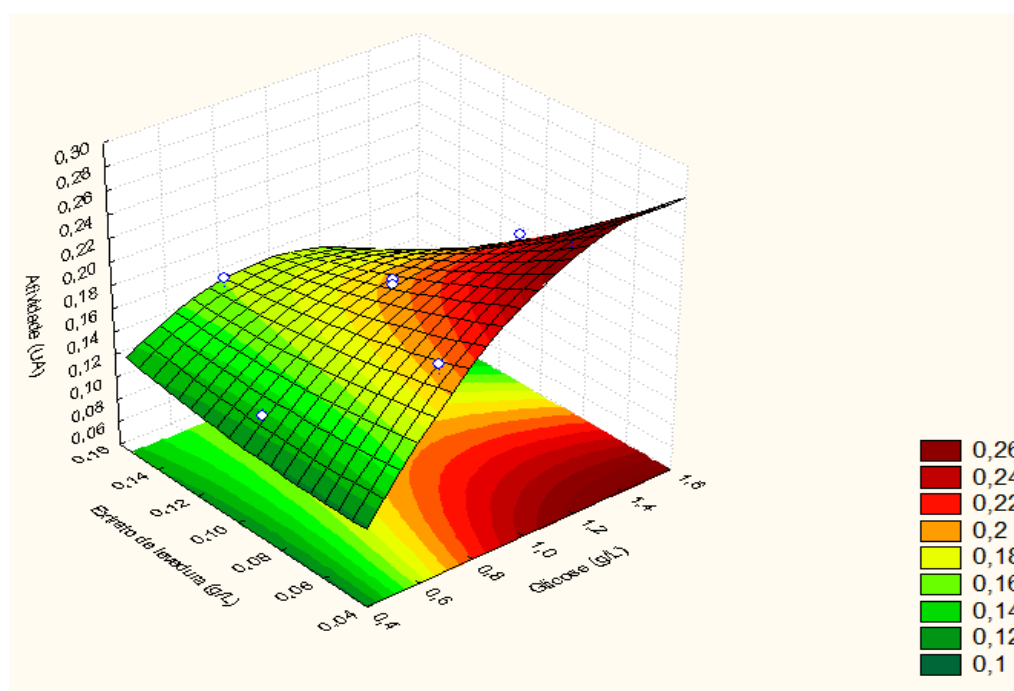


Figura 1: Gráfico de superfície de resposta – influência da glicose e do extrato de levedura na produção de inulinase por *Rhodothurola mucilaginoso* (CCMB 33d1).

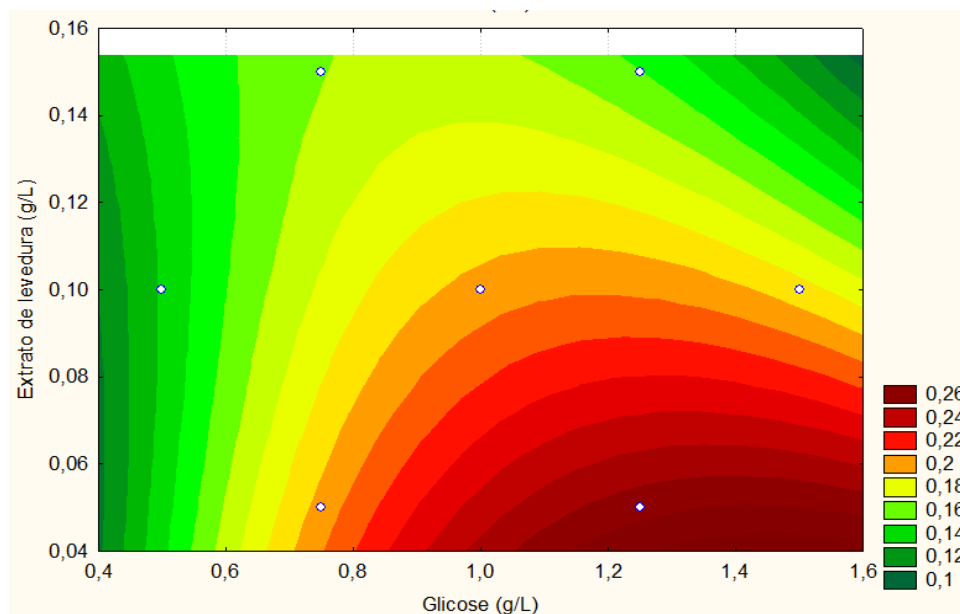


Figura 2: Gráfico de área – influência da glicose e do extrato de levedura na produção de inulinase por *Rhodothurola mucilaginosa* (CCMB 33d1).

A análise do gráfico de Pareto (Figura 3) demonstra que houve influência tanto da quantidade de glicose quanto da quantidade de extrato de levedura no meio mineral de fermentação da linhagem de levedura em estudo, pois a concentração de ambas apresenta  $p > 0,05$ .

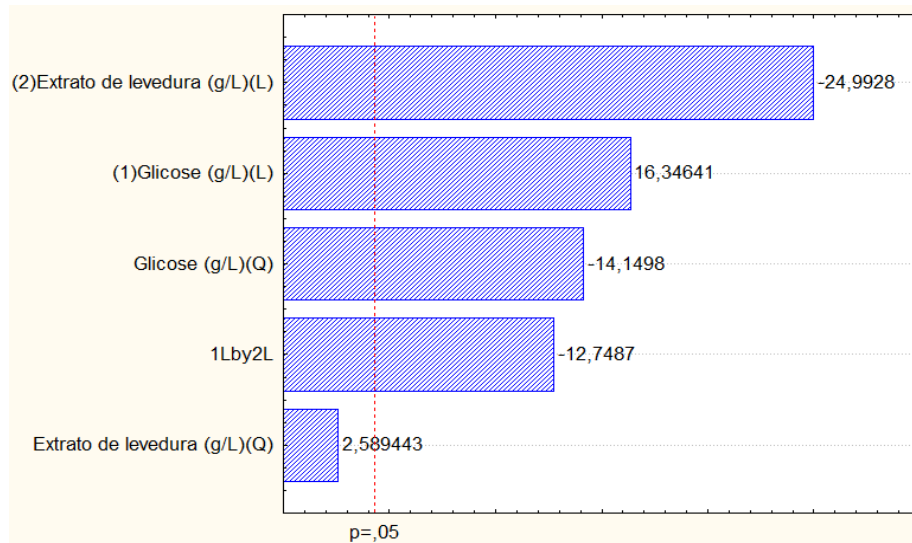


Figura 3: Gráfico de Pareto da influência da concentração de glicose e de extrato de levedura na produção de inulinase por *Rhodothurola mucilaginosa* (CCMB 33d1).

A análise de variância (ANOVA) demonstra que o modelo foi bem ajustado, obtendo um valor de  $R^2$  igual a 0,96957. O F calculado (19,11) é maior que o F tabelado (9,01) mostrando que a função está bem ajustada às respostas obtidas (Figura 18).

As amostras fermentadas nos pontos ótimos foram, então, aplicadas na imobilização. A enzima inulinase foi imobilizada nos suportes sólidos sílica e celite. Após o procedimento de imobilização, realizou-se a dosagem de açúcar redutor, conforme Miller (1959), no qual se obteve os resultados mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade enzimática da imobilização da enzima inulinase em diferentes suportes.

Linhagem de Levedura	Resposta		
	Atividade da enzima livre (UA)	Atividade enzima imobilizada em sílica (UA)	Atividade enzima imobilizada em celite (UA)
<i>Rhodothurola mucilaginosa</i> (CCMB 33d1)	1,3642	0,7168	1,9526

A imobilização realizada foi por meio de adsorção ou ligação da enzima ao suporte, como ligação covalente, que ocorre no caso da sílica. Observou-se que a inulinase produzidas pela levedura CCMB 33d1 apresenta aumento da sua atividade enzimática quando imobilizada no suporte celite e redução da atividade ao ser imobilizada no suporte sílica. Esse resultado pode ser explicado devido possíveis alterações sofridas pela enzima na imobilização, como, por exemplo, o impedimento estérico, que inviabiliza a ligação da enzima ao substrato.

O resultado obtido para imobilização com celite demonstra que possíveis alterações ocorridas na conformação da enzima devido a ligação da inulinase ao suporte não prejudicaram a ligação da mesma com o substrato. O aumento da atividade enzimática da inulinase devido ligação a suportes sólidos pode ser justificado pelo favorecimento da ligação do substrato com a enzima, devido mudanças conformacionais causadas pela ligação da enzima ao suporte, como também pode ocorrer devido ao aumento da estabilidade da enzima na solução do meio reacional. Dessa forma, torna-se interessante a aplicação da enzima inulinase imobilizada em procedimentos de interesse industrial, como na hidrólise da inulina, sendo necessária a otimização das técnicas de imobilização de enzimas para obtenção de resultados mais eficazes.

## REFERÊNCIAS

- BORZANI, W. et al. *Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica*. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2011.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. 2004. Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. *Qui. Nova*, [s.l.], 27(4): 623-630.
- DOEHLERT, D. H. 1970. *Applied Statistical Science*, [s. l.], 19: 231.
- MILLER, G. L. 1959. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. *Analytical Chemistry*, [s.l.], 31(3): 426-428.
- OLIVEIRA, R.Q. 2007. *Bioprospecção de microrganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do Semi-árido baiano*. Univ Estadual de Feira de Santana, Dissertação.
- SANTOS, A. F. dos. 2010. *Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar*. 93 f. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Dissertação.
- VIEIRA, D. C. 2009. *Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação*. 96 f. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Dissertação.