

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR *YARROWIA LIPOLYTICA*

U. S. SOUZA¹, P. M. B. NUNES¹, P. F. F. AMARAL¹ e M. H. M. ROCHA-LEÃO¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica
E-mail para contato: ully_siqueira@ymail.com

RESUMO – A enzima inulinase (2,1- β -D frutanolidrolase) pode ser aplicada na produção de xaropes com alto teor de frutose, pois realiza a hidrólise enzimática da inulina, produzindo frutose e frutooligossacarídeos (FOS). Esta enzima pode ser obtida a partir de plantas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras. A hidrólise da inulina apresenta grande importância na indústria de alimentos e também para a produção de etanol e acetona. O presente trabalho teve como objetivo principal estudar a utilização da inulina, polímero de reserva vegetal, como fonte de carbono por *Yarrowia lipolytica* e avaliar a produção de inulinase por esta levedura. Para tal, a levedura foi inoculada no meio ME contendo inulina, glicerol ou glicose como fontes de carbono. As células foram cultivadas a 28°C, 250 rpm. A biomassa celular e a concentração de substrato foram monitoradas ao longo do cultivo. Os resultados mostram que glicose e glicerol são fontes de carbono melhores para essa levedura. Em inulina houve crescimento lento, mas detectou-se atividade da inulinase. Portanto, esse estudo indica que *Y. lipolytica* tem potencial para produzir inulinase.

1. INTRODUÇÃO

A inulina é um polímero constituído de cadeias lineares de frutose com ligação do tipo β -2,1-D-frutofuranose terminadas com resíduos de glicose (Trivedi *et al.*, 2012). É muito utilizada na indústria de alimentos, pois sua composição confere sabor ligeiramente doce sem alterar o produto final e, por apresentar características peculiares, como a baixa solubilidade em água e capacidade de aumentar a viscosidade do meio, pode ser incorporada a barras de cereais e substituir a gordura em determinados produtos alimentícios (Pimentel *et al.*, 2012).

Inulinases (2,1- β -D-frutanos fructanolidrolases, CE 3.2.1.7) catalisam a hidrólise da inulina, produzindo inulo-oligossacarídeos, frutose e glicose como principais produtos (Neagu & Bahrim, 2011). Entre as enzimas industriais, a inulinase tem recebido muita atenção por poder ser amplamente aplicada na produção de etanol e por ser muito eficiente no preparo de xarope de frutose a partir de inulina (Dilipkumar *et al.*, 2011). Diferentes microrganismos são capazes de produzir inulinases, entre eles, as leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia guilliermondii* (Cazetta *et al.*, 2005, Gong *et al.*, 2007) e os fungos filamentosos *Penicillium janczewskii* e *Aspergillus niger* (Pessoni *et al.*, 2004; Souza-Motta *et al.*, 2005).

Esta levedura não é considerada patogênica, provavelmente devido a sua incapacidade de sobreviver acima de 35°C (Pérez-Campos & Dominguez, 2001). Além disso, excreta

várias enzimas, como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (Nicaud *et al.*, 2002).

O presente trabalho se propôs a avaliar a capacidade de *Y. lipolytica* de utilizar a inulina como fonte de carbono para seu crescimento e otimizar a produção da enzima inulinase durante o cultivo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

A levedura utilizada no presente trabalho foi uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (Hagler & Mendonça-Hagler, 1981). As células são conservadas por repiques regulares em tubo de ensaio com meio YPD (“*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*”) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e solidificado com agar-agar 2%. Após incubação a 28°C por 48 horas na estufa, as culturas são refrigeradas a 4°C.

2.2. Obtenção do Inóculo e Cultivo em Diferentes Condições

As células foram primeiramente cultivadas em erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio YPD (2% glicose; 2% peptona; 1% extrato de lêvedo, m/v) em um incubador rotatório a 28°C e 160 rpm. Os experimentos com diferentes condições de cultivo foram realizados a fim de se estudar a influência da fonte de carbono e aeração do sistema, no crescimento celular de *Yarrowia lipolytica*.

Após 48 horas foram centrifugadas e inoculadas no meio ME (extrato de lêvedo 0,5% e meio mineral K₂HPO₄ 12 g/L, Na₂HPO₄ 12 g/L, MgSO₄.7H₂O 1,5 g/L, CaCl₂.2H₂O 0,15 g/L, FeCl₃.6H₂O 0,15 g/L, ZnSO₄.7H₂O 0,02 g/L, MnSO₄.H₂O 0,06 g/L) contendo inulina, glicerol ou glicose como fontes de carbono. A inulina apresenta solubilidade somente em água quente (Vendrell-Pascuas, et al., 2000), deste modo esta foi aquecida a 50°C até sua total solubilização. As células foram inoculadas em quantidade suficiente para obter-se uma concentração inicial de células de 1 g/L e incubadas em incubador rotatório a 28°C e 250 rpm.

2.3. Crescimento Celular

O crescimento celular de *Y. lipolytica* estudado em três diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol e inulina) foi monitorado por medidas de densidade óptica a 570 nm e em espectrofotômetro UV-Vis Bel Photonics e esses valores convertidos para mg p.s. cél /mL usando-se um fator de conversão previamente determinado em curva de peso seco.

2.4. Atividade Enzimática

As amostras retiradas ao longo do experimento foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática de acordo com Pessoa Junior (1995). Para isso, 0,20 mL de solução que continha a enzima foi misturada em um tubo de ensaio com 0,8 mL de inulina 2%, Tampão citrato-fosfato a 50°C, durante 10 minutos, utilizando o reagente ácido 3,5-dinitrosílico (DNS), com método adaptado de Miller (1959) e Kameda (2007). A leitura foi realizada a 540 nm.

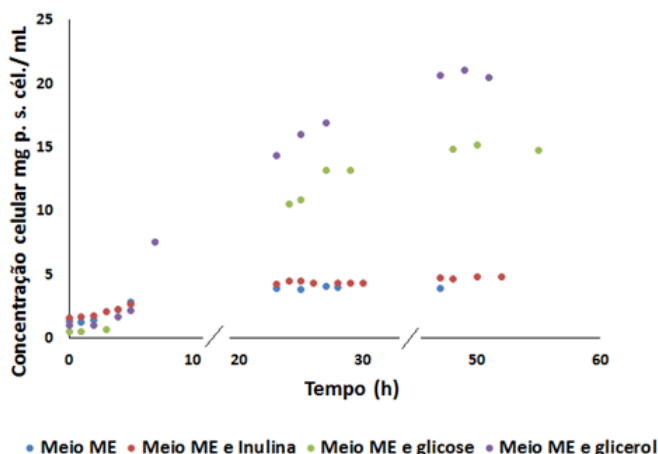
Uma unidade de atividade da inulinase (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a hidrólise da inulina, com a formação de um micromol (μmol) de frutose por minuto, nas condições do teste segundo Pessoa Junior (1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação do Crescimento Celular em Diferentes Fontes de Carbono

Na avaliação do comportamento para produção de biomassa celular e enzimas por *Yarrowia lipolytica* utilizando inulina, esta foi comparada a outras duas fontes de carbono. O crescimento de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 utilizando glicerol e glicose já foi avaliado em estudos anteriores (Pereira-Meirelles, 1997; Amaral, 2003). No entanto, o comportamento da levedura frente à inulina ainda é desconhecido. A Figura 1 apresenta os perfis de crescimento da levedura *Y. lipolytica* cultivada em frascos erlenmeyer contendo meio de cultura com glicose, glicerol e inulina como fonte de carbono em meio mineral.

Figura 1 - Cinética de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* na presença de glicose, glicerol e inulina como fontes de carbono em meio ME cultivada em frascos erlenmeyer.



As cinéticas de crescimento celular apresentadas na Figura 1 mostram que os meios contendo glicose e glicerol favoreceram o crescimento da levedura, com uma maior produção de biomassa em 24 h de cultivo. Isso também é evidenciado na Tabela 1, que apresenta os parâmetros cinéticos dos cultivos. Porém, em meio ME e meio ME com inulina, o crescimento celular foi discreto, sendo ligeiramente maior no segundo. Portanto, os meios de cultura contendo inulina e extrato de lêvedo não favoreceram o crescimento celular, nestas condições.

Tabela 1 - Taxa específica de crescimento celular (μ) e variação de biomassa (ΔX) de *Y. lipolytica*, na presença de diferentes fontes de carbono;

Substrato	Δx_{24h} (mg p s cél./mL)	μ (h^{-1})
Extrato de lêvedo	1,251	0,188
Inulina 4%	1,437	0,178
Glicerol 2%	9,815	0,298
Glicose 2%	7,278	0,449

Observando-se as taxas específicas de crescimento celular (μ) também apresentadas na Tabela 1, calculadas na fase exponencial de crescimento celular para as cinéticas realizadas na presença das diferentes fontes de carbono testadas, é possível observar que os cultivos que apresentaram maior μ foram os que continham glicose e glicerol. E apesar da inulina ter sido menos eficiente na produção de células, houve crescimento celular até 52 h de cultivo, e a partir deste momento, decréscimo da biomassa celular, o que indica que, provavelmente, *Y. lipolytica* utilizou esta fonte de carbono de alguma forma e que inulinasas extracelulares teriam sido produzidas.

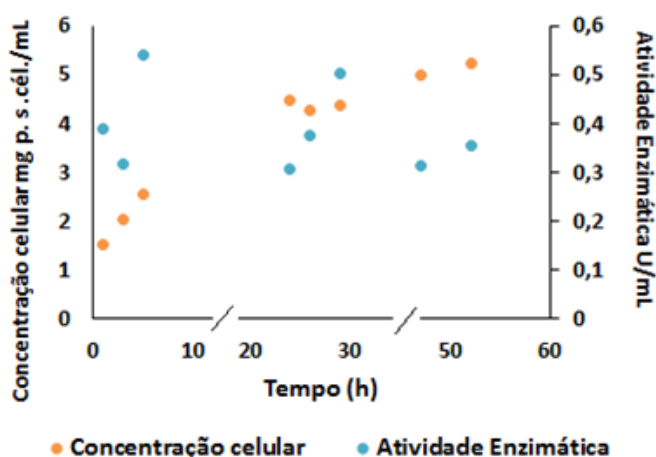
Gong e colaboradores (2007) estudaram as condições de produção de inulinase pela levedura marinha *Pichia guilliermondii* e observaram que as melhores condições para o crescimento das células e produção da enzima foram observadas quando extrato de levedura e peptona foram utilizadas como fonte de nitrogênio.

Segundo a literatura, o extrato de lêvedo apresenta bons resultados para a produção de lipases e induz o crescimento de biomassa, pois não é apenas uma fonte de nitrogênio, mas também de vitaminas (Li *et al.*, 2004).

3.2. Detecção da Produção de Inulinase

A produção de inulinase por *Y. lipolytica* ocorreu durante todo o cultivo, associada ao discreto crescimento celular em relação às outras fontes de carbono. O máximo de atividade de inulinase detectado foi de 0,540 U/mL em 5 h de cultivo. Foram detectadas boas atividades enzimáticas produzidas por esta levedura (Figura 2), e, considerando que trabalhos anteriores relatam que esta levedura não produz invertase (Pereira-Meirelles *et al.*, 1997) conferiu-se a atividade detectada à presença de inulinasas.

Figura 2- Cinética de produção de inulinase por *Yarrowia lipolytica* em meio ME contendo 4% Inulina.



Deste modo, o aumento da produção de biomassa celular e consequente aumento da produção enzimática por *Y. Lipolytica* obtidos com a otimização do meio de cultura corroboram com a literatura. Segundo Hensing *et al.* (1994), as leveduras do gênero

Kluyveromyces são consideradas as mais promissoras na produção desta enzima e podem crescer rapidamente atingindo alta concentração celular em um curto período de tempo, produzindo grandes quantidades da enzima inulinase. A composição do meio de cultivo afeta sensivelmente a excreção enzimática realizada por *Kluyveromyces marxianus*. Meios de fermentação contendo compostos nitrogenados, como extrato de levedura, aminoácidos e uréia, aumentam as taxas de produção da enzima. Portanto, a utilização de meio mineral e extrato de levedura, levaram a um significativo aumento da produção enzimática por *Y. lipolytica*.

4. CONCLUSÃO

Em face aos resultados apresentados, conclui-se que *Yarrowia lipolytica* foi capaz de produzir inulinases em boa quantidade devido ao estudo do meio de cultura com a utilização do meio ME, sendo este favorável à produção de biomassa celular e produção enzimática.

5. REFERÊNCIAS

- AMARAL, P.F.F. (2003). Emprego de carreador de oxigênio na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, Dissertação (Mestre em Ciências), Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- CAZZETA, M.L. Estudo da produção de biomassa e inulinase por *K. marxianus* var. *bulgaricus*: influência das condições de cultivo. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.
- DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOHAN, N. Optimization of inulinase production from garlic by *Streptomyces sp.*, in solid state fermentation using statistical designs. *Biotechnol. Res. Int.*, v, 2011, p 7, 2011.
- GONG, F., SHENG, J., CHI, Z., LI, J. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *J. ind. Microbial. Biotechnol.*, v. 34(3), p. 179-185, 2007.
- HAEGLER, A.N.; MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeast from marine and stuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.41, n.1, pp.173-178, 1981.
- HENSING, M., VROUWENVELDER, H., HELLINGA, C., BAARTMANS, R., VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, v. 42(4), p. 516-521, 1994.
- KAMEDA, E.; LANGONE, M.A.P.; COELHO, M.A.Z.; Removal of Polymeric Filter Cake in Petroleum Wells: a Study of Commercial Amylase Stability. *J. Petrol. Sci. Eng.*, 59(3), 263-270, 2007.
- KIRBY, D.K.; DAVIES, R. Thiol induced release of invertase from cell walls of *Saccharomyces fragilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, Baltimore, v. 201, p. 261-266, 1970.
- Li S.; Armstrong C.M.; Bertin, N; H; Ge, S; Milstein, M; Boxem, P.O; Vidalain, J.D; Han, A; Chesneau, T; Hao, *et al.* A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science*, 303 (2004), pp. 540–543.

- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- NEAGU, C., & BAHRIM, G. Inulinases - a versatile tool for biotechnology. *Innovat. Rom. Food Biotechnol.*, v.9(1), p.1-11, 2011.
- NICAUD, J-M., MADZAK, C., BROEK, P.V.D, GYSLER, C., DUBOC, P., NIEDERBERGER, P. e GAILLARDIN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.*, v.2, n.3, p. 371-379; 2002.
- PESSONI, R., OLMEDO, P. M., CLEMENTE FILHA, A. C., & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. Produção de concentrados de frutose por inulinases de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 24, p. 372-377, 2004.
- PIMENTEL, T.C., GARCIA, S., PRUDENCIO, S. H. Aspectos funcionais, de saúde e tecnológicos de frutanos tipo inulina. *Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.*, v. 30(1), 2012.
- PEREIRA-MEIRELLES, F.V., ROCHA-LEÃO, M.H. SANT'ANNA, G.L. A stable lipase from *Candida lipolytica* – cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.63-65, p.73-85, 1997.
- PEREIRA-MEIRELLES, F.V., ROCHA-LEÃO, M.H. SANT'ANNA, G.L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol. Lett.*, v.22, n.1, pp.71-75, 2000.
- PÉREZ-CAMPOS, F. M. & DOMINGUES, A Factors Affecting the Morphogenetic Switch in *Yarrowia lipolytica*. *Cur. Microbiol.*, v. 43, p. 429–433, 2001.
- PESSOA JUNIOR, A. Obtenção de inulinase: recuperação e ampliação de escala. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- TRIVEDI, S.; DIVECHA, J.; SHAH, A. Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates. *Carb. Polyme.*, v, 90, p, 483– 490, 2012.
- VENDRELL-PASCUAS S., CASTELLOTE-BARGALLO A.I., M.C LOPEZ-SABATER. Determination of insulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. of Chrom. A*, 881 (2000), pp. 591–597
- ZINJARDE S. S., PANT A.: Emulsifier from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM3589. *J. Basic. Microbiol.*, 42, 67-73, 2002.