

Seleção e melhoramento de leveduras inulinolíticas do gênero *Kluyveromyces*: atividade inulinolítica extracelular.

PIBIC/CNPq

Fontana, Fredi*; Echeverrigaray, Sergio; Delamare, Ana Paula Longaray- *ffontana@ucs.br

Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada – Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul – Caxias do Sul - RS

Introdução:

A inulina é um polifruetosídeo encontrado como carboidrato de reserva em várias plantas superiores. Ela pode ser utilizada como fonte alternativa na produção de xarope de frutose, através de sua hidrólise por enzimas específicas (inulinases). Estas enzimas são secretadas por fungos, leveduras ou bactérias. A levedura *Kluyveromyces marxianus* tem se mostrado eficiente na hidrólise de inulina, tanto na produção de inulinase como na produção de etanol a partir deste polifruetosídeo.

Objetivos:

O objetivo deste trabalho é a seleção de acessos, híbridos e segregantes de *Kluyveromyces marxianus* com alta atividade inulinolítica.

Materiais e Métodos:

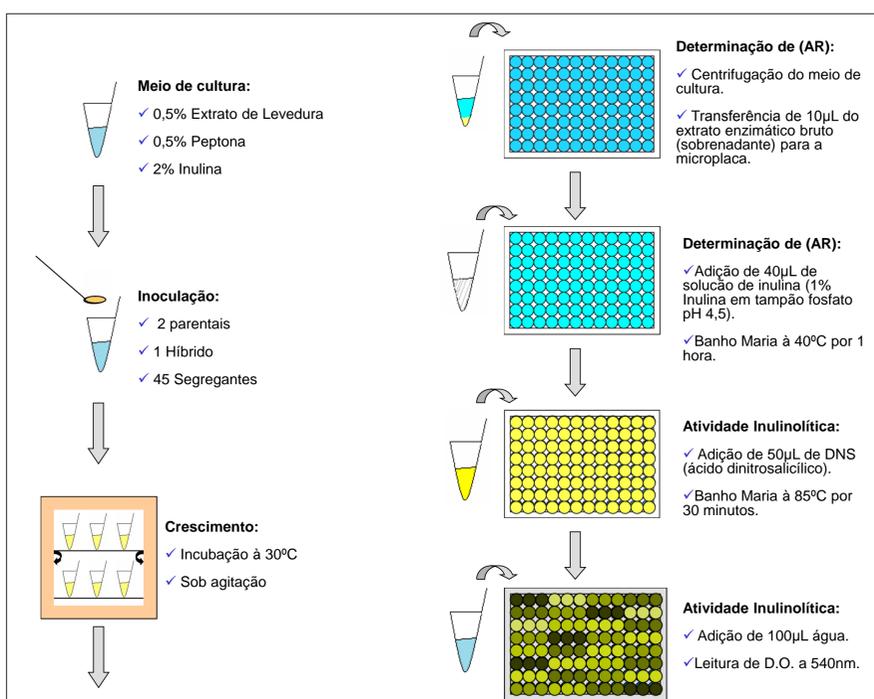


Figura 01: Esquema de avaliação de atividade inulinolítica.

Primeiramente foram avaliados, quanto a sua capacidade de produção de inulinase extracelular, os 45 segregantes de *Kluyveromyces marxianus*, bem como o híbrido (9x21) e seus dois parentais.

Tendo em vista o grande número de linhagens a serem testadas, foi adaptado um micrométodo de determinação baseado na quantificação de açúcares redutores totais por DNS (ácido dinitrosalicílico), conforme mostrado na **Figura 01**. No processo de desenvolvimento do método foram testadas microplacas e placas para PCR, bem como sistemas de aquecimento (estufa e banho maria). O método otimizado requer apenas 10µl de extrato enzimático (sobrenadante), 50µl de reagente DNS, placas de PCR e aquecimento em banho maria a 40°C e 85°C.

Para a determinação de atividade inulinolítica as linhagens foram crescidas em meio com inulina como única fonte de carbono por 24h a 30°C sob agitação constante. As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes utilizados como extratos enzimáticos brutos. A atividade enzimática foi determinada através da quantificação de açúcares redutores (AR) liberados a partir da hidrólise de inulina.

Em um segundo experimento, foram avaliadas as atividades enzimáticas de 11 acessos, o híbrido (9x21), seus parentais e os segregantes (selecionados quanto à atividade inulinolítica no experimento anterior), em diferentes tempos de crescimento (total 48 horas).

Resultados e Discussões:

No primeiro experimento onde foram selecionadas as linhagens que apresentaram maior atividade enzimática, dos 45 segregantes do híbrido 9x21, sobressaíram 17D (630,75 U/ml), 9D (484,02 U/ml), 45E (435,88 U/ml), 7D (371,68 U/ml) e 24E (364,81 U/ml), como mostrado na **Figura 02**.

Analisando as curvas de AR e atividade inulinolítica (**Figuras 03, 04, 05 e 06**) obtidas no segundo teste com os segregantes 17D, 45E, 9D e do híbrido 9x21, foi possível observar aumento de atividade proporcional ao tempo de crescimento e efeito de repressão catabólica pelo substrato produzido. As maiores atividades inulinolíticas foram detectadas com 36h, confirmando a maior atividade nos segregantes: 9D (1990 U/ml), 45E (1850 U/ml), 17D (1780 U/ml) e do híbrido 9x21(1620 U/ml), contra uma média de 1400 U/ml dos parentais KM9 e KM21.

Dentre os acessos testados sobressaíram IZ1339, IZ619, FTI20015, NRRL Y 1190, NRRL Y 6373 e NRRL Y 7521.

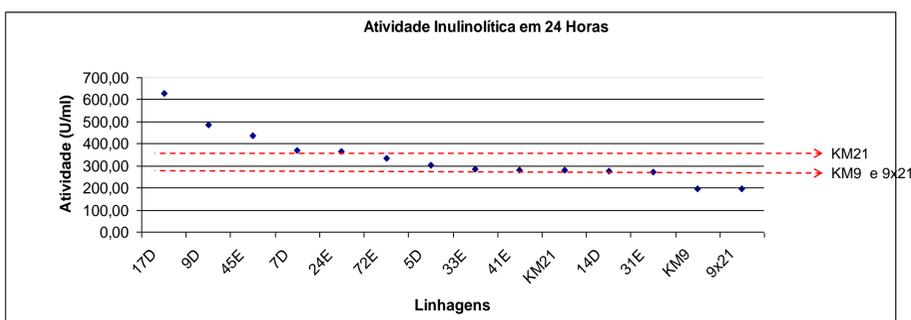


Figura 02: Maiores atividades inulinolíticas de segregantes, comparando com os parentais e o híbrido, em 24 horas de crescimento.

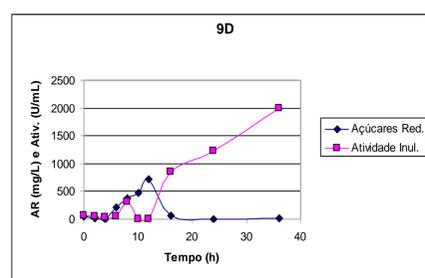


Figura 03: Atividade inulinolítica em sobrenadantes do segregante 9D de *K. marxianus*.

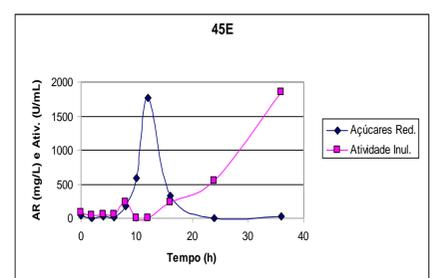


Figura 04: Atividade inulinolítica em sobrenadantes do segregante 45E de *K. marxianus*.

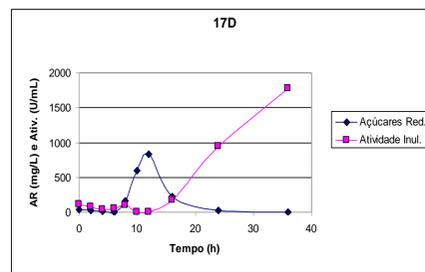


Figura 05: Atividade inulinolítica em sobrenadantes do segregante 17D de *K. marxianus*.

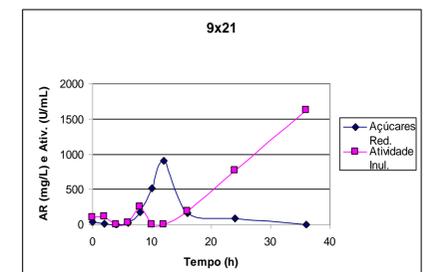


Figura 06: Atividade inulinolítica em sobrenadantes do híbrido 9x21 de *K. marxianus*.

*Uma unidade de inulinase corresponde a 1U=µmolAR. ml⁻¹.min⁻¹

Considerações Finais:

Os resultados obtidos até o presente momento provam a eficiência do método utilizado para seleção de materiais genéticos superiores quanto à atividade inulinolítica. Novos híbridos entre segregantes de *Kluyveromyces marxianus* e entre outros materiais selecionados deverão ser obtidos na continuação deste trabalho.