

Área: Engenharia de Alimentos

EFEITO DE FLUIDO PRESSURIZADO SOBRE INULINASE NÃO-COMERCIAL DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Simone Maria Golunski, Diane Rigo, Vinícius Mossi, Chaline Caren Coghetto, Graciele Kuhn, Márcio Antônio Mazutti, Marco Di Luccio, Débora de Oliveira, José Vladimir de Oliveira, Helen Treichel, Marceli Fernandes Silva*

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, URI - Campus de Erechim, Av. 7 de Setembro, 1621, Erechim - RS, 99700-000

**E-mail: marceli_f@hotmail.com*

RESUMO

O trabalho avalia a atividade enzimática residual e específica da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 submetida a butano comprimido. O efeito do tempo de exposição, pressão e taxa de despressurização sobre as atividades foram avaliados por um planejamento experimental. Os resultados mostram que pressão de 30bar durante 6h com uma taxa de despressurização lenta (20bar/min) favorece um incremento de 209,99% na atividade enzimática residual e utilizando as mesmas condições e uma taxa de despressurização rápida (100bar/min) aumenta a atividade específica (492,55%). Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que o tratamento a alta pressão possibilita um aumento significativo na atividade específica e residual da inulinase obtida de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Palavras-chave: butano, fluido pressurizado, inulinase, atividade enzimática.

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia supercrítica vem sendo empregada de forma crescente para a obtenção de produtos com maior qualidade, visando principalmente a aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica [Castilho et al, 2000].

Dados da literatura apontam a possibilidade de realizar tratamento de enzimas em fluidos supercríticos, obtendo assim maiores taxas de atividade enzimática residual e especificidade [Celebi et al, 2007; Knez e Habulin, 2002; Oliveira et al, 2006a, 2006b].

Quando da utilização dos solventes pressurizados, muitos autores concluíram que o dióxido de carbono é o solvente que acarreta maior perda de atividade enzimática, diferentemente do propano e butano que se mostram solventes potenciais para utilização em reações enzimáticas a altas pressões [Dalla Rosa et al, 2008].

É importante salientar que, de modo geral, o solvente pode afetar fortemente a atividade da enzima através de sua interação com o suporte, no caso de enzimas imobilizadas, ou mesmo com radicais da própria enzima [Oliveira et al, 2006a, 2006b].

Com base em alguns resultados da literatura [Andrade et al, 2008; Liu et al, 2005; Oliveira et al, 2006a, 2006b; Fricks et al, 2006], que revelam que algumas enzimas aumentam suas atividades e outras diminuem/perdem suas atividades após tratamento com fluidos comprimidos, o uso destes solventes pode ser uma alternativa interessante não somente para conduzir reações enzimáticas, mas também aumentar a atividade dos sistemas enzimáticos ou inativar/reduzir sua atividade. Uma breve investigação da literatura revela que, enquanto existe uma quantidade de dados relativamente grande relacionada à atividade e estabilidade de enzimas em dióxido de carbono, existe uma lacuna correspondente à informações experimentais para outros solventes comprimidos, tais como butano.

O interesse pela inulinase iniciou-se com a descoberta de sua habilidade de hidrolisar inulina, um polímero vegetal, em frutose praticamente pura [Ettalibi e Baratti, 1987], e na síntese de oligossacarídeos [Kim et al, 2001], compostos considerados prebióticos. De acordo com Mazutti et al, [2010], as inulinases também são aplicadas na produção de frutooligossacarídeos (FOS) pois apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e não são calóricos, não podem ser considerados carboidratos ou açúcares nem fonte de energia, mas podem ser usados de modo seguro por diabéticos.

Neste contexto, com base na literatura relacionada ao potencial de aplicação de inulinases em reações de FOS, surgiu o interesse em investigar o comportamento da atividade enzimática da inulinase após sofrer tratamento com butano pressurizado.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Reagentes e enzimas

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a qual foi previamente reportada como produtora de inulinase por FES e é pertencente ao grupo GRAS (Generally Recognized as Safe) [Mazutti et al, 2010].

O solvente utilizado foi propano de procedência White Martins S.A. (com 99,5% pureza, fase líquida).

2.1.2 Processo de imobilização

Para o processo de imobilização, inicialmente foi preparada uma solução de gel, contendo água destilada e alginato de sódio, os quais foram aquecidos em micro-ondas, até total dissolução. Em seguida, foi adicionada a sacarose. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados o extrato enzimático com atividade pré-estabelecida, o glutaraldeído e o carvão ativado [Risso et al, 2010]. Com uma bomba peristáltica, o gel foi bombeado em uma solução contendo tampão acetato pH 4,8 0,1 M e cloreto de cálcio 0,2 M com 3,5% de glutaraldeído, em banho de gelo, sob agitação.

2.1.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática do imobilizado foi determinada adicionando-se 0,5 g de enzima imobilizada macerada em 4,5 mL de uma solução tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8 com 2% (p/v) de sacarose. Após diluída, a solução foi mantida a 50°C, por 10 min. A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) [Miller, 1959]. As amostras foram lidas em triplicata, em espectrofotômetro a 540 nm. Para determinação dos valores de proteínas utilizou-se 10µL de amostra em 190µL de solução tampão padrão, as amostras foram lidas em fluorímetro (método do equipamento).

2.1.4 Tratamento das enzimas a alta pressão

O equipamento utilizado nos experimentos de avaliação da atividade da enzima em fluidos pressurizados consiste basicamente de um reservatório de solvente (butano), dois banhos termostáticos, uma bomba de seringa (ISCO 260D), uma cuba de aço inoxidável com um volume interno de 3mL, um transdutor de pressão absoluta (Smar, LD301) construído para conduzir os experimentos até 350bar e 80°C [Fricks et al, 2006]. A inulinase (0,7g) foi colocada na célula e o reator mergulhado no banho com a temperatura já estabelecida (40°C). Após esta etapa, o sistema foi pressurizado e mantido à temperatura constante por um tempo de exposição (1-6h), taxa de descompressão (20–100bar/min) e pressão (30-270 bar) conforme planejamento. A atividade residual e proteína da inulinase foram determinadas em relação aos valores obtidos antes e após o tratamento. Um planejamento experimental, com dois níveis e três variáveis (pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização) e triplicata do ponto central para a avaliação do erro experimental. Os resultados foram analisados usando o software Statística 6.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para a atividade enzimática da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada após tratamento com butano. De acordo com estes resultados a enzima apresentou ganho em todas condições experimentais investigadas. A atividade de inicial desta enzima, determinada neste trabalho, é de 66,67U/g. O maior ganho de atividade ocorreu no experimento 3 (209,99%), relacionado às condições de limite inferior de pressão e taxa de despressurização e limite superior de tempo de exposição. Porém o maior valor de atividade específica foi obtido no experimento 4 (492,55%), relacionado as condições de limite inferior de pressão e limite superior de tempo de exposição e taxa de despressurização.

Com relação à atividade da inulinase submetida a butano pressurizado, após tratamento dos dados da Tabela 1 nota-se que a pressão, assim como a interação entre o tempo de exposição e pressão e a interação entre pressão e taxa de despressurização apresentaram-se mais significativas, sugerindo que submeter a enzima ao solvente em uma menor pressão x

taxa de despressurização e maior tempo de exposição ocasionaria um maior ganho de atividade. Entretanto para que a enzima se torne mais específica em sua quebra é necessário que sofre uma despressurização rápida. Com o tratamento dos dados tabela 1 foi possível obtenção das superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura1).

Tabela 1- Atividade relativa residual* (%) sobre uma inulinase não-comercial de *Klyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 após tratamento em butano pressurizado

| Enzima Imobilizada** | 66,67 (U/g) | | | 0,17 | 399,43 | |
|----------------------|-------------|--------------|----------------|---------------|--|---------|
| Ensaio | P (bar) | T (horas) | R (bar/min) | Butano (%) | Proteína (mg/g) Ativ. Enz. Espec. (U/mg) | |
| 1 | -1 (30) | -1 (1) | -1 (20) | 140,65 | 0,09 | 1000,80 |
| 2 | -1 (30) | -1 (1) | 1 (100) | 138,87 | 0,06 | 1467,90 |
| 3 | -1 (30) | 1 (6) | -1 (20) | 209,99 | 0,14 | 1019,70 |
| 4 | -1 (30) | 1 (6) | 1 (100) | 151,47 | 0,05 | 1967,40 |
| 5 | 1 (270) | -1 (1) | -1 (20) | 116,64 | 0,06 | 1281,60 |
| 6 | 1 (270) | -1 (1) | 1 (100) | 143,55 | 0,08 | 1165,50 |
| 7 | 1 (270) | 1 (6) | -1 (20) | 111,51 | 0,08 | 912,70 |
| 8 | 1 (270) | 1 (6) | 1 (100) | 129,06 | 0,08 | 1008,40 |
| 9 | 0 (150) | 0 (3.5) | 0 (60) | 148,48 | 0,06 | 1654,5 |
| 10 | 0 (150) | 0 (3.5) | 0 (60) | 152,19 | 0,09 | 1095,3 |
| 11 | 0 (150) | 0 (3.5) | 0 (60) | 153,92 | 0,07 | 1462,00 |

P=pressão t=tempo R=taxa de despressurização

* atividade enzimática definida como valor absoluto de (ativ. Final/ativ.inicial)x100

** atividade inicial da enzima antes do tratamento

Alguns trabalhos apresentados na literatura [Knez, 2009;Oliveira et al, 2006a, 2006b] sugerem que a etapa de despressurização interfere na atividade enzimática depois do tratamento com fluidos pressurizados e, segundo Knez [2004], o tratamento a alta pressão pode distorcer a estrutura secundária e terciária do polipeptídeo, o que resultaria numa conformação da enzima diferente da nativa, mas que mantivesse ou aumentasse a atividade catalítica, sem que ocorra a desnaturação da proteína. De acordo com Knez [2009] a taxa de

despressurização é um passo determinante em relação à atividade da enzima pré-tratada em fluidos pressurizados.

Assim, os resultados reportados na literatura e os apresentados neste trabalho, parecem indicar que os solventes com baixa constante dielétrica e ativação interfacial, permitem maior acesso ao sítio ativo da enzima [Knez, 2004].

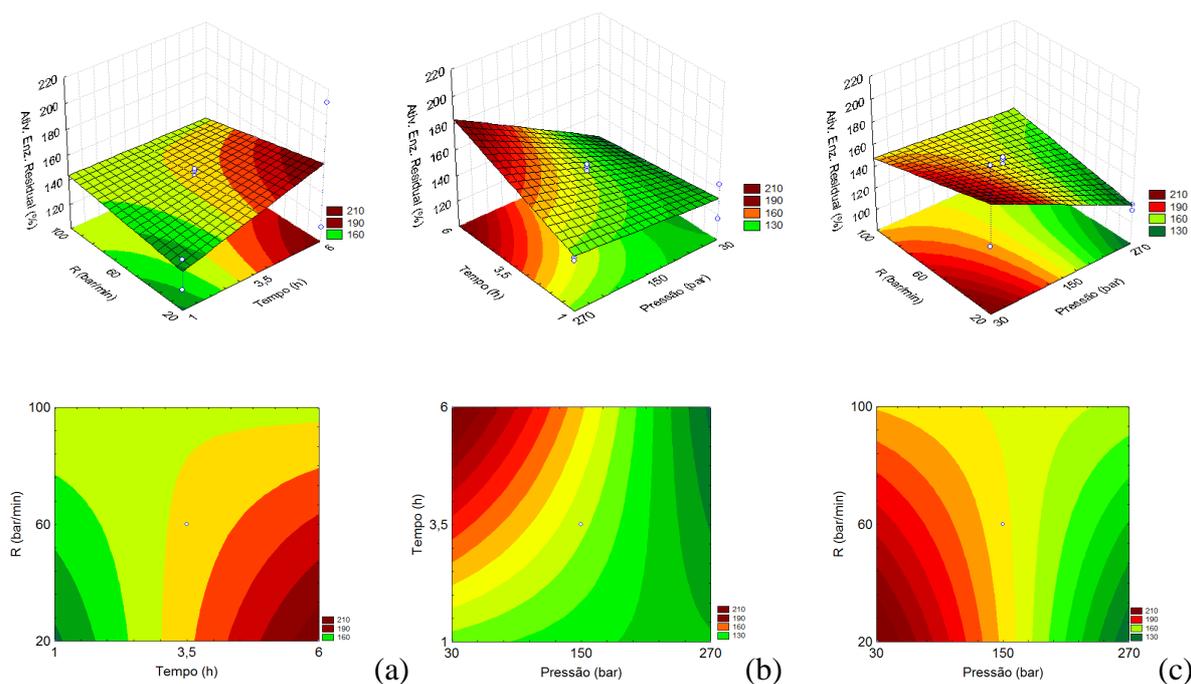


Figura 1- Superfície de resposta e curva de contorno para atividade enzima residual de *K. marxianus* NRRL Y-7571 após tratamento com butano (a) tempo x taxa de despressurização; (b) pressão x tempo; (c) pressão x taxa de despressurização.

3 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que o tratamento de inulinase com butano pressurizado é eficaz para o aumento de atividade enzimática residual (209,99%) e sua especificidade, porém esse aumento depende significativamente da natureza estrutural da enzima, sua forma de apresentação, e as condições experimentais imposta, por exemplo, tempo de exposição, taxa de despressurização e pressão. Foi observado experimentalmente que para inulinase imobilizado ocorreu um aumento em sua atividade em

todas as condições experimentais, porém as pressões próximas ao limite inferior (30bar) permitiu maior incremento. Então, o uso de fluidos comprimidos, como butano, pode ser de relevância tecnológica para melhorar a atividade de enzimas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. M.; OESTREICHER, E. G.; ANTUNES, O. A. C.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; SOARES, C. M.; DARIVA, C., Effect of treatment with compressed CO₂ and propane on D-hydantoinase activity. *J Supercrit Fluid.*, v.46, n. 3, p.342-350, (2008).
- CASTILHO, L. R., POLATO, C. M. S., BARUQUE, E. A., SANT'ANNA Jr, G. L., FREIRE, D. M. G., Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem. Eng. J.*, v.4, n.3, p 239-247, (2000).
- CELEBI, N., YILDIZ, N., DEMIR, A. S., CALIMLI, A., Enzymatic synthesis of benzoin in supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids.*, v. 41, n.3, p. 386-390, (2007).
- DALLA ROSA, C.; MORANDIM, M. B.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V. Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane. *J. of Supercritical Fluids*, v.47, n.1, p.49-53, (2008).
- ETTALIBI, M, BARATTI, J. C., Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. *Enzyme Microb. Technology*, v.28, n.7-8, p. 596-60, (1987).
- FRICKS, A. T., SOUZA, D. P. B., OESTREICHER, E. G., ANTUNES, O. A. C., GIRARDI, J. S., OLIVEIRA, D., DARIVA, C., Evaluation of radish (*Raphanus Sativus* L.) Peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide. *J Supercrit Fluids*, v. 38,n.3 , p. 347-353, (2006).
- LIU, X. F.; ZHANG, B. Q.; LI, T. J. Effects of CO₂ compression and decompression rates on the physiology of microorganisms. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.13, n. 1, p.140-143, (2005).
- KIM, K.W., SONG, B., CHOI, M. Y., KIM, M. J., Biocatalysis in ionic liquids: Markedly enhanced enantioselectivity of lipase. *Organic Letters*, v.10, n. 3, p.1507-1512, (2001).
- KNEZ, Z., High pressure process technology- Quo vadis?, *Chemical Engineering Research and Design*, v.82, n.12, p. 1541-1548, (2004).
- KNEZ, Z., HABULIN, M., Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: A short review. *J Supercrit Fluids*, v.23, n.1 , p.29-42 (2002).
- KNEZ, Z., Enzymatic reactions in dense gases. *J. of Supercritical Fluids*, v.47, n.2 , p.357-372 (2009).

MAZUTTI, M. A., ZABOT, G., SKROVRONSKI, A., OLIVEIRA, D., DI LUCCIO, M., RODRIGUES, M. I., TREICHEL, H., MAUGERI FILHO, F., Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in packed-bed bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.85, n.1,p.109-114 (2010).

MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v.31, n. 3, p.426-428 (1959).

OLIVEIRA, D., FEIHRMANN, A. C., DARIVA, C., CUNHA, A. G., BEVILAQUA, J. V., DESTAIN, J., OLIVEIRA, J. V., FREIRE, D. M. G., Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.39, n.1-4, p.117-121, (2006a).

OLIVEIRA, D., FEIHRMANN, A. C., RUBIRA, A.F., KUNITA, M. H., DARIVA, C., OLIVEIRA, J. V., Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.38, n. 3, p.127-133, (2006b).

RISSO, F. V., MAZUTTI, M. A., TREICHEL, H., COSTA, F., MAUGERI FILHO, F., RODRIGUES, M. I., Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in an organic medium. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.27, n. 4,p. 507-516, (2010).