

Área: Engenharia de Alimentos

EFEITO DO TRATAMENTO DE FLUIDOS COMPRIMIDOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE β -GALACTOSIDASE

**Graciele de Oliveira Kuhn, Ana Paula Manera, Marlucci Marangoni, Marceli Silva,
Helen Treichel, J. Vladimir Oliveira, Débora de Oliveira***

*Laboratório de Termodinâmica, Curso de pós-Graduação em Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciências Agrárias, URI - Campus de Erechim*

**E-mail: odebora@uricer.edu.br*

RESUMO

O presente trabalho investiga a influência da pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização na atividade da β -galactosidase submetida a tratamento com dióxido de carbono comprimido, propano e n-butano. Para isso comparou-se a atividade da β -galactosidase obtida após o tratamento com fluidos pressurizados com a atividade inicial da enzima, sem sofrer nenhum tratamento. Os resultados demonstraram que as atividades deste biocatalisador foram sempre superiores a atividade inicial do mesmo, mostrando que as alterações na atividade enzimática dependem das condições experimentais investigadas, podendo-se determinar as mais adequadas para a aplicação do biocatalisador nas reações de interesse.

Palavras-chave: β -galactosidase; galactoligossacarídeos; fluidos comprimidos.

1 INTRODUÇÃO

As β -galactosidasas, popularmente conhecidas como lactases e classificadas como hidrolases, são responsáveis por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose. A importância industrial da β -galactosidase está em sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite e conhecido popularmente como *açúcar do leite*, em seus monossacarídeos glicose e galactose, obtendo assim, alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e

digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose (Santiago et al., 2004).

A enzima β -galactosidase (EC 3.2.23) é uma enzima comercialmente importante. Ela catalisa a hidrólise de β -galactopiranosídeos, tais como a lactose, hidrolisando a lactose com a β -galactosidase, com isso, os problemas associados com a eliminação do soro, cristalização de lactose em certos alimentos congelados e o consumo de leite por indivíduos com intolerância a lactose podem ser aliviados. Além de catalisar a conversão da lactose a glicose e galactose, a β -galactosidase catalisa também a reação de transgalactosilação; a lactose serve como doador de unidades de galactosil e um aceptor para a fórmula di-, tri- e outros GOS mais elevados (Hsu; Yu; Chou, 2005).

Os galactooligossacarídeos (GOS) são um grupo de oligossacarídeos compostos por moléculas de galactose ligada à lactose, sendo formados de tri a hexassacarídeos com 2-5 unidades de galactose. Os GOS são carboidratos não digeríveis resistentes às enzimas digestivas e fermentados por bifidobactérias. Os benefícios da ingestão de GOS são o aumento da população de bifidobactérias no cólon e, por efeito antagônico, supressão da atividade de bactérias putrefativas, reduzindo a formação de metabólitos tóxicos e produção de ácidos graxos de cadeia curta (Ishikawa et al., 2005).

Em sistemas aquosos a transgalactosilação concorre com hidrólise e, portanto, misturas GOS sempre contêm quantidades consideráveis de lactose restante e monossacarídeos que diminuem o rendimento global (Mahoney, 1998). Uma alternativa para superar essa desvantagem seria o uso de solventes orgânicos para conduzir as reações. O solvente pode afetar uma reação enzimática tanto pela interação direta com a enzima e influenciando a solvatação dos substratos e produtos no meio reacional. No entanto, a utilização de solventes orgânicos como meio reacional tem alguns inconvenientes, tais como a interação do solvente com enzimas, portanto, diminuindo a sua estabilidade, a presença de resíduos químicos que afetam a segurança dos produtos alimentares e os altos custos envolvidos na eliminação do solvente orgânico do produto (Garrea & Riva, 2008).

Numerosos estudos têm demonstrado que muitas reações enzimáticas podem ser conduzidas em dióxido de carbono supercrítico e, em alguns casos, as taxas de seletividade obtidas são superiores as obtidas no estado líquido normal ou reações em fase gasosa (Oliveira & Oliveira, 2000, 2001). No entanto, um grave inconveniente dessas aplicações pode surgir a partir da não-polaridade do dióxido de carbono, afetando negativamente a

atividade da enzima. No entanto, o dióxido de carbono não é o único gás cujas propriedades parecem ser adequadas para a biocatálise (Kao, Ekhorutomwen & Sawan, 1997). Por exemplo, a constante dielétrica comparável do propano e do n-butano com o dióxido de carbono (Habulin & Knez, 2001; Oliveira, Feihmann, Rubira, Kunita, Dariva, & Oliveira, 2006a), e o fato de que maiores valores de pressão de transição de fase são geralmente encontrados em sistemas formados por dióxido de carbono com alto peso molecular quando comparado ao uso do propano e n-butano, isso apóia a convicção de que o propano e o n-butano podem ser adequados como um meio de reação para bioconversões catalisadas por enzimas (Ndiaye, Lanza, Tavares, Dariva, Oliveira, & Oliveira, 2006).

Para realizar reações catalisadas com a B-galactosidase em altas pressões, o comportamento das enzimas em fluidos comprimidos é de fundamental importância, uma vez que a perda da atividade da enzima pode levar a ocorrência de taxas de reação indesejável e baixo rendimento de produtos. Atividade enzimática pode depender da espécie de enzima, das variáveis do processo, características do fluido comprimido, teor de água da enzima/suporte mistura de reação e/manipulador. Inspeção da literatura citada revela que, embora haja alguns poucos relatos sobre a atividade de β -galactosidase submetidos à alta pressão hidrostática (Eisenmenger, & Reyes-De-Corcuera, 2009), há uma falta de informação experimental correspondente a este enzima em dióxido de carbono comprimido, propano e n-butano.

Com base nestes aspectos, o principal objetivo deste estudo é investigar o efeito dos fluidos comprimidos (dióxido de carbono, propano e n-butano) no tratamento sobre a atividade enzimática de B-galactosidase a partir de células permeabilizadas de *K. marxianus* CCT 7082.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Reagentes e Catalisador

Os produtos químicos utilizados foram todos de grau analítico comprados da Synth, Brasil e o-nitrofenil-B-D-galactopiranosídeo (ONPG) adquiridos da Sigma Chem. E.U.A. *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foi utilizado para a produção de B-galactosidase.

2.1.2 Atividade Enzimática

Atividade da B-galactosidase foi determinada usando o B-nitrofenil-D-galactopiranosídeo (ONPG), seguindo o Método descrito por Inchaurredo, Yantorno e Voget (1994). Uma amostra de 50 μL da Suspensão de células permeabilizadas foi misturada com 2 mL de tampão em ONPG (50 mM de KH_2PO_4 e 0,1 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pH 6,6) e incubados por 5 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de carbonato de sódio 1 M. A liberação de o-nitrofenol foi medida espectrofotometricamente em 420nm. Uma Unidade de atividade de B-galactosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de ONPG por minuto nas condições de ensaio.

2.1.3 Tratamento da Enzima a Alta Pressão

O equipamento utilizado em todos os experimentos de avaliação da atividade da enzima em fluidos comprimidos consiste basicamente de um reservatório de solvente, dois banhos termostáticos, uma bomba de seringa (ISCO 260D), uma cuba de aço inoxidável com um volume interno de 3 mL, um transdutor de pressão absoluta (Smar, LD301) equipado com um programador portátil (Smar, HT201) com uma precisão de $\pm 0,4$ bar. Duas válvulas micrométricas (HIP 15 11AF2 316SS) completam o aparato experimental, uma localizada após a bomba de seringa, na entrada da célula de alta pressão, para permitir o carregamento de solvente e a outra logo após a célula para realizar a descarga do solvente. A célula de alta pressão estava submersa em banho de água e apoiada por um dispositivo simples, enquanto que as válvulas micrométricas ficavam localizados fora do banho.

As células permeabilizadas de *K. marxianus* contendo a B-galactosidase (cerca de 0,15 g) foram colocadas na célula. Posteriormente, o sistema foi pressurizado e mantido em temperatura e pressão constantes para um tempo de exposição pré-estabelecido. Após o tempo de tratamento, o sistema foi despressurizado e a atividade da enzima foi medida. A atividade residual foi definida como a relação da atividade enzimática antes (inicial) e após (final) ao tratamento com fluido pressurizado.

Para avaliar os efeitos da taxa de descompressão, do tempo de exposição e da pressão sobre a atividade de B-galactosidase de células permeabilizadas de *K. marxianus* submetidas ao gás carbônico comprimido, propano e n-butano, um planejamento composto central (CCD) foi realizado para cada solvente. Os experimentos foram realizados em temperatura fixa de 37

°C, nos tempos de exposição de 1-6 h para todos os solventes. Para o dióxido de carbono, as taxas de descompressão (R) abrangeram o intervalo de 1-20 kg.m⁻³min⁻¹ com reduzida densidade (DR), variando de 0,5 a 2,0. Para este solvente, a pressão do sistema foi estimada a partir da equação de Angus, Armstrong e Reuck (1976). Para o propano e o n-butano, devido à sua natureza praticamente incompressível no intervalo de temperatura e pressão investigados, foi adotada a despressurização (R) de 2-50 bar.min⁻¹, e a pressão do sistema (P) variou de 30 a 250 bar para o propano e 10 a 250 bar para n-butano.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Efeito do Propano Pressurizado sobre a Atividade B-Galactosidase de Células Permeabilizadas de *K. marxianus*

Resultados obtidos com a aplicação da CCD para avaliar os efeitos das variáveis de processo sobre a atividade β -galactosidase tratadas com propano pressurizado são apresentados na Tabela 1. Para todos os ensaios experimentais, verificou-se que a atividade da enzima aumentou após o tratamento com propano. O ganho de atividade da enzima foi na faixa de 128,0-211,1%, resultado interessante, considerando as possíveis aplicações de enzimas para a síntese de produtos alimentares, como é o caso de galactooligosacarídeos ou hidrólise da lactose pela β -galactosidase.

Tabela 1 – Matriz CCD (planejamento composto central) e atividade enzimática da β -galactosidase submetida a propano pressurizado.

Exp	P (bar)	t (h)	R (bar.min ⁻¹)	Ativ. Enzimática final (U.g ⁻¹)	Atividade Relativa (%) ^a
1	30 (-1)	1 (-1)	2 (-1)	450.4	176.0
2	250 (1)	1 (-1)	2 (-1)	327.3	128.0
3	30 (-1)	6 (1)	2 (-1)	356.1	139.2
4	250 (1)	6 (1)	2 (-1)	351.7	137.4
5	30 (-1)	1 (-1)	50 (1)	540.1	211.1
6	250 (1)	1 (-1)	50 (1)	459.3	179.5
7	30 (-1)	6 (1)	50 (1)	519.6	203.1
8	250 (1)	6 (1)	50 (1)	535.4	209.2
9	140 (0)	3.5 (0)	26 (0)	436.6	170.6
10	140 (0)	3.5 (0)	26 (0)	438.8	171.4
11	140 (0)	3.5 (0)	26 (0)	462.5	180.7

^aAtividade Relativa definida como a razão da (Atividade final/Atividade inicial) x 100; Atividade enzimática inicial: 255.9 U.g⁻¹.

Para avaliar os principais efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade da enzima, os dados da Tabela 1 foram tratados estatisticamente, considerando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). A Tabela 2 apresenta os efeitos dessas variáveis sobre a atividade final da β -galactosidase. Como se observa a única variável significativa foi a taxa de descompressão, que apresentou um efeito positivo, indicando que maiores taxas de descompressão levam a um aumento na atividade de β -galactosidase.

Tabela 2 – Efeitos das variáveis de processo na atividade da β -galactosidase submetida a propano, n-butano e CO_2 pressurizados.

	Efeito	Erro padrão	t-valor (7)	p-valor
Propano				
Média	443.44	10.66	41.60	<0.001
(1)P(bar)	-48.13	25.00	-1.92	0.10
(2)t(h)	-3.58	25.00	-0.14	0.89
(3)R (bar.min⁻¹)	142.23	25.00	5.69	<0.001
n-butano				
Média	383.56	10.58	36.24	<0.001
(1)P(bar)	-25.48	24.82	-1.03	0.34
(2)t(h)	-25.48	24.82	-1.03	0.34
(3)R (bar.min⁻¹)	30.93	24.82	1.25	0.25
CO₂				
Média	411.45	21.22	19.39	<0.001
(1)P(bar)	-43.48	49.76	-0.87	0.41
(2)t(h)	-4.77	49.76	-0.10	0.93
(3)R (bar.min⁻¹)	-21.88	49.76	-0.44	0.67

De fato, alguns trabalhos apresentados na literatura mostram que os solventes com baixa constante dielétrica, como o gás propano, poderiam manter ou mesmo aumentar a atividade enzimática e estabilidade (Knez & Habulin, 2002, Oliveira et al., 2006a; Oliveira et al. 2006b ; Fricks et al., 2006; Andrade et al., 2008). Uma vez que as propriedades solventes afetam a interação com enzimas específicas, diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo da enzima estudada (Kasche, Schlothauer & Brunner, 1988; Fricks et al., 2006). Para o caso em apreço, pode-se observar que o uso de propano pressurizado como solvente, para todas as condições experimentais investigadas, levou a um aumento na atividade de β -galactosidase. Como propano apresenta solubilidade em água relativamente baixa, pode-se especular que ele poderia estar atuando como um pistão líquido, aumentando a pressão sobre a enzima. Quanto ao efeito da pressão hidrostática sobre a estabilidade da enzima, a literatura indica que os

valores de pressão em torno dos utilizados neste trabalho causam um pequeno efeito sobre a atividade da enzima (ANDRADE et al., 2008).

Ao que se conhece até o momento, não há relatos referindo-se à atividade de β -galactosidase tratados com propano comprimido. No entanto, os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes aos encontrados por Franken et al. (2008) para a atividade da lipase imobilizada em propano, no qual a única variável significativa foi a taxa de descompressão e aumento da atividade em todas as condições experimentais. Oliveira et al. (2006a) também verificaram que o uso de propano comprimido, enquanto aumentou a atividade da lipase Novozym 435, levou a mudanças insignificantes para Lipozyme IM.

2.2.2 Efeito de n-Butano Pressurizado sobre a Atividade de B-Galactosidase de Células Permeabilizadas de *K. marxianus*

Resultados obtidos com a aplicação da CCD para avaliar os efeitos das variáveis de processo sobre a atividade β -galactosidase tratados com n-butano pressurizado são apresentados na Tabela 3. Como verificado para o propano, a atividade da enzima aumentou em todas as corridas experimentais após o tratamento com n-butano comprimido. Para este solvente, o ganho de atividade da enzima foi na faixa de 118,5-161,8%. Após a análise estatística dos dados experimentais apresentados na Tabela 3, é possível observar que nenhuma das variáveis foram significativas ($p < 0,05$) no intervalo de avaliação (Tabela 2).

Tabela 3 – Matriz CCD (planejamento composto central) e atividade enzimática da β -galactosidase submetida a n-butano pressurizado.

Exp	P (bar)	t (h)	R (bar.min ⁻¹)	Ativ. Enzimática final (U.g ⁻¹)	Atividade Relativa (%) ^a
1	10 (-1)	1 (-1)	2 (-1)	446.8	161.8
2	250 (1)	1 (-1)	2 (-1)	327.1	118.5
3	10 (-1)	6 (1)	2 (-1)	345.4	125.1
4	250 (1)	6 (1)	2 (-1)	337.2	122.1
5	10 (-1)	1 (-1)	50 (1)	400.4	145.0
6	250 (1)	1 (-1)	50 (1)	395.0	143.0
7	30 (-1)	6 (1)	50 (1)	376.7	136.4
8	250 (1)	6 (1)	50 (1)	408.1	147.8
9	130 (0)	3.5 (0)	26 (0)	414.1	150.0
10	130 (0)	3.5 (0)	26 (0)	371.1	134.4
11	130 (0)	3.5 (0)	26 (0)	397.3	143.9

^a Atividade enzimática inicial: 276.1 U.g⁻¹

Como no caso do propano, não foram encontrados relatos na literatura referentes à atividade de β -galactosidase tratados em comprimido n-butano. Para lipases, Oliveira et al. (2006a) verificaram que o tratamento da Novozym 435 e Lipozyme IM em n-butano comprimido resultou em ganhos para ambas as enzimas, atividade na ordem dos 21 e 4%, respectivamente.

2.2.3 Efeito de CO₂ supercrítico sobre a Atividade a B-Galactosidase de Células Permeabilizadas de *K. marxianus*

A Tabela 4 apresenta os resultados da execução do CCD para avaliar os efeitos das variáveis de processo sobre a atividade β -galactosidase com CO₂ supercrítico. Pode ser visto a partir deste quadro que a atividade da enzima, após tratamento com CO₂ supercrítico aumentou para todas as condições experimentais investigadas. O maior aumento ocorreu no experimento 1 (~177%) com o menor tempo de exposição (1,0h), menor taxa de depressurização (10 kg/m³.min) e a menor pressão reduzida (0,5). A análise estatística dos dados experimentais apresentados na Tabela 4 revelaram que as variáveis do processo não apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a atividade da enzima (Tabela 2).

Tabela 4 – Matriz CCD (planejamento composto central) e atividade enzimática da β -galactosidase submetida a CO₂ supercrítico.

Exp	RD	t (h)	R (kg.m ⁻³ .min ⁻¹)	Ativ. Enzimática final (U.g ⁻¹)	Atividade Relativa (%) ^a
1	0.5 (-1)	1 (-1)	10 (-1)	525.0	176.8
2	2.0 (1)	1 (-1)	10 (-1)	328.1	110.5
3	0.5 (-1)	6 (1)	10 (-1)	479.1	161.3
4	2.0 (1)	6 (1)	10 (-1)	345.6	116.4
5	0.5 (-1)	1 (-1)	200 (1)	385.5	129.8
6	2.0 (1)	1 (-1)	200 (1)	405.0	136.4
7	0.5 (-1)	6 (1)	200 (1)	331.4	111.6
8	2.0 (1)	6 (1)	200 (1)	468.4	157.7
9	1.25 (0)	3.5 (0)	105 (0)	413.3	139.2
10	1.25 (0)	3.5 (0)	105 (0)	415.7	140.0
11	1.25 (0)	3.5 (0)	105 (0)	428.9	144.4

^a Atividade enzimática inicial: 297.0 U.g⁻¹

Pode ser importante mencionar que a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura relacionados ao tema presente se referem ao uso de dióxido de carbono como solvente e na maioria dos casos, a utilização deste solvente levou a perdas de atividade enzimática, devido

principalmente à característica hidrofílica do dióxido de carbono. Segundo muitos autores, o dióxido de carbono supercrítico pode retirar a água essencial responsável por manter a atividade enzimática (Primo et al., 2007; Oliveira et al., 2006a; Oliveira et al. 2006b; Fricks et al., 2006). Por outro lado, neste trabalho, verificou-se um aumento na atividade da enzima após o tratamento com dióxido de carbono supercrítico para todas as condições experimentais. Isto pode ser devido ao fato de que a água possivelmente removida das células permeabilizadas não afetou o teor de água responsável por manter a atividade da enzima. A melhora na atividade poderia ser devido às mudanças na estrutura terciária da β -galactosidase promovida durante a exposição a alta pressão de dióxido de carbono.

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as células permeabilizadas de *K. marxianus* contendo enzima β -galactosidase mostraram atividades mais elevadas após o tratamento com fluidos comprimidos, permitindo a sua utilização na síntese de produtos, como por exemplo o GOS neste tipo de solvente. Concluiu-se que a magnitude da pressão (ou reduzida densidade), taxa de decompressão e tempo de exposição influenciaram positivamente na atividade da enzima em um grau similar para todos os solventes.

Os resultados aqui obtidos permitem a possível utilização de β -galactosidase para síntese de produtos, em condições de alta pressão e abre uma possibilidade promissora de melhorar a atividade da enzima, contribuindo assim no desenvolvimento de processos de biotransformação de variados tipos de matérias-primas.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, J. M., OESTRIECHER, 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. *The Journal of Supercritical Fluids*, 46, 342-350, 2008.

ANGUS, S., ARMSTRONG, B., & REUCK, K. M. International thermodynamics tables of the fluid state: carbon dioxide, Pergamon Press, Oxford, UK, chapter 2, p. 340, 1976.

EISENMENGER, M. J., & REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 331-347, 2009.

FRANKEN, L. P. G., MARCON, N. S., TREICHEL, H., OLIVEIRA, D., FREIRE, D. M. G., DARIVA, C., DESTAIN, J., & OLIVEIRA, J. V. Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity. *Food Bioprocess and Technology*, DOI 10.1007/s11947-008-0087-5., 2008.

FRICKS, A. T., SOUZA, D. P. B., OESTRICHER, E. G., ANTUNES, O. A. C., GIRARDI, J. S., OLIVEIRA, D., & DARIVA, C. (2006). Evaluation of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38, 347-353, 2006.

HSU, C. A.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 104, n. 2, p. 197-206, 2005.

ISHIKAWA, E. et al. Identification, Cloning, and Characterization of a *Sporobolomyces singularis* β -galactosidase-like Enzyme Involved in Galacto-Oligosaccharide Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 99, n. 4, p. 331-339, 2005.

SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *kluuyvoromyces marxinus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.