

## Área: Engenharia de Alimentos

# USO DE FLUIDO PRESSURIZADO NO TRATAMENTO DE INULINASE OBTIDA A PARTIR DE *Aspergillus niger*

**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\***

*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, URI Campus de Erechim*

*\*E-mail: marceli\_f@hotmail.com*

## RESUMO

O trabalho avalia a atividade enzimática residual e específica da inulinase de *Aspergillus niger* submetida a dióxido de carbono pressurizado. O efeito do tempo de exposição, pressão e taxa de depressurização sobre as atividades foram avaliados por um planejamento experimental fatorial com 8 pontos fatoriais e triplicata do ponto central. Os resultados mostram que pressão de 75bar durante 6h com uma taxa de depressurização rápida (200 bar/m-3min-1) favorece uma menor perda na atividade residual de 61,06%, porém nas mesmas condições é obtido um aumento de 12% na especificidade da enzima. 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 *Aspergillus niger*.

**Palavras-chave:** enzima, inulinase, dióxido de carbono, *Aspergillus niger*.

## 1 INTRODUÇÃO

A aplicação de solventes em condições supercríticas ou próximas ao seu ponto crítico é baseada na observação experimental da característica que muitos gases apresentam de melhorar significativamente o seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (McHugh e Krukoni, 1994).

Dentre os diversos fluidos supercríticos, o dióxido de carbono tem sido apontado como o mais adequado, pois as escalas de temperatura usadas no emprego deste solvente são

compatíveis com o uso das enzimas como catalisadores. Além disso, ele é o solvente mais aceito para aplicações industriais, uma vez que oferece algumas vantagens sobre os solventes orgânicos ou a água, quais sejam: atoxicidade, não inflamabilidade, baixo custo, facilidade de recuperação do produto e alta transferência de massa e taxas de reações enzimáticas.

Muitas reações têm sido estudadas nesta área, incluindo a oxidação de fenóis pela polifenol oxidase (Hammond et al., 1985) e a conversão de p-nitrofenilfosfato e p-nitrofenol por uma fosfatase alcalina (Randolph et al., 1988). Dentre os estudos encontrados na literatura sobre o uso de dióxido de carbono como solvente, verifica-se o de Knez e Habulin (2001), que investigaram a estabilidade de diversas enzimas, entre elas as de *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus* e *Candida rugosa* frente ao dióxido de carbono supercrítico e propano próximos ao ponto crítico, expostos a 300 bar e 40°C por 24 horas. Neste mesmo estudo, os autores submeteram a enzima de *Candida rugosa* à reação de esterificação do ácido n-butírico em dióxido de carbono supercrítico, propano e sem solvente. Verificou-se que as taxas iniciais de reação dependem fortemente da escolha do solvente a ser utilizado. Ocorreu uma diferença significativa entre a atividade da lipase em dióxido de carbono supercrítico e em propano, sendo que em dióxido de carbono a atividade das lipases diminuíram notadamente.

Existe uma infinidade de aplicações possíveis para gases pressurizados e, possivelmente, um maior conhecimento das características e do comportamento de enzimas nestes solventes, significaria aprimoramento destas aplicações.

As inulinasas podem ser utilizadas em processos de hidrólise da inulina para obtenção de xarope de frutose e de frutooligossacarídeos, e também na síntese de frutooligossacarídeos a partir da sacarose. Muitos dos frutooligossacarídeos não são degradados pelas enzimas digestivas humanas, o que os tornam desejáveis como adoçantes, alimentos de baixa caloria podendo ser consumidos por diabéticos (Playne Crittenden, 1996).

A literatura apresenta escassez de estudos no uso de fluidos pressurizados como tratamento de inulinase. A maior parte dos estudos publicados trata-se dos efeitos sobre a lipase. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento da atividade enzimática residual e específica da inulinase obtida de *Aspergillus niger*, após ser submetida a dióxido de carbono pressurizado.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### Reagentes e enzimas

O micro-organismo utilizado foi a *Aspergillus niger* adquirido da Sigma-Aldrich.

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

#### 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.

#### 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 5,5 com 2% (p/v) de sacarose. Após diluída, a solução foi mantida a 50°C, por 2 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).

## 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 (dióxido de carbono), 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]. 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 (10–200bar/min) e pressão (75-275 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 menor perda de atividade após o tratamento com dióxido de carbono foi encontrada no ensaio 4 (61,06%) onde a enzima foi exposta a 75bar durante 6h com uma taxa de despressurização rápida de 200kg/m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. Observa-se que a maior atividade residual e específica ocorre no ensaio onde a enzima foi submetida a uma taxa de despressurização rápida, o que pode ter ocasionado uma mudança em sua conformação terciária e por consequência aumento em sua especificidade

Segundo Celebi et.al. (2007), ao realizar o tratamento da enzima com CO<sub>2</sub>, pode ocorrer uma interação do gás com o centro ativo da enzima promovendo uma alteração em sua conformação. Essa interação pode formar compostos carbamatos do CO<sub>2</sub> e grupos de aminas livres na superfície da enzima, esses compostos propiciam a desnaturação das proteínas que não participam da reação e podem favorecer a enantioseletividade da enzima.

Kim e Hong (2001) estudaram o tratamento de celulose com dióxido de carbono supercrítico e tiveram um significativo aumento no rendimento de açúcares finais na hidrólise enzimática, mostrando ser este um tratamento com muitas vantagens como a não toxicidade e

baixo custo do CO<sub>2</sub>, altas concentrações de sólidos nos materiais pré-tratados e baixas temperaturas no pré-tratamento.

Zheng et al, (1995) estudaram a explosão de celulose com CO<sub>2</sub> supercrítico e observaram um aumento da reatividade da celulose, melhorando a taxa de hidrólise pelo aumento da área superficial acessível do substrato celulósico. Um aumento da pressão acelera a penetração das moléculas de CO<sub>2</sub> na estrutura cristalina e assim, mais glicose é produzida na hidrólise em relação ao material não tratado com CO<sub>2</sub>.

Tabela 1- Atividade reativa residual \*(%) sobre a inulinase de *Aspergillus niger* após tratamento com CO<sub>2</sub> pressurizado.

Enzima Imobilizada (U/g)**				106,06 (U/g)	0,13	798,03
Ensaio	P (bar)	T (horas)	R (kg m <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> )	Ativ. Residual Enzimática (%)*	Proteína (mg/g)	Atividade Enzimática específica (U/mg)
1	-1 (75)	-1 (1)	-1 (10)	51,63	0,07	747,60
2	-1 (75)	-1 (1)	1 (200)	43,86	0,16	282,4
3	-1 (75)	1 (6)	-1 (10)	52,00	0,14	389,8
4	-1 (75)	1 (6)	1 (200)	61,06	0,07	952,3
5	1 (275)	-1 (1)	-1 (10)	32,32	0,06	539,00
6	1 (275)	-1 (1)	1 (200)	32,03	0,09	361,90
7	1 (275)	1 (6)	-1 (10)	29,82	0,12	268,70
8	1 (275)	1 (6)	1 (200)	45,53	0,09	506,10
9	0 (175)	0 (3.5)	0 (105)	49,55	0,06	811,70
10	0 (175)	0 (3.5)	0 (105)	47,78	0,07	741,50
11	0 (175)	0 (3.5)	0 (105)	51,86	0,06	840,10

P=pressão t= tempo de exposição R= taxa de despressurização

\*atividade enzimática residual definida como o valor absoluto de (ativ. Inicial/ativ. Final)/100

\*\* atividade da enzima antes do tratamento

Após o tratamento dos dados da Tabela 1, foi possível a construção das curvas de contorno, onde observa-se que os maiores valores de atividade residual e específica da

enzima de *Aspergillus niger* após ser submetida ao tratamento em fluido pressurizado ocorre quando os experimentos foram conduzidos em níveis superiores de tempo (6h) e taxa de despressurização ( $200 \text{ kg/m}^3 \text{ min}^{-1}$ ) e nível inferior de pressão (75bar).

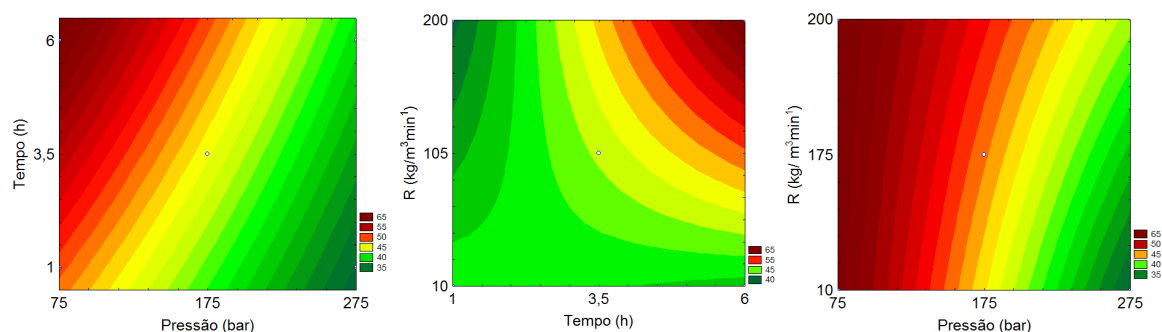


Figura 1- Curvas de contorno para os resultados de atividade residual e específica da enzima de *Aspergillus niger* após tratamento com dióxido de carbono (a) tempo x pressão; (b) taxa de despressurização x tempo; (c) taxa de despressurização x pressão.

### 3 CONCLUSÃO

O emprego do  $\text{CO}_2$  como tratamento de enzimas promove um aumento na especificidade da reação enzimática e uma menor perda em sua atividade residual. A condição onde ocorreu maior aumento da atividade específica ( $952,30 \text{ U/mg}$ ) e menor perda na atividade residual (61,06%) para a enzima comercial de *Aspergillus niger* foi a correspondente à pressão de 75bar e taxa de despressurização rápida de  $200 \text{ kg/m}^3 \text{ min}^{-1}$  durante 6h. Mostrando que a utilização de dióxido de carbono pressurizado pode causar um aumento de 12% na capacidade de hidrólise da sacarose pela inulinase.

### REFERÊNCIAS

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).

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).

HAMMOND, D. A., KAREL, M. E KLIBANOV, A. M. Enzymatic reactions in supercritical gases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 11, p. 393, (1985).

KNEZ, Z., HABULIN, M., Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: A short review. *J Supercrit Fluids*, v.23, n.1 , p.29-42 ,(2001).

KIM, K. H., HONG, J. Supercritical CO<sub>2</sub> Pretreatment of Lignocellulose Enhances Enzymatic Cellulose Hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 77, n. ,p 139- 144, (2001).

McHUGH, M., KRUKONIS, V. Supercritical Fluid Extration, Stonenham, Butterworth-Heinenamm, (1994).

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

PLAYNE, M. J., CRITTENDEN, R. Commercially Available Oligosaccharides, in *Bulletin of the IDF*, v. 313, p.10-22, (1996).

RANDOLPH, T.W., CLARK, D.S., BLANCH, H.W., PRAUSNITZ, J.M., WILKE, C.R. Cholesterol aggregation and interaction with cholesterol oxidase in supercritical carbon dioxide. *Proceedings of National Academy Science, USA*, v. 85,n. , p.2979, (1988).

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).

ZHENG, Y., LIN, H.M., WEN, J., CAO, N., YU, X., TSAO, G.T. Supercritical Carbon Dioxide Explosion as a Pretreatment for Cellulose Hydrolysis. *Biotechnology Letters*,v. 17, n. , p. 845- 850, (1985).