



IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE EM SÍLICA MODIFICADA

Ana Heloisa da Silveira Venzel (PIBIC/CNPq/UEM), Poliana Carneiro Tiosso, Flávio Faria de Moraes, Gisella Maria Zanin. E-mail: giselladeq@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Engenharia Química/ Centro de Tecnologia / Maringá, PR

Engenharias e Tecnologias

Palavras-chave: imobilização, β -galactosidase, sílica de porosidade controlada.

Resumo:

A enzima β -galactosidase pode ser utilizada para a produção de galacto-oligossacarídeos, que são probióticos. Apesar das vantagens de se utilizar enzimas em processos catalíticos, sua aplicação em processos industriais tem sido pouco explorada, devido às limitações causadas por sua baixa estabilidade em condições de operação, ao elevado custo de obtenção da enzima e, para a separação do substrato e produto ao final da reação. A imobilização de enzimas é uma alternativa viável para minimização desses problemas. Sendo assim, essa pesquisa visou a obtenção das melhores condições de preparo do suporte e de imobilização da enzima. Realizou-se a caracterização da enzima livre e conduziu-se testes variando a temperatura de silanização da sílica, a temperatura durante a reação de imobilização da enzima, o tempo de imobilização e a concentração de GPTMS. A partir dos experimentos, obteve-se um método de imobilização da β -galactosidase, sendo as melhores condições a concentração de 1,0% de GPTMS, a reação de modificação química da enzima a 60°C, a temperatura de imobilização de 20°C, e o tempo de imobilização de 48 horas. A atividade específica da enzima nessas condições foi de 2,42 U/mg de proteína e 90,8% de recuperação da atividade específica da enzima, enquanto a atividade específica máxima da enzima livre foi de 2,7 U/mg de proteína. Esse resultado demonstra-se vantajoso, pois a atividade específica foi similar à da enzima livre e conseguiu-se aumentar a estabilidade dessa às variações de temperatura e pH e reaproveitar o biocatalisador.

Introdução

A enzima β -galactosidase é utilizada para a produção galacto-oligossacarídeos (GOS), que apresentam efeito probiótico. Mas, apesar das vantagens catalíticas das enzimas sejam muitas, sua utilização em processos industriais tem sido limitada, devido, principalmente à baixa estabilidade nas condições de operação, ao elevado custo de obtenção da enzima, desde o isolamento até a purificação, e à dificuldade técnica e do elevado custo para a separação do substrato e produto ao final da reação, pois são de difíceis solubilização no meio de reação (ASRAF & GUNASEKARAN, 2010).

Dessa forma, a imobilização de enzimas é uma alternativa viável para minimização desses problemas. O processo de imobilização consiste em fixar a enzima na superfície de um agente imobilizador ou alojá-la dentro de um suporte, impedindo o





movimento independente dessa na parte aquosa do sistema (TAMPIOM e TAMPIOM, 1988). Dentre a vasta quantidade de materiais disponíveis para o desenvolvimento de novos suportes, a sílica de porosidade apresenta características interessantes para esse processo.

Neste contexto, foi realizada a imobilização da enzima β -galactosidase em suporte de sílica de porosidade controlada e avaliou-se a atividade e estabilidade térmica da enzima livre e a atividade da enzima imobilizada.

Materiais e métodos

Foram utilizadas a enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* Lactozym 2600L, Novozymes e a sílica de porosidade controlada, com diâmetro médio de partículas igual a 0,42 mm. O soro de queijo em pó foi fornecido pela empresa Alibra e os demais reagentes foram de grau analítico P.A. Os equipamentos utilizados para as análises foram um espectrofotômetro UV-VIS, marca SHIMADZU, modelo UV-1601PC; pHmetro TECNAL, modelo TEC-2; agitador de tubos PHOENIX AT 56; banho termostático Dubnoff Tecnal TE-053; balança analítica METTLER AE200; e, balança semi-analítica METTLER PM400.

A concentração de glicose durante a reação da hidrólise da lactose foi medida pelo método de GOD-PAD. A determinação do teor de proteína da enzima β -galactosidase (U/mL) foi realizada por meio do método colorimétrico do azul de Coomassie (BRADFORD, 1976).

A atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais, a atividade específica da enzima livre e a estabilidade térmica foram medidas conforme descrito por Matioli, Moares e Zanin (2001). A imobilização da enzima foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Bernal, Sierra e Mesa (2014), com modificações.

Resultados e Discussão

Caracterização da enzima livre

Realizou-se a caracterização da enzima livre, tendo sido avaliados o teor de proteína da enzima e a sua atividade específica em relação ao pH e temperatura. O teor de proteína na enzima livre foi de 10,194 mg/mL. A atividade da enzima β -galactosidase foi igual a 2241,30 U.mL⁻¹.

Os resultados para atividade específica da enzima livre em relação ao pH e à temperatura estão ilustrados na figura 1. Em relação à estabilidade térmica da enzima livre, os resultados obtidos encontram-se na figura 2.

Esses resultados permitiram definir que as melhores condições de reação para a enzima são pH 6,5 e temperatura de 45°C. Nessas condições a atividade específica máxima da enzima foi de 2,67 U/mg proteína. Esse resultado é coerente com os estudos realizados por Matioli et al. (2001), nos quais obteve atividade máxima da enzima (3,12 U/mg de proteína) em pH 6,5 na temperatura de 45 °C.

Observa-se que nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C a enzima demonstrou ser estável durante todo o ensaio. Na temperatura de 45 °C, por outro lado, a enzima perdeu





19,44% de sua atividade após 80 minutos e, a 50 °C, após 40 minutos estava praticamente inativa. Embora a maior atividade da enzima tenha sido a 45°C, esta foi inativada em pouco tempo. Conclui-se, portanto, que sua aplicação em reações de longa duração deve ser conduzida em temperaturas inferiores a 45 °C.

Os resultados obtidos condizem com os encontrados por Matioli et al. (2001), que concluíram que apesar da atividade máxima ser encontrada a 45 °C, recomendam a 40 °C para processos de longa duração (2,81 U/mg de proteína), pois a enzima demonstrou ser mais estável nesta temperatura, além de apresentar atividade específica apenas 10 % menor que a 45 °C (3,12 U/mg de proteína).

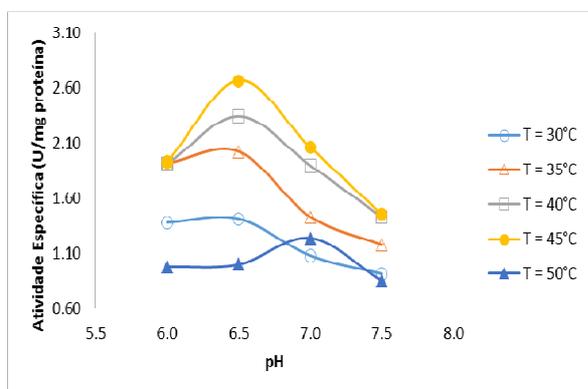


Figura 1- Atividade específica da enzima livre em relação ao pH e à temperatura

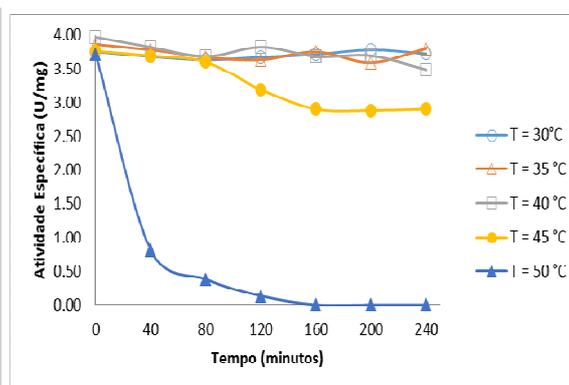


Figura 2 – Estabilidade térmica em função da temperatura em pH 6,5.

Imobilização enzimática

Apesar da imobilização da enzima ter sido realizada conforme descrito por Bernal et al (2014), a atividade enzimática obtida não foi a esperada. Dessa forma, novos testes tomando, como base o método de imobilização de Zanin (1989), que sugere condições mais brandas na modificação do suporte, foram realizados. Variou-se a concentração dos reagentes, as temperaturas e tempos de reação. Os melhores resultados encontrados estão apresentados na tabela 1.

Em termos de atividade específica e retenção da atividade específica da enzima, verificou-se que não havia a necessidade de realizar a preparação da sílica à 85°C, pois os resultados obtidos para as duas temperaturas foram bastante similares. Com isso, reduz-se o custo com aquecimento da solução, descarta-se a necessidade de utilização de condensador durante a reação e, conseqüentemente, elimina a necessidade de água de resfriamento.

Na condição de concentração de 1,0% de GPTMS, modificação química da enzima à 60°C, temperatura de imobilização de 20°C, por um período de 48 horas, obteve-se uma atividade específica de 2,42 U/mg de proteína e 90,77% de recuperação da atividade específica da enzima. Tendo em vista que a atividade específica máxima da enzima livre foi de 2,66 U/mg de proteína, esse resultado mostra-se muito vantajoso, pois além de ter apresentado uma atividade específica praticamente igual à da enzima livre, a enzima imobilizada promove maior estabilidade operacional, aumenta a vida útil da enzima, que pode ser usada repetidamente, inclusive em reatores de fluxo contínuo.





Tabela 1 – Resultados da imobilização enzimática

Condições Imobilização	E (mg prot./g)	Ei (mg prot./g)	AEi a 45°C (U/mg prot.)	RI 45°C (%)
1% GPTMS, 20°C, 48h	10,8	7,64	2,41	90,4
1% GPTMS, 20°C, adição 40% de glicerina, 48h	10,8	7,60	0,38	14,3
1% GPTMS, 20°C, 48h	5,30	0,70	0,97	36,4
1% GPTMS, 20°C, 48h	21,6	10,9	1,1	41,3
1% GPTMS, 20°C, 48h, silanização a 60°C	10,8	7,80	2,42	90,8
1% GPTMS, 20°C, 72h	10,96	0,87	0,87	32,5
1% GPTMS, 20°C, adição 40% de glicerina, 72h	10,96	0,34	0,27	10,3
1% GPTMS, 26°C, 48h	10,7	1,34	1,75	65,6
1% GPTMS, 26°C, adição 40% de glicerina, 48h	10,7	1,17	1,12	42,014
1% GPTMS, 4°C, 48h	10,7	0,87	0,62	23,3
1% GPTMS, 4°C, adição 40% de glicerina, 48h	10,7	0,65	0,47	17,6
0,5% GPTMS, 20°C, 48h	10,8	0,89	0,79	29,9
0,5% GPTMS, 20°C, adição 40% de glicerina, 48h	10,8	1,13	1,15	43,1

E - atividade oferecida para imobilização (mg proteína/g suporte seco); Ei - enzima imobilizada; AEi - atividade específica enzima imobilizada; RI - retenção de atividade; GPTMS – gama-amino-propil-trietoxi-silano

Conclusões

A enzima imobilizada apresentou uma atividade específica muito similar à da enzima livre e, um percentual de retenção da atividade da enzima de 90,8%.

Agradecimentos

Ao CNPQ pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Referências

ASRAF, S. S. e GUNASEKARAN, P. **Current trends of beta-galactosidase research and application.** Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology v.2, p. 880-890, 2010.

BERNAL, C., SIERRA, L., MESA, M., Application of Hierarchical porous silica with a stable large porosity for β -galactosidase immobilization. **ChemCatChem**, 3, 1948–1954, 2011.

BRADFORD, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

MATIOLI, G., MORAES, F. F., ZANIN, G. M., Hydrolysis of lactose by betagalactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. **Acta Scientiarum, Maringá**, v. 23, p. 655-659, 2001.

TAMPION, J.; TAMPION, M.D. **Immobilized cells: principles and applications.** Cambridge University Press. 257 p., 1988.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada.** 1989. 489f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

