

## OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE EM SÍLICA MODIFICADA

Thaís Eloá da Silveira Venzel (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Poliana Carneiro Tiosso, Gisella Maria Zanin. E-mail: giselladeq@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro Tecnologia / Maringá, PR.

### Engenharias e Tecnologias

**Palavras-chave:** imobilização enzimática,  $\beta$ -galactosidase, ligação covalente, Método da Ancoragem.

#### Resumo:

As vantagens do uso da enzima  $\beta$ -galactosidase em nível industrial são, de fato, numerosas: elas dizem respeito à capacidade da enzima de romper as ligações glicosídeas da lactose e à sua função de catalisador na síntese de oligossacarídeos. Entretanto, as enzimas ainda têm sido pouco exploradas neste campo. Isto acontece porque elas têm custo elevado, são de difícil separação do substrato no final da reação e possuem baixa estabilidade nas condições de operação. A solução mais viável é, então, a imobilização enzimática. Sendo assim, esta pesquisa visou a otimização da imobilização da  $\beta$ -galactosidase por um método criado recentemente, denominado imobilização por ancoragem, comparando-o com dados de um método mais difundido e investigado de imobilização – o método de ligação covalente. Para isso, modificou-se quimicamente a sílica de porosidade controlada com solução 1% de GPTMS, com o objetivo de melhorar as condições de imobilização. Em seguida, realizou-se a imobilização por ancoragem da  $\beta$ -galactosidase com diferentes solventes, obtendo-se resultados de atividade enzimática acima dos da enzima livre. Neste caso foi o hexano o solvente que apresentou os melhores resultados de atividade, 5.3677U/mg de proteína contra 2,6663U/mg de proteína da enzima livre. Após, foram feitos ensaios da estabilidade térmica dos solventes que melhor se ajustaram ao novo método de imobilização e, para todos eles, o decaimento da atividade foi bastante brusco, mesmo trabalhando-se nas condições ótimas de temperatura e pH da enzima. Este resultado torna a utilização do método da ancoragem limitada, porque ainda, necessita de estudos para adaptação às condições de operação na indústria.

#### Introdução

A hidrólise enzimática da lactose pela  $\beta$ -galactosidase, ou lactase, como é conhecida, é a tecnologia mais popular na redução da lactose do leite e dos seus produtos para indivíduos intolerantes. A lactose é um açúcar higroscópico; tem a tendência de absorver odores e sabores e pode causar diversos defeitos em produtos refrigerados tais como a cristalização e o

desenvolvimento de uma textura arenosa nos derivados do leite. Hidrolisando a lactose com a  $\beta$ -galactosidase, estes defeitos também podem ser corrigidos (GROSOVÁ e colab., 2003).

O custo da enzima, todavia, é considerado alto, principalmente quando comparado ao baixo valor do soro do leite descartado: é economicamente inviável a adição direta da  $\beta$ -galactosidase no substrato. A imobilização da enzima, portanto, reduziria as perdas do processo, uma vez que o biocatalisador pode ser reutilizado diversas vezes. Ainda, a utilização de uma enzima imobilizada, quando comparada à enzima livre, traz benefícios tais como: a fácil separação da enzima do substrato e produto da solução no final da reação, não há contaminação do produto pela enzima, maior estabilidade operacional e a possível utilização de um processo contínuo (GROSOVÁ e colab., 2003). Apesar dos seus benefícios, a imobilização pode alterar as propriedades da enzima de estabilidade à temperatura e ao pH e parâmetros cinéticos, e, por isso, deve ser avaliada.

Estudos dos diferentes métodos de imobilização enzimática buscam aumentar a eficiência da imobilização de forma a manter as propriedades das enzimas. O método da ligação covalente, um dos mais difundidos, é fundamentado na ligação química forte que enzima e suporte podem formar. Suportes como cerâmica, vidro, sílica e metais são os mais utilizados neste processo. Além disso, a imobilização por este método em sílica ativada conferiu estabilidade térmica relativamente boa a 40°C para a  $\beta$ -galactosidase (TIOSSO, 2016). O método da imobilização por ancoragem, por sua vez, foi desenvolvido de forma a permitir um contato mais íntimo entre a solução enzimática e a superfície da matriz de imobilização. O princípio deste método é a evaporação do solvente em um ambiente de pressão reduzida (DANTAS, 2016).

## **Materiais e métodos**

Foram utilizadas a enzima  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* Lactozym 2600L, Novozymes adquirida da Sigma-Aldrich, 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 nas análises foram: 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 METLER 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 atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais, e a estabilidade térmica foi medida conforme descrito por Mاتيoli, Moares e Zanin (2001).

A imobilização da enzima foi realizada de acordo com a metodologia proposta da imobilização por ancoragem (DANTAS, 2016). Ainda, para averiguar se o método da ancoragem de fato imobiliza a enzima na sílica e não apenas evapora todo o solvente, deixando a enzima livre, realizou-se o

seguinte teste: (1) imobilizou-se a enzima na sílica com hexano, (2) lavou-se esta sílica com o próprio hexano e (3) determinou-se o teor de proteína no produto da lavagem pelo método colorimétrico do azul de Coomassie (BRADFORD, 1976).

## Resultados e Discussão

Deve-se levar em conta que a enzima livre comercial  $\beta$ -galactosidase *Kluyveromyces lactis* tem sua atividade enzimática ótima em pH 6,5 e temperatura de 45 °C, sendo esta de 2,67U/mg de proteína. Além disso, uso da enzima em reações de longa duração apresenta melhores resultados para ensaios a 40 °C (ROSSETTO, 2013).

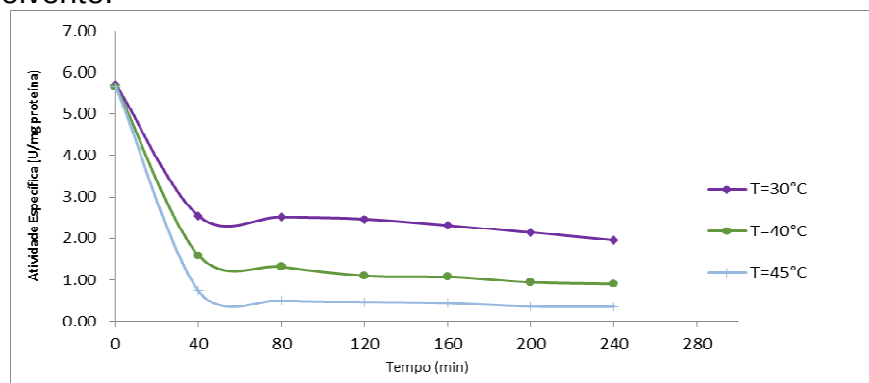
Com o objetivo de otimizar o Método de Imobilização por Ancoragem, foram testados solventes tais como hexano, pentano, clorofórmio e heptano. Entretanto, após a observação da interação da sílica com a enzima e os solventes, optou-se também por fazer o procedimento diretamente da enzima na sílica, sem auxílio de solvente. As atividades da enzima imobilizada estão apresentadas na Tabela 1 para os solventes que apresentaram melhores resultados.

**Tabela 1**– Dados da atividade específica da  $\beta$ -galactosidase nas condições ótimas de temperatura e pH para a imobilização para cada solvente

| Solvente     | Atividade Específica<br>(U/mg de proteína) |
|--------------|--------------------------------------------|
| Hexano       | 5,3677                                     |
| Pentano      | 3,3939                                     |
| Sem Solvente | 4,4898                                     |

Assim o método mostra-se eficiente neste aspecto, aumentando nos três casos a atividade da enzima livre nas mesmas condições.

O gráfico da Figura 1 mostra, um rápido decaimento da atividade enzimática com o tempo para as diferentes temperaturas. São estes dados da estabilidade térmica para a enzima imobilizada por ancoragem com hexano como solvente.



**Figura 1** – Gráfico da estabilidade térmica da  $\beta$ -galactosidase imobilizada por ancoragem com hexano

Observa-se que após 40 minutos, em qualquer uma das temperaturas, a atividade enzimática é menor que aquela da enzima livre.

Nos ensaios feitos com pentano e sem solvente, a estabilidade térmica não mostrou-se mais eficiente. A 40°C a atividade específica da enzima imobilizada com pentano caiu para 0,731U/mg de proteína. Sem solvente a atividade específica caiu para 1,886U/mg de proteína.

Por fim, averiguou-se a imobilização, obtendo um teor de proteína após a lavagem da sílica de 0,0151mg/ml. Como o teor de proteína na enzima é de 10,194 mg/ml, pode-se considerar que a enzima foi imobilizada.

## Conclusões

A aplicação do Método de Imobilização por Ancoragem da  $\beta$ -galactosidase apesar de mostrar bons resultados de atividade específica nas condições ótimas da enzima, não é viável por não ser capaz de manter estável esse valor com a temperatura.

## Agradecimentos

Ao CNPQ pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto e às minha orientadoras pela confiança e pelo aprendizado neste ano de pesquisa.

## Referências

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.

DANTAS, J. H. **Modulação da hidrofobicidade da sílica para imobilização de Lipase de Burkholderia cepacia.**, 2016. 172f. Tese de Doutorado em Engenharia Química na área de Biocatálise e Processos Bioquímicos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Perspectives and Applications of Immobilised  $\beta$ -Galactosidase in Food Industry – a Review. **Czech J. Food Sci.**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 2003.

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.

ROSSETTO, B. P. **Síntese de Galacto-oligossacarídeos a partir de soro de queijo por reação enzimática**, 2013. 79f. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

TIOSSO, P. C. **Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de soro de leite por reação enzimática em processo batelada alimentada**, 2016. 60f. Proposta de pesquisa para a Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.