



IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EM AGAROSE E ÁLCOOL POLIVINÍLICO

R. A. S. Santos¹; C. B. B. Isaac²; J. W. de Sousa Filho³

^{1,2,3} Universidade de Uberaba, Departamento de Engenharia Química

RESUMO – *O objetivo deste trabalho foi estudar a imobilização enzimática da lactase, enzima responsável pela hidrólise da lactose do leite em glicose e galactose. A intolerância a lactose atinge cerca de 70% da população adulta mundial.*

*A indústria de laticínios busca o desenvolvimento de novos produtos com baixo teor de lactose para atender a esse público. A enzima liofilizada β -galactosidase utilizada no presente trabalho é de origem do fungo *Aspergillus oryzae* da marca Lactosil. A imobilização foi feita utilizando dois suportes diferentes, álcool polivinílico e solução amies agar gel.*

O meio operacional sofreu variações de temperatura e pH para saber qual suporte resistiria melhor a essas condições. A enzima livre e a enzima imobilizada com amies agar gel tiveram melhor rendimento a 60°C. Já a enzima imobilizada com álcool polivinílico teve maior conversão a 90°C.

Nos ensaios de variação de pH tanto a enzima livre quanto as enzimas imobilizadas tiveram bons rendimentos de atividade catalítica. Os melhores resultados de atividade enzimática ocorrem em uma faixa de pH variando de 6 a 8, para a enzima livre e para as enzimas imobilizadas. De acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar que o álcool polivinílico apresentou maior estabilidade em temperaturas próximas da desnaturação enzimática, ou seja, próxima a 100°C. No presente trabalho foi-se estudado também o tempo de desnaturação da enzima em temperaturas extremas, estudando assim o comportamento da enzima livre comparado aos suportes utilizados.

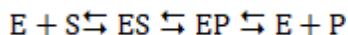
1. INTRODUÇÃO

Os processos industriais atualmente utilizam a biotecnologia industrial para produzir produtos de alto valor agregado usando menos matéria-prima. A aplicação da biotecnologia é feita em diversas áreas industriais tais como papel e celulose, mineração, têxteis, químicos e energia (Abbi, 2017).

A biotecnologia utiliza microrganismos e enzimas para a otimização dos processos industriais (Embrapa, 2015). As enzimas são catalisadoras de reações químicas, ou seja, elas aceleram os processos químicos e são mais vantajosas que os catalisadores químicos por serem mais viáveis ecologicamente (Monteiro; Silva, 2009).

A reação de uma enzima pode ser descrita como na Figura 1, onde E é enzima, S o substrato e P o produto. Os complexos ES e EP são provisórios, representam a enzima com o substrato e com o produto (Lehninger, 2014).

Figura 1: Reação enzimática



Fonte: LEHNINGER, 2014.

As enzimas são catalisadores de alto custo, por isso para tornar o processo mais acessível economicamente tem-se que recuperar e reutilizar essas enzimas. A reutilização desses biocatalisadores é viável quando são imobilizados e a sua preparação é estável (Resende, 2016).

Esses biocatalisadores são expostos a variações de temperatura, pressão, pH e solventes orgânicos em um processo industrial, dependendo do grau de exposição a essas variações as enzimas perdem a sua capacidade de catalisar reações químicas (Mendes *et al.*, 2011). A imobilização enzimática possui várias vantagens sobre a enzima solúvel, são mais resistentes a influências da temperatura, pH e solventes orgânicos (Resende, 2016). Outros ganhos com a utilização de enzimas imobilizadas é o aproveitamento da atividade catalítica por mais tempo, a facilidade de separar o biocatalisador do produto da reação, a oportunidade de reutilizar as enzimas, a fácil interrupção da reação, quando se atingiu o rendimento desejado e a possibilidade de conduzir processos contínuos (Resende, 2016; Mendes *et al.*, 2011).

A imobilização enzimática depende do tipo de método e suporte utilizado (Resende, 2016; Mendes *et al.*, 2011). Os métodos podem ser: encapsulação, adsorção física, ligação covalente e reticulação (Resende, 2016; Mendes *et al.*, 2011; Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Os suportes são classificados em orgânicos e inorgânicos e de acordo com a sua morfologia são porosos, não porosos e de estrutura de gel (Mendes *et al.*, 2011). Não existe um método de imobilização que pode ser utilizado em todas as enzimas. A escolha do método deve levar em consideração as seguintes características: ser o mais simples de executar, o mais viável economicamente, o que permita que a enzima tenha uma boa atividade catalítica, o que a enzima tenha regeneração e inativação, a toxicidade dos reagentes e que tenha boa estabilidade operacional (Resende, 2016).

Atualmente a indústria de laticínios tem desenvolvido produtos com baixo teor de lactose, para atender a consumidores que possuem intolerância a lactose (Longo, 2006; Pereira, 2013). A intolerância a lactose atinge 70% da população adulta mundial e é causada pela má absorção da lactose no sistema digestivo (Mahan; Escott-Stump, 1998; Swagerty; Walling; Klein, 2002). A enzima lactase é responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose para transporte através da membrana celular (Swagerty; Walling; Klein, 2002).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo a imobilização enzimática da lactase comercial, utilizando álcool polivinílico e gel de agarose. Foi realizado testes em diferentes temperaturas e pH como meio operacional, para observar qual imobilização teve melhor rendimento.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

O substrato utilizado foi leite pasteurizado tipo A de marca comercial, comprado em mercado na cidade de Uberaba no estado de Minas Gerais, o substrato em questão possuía pH inicial de 6,8. Todo o ensaio foi feito com variação de temperatura de 10°C, iniciando em 30°C e terminando em 100°C. A variação de pH foi de 1 em 1, iniciando em 3 e terminado em 8. A variação de temperatura foi realizada com o auxílio de banho maria da marca TECNAL e as variações de pH foram feitas com adição de Hidróxido de Sódio (NaOH) e Ácido Clorídrico (HCl) ambos em concentrações de 0,5 mol/L e utilizando PHmetro digital PG2000 Gehaka.

A enzima liofilizada β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* da marca Lactosil foi utilizada no presente trabalho com concentração Lactase - 10.000 FCC ALU (Unidades de lactase) 100 mg de enzima bruta e 1,9 gramas de carboidratos e apresenta-se na forma de um pó branco ou levemente amarelado. A lactase é solúvel em água, insolúvel em etanol, acetona e isopropanol. Uma unidade FCC de Lactase (FCC LU) é a quantidade de enzima que vai liberar 1 micromol de o-nitrofenol/minuto, a 37° C, a um pH de 4,5, sob as condições de teor recomendadas pelo fabricante na proporção de 1 sachê de 2 gramas para 1000 mL de leite. Todos os ensaios experimentais foram feitos individuais, amostras eram pesadas e imobilizadas uma a uma. Para o suporte enzimático utilizou-se álcool polivinílico (PVOH 92 - 95%), produto em forma de pó granulado, de odor inodoro, cor branco amarelado, densidade 0,61 – 0,67 g/cm³ e característica higroscópica.

Para o preparo do suporte pesou-se uma amostra de 1 grama de PVOH em balança analítica e hidratado com água destilada em proporção de 1/1 m/m. A adição da água só acontecia após a adição da enzima no PVOH. Após a hidratação do PVOH agitando continuamente com ajuda de uma espátula de aço, formou-se uma esfera semissólida. Para o segundo suporte foi utilizado solução Amies Agar gel-COPAN da marca Transysem, disponibilizado por uma empresa de biotecnologia animal sediada na cidade de Uberaba-MG, que tem por finalidade o envio de amostras em Swab para detecção de campilobacteriose genital bovina.

O suporte em Amies Agar gel consistiu em pesar amostras de 1 grama em béquer e em seguida adicionar a enzima e agitar por alguns segundos com auxílio de uma espátula/a de alumínio fazendo assim sua total diluição. Os ensaios de laboratório para determinação da hidrólise da lactose do leite em glicose e galactose utilizando β - galactosidase foram realizados em diferentes temperaturas. O leite foi fracionado em 50 mL usando uma proveta de vidro e colocado em Erlenmeyer de 250 mL, em seguida foram colocados em banho maria, a enzima foi adicionada ao ensaio após o leite adquirir a temperatura desejada. Dando sequência ao experimento, as amostras foram mantidas a temperatura constante por 15 minutos, em seguida, retiradas e colocadas em banho de gelo e sequencialmente analisadas. O experimento se repetiu nas temperaturas inicial de 30°C, variando de 10°C até a temperatura de ebulição aproximadamente 100°C. O segundo ensaio experimental foi conduzido em condições experimentais de 60°C, os resultados obtidos foram em grau de hidrólise da lactose na temperatura em questão.

O leite utilizado apresentou pH inicial de 6,8, as medições ocorreram em pHmetro digital. O



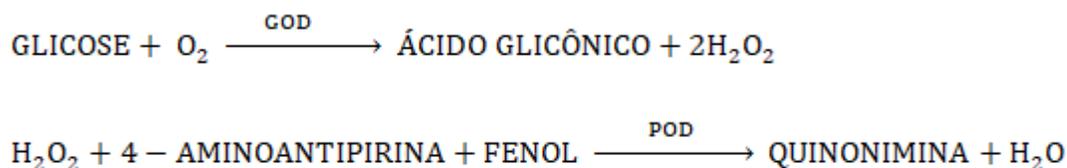
comportamento dos ensaios foi acompanhado por um período de 15 minutos e em seguida feito a medição em espectrofotômetro pela hidrólise da lactose utilizando o método GOD-PAP, glicose oxidase. Os valores obtidos foram subtraídos de um valor inicial de 1,1586. Para o ensaio as amostras de leite foram divididas em Erlenmeyer de 250 mL e identificados com siglas para designar seus determinados pH, sendo E1=3 e sequencialmente até o pH final de 8. A acidificação do meio ocorreu com a adição de solução de ácido clorídrico com concentração de 0,5 mol/l, uma pequena quantidade foi adicionada agitando constantemente a solução em seguida mensurado o pH. Para os ensaios alcalinos uma quantidade de hidróxido de sódio a 0,5 mol/l foi adicionada e aferido o pH para ajuste do mesmo. As amostras foram fracionadas em 17 mL de leite, adicionadas em béqueres e feito a proporção de enzima e suporte para uma amostragem menor.

No final foram identificadas com os determinados ensaios e em seguida levados a banho maria, a enzima foi adicionado ao ensaio após o leite adquirir a temperatura desejada. Dando sequência ao experimento as amostras foram mantidas a temperatura constante por 15 minutos, retiradas e colocadas em banho de gelo e sequencialmente analisadas. A lactose é um dissacarídeo, que ao sofrer hidrólise, forma como produtos glicose e galactose. Segundo Zadow (1984 apud Carminatti, 2001) os dois monossacarídeos são unidos por uma ligação carbono-1 da galactose e o carbono-4 da glicose. Os ensaios experimentais de hidrólise do leite têm por objetivo principal determinar a concentração de glicose presente na amostra após o período de exposição a determinadas temperaturas e pH para detecção da melhor atividade enzimática.

Todas as amostras foram analisadas pelo kit de glicose oxidase método GOD-PAP. O kit contém um reagente R1 com a composição de tampão fosfato 182,42 mmol/l pH 7,0, GOD- Glicose oxidase >15000U/l, POD-Peroxidase >1200 U/l, 4- aminoantipirina 0,3 mmol/l, fenol 10mmol/ e solução para preparo do padrão STD a base de azida sódica 0,02% e solução de glicose equivalente a uma concentração de 100mg.

O princípio do método consiste na oxidação da glicose pela enzima oxidase existente na amostra, em presença de oxigênio, produzindo peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase catalisa a oxidação do fenol pelo peróxido de hidrogênio formado em presença de 4- aminoantipirina produzindo um composto de cor rosa (quinonimina), reação indicada na Figura 2, que apresenta máximo de absorção em 505 nm. A intensidade de cor é proporcional a concentração de glicose na amostra.

Figura 2: Método GOD-PAP glicose oxidase



Fonte: Bula glicose R1 Biotécnica.

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro 700plus da marca Femto, feitas em



triplicata com cubetas de vidro de volume útil 2 mL e comprimento de onda de 505 nm. Os procedimentos técnicos seguiram as orientações especificadas pela fabricante do reagente glicose R1 Biotécnica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidrólise do leite utilizando enzima liofilizada β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* da marca Lactosil foi utilizada no presente trabalho com concentração Lactase - 10.000 FCC ALU (Unidades de lactase), o experimento permitiu o estudo da hidrólise da lactose sob diversas condições operacionais.

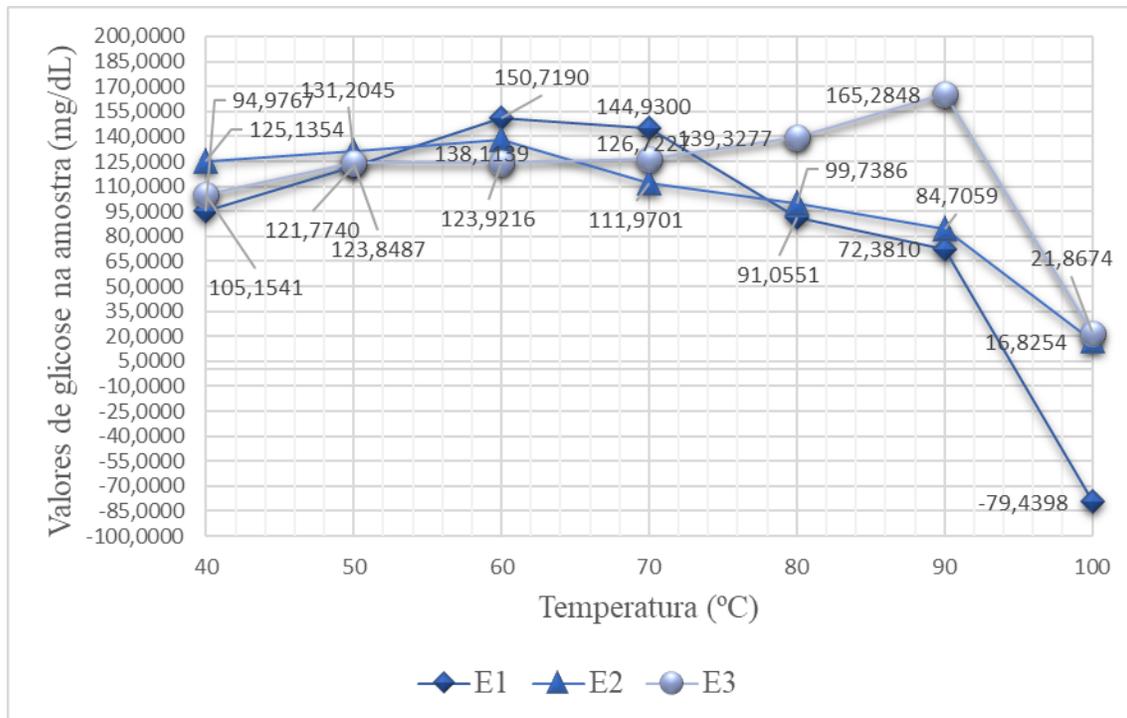
Condições operacionais em variações de temperatura

Primeiramente foi realizado uma análise do leite em temperatura ambiente para quantificar a glicose inicial. O resultado obtido da absorvidade deste ensaio foi de 1,1586. O valor inicial foi então utilizado para o cálculo dos demais ensaios com variações de 10°C. Os resultados posteriores foram subtraídos do valor inicial da glicose. Nos ensaios experimentais observou-se que os melhores rendimentos nos experimentos E1 e E2 foi a 60°C, sendo considerada essa a temperatura ótima e próxima ao valor literal, para o experimento E3 o valor de máxima conversão foi a 90 °C.

O PVOH, um promissor polímero sintético, tem sido usado para imobilização celular. É um polímero atrativo para uso como suporte para imobilização, pois é de baixo custo, é produzido em larga escala e é inofensivo a biomateriais como enzimas, células e tecidos (Ariga et al., 1994). Os valores foram plotados em gráfico para melhor observação da variação da atividade enzimática, como observado no Gráfico 1. No experimento E2 houve pouca discrepância em comparação ao E1, que por ser livre o contato da enzima com o substrato e a formação do complexo enzima substrato foi mais eficiente a temperatura de 60°C. No entanto o ensaio E2 definido como oclusão ou aprisionamento de enzima em espaços intersticiais da rede polimérica (enzima confinada no interior de miscelas), obteve rendimentos favoráveis em comparação ao E1, porém com o aumento da temperatura o suporte não se mostrou eficiente fazendo com que a atividade enzimática caísse gradualmente.



Gráfico 1: Influência da temperatura na atividade enzimática



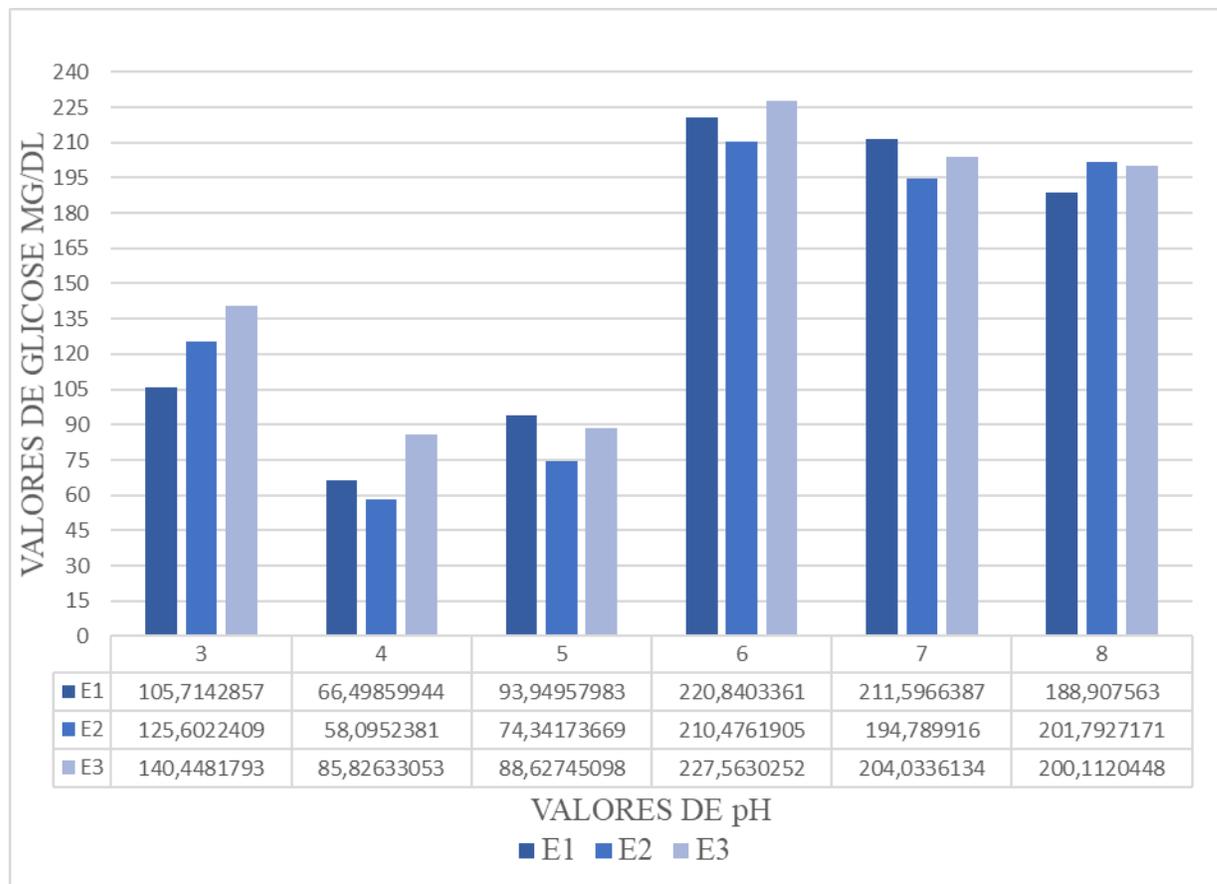
Fonte: Acervo do autor, 2017.

Condições operacionais em variações de pH

O segundo ensaio experimental mostrou que em todas as faixas de pH houve atividade enzimática, em ambos os ensaios a melhor faixa de pH foi 6, valores entre 1 e 5 tiveram as piores atividades enzimáticas, e os melhores rendimentos foram na faixa de 6 a 8, como mostrado no Gráfico 2. A análise mostra que o grau de hidrólise foi aproximado quando a reação ocorreu em pH 6 e 7. Nos ensaios de pH ácido os valores para o grau de hidrólise foram baixos, melhorando gradualmente com a diminuição da acidez, e valores de grau 1 em acidez proporcionou diferentes valores de hidrólise.



Gráfico 2: Influência do pH na atividade enzimática



Fonte: Acervo do autor, 2017.

Comparativo desnaturação 100°C

As reações enzimáticas são fortemente dependentes da temperatura ótima, que está diretamente ligada a atividade catalítica, em temperatura baixas e ou altas ocorre a inativação da enzima, devido a desnaturação da mesma.

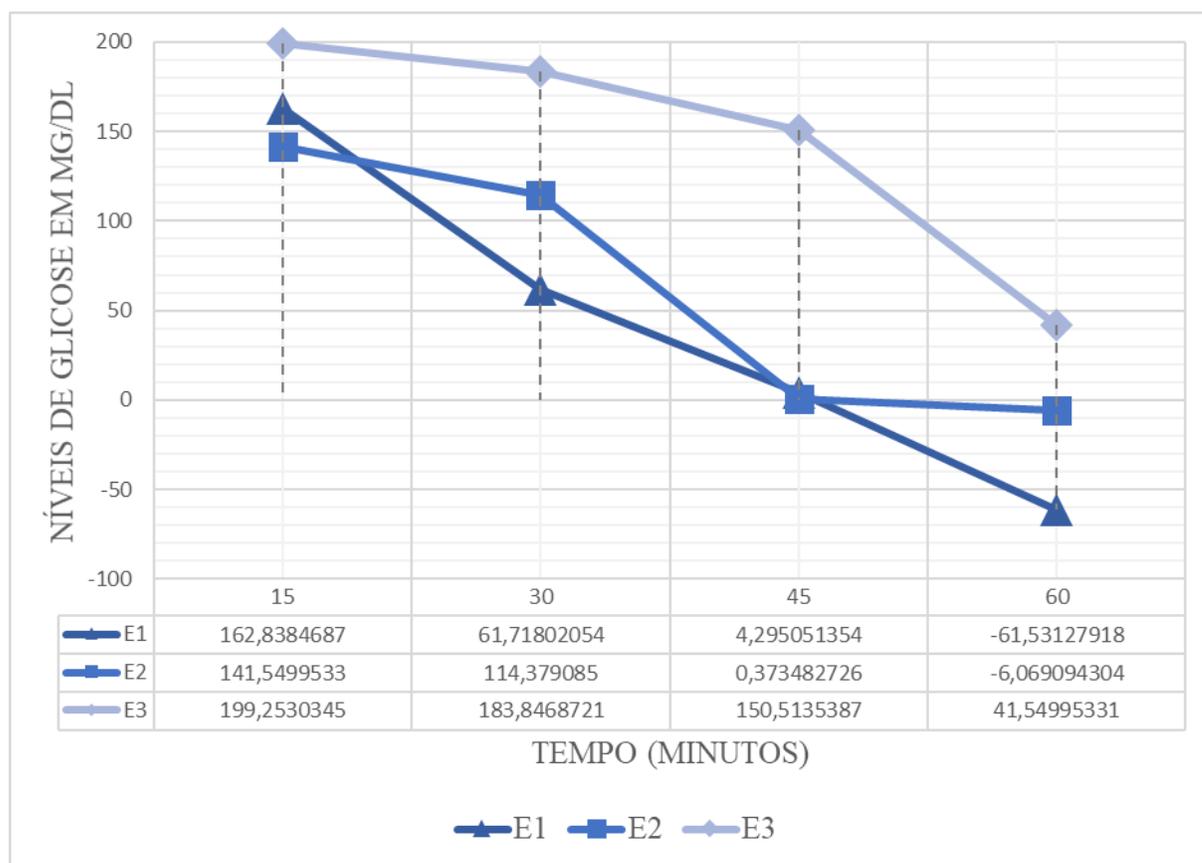
O experimento foi conduzido a temperatura de 100°C, resultados experimentais conduzidos nesta determinada temperatura permitiu a detecção de queda no grau de hidrólise, causado pela desnaturação da enzima. O comportamento dos ensaios foi acompanhado por um período de 60 minutos e comparados com valores de hidrólise de lactose inicial. A partir do valor inicial foi feita a média das análises iniciais dos três ensaios totalizando um valor de 1,158667. Os demais valores dos ensaios são feitos a subtração da análise em questão pelo valor da análise inicial.

Com o aumento da temperatura a conversão de lactose reduziu sensivelmente, com conversão máxima a 60°C e desnaturação na faixa de 90 a 100°C.



Analisado o tempo de desnaturação enzimática a 100°C por 60 minutos, conforme mostra o Gráfico 3, constatou-se que o suporte enzimático E₂ é menos eficiente que o E₃, sendo o aprisionamento menos eficiente que a adsorção física, no entanto ambos tiveram rendimentos favoráveis e exerceram a função de proteção para enzima.

Gráfico 3: Influência do tempo na atividade enzimática



Fonte: Acervo do autor, 2017.

Análises em glicose oxidase apresentaram queda no decorrer de 60 minutos, o leite apresentou grau de fervura elevado evaporando grande parte da água e, assim dificultando a continuidade do experimento.



5. CONCLUSÃO

Podemos concluir com o presente trabalho que todos os ensaios experimentais permitiram analisar a estabilidade do imobilizador e as influências nas condições operacionais de temperatura e pH.

- As variações de temperatura interferiram diretamente na atividade enzimática, obtendo melhor hidrólise de lactose em temperatura de 60°C nos experimentos E₁ e E₂ e nos ensaios de E₃ próximo da temperatura de 90°C.
- Nos ensaios de variação de pH, a hidrólise de lactose obteve valores baixos em pH baixo, entre 3 e 5, e teve as melhores atividades enzimáticas em pH 6 e 8, sendo que em todos os experimentos a melhor hidrólise de lactose ocorreu em pH 6.
- A utilização de suportes enzimáticos orgânicos e inorgânicos possibilitou a comparação de estabilidade e proteção da enzima. O álcool polivinílico apresentou estabilidade em temperaturas próximas da desnaturação e o método de adsorção da enzima apresentou proteção, no entanto, houve baixa hidrólise em temperaturas entre 30 a 70°C em comparação aos outros ensaios enzimáticos.
- No experimento de desnaturação enzimática a 100°C, houve grande dificuldade na continuidade da hidrólise ao longo do tempo, a evaporação do leite impossibilitou a continuação do experimento e os valores de hidrólise apresentaram queda, uma das hipóteses é que a glicose do meio foi arrastada por adsorção na água.

6. REFERÊNCIAS

- ABBI. Biotecnologia Industrial. 2017. Associação Brasileira de Biotecnologia Industrial.
- ARIGA, O. Encapsulation of Biocatalyst with PVA Capsules. India, 1994.
- ARROYO, M. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. Madrid, 1996.
- CARMINATTI, C. A. Ensaios de hidrólise enzimática da lactase em reator de membrana utilizando beta-galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*. Florianópolis, 2001.
- DALLA-VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 623-630, ago. 2004.
- EMBRAPA. Enzimas: a chave da biotecnologia. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2015.
- LONGO, G. Influência da adição de lactase na produção de iogurtes. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia. 9. ed. São Paulo: Roca, 1998.
- MENDES, Adriano A. *et al.* Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos*, Goiânia, v.3, n.5, ano 3, jan./jun. 2009.
- PEREIRA, Mônica Cecília Santana *et al.* LÁCTEOS COM BAIXO TEOR DE LACTOSE: UMA NECESSIDADE PARA PORTADORES DE MÁ DIGESTÃO DA LACTOSE E UM NICHOS DE MERCADO. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, [S.l.], v. 67, n. 389, p. 57-65, dez. 2013. ISSN 2238-6416.
- RESENDE, R. R. Biotecnologia Aplicada À Agro&Indústria – Fundamentos e Aplicações. v. 4. São Paulo: Blucher, 2016.
- REZA.M. INTERFERENSI OBAT DALAM ANALISA. Disponível em:
<<http://rezaankes.blogspot.com.br/2015/07/interferensi-obat-dalam-analisa.html#>>. Acesso em:
30 out. 2017
-



SWAGERTY JR, D. L.; WALLING, A D.; KLEIN, R. M. Lactose intolerance. American Family Physician, v. 65, n. 9, p. 1845–1850, 2002.

VIEIRA, M. A. Imobilização de enzimas em suportes sólidos e aplicações sintéticas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.