



## X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

*“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”*

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Universidade Severino Sombra  
Vassouras – RJ – Brasil

### ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DA LACTOSE CATALISADA POR $\beta$ -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564

HORTÊNCIO<sup>\*1</sup>, L. C.; PINHEIRO<sup>1</sup>, B.B.; FREITAS<sup>2</sup>, M. F. M.; GONÇALVES<sup>4</sup>, L. R. B.

<sup>1</sup>Bolsista do Programa de Educação Tutorial – PET/DEQ/UFC;

<sup>2</sup>Doutorando– PGEQ/UFC;

<sup>4</sup>Docente - DEQ/UFC.

Departamento de Engenharia Química (DEQ) - Universidade Federal do Ceará (UFC) – Campus do Pici, Bloco 709, Fortaleza - CE, CEP 60440-554  
e-mail: lrg@ufc.br; lucashortencio18@yahoo.com.br

**RESUMO** – A enzima  $\beta$ -galactosidase é muito utilizada na indústria de alimentos uma vez que hidrolisa a lactose em monossacarídeos mais solúveis e com menor tendência a cristalização. Uma das principais aplicações da enzima  $\beta$ -galactosidase é a hidrólise da lactose, que pode ser conduzida em condições amenas de operação (temperatura ambiente e pH próximo da neutralidade). Um grande número de suportes têm sido usados para a imobilização da  $\beta$ -galactosidase, que devem ser inertes e possuir características desejadas de acordo com a aplicação da imobilização. Neste contexto, a quitosana, usada para imobilização da enzima neste trabalho, apresenta-se como promissor, devido ao seu baixo custo e a facilidade do processo de preparação do catalisador. A reação de hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada tem sido modelada em termos de inibição pelos produtos, especialmente pela galactose. Na maioria dos trabalhos científicos, a galactose atua como um inibidor competitivo, ao passo que a glicose não atua como inibidor. Este trabalho teve como objetivo determinar a influência da concentração de substrato e produto na hidrólise de lactose catalisada por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 imobilizada, avaliando os modelos cinéticos através da comparação com os resultados experimentais.

**Palavras chave:** hidrólise,  $\beta$ -galactosidase e imobilizada.

## INTRODUÇÃO

A enzima  $\beta$ -galactosidase é muito utilizada na indústria de alimentos uma vez que hidrolisa a lactose em monossacarídeos mais solúveis, doces e com menor tendência a cristalização. A hidrólise da lactose pode ser realizada também por catálise ácida sendo exigido alta concentração de ácido e altas temperaturas, além de promover reações

paralelas complexas, no entanto na hidrólise enzimática as condições de operação são mais suaves com relação à temperatura e pH gama de aplicações industriais.

O objetivo do trabalho foi determinar a influência da concentração de substrato e produto na hidrólise de lactose catalisada por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564, avaliando os modelos cinéticos

através da comparação com os resultados experimentais.

## METODOLOGIA

### Microrganismo

A espécie *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 foi doada pelo USDA (United States Department of Agriculture). A cultura estoque foi mantida em meio ágar YEPD (contendo: extrato de levedura 10 g/L; peptona 20 g/L; glicose 20 g/L e ágar 20 g/L) sob refrigeração.

### Preparo do inóculo

A cepa de *Kluyveromyces lactis* foi repicada em meio ágar YEPD (contendo: ágar 20 g/L; dextrose 20 g/L; extrato de levedura 10 g/L e peptona 20 g/L) e incubada em estufa bacteriológica a 30 °C por 24h, para ativação. Após esse período, foram transferidas por meio de uma alça, colônias para os respectivos meios de propagação de inóculo, incubado a 30 °C, sob agitação de 180 rpm por 24 h. Após as 24 h, a densidade ótica (DO) do mesmo foi lida a 620 nm em espectrofotômetro, com leitura da DO na faixa de  $1,0 \pm 0,1$ , prosseguia-se para o ensaio do cultivo do micro-organismo inoculando 10% (v/v) do volume desse inóculo em 50 mL de meio de cultivo.

### Cultivo para a produção de $\beta$ -galactosidase

50 mL de soro de leite pre-tratado de acordo com Santiago *et al.*, (2004) e Lima (2011) foi distribuído em frascos Erlenmeyers de 250 mL e esterilizado a 115 °C por 10 min. Depois de esterilizados, esse soro serviu como fonte de substrato na fermentação da levedura *Kluyveromyces lactis*. As condições do ensaio foram as mesmas condições da propagação do inóculo: 30 °C, 180 rpm com o tempo de 14 h. Após o término da fermentação, as amostras foram retiradas para análise de biomassa, pH e determinação da atividade enzimática.

### Ruptura celular

O método de ruptura celular foi o do agitador do tipo vortex associado a micropérolas de vidro Segundo Medeiros *et al.*, (2008).. O primeiro foi realizado através de ensaios de ruptura com cargas de pérolas de vidro de 1,10 g/mL por um período de 30 min, com intervalos de 2 min em banho de gelo a cada 5 min de processo de agitação.

### Determinação da atividade da enzima $\beta$ -galactosidase através da hidrólise substrato ONPG

Para a determinação da atividade inicial hidrolítica da enzima, utilizou-se o substrato sintético o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG), a 37°C e pH 6,6. Para a enzima solúvel, 2 mL de ONPG 1,25 mM, em tampão fosfato de potássio 50 mM com  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,1 mM a pH 6,6, foram colocados em tubos de ensaios. Em seguida os tubos foram colocados no banho-maria a 37 °C para estabilidade térmica e adicionou-se uma amostra de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático contendo  $\beta$ -galactosidase. Após 5 minutos, parou-se a reação pela adição de 0,5 mL de carbonato de sódio 1M. A atividade foi determinada por meio de um espectrofotômetro a 420 nm e calculada de acordo com a Equação 1:

$$At(\text{U/mL}) = \frac{A \times V_t}{\epsilon \times L \times V_e \times t} \quad (1)$$

Sendo: A - absorbância lida;  $V_t$  - volume total = 2,55 mL;  $V_e$  - volume de enzima = 0,05 mL; t - tempo de reação = 5 min; L - caminho óptico = 1 cm;  $\epsilon$  - coeficiente de extinção = 4,53 mol/cm.

A atividade da  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi realizada colocando a massa necessária para uma carga de 3,8U/g do derivado imobilizado em um reator a 37 °C, contendo 5 mL de solução de ONPG 1,25 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6 com 0,1 mM de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  mantido sob

agitação. Após 5 minutos de hidrólise, retirou-se 2 mL dessa solução com um filtro e adicionou-se 0,5 mL de carbonato de sódio 1 M. A atividade do imobilizado pode ser calculada de acordo com Equação 2.

$$At_{\text{derivado}}(\text{U/g}) = \frac{A \times V_t}{\epsilon \times L \times m_{\text{DERIVADO}} \times t} \quad (2)$$

Sendo: A - absorbância lida;  $V_t$  - volume total = 2,55 mL; t - tempo de reação = 5 min; L - caminho óptico = 1cm;  $\epsilon$  - coeficiente de extinção = 4,53 mol/cm;  $m_{\text{DERIVADO}}$  = massa de gel em g.

### **Determinação do pH ótimo para a atividade da $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada**

O pH ótimo da enzima  $\beta$ -galactosidase foi determinado através da hidrólise da lactose 5% (m/v) a 40 °C, em tampão fosfato 100 mM contendo de  $\text{MnCl}_2$  e 0,2 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Os valores de pH do meio reacional variaram de 5,5 a 8,0.

### **Determinação da temperatura ótima para a atividade da $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada**

A temperatura ótima de hidrólise de lactose da enzima  $\beta$ -galactosidase foi determinada utilizando uma solução sintética em tampão de fosfato de potássio 100 mM com 0,1 mM de  $\text{MnCl}_2$  e 0,2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,0. Variou-se a temperatura de incubação de 30 a 50 °C e o tempo de reação foi de 10 min.

### **Preparação das partículas de quitosana e ativação**

As partículas de quitosana foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Vieira (2009). Quitosana em pó foi solubilizada em ácido acético 2,0% (v/v) e homogeneizada por 30 minutos em agitador mecânico a temperatura ambiente. Posteriormente, 30 mL desta solução foi colocada em um reator a 50°C e adicionou-se 45 mL de KOH 0,5 M como agente coagulante,

mantendo a agitação por mais 30 minutos. Seguiu-se então para ativação deste suporte, adicionando-se glutaraldeído 0,8%; (v/v), sob a solução de quitosana coagulada com KOH. Após 30 minutos de ativação a 50°C, as partículas foram lavadas com água destilada e secas utilizando uma bomba a vácuo

### **Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase**

A  $\beta$ -galactosidase foi imobilizada em gel de quitosana ativado com glutaraldeído 0,8%, em pH 7,0 e a 25 ° em tampão fosfato de potássio 100 mM, contendo 0,1 mM de  $\text{MnCl}_2$  e 0,2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , sob agitação suave em agitador rotatório por 5h .O gel de quitosana foi com água destilada e secado a vácuo. Depois, analisou-se a atividade pelo método do substrato ONPG.

### **Determinação da atividade de hidrólise de lactose pela enzima solúvel e imobilizada**

A atividade  $\beta$ -galactosidase também foi determinada pela a hidrólise da lactose PA, que foi conduzida em tubos de ensaios de 10 mL contendo 5 mL solução sintética (lactose 5,0% (m/v) em tampão de fosfato de potássio 100mM com 0,1 mM de  $\text{MnCl}_2$  e 0,2 mM de  $\text{MgCl}_2$  pH 7,0), a temperatura de 37 °C por 10 min. A glicose produzida foi quantificada pelo o método GOD-PAP utilizando um kit enzimático para a dosagem de glicose (Bezerrar, 2010). Uma unidade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um micromol de glicose por minuto nas condições descritas acima.

Para a enzima solúvel, adicionaram-se 80 microlitros da enzima solúvel previamente diluída. Após 10 minutos, retiraram-se as amostras (150  $\mu\text{L}$ ), interrompeu-se a reação pela adição de 150  $\mu\text{L}$  de 0,1 M NaOH. A atividade foi calculada de acordo a Equação 3:

$$At(U/mL) = \frac{A \times V_t \times 5,5}{t_H \times V_e} \quad (3)$$

Sendo: A - absorvância lida (mg/mL);  $V_t$  - volume total = 5mL;  $t_H$  - tempo da reação de hidrólise = 10 min;  $V_e$  - volume de enzima = 0,08 mL;

A atividade da  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi determinada em reator batelada mantida a 37° C contendo a solução de substrato, sob agitação mecânica suave. Amostras foram retiradas do sobrenadante e a glicose produzida foi quantificada. A atividade do derivado foi calculada de acordo a equação:

$$At_{\text{derivado}}(U/g) = \frac{A \times V_t \times 5,5}{t_H \times m_{\text{enzima}}} \quad (4)$$

Sendo: A - absorvância lida (mg/mL);  $V_t$  - volume total = 5mL;  $t_H$  - tempo da reação de hidrólise = 10 min;  $m_{\text{enzima}}$  = massa de gel em g.

#### **Hidrólise da solução de lactose utilizando a $\beta$ - galactosidase imobilizada.**

O ensaio foi realizado através da hidrólise comercial da lactose. A reação foi conduzida em reatores encamisados contendo 20 mL de solução de lactose 1% e 5% (m/v) em tampão fostato 100mM pH 7,0 adicionado de 0,1 mM

de  $MnCl_2$  e 2 mM de  $MgCl_2$  em temperatura de 40°C. Os 10 minutos iniciais foram para estabilização da temperatura. Então, retirou-se o branco e adicionou 3,8 U/g em massa de imobilizado. A reação foi conduzida por 60 minutos retirando alíquota a cada 10 minutos adicionando-a em uma amostra de 0,1 M de NaOH para interromper a reação. A quantificação da glicose foi feita pelo método GOD-PAP utilizando produto enzimático para dosagem de glicose (TRINDER, 1969). A quantidade foi analisada espectrofotometricamente, com um comprimento de onda de 550 nm.

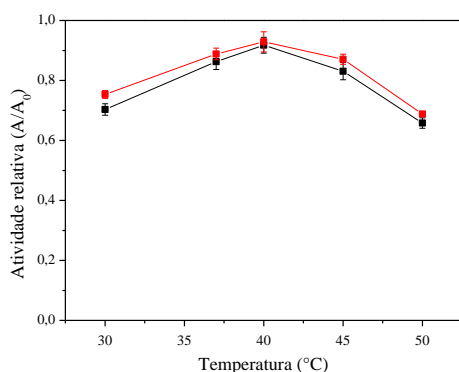
#### **Hidrólise da solução de lactose acrescida de galactose utilizando a $\beta$ - galactosidase imobilizada.**

O ensaio foi realizado através da hidrólise comercial da lactose. A reação foi conduzida em reatores encamisados contendo 20 mL de solução de lactose 1% e 5% (m/v) em tampão fostato 100mM pH 7,0 adicionado de 0,1 mM de  $MnCl_2$  e 2 mM de  $MgCl_2$  acrescido de 2% de galactose (m/v) em temperatura de 40°C. Os 10 minutos iniciais foram para estabilização da temperatura. Então, retirou-se o branco e adicionou 3,8 U/g em massa de imobilizado. A reação foi conduzida por 60 minutos retirando alíquota a cada 10 minutos adicionando-a em uma amostra de 0,1 M de NaOH para interromper a reação.. A quantificação da glicose foi feita pelo método GOD-PAP utilizando produto enzimático para dosagem de glicose (TRINDER, 1969). A quantidade foi analisada espectrofotometricamente, com um comprimento de onda de 550 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinação da temperatura ótima da enzima.

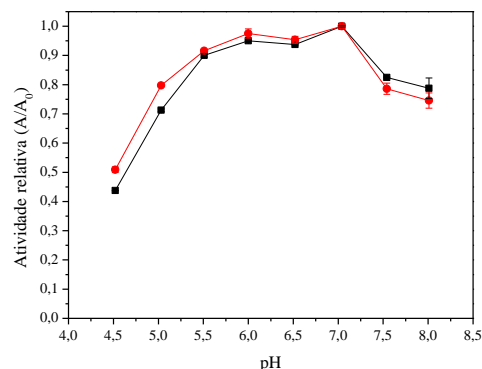
A Figura 1. mostra a influência da temperatura na atividade de hidrólise de lactose catalisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Observa-se que a temperatura ótima para a enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada foi 40 °C.



**Figura 1.** Influência da temperatura sobre a atividade de hidrólise de lactose catalisada por  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada. Legenda: (■) enzima solúvel; (■) enzima imobilizada.

### Determinação do pH ótimo da enzima

A Figura 2 mostra a influência do pH na atividade da enzima livre e imobilizada, mostrando que a faixa de pH ótimo é entre 6,5 a 7 tanto para a enzima solúvel e imobilizada.



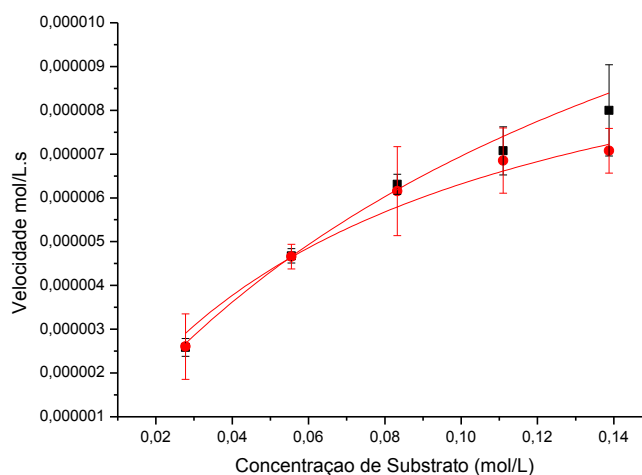
**Figura 2.** Influência do pH sobre a atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada na hidrólise de lactose a 40 °C. (■) enzima solúvel e (●) enzima imobilizada.

A atividade relativa ( $A_r$ ) foi definida como a razão entre a atividade enzimática do

estado final (A) e a atividade enzimática do estado inicial ( $A_0$ ).

O pH ótimo da enzima depende de fatores tais como, pKa dos grupos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima, microambiente em torno do sítio ativo e a polaridade da solução do solvente (Price e Stevens, 2000).

### Hidrólise de lactose catalisada por $\beta$ -galactosidase



**Figura 3.** Hidrólise da lactose, avaliando diferentes concentrações iniciais de substrato, ajustado a cinética de Michaelis-Menten para  $\beta$ -galactosidase (■) Sem a presença de inibidor (■) Com a presença de inibidor (20 g/L galactose).

	Velocidade max ( $V_{m\acute{a}x}$ ) mol/L.min	$K_m$ mol/L
Enzima	$1,15 \times 10^{-5} \pm 8,72 \times 10^{-7}$	$0,081 \pm 0,01221$
Enzima com Inibidor	$1,8 \times 10^{-5} \pm 2,23 \times 10^{-6}$	$0,1595 \pm 0,0281$

**Tabela 1.** Parâmetros cinéticos da hidrólise da lactose usando a enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada .

O modelo de Michaelis-Menten ajustou-se bem a cinética de hidrólise da lactose pela enzima  $\beta$ -imobilizada com e sem a presença do inibidor (produto – galactose). Não foi observado um comportamento diferente para os dois estudos da hidrólise da

lactose, perfis iguais considerando o desvio padrão.

O parâmetro velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) foi próximo para as duas cinéticas, resultado já esperado para um tipo de inibição competitiva.

O valor de  $K_m$  aumentou ( $K_m^{ap}$ ) indicando que a presença de galactose no início da reação diminui a afinidade da enzima pelo substrato lactose, pois a galactose compete pelo sítio ativo da enzima.

## CONCLUSÃO

A temperatura ótima e pH ótimo da enzima  $\beta$ -galactosidase foram 40 °C e 7,0, respectivamente, para a hidrólise da lactose usando a enzima solúvel ou imobilizada.

O modelo de Michaelis-Menten ajustou-se bem a cinética de hidrólise da lactose pela enzima  $\beta$ -imobilizada com e sem a presença do inibidor (produto – galactose).

Os valores dos parâmetros obtidos foram  $K_m$  para a cinética sem inibidor e com inibidor foram 0,081 e 0,1595 mol/L, respectivamente. Os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  foram aproximadamente iguais a  $1,15 \times 10^{-5}$  e  $1,8 \times 10^{-5}$  mol/L.min, respectivamente.

Não observou uma diferença entre o perfil da cinética conduzida sem a presença do inibidor galactose e com a presença na concentração estudada de 20 g/L.

Com base nos resultados exposto, a enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada mostrou-se eficiente na hidrólise da lactose, inclusive na presença do inibidor na concentração avaliada.

## REFERÊNCIAS

VIEIRA, D. C. Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. Dissertação de mestrado em Engenharia Química.

Universidade Federal de São Carlos, SP – Brasil, 2009.

BEZERRA, C.S..Imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos de ativação. Universidade Federal do Ceará. 2010.

FREITAS, M.F.M..Produção de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana. Universidade Federal do Ceará. 2013.

GUISÁN, J.M, Immobilization of enzymes and Cells. 2 ed. Totowa: Humana Press, 2006, cap 1, p.6-14.

MEDEIROS, F. O. ; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de  $\beta$ -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v.31, p. 336-339, 2008.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

LIMA, A. F. **Imobilização de uma  $\beta$ -galactosidase produzida por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, 2012.

PRICE, N., STEVENS, L. An introduction to enzyme kinetics. In: Price, N., Stevens, L. (Eds.), **Fundamentals of Enzymology: The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins**, Oxford University Press, p. 135, 2000.