



## 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

### IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE POR LIGAÇÕES MULTIPONTUAIS EM RESINAS DE TROCA IÔNICA

**L.Q.RAMOS<sup>1</sup>; L.N.S.S. FALLEIROS<sup>2</sup>, E. J. RIBEIRO<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Aluno da FEQUI/UFU    <sup>2</sup>Doutoranda da FEQUI/UFU    <sup>3</sup>Docente da FEQUI/UFU  
Faculdade de Engenharia Química - Universidade Federal de Uberlândia  
Endereço – UFU, Av João Naves de Ávila, 2121, Uberlândia, CEP. 38.408-100, MG,  
email: ejribeiro@ufu.br

**RESUMO** - Neste trabalho foram estudadas a imobilização e estabilização de  $\beta$ -galactosidase em resina de troca iônica, com e sem *cross-linking*, utilizando glutaraldeído. O processo de imobilização consistiu na adsorção da enzima na resina de troca iônica Duolite A-568 e a estabilização do derivado enzimático foi realizada através da sua incubação em tampão pH 9. Foi avaliada a influência da ordem das etapas de obtenção do biocatalisador imobilizado, bem como a influência do tampão utilizado na estabilização e o efeito da presença do substrato na obtenção do mesmo. Os resultados indicaram que o método de obtenção de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em Duolite A-568 que resultou na maior atividade catalítica foi a sequência dos processos de imobilização por adsorção, estabilização e o processo de ligação cruzada, promovendo um aumento de 44% da atividade enzimática, quando comparado com a atividade alcançada pelo biocatalisador obtido, apenas, pelos processos de adsorção e *cross-linking*. O emprego do tampão borato reduziu a atividade em aproximadamente 70% quando comparado com o tampão fosfato. A adição da lactose como composto protetor do sítio ativo da enzima durante a imobilização por adsorção não alterou o desempenho do biocatalisador, mostrando que o sítio ativo não está diretamente envolvido no processo de imobilização.

**Palavras chave:** Duolite A-568, lactose, ligação cruzada.

### INTRODUÇÃO

A produção mundial de leite em 2012 foi de 464,7 bilhões de litros, sendo o Brasil o terceiro maior produtor, gerando em torno de 6,3 milhões de toneladas de soro de queijo (USDA, 2012).

A enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.2.1.23) é classificada como uma hidrolase, sua principal função é

hidrolisar a lactose no leite e do soro, o que propicia o consumo de produtos lácteos derivados por pessoas intolerantes à lactose e também para reciclar soro que pode ser usado como um aditivo ao consumo humano ou alimento animal (HAIDER e HUSAIN, 2007). As propriedades da enzima  $\beta$ -galactosidase depende de sua fonte. A enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* é monomérica, com um peso molecular de 105

kDa e um pI de 4,6, apresentou pH ótimo de 4,5 com ONPG e 4,8 com lactose (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; ANSARI e HUSAIN, 2010).

Tem-se ainda um grande interesse na estabilização da enzima imobilizada através de ligações covalentes multipontuais, visto que estas ligações podem aumentar a rigidez da enzima e, por consequência, aumentar a estabilidade frente a agentes inativantes.

O objetivo deste trabalho foi estudar a imobilização e estabilização de  $\beta$ -galactosidase por ligações multipontuais em resina de troca iônica, verificando a influência da ordem de execução dos processos de imobilização, estabilização e reticulação com glutaraldeído, além de analisar a influência da composição do tampão utilizada na etapa de estabilização.

## MÉTODOS

### Determinação da atividade da enzima imobilizada

A reação de hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase era realizada em um reator, com um volume de 100 mL de substrato contendo 50 g/L de lactose a 35°C. Para cada experimento era adicionada ao reator uma cesta de aço inox com a enzima imobilizada.

A unidade de atividade (U) foi definida como grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de suporte ( $\text{g glicose/L.min.g suporte}$ ). Para cada experimento foram tomadas cinco amostras do meio reacional no intervalo de três em três minutos. Cada amostra era colocada em um tubo de ensaio, o qual era tampado e imediatamente colocado em um banho de água em ebulição, por 10 minutos. A glicose formada era dosada pelo método da glicose-oxidase (BAO *et al.*, 2004).

A atividade foi calculada a partir do método das taxas iniciais, para cada reação da hidrólise de lactose, era obtida pela inclinação das equações lineares de concentração de glicose em função do tempo de reação. Os experimentos foram realizados em triplicata para uma maior confiabilidade nos resultados obtidos.

### Etapas de obtenção do biocatalisador imobilizado

O processo de obtenção do biocatalisador imobilizado foi separado em três etapas, imobilização por adsorção em resinas de troca iônica, estabilização pela incubação a pH 9 e reticulação com glutaraldeído. Os procedimentos empregados para cada uma das etapas estão descritos a seguir.

**Imobilização:** consistiu na adsorção da enzima na resina de troca iônica Duolite A-568. Uma massa de 0,5 g da resina, foi incubada em 10 mL de solução enzimática com concentração definida para cada experimento preparada em tampão acetato de pH 4,5 (razão resina: solução enzimática = 1:20), sob agitação de 150 rpm em incubadora rotativa a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 horas. As condições de imobilização empregadas foram as encontradas no trabalho de Guidini *et al.* (2010).

**Estabilização:** foi realizada pela incubação do derivado enzimático em 10 mL de solução tampão fosfato  $10^{-1}\text{M}$  pH 9 sob agitação de 150 rpm em incubadora rotativa a  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h (MATEO *et al.*, 2000).

**Reticulação:** utilizou glutaraldeído como agente reticulante na razão 1:10 (1 g de resina para 10 mL de solução 3,5 g/L de glutaraldeído). Adicionou-se 5 mL da solução de glutaraldeído 3,5 g/L à enzima imobilizada e manteve-se este sistema sob agitação de 150 rpm e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 1,5 horas. As variáveis, concentração do glutaraldeído e tempo, foram definidas conforme estudo realizado por Guidini *et al.* (2010).

### Influência da etapa de estabilização na atividade do biocatalisador imobilizado

Para o estudo da influência da etapa de estabilização na atividade do biocatalisador imobilizado foram preparadas três amostras combinando as etapas do processo de obtenção do biocatalisador imobilizado. O primeiro experimento avaliou a influência da aplicação do processo de estabilização na resina antes da imobilização, conforme Lecta *et al.* (2004), que definiu este processo como “estabilização da resina”.

Para o derivado enzimático obtido, quando a enzima foi submetida ao processo de imobilização, seguido de incubação e finalmente exposta à ação do agente

reticulante, foram realizados dois experimentos utilizando solução enzimática com concentração de 5 g/L. No primeiro, entre cada etapa para obtenção do biocatalisador imobilizado, lavou-se a resina com tampão acetato pH 4,5, e no segundo experimento foi suprimida a etapa de enxágue da resina com tampão. Para análise da influência da etapa de enxágue foi quantificada a concentração de proteína, antes e após a imobilização, pelo método de Lowry *et al.* (1951).

### **Influência do tampão na atividade do biocatalisador imobilizado**

Para análise da influência do tampão utilizado na etapa de estabilização, três amostras de  $\beta$ -galactosidase foram submetidas ao processo de imobilização utilizando solução enzimática de 16 g/L, seguido do processo de reticulação e finalmente de estabilização. Foram empregados tampão borato 0,1 M, tampão tris (hidroximetilaminometano) 0,1 M e tampão fosfato 0,1 M, previamente preparados e ajustados para obter uma solução tamponada com pH 9. Determinou-se a atividade enzimática de cada derivado enzimático pelo método das taxas iniciais.

### **Efeito da adição de substrato durante o processo de imobilização**

Com a finalidade de verificar a influência da presença do substrato durante o processo de obtenção do biocatalisador imobilizado foram preparadas seis amostras combinando as etapas de imobilização e reticulação. As duas primeiras amostras foram submetidas apenas ao processo de imobilização padrão, a primeira na ausência e a segunda na presença de 0,5 g de lactose. As quatro amostras seguintes foram obtidas combinando os processo de imobilização e reticulação, sendo que duas amostras foram submetidas à imobilização padrão (ausência de substrato) e em seguida submetidas à ação do agente reticulante na ausência e presença do substrato, respectivamente. As últimas amostras foram imobilizadas na presença de 0,5 g de lactose, em seguida submetidas ao processo de reticulação, uma na presença de 0,25 g de lactose e outra na ausência de substrato. A quantidade de substrato adicionada em cada etapa de obtenção do

biocatalisador foi calculada para obter concentração de lactose de 50 g/L. Neste estudo utilizou-se solução enzimática com concentração de 16 g/L. Determinou-se a atividade enzimática de cada derivado enzimático pelo método das taxas iniciais.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Influência da etapa de estabilização na atividade do biocatalisador imobilizado**

A partir dos dados apresentados na Tabela 1, verifica-se que a inserção da etapa de estabilização (incubação em solução tamponada pH 9) aumentou a atividade enzimática em todas as amostras analisadas, independentemente da ordem em que a mesma foi executada, alcançando um incremento de 44% quando a enzima foi submetida ao processo de imobilização, seguido de incubação e finalmente exposta a ação do agente reticulante.

**Tabela 1 – Resultado de atividade enzimática em relação à atividade enzimática alcançada pelo biocatalisador**

Etapas de obtenção do Derivado enzimático	Atividade relativa (%)
1° Estabilização	119
2° Imobilização	
3° Reticulação	
1° Imobilização	144
2° Estabilização	
3° Reticulação	
1° Imobilização	129
2° Reticulação	
3° Estabilização	

Este aumento de 44% pode ser explicado pela elevação da taxa de imobilização produzida pelo aumento da reatividade dos grupos amino dos resíduos de lisina. Mateo *et al.* (2005) afirmam em seu trabalho que deve ser considerado que as proteínas podem ter, pelo menos, dois tipos diferentes de grupos amino primários, sendo o grupo amino dos resíduos de lisina o mais abundante, contudo apresenta um pKa relativamente elevado (cerca de 10,5 – 10,8) possuindo baixa

reatividade em valores de pH abaixo de 9 (PEDROCHE *et al.*, 2007; BOLIVAR *et al.*, 2009).

### Influência do tampão na atividade do biocatalisador imobilizado

O estudo realizado para verificar a influência da composição do tampão pH 9, utilizado na etapa de estabilização, mostra que a depender da composição do tampão a atividade do biocatalisador difere marcadamente, como pode ser visto nos resultados apresentados na Tabela 2, que mostra a atividade enzimática relativa em relação ao tampão pH utilizado na etapa de estabilização do derivado enzimático.

**Tabela 2 – Resultado da influência da composição do tampão pH 9 na atividade enzimática**

Tipo de Tampão	Atividade relativa(%)
Borato	32
Fosfato	100
Tris	95

Pela análise dos dados apresentados na Tabela 2 verifica-se que a escolha do tampão interfere significativamente na atividade do derivado enzimático obtido, uma vez que o emprego do tampão borato reduziu a atividade em aproximadamente 70% quando comparado com a atividade do derivado obtido utilizando tampão fosfato. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que o tampão borato conter ácido bórico em sua composição, este por sua vez, se comporta como um ácido de Lewis (receptor de elétrons) permitindo sua complexação com o par de elétrons dos grupos amino da enzima, possivelmente em seus grupos ativos, causando uma diminuição na atividade da enzima (BLEVINS e LUKASZEWSKI, 1998; ALCÂNTARA *et al.*, 2002; MONTALVO-ANDIA, 2009;

### Efeito da adição de substrato durante o processo de imobilização

A Tabela 3 apresenta os resultados de atividade enzimática obtidos pelo estudo do efeito da adição de substrato durante o processo de imobilização.

Os resultados de atividade enzimática obtidos quando a enzima foi submetida ao

processo de imobilização por adsorção tanto na presença quanto na ausência de substrato foram estatisticamente iguais, por Tukey a 5%. Analisando apenas o processo de reticulação, este também não sofreu alterações mediante adição de substrato, mostrando-se estatisticamente iguais, por Tukey a 5%.

**Tabela 3 – Resultado do efeito da adição de substrato no processo de imobilização**

Amostra	Etapas para obtenção do biocatalisador imobilizado	Atividade enzimática (U)
1	Imobilização	0,722 ± 0,033 <sup>a</sup>
2	Imobilização com lactose	0,720 ± 0,023 <sup>ab</sup>
3	Imobilização + Reticulação	0,680 ± 0,019 <sup>ab</sup>
4	Imobilização + Reticulação com Lactose	0,662 ± 0,019 <sup>b</sup>
5	Imobilização com Lactose + Reticulação	0,588 ± 0,011 <sup>c</sup>
6	Imobilização com Lactose + Reticulação com Lactose	0,594 ± 0,017 <sup>c</sup>

Tratamentos seguidos de mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey, com  $\alpha=5\%$ .

## CONCLUSÃO

A atividade do biocatalisador obtido pela imobilização, seguido de estabilização e finalmente exposta à ação do agente reticulante foi 44% maior do que a atividade alcançada por adsorção e cross-linking de  $\beta$ -galactosidade em resina de troca iônica. A utilização de tampão borato reduziu 70% da atividade enzimática em relação à atividade obtida utilizando tampão fosfato, indicando que o borato reduz a taxa de imobilização e de estabilização do derivado obtido.

## REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, A.F.C.; BARROSO, H.S.; PILÓ-VELOSO, D. Redução de amidas por boranos. **Química Nova**, v. 25, p. 300-311, 2002.
- ANSARI, S.A.; HUSAIN Q. Lactose hydrolysis by bgalactosidase immobilized on concanavalin A cellulose in batch and continuous mode. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, p. 68-74, 2010.
- BAO, J., FURUMOTO, K., FUKUNAGA, K., NAKAO, K. A., KOUMATSU, K., YOSHIMOTO, M. Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for

- production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 33-41, 2004.
- Blevins, D.G.; Lukaszewski, K.M. Boron in plant structure and function, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 481-500, 1998.
- BOLIVAR, J.M.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; GODOY, C.; RODRIGUES, D.S.; RODRIGUES, R.C.; BATALLA, P.; MARTÍN, J.R.; MATEO, C.; GIORDANO, R.L.C.; GUISÁN, J.M. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 477-483, 2009.
- FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 136 p., 2010.
- GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p.2-12, 1985.
- GUIDINI, Z.C; FISCHER, J.; SANTANA, L.N.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking, **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 137-143, 2010.
- HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Calcium Alginate Entrapped Preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase: Its stability and Applications in the Hydrolysis of Lactose **International Journal of Biological Macromolecules**. p. 72-80, 2007.
- LETCA, D.; HEMMERLING. C.; WALTER, M.; WULLBRAND, D.; BUCHHOLZ, K. Immobilization of Recombinat Inulase II from a Genetically Modified *Escherichia coli* Strain. **Roumanian Society of Biological Sciences**. v. 9, p. 1879-1886, 2004.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MATEO C.; ABIAN O.; FERNANDEZ-LORENTE R.; GUI SAN J.M.; Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme Microbial Technology**, v. 26, p. 509-515, 2000.
- MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; GRAZU, V.; PESSALA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, ANDREA.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 456-462, 2005.
- MONTALVO-ANDIA, J.P.; TEIXEIRA, L.A. (Advisor), **Boron removal from oil production wastewater and effluents by adsorption**. Brazil: Engineering Department Materials, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro: Doctoral Thesis: 2009. 138 p.
- PEDROCHE J.; YUST M.M.; MATEO C.; FERNANDEZ-LAFUENTE R.; GIRON-CALLE J.; ALAIZ M. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports. Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1161-7, 2007.
- USDA, United States Department of Agriculture. Dairy: World Markets and Trade. Dezembro, 2012. Disponível em [www.fas.usda.gov](http://www.fas.usda.gov). Acessado em 14/01/2013

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UFU e a FEQUI pela oportunidade de realizar este trabalho, ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro. A Dow Brasil S.A pela doação da resina.