

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* EM RESINA DE TROCA IÔNICA E RETICULAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO

L. C. C. SILVA¹, C. C. SOUSA¹ e L. N. S. S. FALLEIROS¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: larissa.falleiros@ufu.br

RESUMO – A β -galactosidase é uma importante enzima utilizada na indústria para a produção de alimentos com baixo teor de lactose, entre outras aplicações. Essa enzima pode ser obtida de maneira segura através da levedura *K. marxianus*, no entanto, a utilização em sua forma livre é dificultada pela estabilidade moderada e altos custos. Assim, surge a necessidade de se trabalhar com as enzimas imobilizadas, que podem permitir maior estabilidade e facilitar a recuperação do biocatalisador ao final do processo. Deste modo, o presente trabalho avaliou a imobilização da β -galactosidase em resina de troca iônica Duolite[®] A-568 e reticulação com glutaraldeído. Analisou-se a atividade enzimática da imobilização antes e após a reticulação com o agente de ligação cruzada, obtendo uma retenção de 88% da atividade enzimática inicial no teste de estabilidade, realizado após o processo de reticulação, utilizando uma concentração de 0,35 g L⁻¹ de glutaraldeído.

1. INTRODUÇÃO

A β -galactosidase é uma importante enzima usada na indústria de alimentos para a hidrólise da lactose, processo necessário para a produção de laticínios para pessoas intolerantes a esse carboidrato. Observam-se, também, vantagens tecnológicas e ambientais das aplicações industriais, tais como a formação de galacto-oligossacarídeos, o aumento da solubilidade dos produtos hidrolisados evitando sua cristalização em processos de secagem e a redução do impacto ambiental pela remoção da lactose (LEMOS, 2018).

Esta enzima pode ser obtida a partir de microrganismos, plantas e animais. A obtenção da enzima por microrganismos é considerada a mais adequada para aplicações industriais porque oferece diversas vantagens, como maior taxa de multiplicação e alto rendimento de produção comparado a outras fontes (SICUPIRA *et al.*, 2017). Em especial, as leveduras do gênero *Kluyveromyces* apresentam grande potencial, pois são capazes de assimilar lactose, além de inúmeras vantagens como: classificação como microrganismos seguros, bom rendimento de crescimento e ampla faixa de temperatura (SPOHNER, 2016).

No entanto, o uso da β -galactosidase em sua forma livre em processos industriais é dificultado devido à sua estabilidade moderada e ao alto custo. Como alternativa eficiente, surgem as enzimas imobilizadas (SHELDON, VAN PELT, 2013). Assim, enzimas quando imobilizadas poderiam ser reutilizadas diversas vezes, o que diminuiria o custo de produção (LEMOS, 2018).



O método de imobilização deve ser simples, de baixo custo, que leve a uma obtenção de um biocatalisador com alta atividade e estabilidade operacional. Diante disso, a imobilização por adsorção física em resina de troca iônica Duolite A-568 apresenta-se como um método simples e de baixo custo, no entanto, apresenta a desvantagem de possibilidade de desprendimento da enzima, em decorrência de modificações no pH e na força iônica do meio (SOUSA, 2018).

Assim, a fim de minimizar as desvantagens decorrentes deste método, recomenda-se a utilização de agentes de ligação cruzada, geralmente utilizando glutaraldeído como agente reticulante, melhorando a estabilidade do biocatalisador (FALLEIROS, 2017).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática da β -galactosidase imobilizada em resina de troca iônica Duolite A-568 por combinação de métodos, adsorção física e reticulação com glutaraldeído.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção e extração da β -galactosidase

A enzima foi produzida a partir da levedura *K. marxianus* por fermentação submersa em reator com volume útil de 1,5L, conduzida em condições controladas de temperatura a 30°C, agitação de 300 rpm, aeração 1 vvm no tempo de 24 horas, conforme condições definidas de acordo com a otimização realizada por Falleiros, 2016. O caldo fermentado foi centrifugado e, posteriormente, ressuspensionado em tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,3 para obter uma suspensão celular com 2,62 mg mL⁻¹. Para a extração da enzima intracelular, foi utilizado rompimento ultrassônico, em que a suspensão celular foi submetida a 30 minutos de pulsos ultrassônicos e, a suspensão celular obtida após o processo de ruptura, foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade enzimática.

2.2 Suporte para imobilização

Utilizou-se a resina de troca iônica Duolite[®] A-568 (Rohm Haas), doada pela Dow Chemical Company. A resina Duolite[®] A-568 é um trocador aniônico fracamente básico e tem como princípio a ligação cruzada fenol-formaldeído.

2.3 Imobilização

O processo de imobilização consistiu na adsorção da enzima na resina de troca iônica Duolite[®] A-568. Uma massa de 0,5g da resina, previamente ativada, foi incubada em solução de β -galactosidase preparada em tampão fosfato de sódio 0,8M em pH 7,3. As amostras foram mantidas em incubadora rotatória a 150 rpm e 25 \pm 1°C por 1 hora. As condições de imobilização empregadas em relação à temperatura, agitação e massa de resina foram seguidas de acordo com Falleiros *et al.* (2017).

Com o intuito de melhorar a atividade da enzima imobilizada, foi feito o experimento com duas imobilizações, com o objetivo de realizar uma pré-purificação na primeira etapa e a imobilização na segunda etapa. Dessa forma, realizou-se a imobilização de acordo com o

procedimento descrito acima em um tempo de 30 minutos e, após o processo, a resina foi separada do sobrenadante. Este foi novamente ofertado a uma nova resina com mesma massa (0,5g), e a segunda imobilização foi realizada nas mesmas condições, porém em um tempo de 1 hora. As resinas das duas etapas foram lavadas, separadamente, com tampão fosfato de sódio 0,8 M a pH 7,3.

2.2 Reticulação com glutaraldeído

O processo de ligação cruzada utilizou glutaraldeído como agente reticulante na razão de 1:10 (1 g de resina para 10 mL de solução de glutaraldeído). A solução de glutaraldeído utilizada foi preparada em tampão fosfato de sódio 0,8 M, pH 7,3. Para reticulação variou-se a concentração de glutaraldeído em 0,14; 0,35 e 3,5 g L⁻¹. Adicionou-se 5 mL de solução de glutaraldeído à 0,5 g de resina imobilizada com a β-galactosidase e manteve-se o sistema sob agitação de 150 rpm e temperatura de 25 ± 1°C por 1,5 horas. Foi realizado também a estabilidade por duas horas à 30 °C da amostra reticulada, em seguida foi determinada a atividade enzimática de acordo com o item 2.3.

2.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade era obtida da inclinação das equações lineares de concentração de glicose em função do tempo, usando o método das taxas iniciais da reação de hidrólise da lactose, sendo conduzido em reator de mistura batelada tipo cesta, usando uma solução 50 g L⁻¹ de lactose (PA) preparado em tampão láctico pH 6,5, a 30°C. A unidade de atividade foi U, definida como μmol de glicose produzida por minuto. O método da glicose-oxidase foi utilizado para dosar a glicose formada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para reticulação com glutaraldeído realizaram-se testes preliminares variando a concentração da solução. Após a reticulação avaliou-se também a estabilidade em 2 horas a 30 °C. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Avaliação da reticulação com glutaraldeído em diferentes concentrações

	Concentração de Glutaraldeído		
	0,14 (g L ⁻¹)	0,35 (g L ⁻¹)	3,50 (g L ⁻¹)
Atividade Inicial (U)	14,56	11,58	17,27
Primeira Imobilização (U)	2,28	2,14	2,20
Segunda Imobilização (U)	6,22	5,70	5,51
Reticulação com glutaraldeído	3,89	2,07	0,36
Estabilidade em 30 °C a 2 horas	2,69	1,82	--

Na Tabela 1 pode ser observado que houve um aumento da atividade enzimática da primeira para a segunda imobilização. Isto se deve ao fato de que a primeira imobilização serviu como uma pré-purificação, em que as impurezas existentes na solução enzimática ficaram retidas na resina. Assim, na segunda etapa mais enzimas foram adsorvidas na resina, aumentando a atividade enzimática. Também é possível observar que o glutaraldeído afetou a atividade enzimática, sendo que quanto maior a concentração da solução de glutaraldeído maior foi a redução na atividade enzimática. Utilizando uma solução a $0,14 \text{ g L}^{-1}$ a atividade enzimática foi de 3,89 U, apresentando uma retenção de 63% em relação à atividade da segunda imobilização, para $0,35 \text{ g L}^{-1}$ a retenção foi de 32% (2,07 U) e para $3,5 \text{ g L}^{-1}$ a retenção foi de apenas 6% (0,36 U).

A estabilidade em 2 horas foi realizada nas duas menores concentrações e mesmo com a reticulação com glutaraldeído houve perda na atividade enzimática. Na concentração de $0,35 \text{ g L}^{-1}$ a retenção da atividade enzimática foi de 88% (2,07 U para 1,82 U) enquanto para $0,14 \text{ g L}^{-1}$ a retenção foi de 69% (3,89 U para 2,69 U).

A partir disto, percebe-se que altas concentrações de glutaraldeído impactam de modo negativo na atividade do biocatalisador, e concentrações muito baixas não foram suficientes para manter a estabilidade deste. Isto pode ocorrer devido ao eventual impedimento estérico causado pelo glutaraldeído, pelas dificuldades de estabelecer regras gerais para a imobilização, podendo ser afetado o sítio ativo da enzima e, ainda, por casuais perturbações durante o processo. Comparando este resultado com Kuribayashi (2018), que estudou a imobilização da β -galactosidase em resina de troca iônica e pelo método das ligações multipontuais, é possível dizer que o resultado obtido é admissível, pois concluíram que concentrações de glutaraldeído maiores que $3,5 \text{ g L}^{-1}$ impactaram negativamente na atividade enzimática retida no suporte, enquanto que concentrações menores que $1,0 \text{ g L}^{-1}$ não afetaram a atividade da enzima imobilizada e não ofereceram boa estabilidade ao biocatalisador.

4. CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados apresentados, infere-se que a imobilização em série da β -galactosidase é um método eficaz de purificação do biocatalisador, conferindo uma atividade enzimática ainda maior na segunda imobilização. Ainda, a combinação de métodos com a reticulação em glutaraldeído apresenta-se como um método eficiente para concentrações moderadas deste agente de ligação cruzada, mas fazem-se necessários estudos a fim de aumentar a estabilidade do biocatalisador com a reticulação.

5. REFERÊNCIAS

FALLEIROS, L. N. S. S. Produção e caracterização de β -galactosidase *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537. Tese de doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 150 p., 2016.



- FALLEIROS, L. N. S. S.; CABRAL, B. V.; GUIDINI, C. Z.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Improvement of recovered activity and stability of the *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on duolite A568 by combination of immobilization methods, p. 6, 2017.
- KURIBAYASHI, L. M.; Imobilização de β -galactosidase produzida por *bacillus licheniformis* para aplicação em indústria láctea, 2018.
- LEMOS, G. P. M. Imobilização de enzimas em membranas para hidrólise da lactose, p. 7, 2018.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>
- SICUPIRA, M.; MANERA, A. P.; ALMEIDA, L.; MORAES, C. C. Hidrólise da lactose a partir da enzima β -galactosidase – prozyn lactase, p. 1, 2017.
- SOUSA, C. C. Síntese e imobilização em resina de troca iônica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*, p. 4-40, 2018.
- SPOHNER, S.C.; SCHAUM, V.; QUITMANN, H.; CZERMAK, P. *Kluyveromyces lactis*: na emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, v.222, p.104-116, 2016.