

# ESTUDO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASE IMOBILIZADA EM DUOLITE A568 POR COMBINAÇÃO DOS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

L. R. ARAUJO<sup>1</sup>, L. N. S. S. FALLEIROS<sup>1</sup>, M. M. de RESENDE e E. J. RIBEIRO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química  
E-mail para contato: leticiaraujor@yahoo.com.br

**RESUMO** – A intolerância a lactose é um problema - cada vez mais comum, tornando a hidrólise de lactose um processo promissor para a indústria de alimentos, pois permite a produção de produtos livres de lactose. A enzima  $\beta$ -galactosidase, usualmente conhecida como lactase, catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-glicose. O uso dessa enzima na forma imobilizada se torna mais viável, pois permite a sua reutilização, e pode proporcionar maior estabilidade. Foi estudado o processo obtenção de  $\beta$ -galactosidase imobilizada em Duolite A-568. A atividade enzimática foi determinada pelo método das taxas iniciais de hidrólise de lactose em microreator. Foi analisada a estabilidade térmica da enzima imobilizada, no processo de hidrólise. Dessa forma foi verificada uma forte dependência da enzima imobilizada em relação à temperatura. Para as temperaturas de 60,0, 57,5 e 55,0 °C foi observado um patamar de estabilidade até os 30 minutos de incubação, a partir daí observa-se o processo de inativação térmica. Para a temperatura de 55,0 °C, após 140 minutos o biocatalisador reteve 77% da atividade em relação à inicial.

## 1. INTRODUÇÃO

A lactose é um dissacarídeo abundante no leite e no soro de leite, contudo a sua utilização em produtos lácteos é bastante limitada devido ao seu baixo poder adoçante, à sua baixa solubilidade, forte tendência a absorver odores e sabores, além de ser um açúcar higroscópico, o que causa o endurecimento dos derivados lácteos em pó. Outra restrição deve-se à intolerância a este dissacarídeo por grande parte da população mundial. A utilização de soro de leite tem sido limitada, sendo este normalmente descartado como um efluente de difícil degradação, em função de seu alto teor de lactose (Carminatti, 2001).

O leite é um alimento básico da dieta, principalmente para crianças. É considerado a primeira fonte de nutrientes para os mamíferos e a maior fonte de cálcio absorvível à disposição do homem (Leite, 2009). Entretanto, grande parte da população mundial não pode desfrutar dos benefícios proporcionados pelo leite devido a algum grau de rejeição aos produtos lácteos. A intolerância à lactose é um problema comum, estimado em 20-25% na população brasileira de acordo com a Escola Paulista de Medicina, apesar de pouco diagnosticada (Freitas, 2007).

Assim a hidrólise da lactose é um processo promissor para indústria de alimentos porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose. Enzimas adequadas a serem usadas na indústria de alimentos são produzidas por micro-organismos considerados seguros. Para a hidrólise de lactose em leite e produtos lácteos, enzimas de leveduras *Kluyveromyces lactis* ou *marxianus* e fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *oryzae* são aceitas (Freitas, 2007).

A enzima  $\beta$ -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) é uma proteína usualmente chamada de lactase, ou ainda pelo nome sistemático  $\beta$ -D-galactosideo-galactohidrolase, é classificada como hidrolase e catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-glicose. (Almeida e Pastore, 2001; Vinhal, 2001).

A enzima  $\beta$ -galactosidase pode ser utilizada na forma de enzima solúvel, que é normalmente utilizada em processos batelada e na forma imobilizada, que opera tanto em batelada quanto em operação contínua. Devido ao alto custo da enzima, o sistema de imobilização de  $\beta$ -galactosidase continua a ser mais viável economicamente do que os sistemas enzimáticos livres, uma vez que estes processos podem ser realizados continuamente por oferecerem a possibilidade de reutilização da enzima, além de conferir uma maior estabilidade. Atualmente  $\beta$ -galactosidase imobilizada tem sido extensivamente utilizada para hidrólise de lactose presente no leite/soro e tem sido testada a sua aplicação para produção de galacto-oligossacarídeos (Panesar et al., 2010).

Mateo et al. (2007) estudaram a melhoria da estabilidade, atividade e seletividade de enzimas através de técnicas de imobilização e verificaram que a ocorrência de ligações covalentes multipontuais pode aumentar a rigidez da estrutura tridimensional da molécula da enzima, e por consequência, aumentar a estabilidade da enzima imobilizada frente a diferentes agentes inativantes, tais como, temperatura, pH, solventes orgânicos entre outros.

A utilização de resina como suporte no processo de imobilização de enzimas é de suma importância na obtenção de biocatalisadores enzimáticos para aplicação nas mais variadas indústrias. A resina de troca iônica permite rápido isolamento e separação ao final da reação, reduzindo o custo operacional de separação da enzima imobilizada do meio reacional (Letca et al., 2004).

Com base no exposto, neste trabalho objetivou-se estudar a estabilidade térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus. oryzae* imobilizada em resina de troca iônica Duolite A568 por combinação dos métodos de adsorção física, ligação covalente multipontual e ligação cruzada.

## 2. MATERIAS E MÉTODOS

### 2.1 Material

Foi utilizada a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.2.1.23) da marca Sigma. Como suporte de imobilização foi utilizado a resina de troca iônica, Duolite A-568, doada pela Dow Brasil S.A. Como substratos foram utilizados solução de lactose em tampão acetato pH 4,5 e permeado de soro de leite em pó produzido pela empresa SOORO situada em

Marechal Cândido Rondon no Estado do Paraná. Os demais reagentes foram todos de grau analítico.

## 2.2 Obtenção do Biocatalisador Imobilizado

O processo de imobilização foi dividido em três etapas. A primeira etapa consistiu na adsorção da enzima na resina, foi incubado 0,5 g da resina em 10 mL de solução enzimática 5 g/L preparada em tampão acetato  $10^{-1}$ M pH 4,5, sob agitação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 horas. Na etapa de estabilização, o derivado enzimático foi incubado em 10 mL de tampão fosfato  $10^{-1}$  M pH 9, sob agitação por 24 h. Na etapa de reticulação, 5 mL da solução de glutaraldeído 3,5 g/L foi adicionada à enzima imobilizada e manteve-se este sistema sob agitação por 1,5 h.

## 2.3 Determinação da Atividade de $\beta$ -Galactosidase Imobilizada

A atividade catalítica da  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi determinada pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose, em um micro-reator de mistura contendo 100 mL de solução de lactose a 50 g/L em pH 4,5 a  $35^\circ\text{C}$ , com as partículas de enzima imobilizada retidas em um cesto de aço inox, conforme Guidini et al. (2010) que estudou a influência conjunta de temperatura e pH na atividade do biocatalisador e obteve pH 4,5 e temperatura de  $35^\circ\text{C}$  como as condições ótimas de operação. A glicose formada está foi dosada pelo método da glicose-oxidase (Bao et al., 2004). A unidade de atividade (U) foi definida como grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de enzima imobilizada.

## 2.4 Estudo da estabilidade térmica da $\beta$ -galactosidase imobilizada na hidrólise de lactose

Com a finalidade de estudar a estabilidade térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada, as amostras são colocadas em 50 mL de tampão de acetato pH 4,5 e incubadas num banho termostático de temperatura variando  $55,0 - 65,0^\circ\text{C}$ . Para cada temperatura de incubação, as amostras do biocatalisador imobilizado foram removidas em intervalos de tempo apropriados (5 em 5 minutos a  $65,0 \pm 1^\circ\text{C}$ , 7 em 7 a  $62,5 \pm 1^\circ\text{C}$ , 10 em 10 minutos a  $60,0 \pm 1^\circ\text{C}$ , 15 em 15 minutos a  $57,5 \pm 1^\circ\text{C}$ , 20 em 20 minutos a  $55,0 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Estas amostras foram rapidamente arrefecidos num banho de gelo, e a atividade residual foi determinada pela taxa inicial de reação com uma concentração inicial de lactose de 50 g / L, pH 4,5 a  $35,0^\circ\text{C}$ .

Os tempos de meia vida foram determinados para cada temperatura, considerando o melhor ajuste dos dados experimentais utilizando a Equação 1 e 2, para os modelos de desativação térmica de primeira ordem e em série com uma única etapa, respectivamente. A energia de ativação do processo de desativação térmica foi calculada pela Equação 3 por uma regressão linear.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (1)$$

$$t_{1/2} = -\frac{1}{k_d} \ln \left( \frac{\frac{A}{A_0} - \alpha}{1 - \alpha} \right) \quad (2)$$

$$\ln(k_d) = \ln(A^*) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3)$$

$A^*$  = fator de frequência para a reação

$E_a$  = energia de ativação do processo de desativação térmica

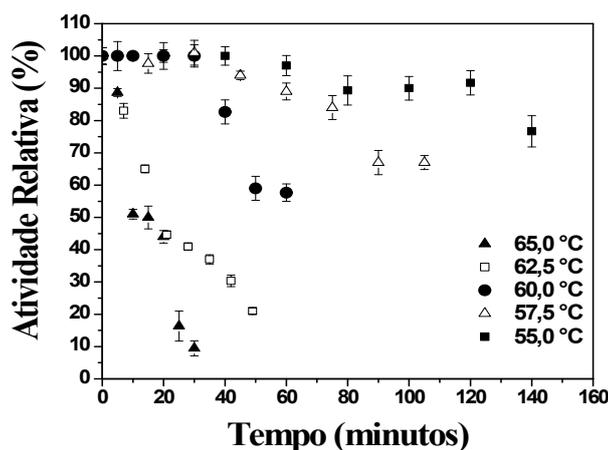
$T$  = temperatura absoluta.

$R$  = constante da lei dos gases

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência da temperatura na estabilidade de  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi estudada a partir dos resultados das atividades relativas em função do tempo de incubação, nas temperaturas estudadas, ilustrados na Figura 1.

Figura 1 – Perfis de inativação térmica para  $\beta$ -galactosidase imobilizada.



A Figura 1 evidencia a forte dependência da estabilidade da enzima imobilizada com a temperatura. Observa-se que para a temperatura de 65,0 °C, em 15 minutos houve uma queda de 50% da atividade em relação à inicial. Para a temperatura de 62,5 °C a inativação enzimática foi um pouco mais lenta, o biocatalisador atingiu 50% de atividade relativa à aproximadamente 20 minutos de incubação. Já para as temperaturas de 60,0 ; 57,5 e 55,0 °C foi observado um patamar de estabilidade até os 30 minutos de incubação, a partir daí observa-se o processo de inativação térmica, no qual a queda da atividade catalítica se apresenta mais abrupta com o aumento da temperatura.

Foi considerado o melhor o ajuste dos modelos matemáticos somente na faixa onde foi observado o processo de desativação térmica (40 a 140 minutos). O parâmetro ajustado ao modelo de desativação de primeira ordem esta representado na Equação 4.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,2403 \times 10^{-2} \cdot t)} \quad (4)$$

Utilizando as constantes de desativação térmica ( $k_d$ ) ajustadas ao modelo de desativação térmica de primeira ordem e a Equação 5, foram calculados os tempos de meia-vida para cada temperatura. Para as temperaturas de 60,0, 57,5 e 55,0°C, o tempos de meia vida calculados foram acrescidos do tempo em que o biocatalisador permaneceu estável, sendo que para as temperaturas de 60,0 e 57,5 °C foi somado 30 minutos e para a temperatura de 55,0 °C somou-se 40 minutos ao tempo de meia-vida calculado. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

$$t_{1/2} = -\frac{1}{k_d} \ln \left( \frac{\frac{A}{A_0} - \alpha}{1 - \alpha} \right) \quad (5)$$

Tabela 1 - Valores de  $k_d$  e tempos de meia-vida calculados pelo modelo de primeira ordem de desativação térmica

Temperatura (°C)	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$t_{1/2}$ (min)	$t_{1/2}$ (experimental) (min)
65,0	0,0546	0,92	12,70	15
62,5	0,0313	0,98	22,15	20
60,0	0,0211	0,95	62,85	-
57,5	0,0052	0,92	163,30	-
55,0	0,0024	0,94	328,81	-

Os resultados apresentados estão em concordância com o trabalho de Fischer (2010), que calculou os tempos de meia-vida utilizando o modelo desativação térmica de primeira ordem para  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada pela combinação dos processos de adsorção e ligação cruzada para as temperaturas de 65, 63, 60, 57 e 55 °C e obteve como resultados 23,03; 58,24; 126,02; 228,79 e 533,15 min, respectivamente.

## 5. CONCLUSÃO

Verificou-se uma forte dependência da enzima imobilizada em relação à temperatura. A 65,0 °C, em 15 minutos houve uma queda de 50% da atividade em relação à inicial. Para as temperaturas de 60,0, 57,5 e 55,0 °C foi observado um patamar de estabilidade até os 30 minutos de incubação, a partir daí observa-se o processo de inativação térmica. O modelo de desativação térmica de primeira ordem se ajustou melhor aos dados experimentais comparado ao modelo de desativação em série em uma única etapa para descrever a cinética de desativação térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. A energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em Duolite A568 foi 71,03 kcal/mol com tempo de meia-vida de 5,5 horas a 55,0 °C, o que permite aplicação do biocatalisador em processos que exigem temperaturas moderadas (próximas a 55,0 °C), sem que ocorra perda significativa da atividade do biocatalisador;

## 6.REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos: Produção e Efeitos Benéficos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: SBCTA, 2001. v. 35, n. 1/2, p. 12-19, 2001.

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.

CARMINATTI, C. A. *Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando  $\beta$ -galactosidase *Kluyromyces lactis**. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química – UFSC. 2001.

FREITAS, F.F. *Otimização do processo de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído*, Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2007.

GUIDINI, C.Z. **Imobilização de  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Resinas de Troca Iônica**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

LEITE, J.L.B. *Comércio Internacional de Lácteos*, 2. ed. rev. e ampl. – Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 350 p., 2009.

LETCA, D.; HEMMERLING.C.; WALTER, M.; WULLBRAND, D.; BUCHHOLZ, K. *Immobilization of Recombinant Inulase II from a Genetically Modified Escherichia coli Strain*. Roumanian Society of Biological Sciences. v. 9, p. 1879-1886, 2004.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, R. *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*. Enzyme and Microbial Technology. v. 40, p. 1451-1463, 2007.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. *Potential Applications of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase in Food Processing Industries*. Enzyme Research, v.2010, 16 p., 2010

VINHAL, E. F. **Hidrólise da Lactose no Leite por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis***. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química - UFU. 2001.