

ESTUDO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE β -GALACTOSIDASE IMOBILIZADA EM DUOLITE A568 POR COMBINAÇÃO DOS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

L. R. ARAUJO¹, L. N. S. S. FALLEIROS¹, M. M. de RESENDE e E. J. RIBEIRO¹

¹ 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 β -galactosidase, usualmente conhecida como lactase, catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à β -D-galactose e α -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 β -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 β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) é uma proteína usualmente chamada de lactase, ou ainda pelo nome sistemático β -D-galactosideo-galactohidrolase, é classificada como hidrolase e catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à β -D-galactose e α -D-glicose. (Almeida e Pastore, 2001; Vinhal, 2001).

A enzima β -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 β -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 β -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 β -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 β -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 β -Galactosidase Imobilizada

A atividade catalítica da β -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°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°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 β -galactosidade imobilizada na hidrólise de lactose

Com a finalidade de estudar a estabilidade térmica da enzima β -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

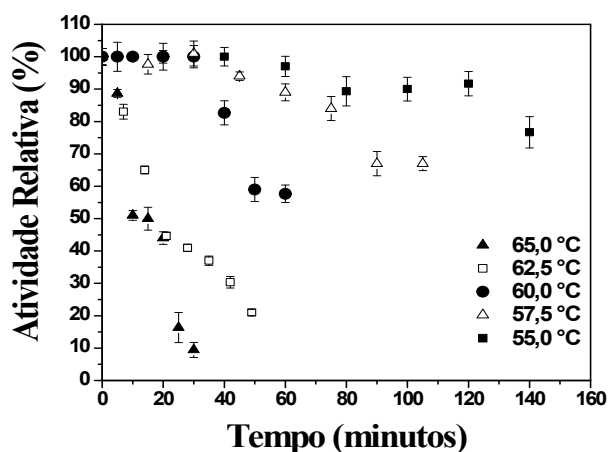
T = temperatura absoluta.

R = constante da lei dos gases

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência da temperatura na estabilidade de β -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 β -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 ⁻¹)	R ²	$t_{1/2}$ (min)	$t_{1/2}(\text{experimental})$ (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 β -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 β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. A energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima β -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 β -galactosidase de Kluyveromyces fragilis*. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química – UFSC. 2001.
- FREITAS, F.F. *Otimização do processo de imobilização de β -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 β -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.; GUISAN, 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 β -Galactosidase in Food Processing Industries*. Enzyme Research, v.2010, 16 p., 2010
- VINHAL, E. F. **Hidrólise da Lactose no Leite por β -galactosidase de Kluyveromyces fragilis**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química - UFU. 2001.