

Propriedades Termodinâmicas da Enzima β -Galactosidase Imobilizada em Eupergit® C

Anna Rafaela Cavalcante Braga¹, Jéssica Teixeira da Silveira¹, Susana Juliano Kalil¹

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos
Caixa Postal 474 – CEP 96.203-900 Rio Grande – RS - E-mail: annarafaela@gmail.com;

RESUMO

*A caracterização enzimática envolve o conhecimento de propriedades da enzima, como estabilidade térmica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Este trabalho visou determinar algumas propriedades enzimáticas de β -galactosidase parcialmente purificada e imobilizada, utilizando Eupergit® C como suporte. A enzima foi obtida por cultivo submerso utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, a mesma foi purificada por precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise e, posteriormente, imobilizada. Foram determinados os parâmetros termodinâmicos (ΔG^* , ΔH^* , ΔS^*), os valores D e z , além do parâmetro cinético K_m . Os valores da energia livre de Gibbs (ΔG^*) para a enzima em estudo variaram de 42,1 a 54,2 kJ.mol^{-1} , a entalpia (ΔH^*) e a entropia (ΔS^*) foram 216,97 kJ.mol^{-1} e 0,525 $\text{kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, respectivamente. O parâmetro cinético K_m da enzima imobilizada foi 5,2 mM, considerando ONPG como substrato.*

Palavras-chave: caracterização enzimática, energia livre de Gibbs, Entalpia, Entropia.

INTRODUÇÃO

A β -galactosidase é uma enzima hidrolítica com capacidade de transferase para grupos galactosil, atuando no resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar seus monossacarídeos glicose e galactose. É utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia principalmente na elaboração de produtos destinados a pessoas com intolerância à lactose¹.

A lactose é um dissacarídeo que tem como características principais, baixa solubilidade em água e baixo poder adoçante. A cristalização deste açúcar em produtos lácteos, como leite condensado, e a restrição ao consumo de tais alimentos por pessoas intolerantes a este carboidrato, devido a baixos níveis de β -galactosidase intestinal, podem ser evitadas através do processo de hidrólise enzimático¹.

Dentre as fontes de β -galactosidase destacam-se aquelas obtidas por micro-organismos, principalmente a partir de leveduras do gênero *Kluyveromyces*, que são considerados seguros, podendo ser utilizados na área de alimentos^{2,3}. A imobilização de β -galactosidase é uma ferramenta muito poderosa para melhorar quase todas as suas propriedades, incluindo estabilidade, atividade, seletividade, especificidade e redução de inibição⁴.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi determinar algumas propriedades enzimáticas da enzima β -galactosidase parcialmente purificada e imobilizada, utilizando Eupergit® C como suporte.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção, Extração e Purificação da enzima β -galactosidase



O micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foi selecionado previamente por Manera e colaboradores². Para a obtenção da enzima β -galactosidase intracelular, as células foram rompidas segundo Medeiros e colaboradores⁵. A purificação da enzima foi realizada utilizando precipitação com sulfato de amônio até 70 % de saturação⁶.

Imobilização da enzima

A β -galactosidase foi imobilizada através da técnica adsorção seguida por ligação covalente. Foi utilizada β -galactosidase parcialmente purificada e o suporte Eupergit[®] C. A imobilização foi realizada em um reator agitado e encamisado (10 °C) onde a enzima, o suporte e o tampão foram homogeneizados⁶.

Parâmetros termodinâmicos de desnaturação da enzima

Os parâmetros termodinâmicos foram estudados para a faixa de temperatura de 37 a 60 °C. Os valores de ΔH^* e ΔS^* foram obtidos pela inclinação e interceptação do gráfico $\ln(K_d/T)$ versus $1/T$, respectivamente, e calculados de acordo com a Equação 1. O ΔG^* foi estimado pela Equação 2.

$$\ln\left(\frac{K_d}{T}\right) = \ln\left(\frac{K_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^*}{R} - \frac{\Delta H^*}{R} \cdot \left(\frac{1}{T}\right) \quad (1)$$

onde K_B , h , ΔS^* , ΔH^* e R são constante de Boltzmann, constante de Planck, entropia de inativação, entalpia de inativação e constante universal dos gases, respectivamente.

$$\Delta G^* = \Delta H^* - \Delta S^* \cdot T \quad (2)$$

Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação do parâmetro cinético K_m foi realizada medindo-se a atividade enzimática em diferentes concentrações de oNPG (1-10 mM). A cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas obedece à equação de Michaelis-Menten (Equação 3), onde foram calculadas a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e a constante de Michaelis-Menten (K_m) utilizando o método de Lineweaver-Burk (Equação 4).

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S} \quad (3)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

Determinação dos valores D e z

Para verificar a influência da temperatura (37 a 60 °C) na estabilidade da enzima foram estudados os valores D e z. O valor de redução decimal (D) é o tempo necessário para reduzir a velocidade de reação a 10% e foi determinado pela Equação 5.

$$D = \frac{2,3026}{K_d} \quad (5)$$

A variação de temperatura (valor z) requerida em um sistema para que ocorra uma redução decimal na velocidade de reação foi obtida pelo inverso do coeficiente angular da reta construída a partir de $\log(D)$ versus temperatura (°C).

Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada utilizando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de o-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio⁷.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização enzimática fornece informações importantes para a utilização industrial das enzimas. A determinação dos parâmetros termodinâmicos ajuda a entender o mecanismo de desnaturação da enzima, bem como o efeito da temperatura na taxa de desnaturação enzimática. Os parâmetros ΔH^* e ΔS^* fornecem o número de ligações não covalentes quebradas e a mudança na desordem enzima/solvente associada com a formação do estado de transição, respectivamente⁸.

A partir da Tabela 1 podemos observar que com o aumento da temperatura ocorre um leve decréscimo nos valores de energia livre de Gibbs (ΔG^*). Todos os valores de ΔG^* estão na ordem de magnitude esperada para desnaturação proteica⁹. Os valores ΔH^* e ΔS^* (Tabela 1) obtidos no presente estudo, também estão de acordo com o esperado para enzimas desnaturadas pelo calor. Altos valores de entalpia também são característicos da reação de desnaturação proteica. Valores de ΔS^* próximos de zero, demonstram que a desnaturação térmica não necessariamente implica em variações na estrutura terciária da enzima¹⁰.

Tabela 1: Parâmetros termodinâmicos de β -galactosidase imobilizada de 37-60°C.

Enzima	T (°C)	ΔG^* (kJ/mol)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (kJ/mol.K)	D (min)
β -Galactosidase parcialmente purificada e imobilizada	37	54,2	216,97	0,525	17692,3
	40	52,6			2300,0
	45	49,9			1210,5
	50	47,3			153,3
	55	44,7			75,7
	60	42,2			40,7

Quando se trabalha com enzimas que são aplicadas na indústria de alimentos é comum expressar sua inativação usando os parâmetros D e z¹¹. O valor de redução decimal D representa a resistência a uma determinada temperatura, enquanto o valor z é expresso em °C e equivale à dependência do fator termodegradável à mudança de temperatura. Como a enzima β -galactosidase é utilizada na indústria láctea, que algumas vezes requer altas temperaturas durante alguns processos, consideramos de extrema importância a determinação dos valores D (Tabela 1). Pela observação dos valores D na Tabela 1, é possível afirmar que a enzima é mais estável em temperaturas próximas de 37 °C (D = 17692,3 min). O valor de z obtido foi de 8,7 °C, ou seja, ao variar a temperatura para mais ou para menos no valor de z, muda-se o valor D em um ciclo logarítmico. O valor z da enzima livre obtido por Heidtmann e colaboradores foi 5,8 °C¹¹ indicando a mesma é mais afetada pela variação de temperatura que a enzima imobilizada.

O parâmetro cinético K_m da enzima imobilizada foi de 5,2 mM, considerando ONPG como substrato. Heidtmann e colaboradores¹¹ obtiveram K_m 3,7 mM para a mesma enzima na forma livre. Sabe-se que quanto menor o valor dessa constante, maior a afinidade da enzima pelo substrato, portanto, nas condições estudadas, a enzima imobilizada apresenta uma menor afinidade pelo substrato que a enzima livre.



CONCLUSÕES

A energia livre de Gibbs reduziu com o aumento de temperatura variando, em $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, de 42,1 a 54,2. A entalpia e a entropia mostraram-se de acordo com o esperado para desnaturação enzimática. Os valores D confirmaram que a enzima imobilizada foi mais estável em temperaturas próximas de 37 °C. O parâmetro cinético Km foi de 5,2 mM, demonstrando uma menor afinidade da enzima imobilizada que a livre considerando o substrato ONPG.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à FAPERGS e à CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- (1) SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L. e RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 567-572, 2004.
- (2) BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A. e KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1653-1663, 2012.
- (3) MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.
- (4) PESSELA, B. C. C.; LAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISAN, J. M. e FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 310-315, 2007.
- (5) MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; DE SOUZA MARTINS, D.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Ultrasonic waves and glass pearls: A new method of extraction of β -galactosidase for use in laboratory. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.
- (6) BRAGA, A. R. C. **Obtenção e caracterização da enzima β -galactosidase submetida a diferentes processos: purificação, imobilização e altas pressões**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2012.
- (7) INCHAURRONGO, V. A.; YAUTORNO, O. M. e VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 47-54, 1994.
- (8) WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food science**, Editora: Marcel Dekker Inc., New York, 1994.
- (9) USTOK, F. I.; TARI, C. e HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1114-1120, 2010.
- (10) ORTEGA, N.; DIEGO, D. S.; PEREZ-MATEOS, M. e BUSTO, M. D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, p. 209-217, 2004.
- (11) HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C. e KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2012.