

Determinação do Reuso e Caracterização Estrutural da Enzima β -Galactosidase Imobilizada em Eupergit[®] C

Anna Rafaela Cavalcante Braga¹, Jéssica Teixeira da Silveira¹, Marceli Fernandes da Silva², Helen Treichel³, José Vladimir de Oliveira⁴ e 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

² Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Engenharia de Alimentos

³ Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim

⁴ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química

RESUMO

*A imobilização de enzimas é uma das etapas mais importantes na utilização das mesmas, pois permite superar as desvantagens da solubilidade no meio reacional e da instabilidade operacional no seu uso industrial, além de permitir o reuso das mesmas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, utilizando Eupergit[®] C com suporte, em relação ao seu reuso e sua caracterização estrutural. No estudo do reuso da enzima, a mesma manteve mais de 50% de sua atividade inicial após cinco ciclos de utilização. Adicionalmente, a caracterização do suporte e da enzima β -galactosidase imobilizada foi realizada através de análise de área e de superfície de partículas (BET) e de microscopia eletrônica de varredura (MEV).*

Palavras-chave: enzima, imobilização, reutilização.

INTRODUÇÃO

A enzima β -galactosidase é amplamente utilizada na indústria de alimentos, em especial em produtos lácteos. Dentre as fontes da mesma, destacam-se aquelas obtidas por microorganismos, principalmente a partir de leveduras do gênero *Kluyveromyces*, que são considerados seguros, podendo ser utilizados na área farmacêutica e alimentícia^{1,2}.

Ambas as formas, solúvel e imobilizada, da enzima β -galactosidase são utilizadas para a hidrólise da lactose, no entanto, algumas propriedades da enzima solúvel podem dificultar seu uso. A utilização de um catalisador relativamente dispendioso exige, em muitos casos, a sua recuperação e reutilização e isso só é possível quando a enzima se encontra imobilizada³.

A avaliação da imobilização através da caracterização estrutural pode fornecer informações importantes, principalmente, no sentido de assegurar a ligação suporte/enzima. Ao utilizarmos o suporte Eupergit[®] C, a enzima é ligada ao mesmo, inicialmente por adsorção com posterior ligação covalente⁴.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a imobilização da enzima β -galactosidase obtida de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em Eupergit[®] C através do seu reuso e da caracterização estrutural da mesma.



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 homogeneizados⁸.

Reuso da enzima

β -Galactosidase imobilizada em Eupergit[®] C foi utilizada sucessivamente em reações de hidrólise com lactose 200 mM (150 rpm por 30 min a 35° C) e a atividade da primeira reação foi considerada 100%. Após um ciclo, as mesmas partículas (enzima ligada ao suporte) foram removidas do meio de reação, lavadas com tampão fosfato de potássio 2 M com MgCl₂ 0,1 mM pH 7,5 e reutilizadas, sendo esse procedimento repetido por 8 ciclos de uso⁸.

Caracterização estrutural do suporte e da enzima imobilizada

A área superficial específica, volume médio dos poros e diâmetro de poros foram determinados utilizando o equipamento AUTOSORB-1 (Quantachrome, modelo Nova-2200E). Antes da análise, as amostras foram tratadas sob vácuo a 100 ° C durante a secagem completa. As medições foram realizadas utilizando a N₂ líquido (-196 ° C). A área superficial específica foi determinada pelo método BET, e o diâmetro poroso médio utilizando o método BJH (Barret, Joyner e Halenda) no limite de adsorção. Para obtenção das micrografias a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada. As amostras foram cobertas com uma película de ouro e analisadas em equipamento JEOL JSM-6390LV com voltagem de aceleração de 20 kV.

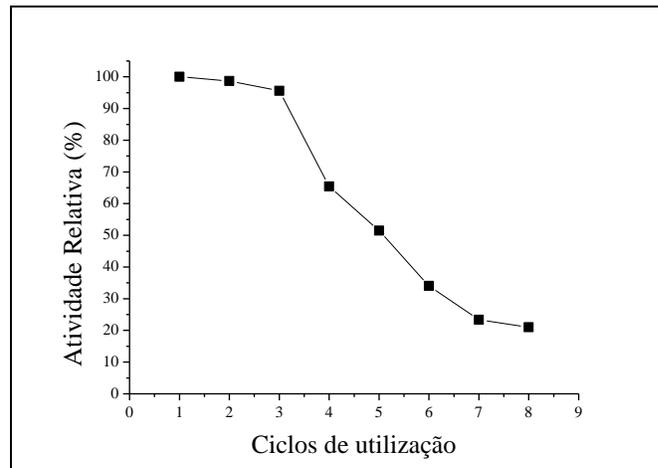
Determinação da atividade enzimática

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

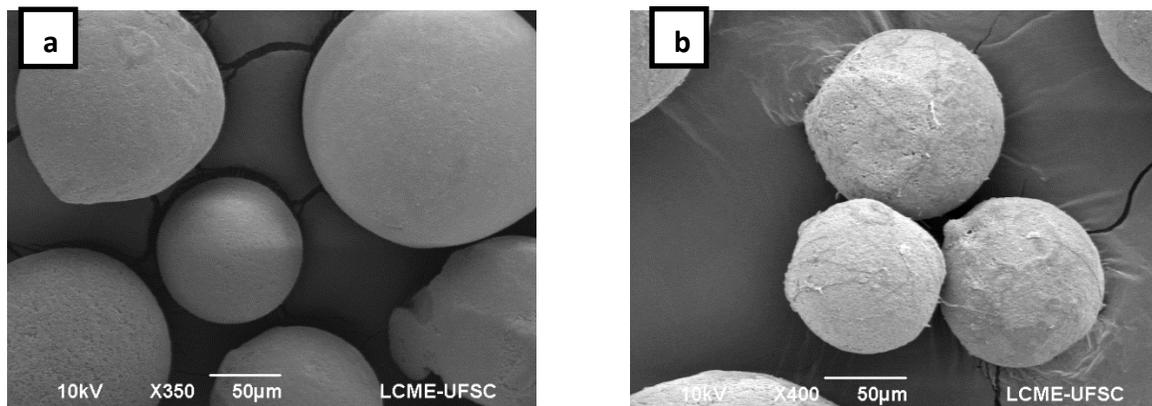
O reuso da enzima β -galactosidase imobilizada em Eupergit[®] C mostrou que o sistema enzima/suporte manteve até 50% da atividade inicial após 5 ciclos de utilização, podendo então ser utilizado consecutivamente no processo industrial sem perdas por 3 ciclos (Figura 1). Esse resultado é extremamente relevante, devido à complexidade do uso industrial da β -galactosidase, por conta da sua instabilidade frente às adversidades do meio reacional e sua sensibilidade a mudanças durante os processos.

Figura 1. Reuso da enzima β -galactosidase imobilizada em Eupergit[®] C em reações de hidrólise da lactose.



Além da avaliação do reuso na melhor condição de imobilização, utilizando o melhor ensaio anteriormente determinado foi também realizada a caracterização parcial da partícula. A comparação da área superficial do suporte ($25,2 \text{ m}^2/\text{g}$) e da enzima imobilizada ($15,1 \text{ m}^2/\text{g}$), permite-nos verificar uma redução significativa neste parâmetro, indicando a aderência da enzima sobre as cavidades do suporte. Um aumento do diâmetro dos poros foi observada após o processo de imobilização ($21,3$ e $22,4 \text{ }^\circ\text{A}$ para o suporte e a enzima imobilizada, respectivamente), provavelmente causado pela entrada da enzima sobre a estrutura do suporte. A Figura 2 mostra as micrografias de MEV do suporte (a) e a enzima imobilizada (b).

Figura 2. MEV do suporte Eupergit[®] C (a) antes e (b) depois da imobilização da enzima β -galactosidase



As imagens de MEV indicaram que β -galactosidase foi agregada na superfície do suporte. Além disso, após a imobilização (Figura 2b), as micrografias assumem uma aparência mais turva, sugerindo que a enzima foi imobilizada não apenas no interior dos poros, mas também sobre a superfície do suporte. O processo de imobilização apresenta vantagens bastante notáveis e tem o potencial para aplicação em toda a indústria, sendo de extrema importância o conhecimento abrangente desse processo.



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

CONCLUSÕES

A enzima em estudo manteve 50% da sua atividade inicial após 5 ciclos de utilização, o que demonstra alto potencial de utilização no processo industrial, sem perdas consecutivas por 3 ciclos. Tanto as análises de BET com as de MEV evidenciam a imobilização enzimática fornecendo informações importantes em relação a caracterização estrutural da enzima β -galactosidase imobilizada em Eupergit[®] C.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M. e FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, May 2 2007.
- (4) KATCHALSKI-KATZIR, E. e KRAEMER, D. M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1-3, p. 157-176, 2000.
- (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) 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.
- (7) INCHAURRONDO, 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) 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.