

## IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EM AGAROSE E ÁLCOOL POLIVINÍLICO

Romulo Antonio Silva Santos<sup>1</sup>; Caroline Beatriz Benetolo Isaac<sup>2</sup>; Jose Waldir de Sousa Filho<sup>3</sup>  
<sup>1, 2, 3</sup>Universidade de Uberaba  
romulo\_tdg@hotmail.com  
josewaldir.engenharia@gmail.com

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a imobilização enzimática da lactase, enzima responsável pela hidrólise da lactose do leite em glicose e galactose. A intolerância a lactose atinge cerca de 70% da população adulta mundial. A indústria de laticínios busca o desenvolvimento de novos produtos com baixo teor de lactose para atender a esse público. A enzima liofilizada  $\beta$ -galactosidase utilizada no presente trabalho é de origem do fungo *Aspergillus oryzae* da marca Lactosil. A imobilização foi feita utilizando dois suportes diferentes, álcool polivinílico e solução amies agar gel. O meio operacional teve variações de temperatura e pH para saber qual suporte resistiria melhor a essas condições. A enzima livre e a enzima imobilizada com amies agar gel tiveram melhor rendimento a 60°C. Já a enzima imobilizada com álcool polivinílico teve maior conversão a 90°C. Nos ensaios de variação de pH tanto a enzima livre quanto as enzimas imobilizadas tiveram bons rendimentos de atividade catalítica. Os melhores resultados de atividade enzimática ocorrem em uma faixa de pH variando de 6 a 8, para a enzima livre e para as enzimas imobilizadas. De acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar que o álcool polivinílico apresentou maior estabilidade em temperaturas próximas da desnaturação enzimática, ou seja, próxima a 100°C.

**Palavras-chave:** Lactase. Atividade Enzimática. Hidrólise da Lactose.

### 1 Introdução

Os processos industriais atualmente utilizam a biotecnologia industrial para produzir produtos de alto valor agregado

usando menos matéria-prima (ABBI, 2017). A aplicação da biotecnologia é feita em diversas áreas industriais tais como papel e celulose, mineração, têxteis, químicos e energia (ABBI, 2017).

A biotecnologia utiliza microrganismos e enzimas para a otimização dos processos industriais (EMBRAPA, 2015). As enzimas são catalisadoras de reações químicas, ou seja, elas aceleram os processos químicos e são mais vantajosas que os catalisadores químicos por serem mais viáveis ecologicamente (MONTEIRO; SILVA, 2009).

As enzimas são catalisadores de alto custo, por isso para tornar o processo mais acessível economicamente tem-se que recuperar e reutilizar essas enzimas (RESENDE, 2016). A reutilização desses biocatalisadores é viável quando são imobilizados e a sua preparação é estável (RESENDE, 2016).

Esses biocatalisadores são expostos a variações de temperatura, pressão, pH e solventes orgânicos em um processo industrial, dependendo do grau de exposição a essas variações as enzimas perdem a sua capacidade de catalisar reações químicas (MENDES *et al.*, 2011). A imobilização enzimática possui várias vantagens sobre a enzima solúvel, são mais resistentes a influências da temperatura, pH e solventes orgânicos, aproveitamento da atividade catalítica por mais tempo, facilidade de separar o biocatalisador do produto da reação e oportunidade de reutilizar as enzimas (RESENDE, 2016; MENDES *et al.*, 2011).

A imobilização enzimática depende do tipo de método e suporte utilizado (RESENDE, 2016; MENDES *et al.*, 2011). Os métodos podem ser: encapsulação, adsorção física, ligação covalente e reticulação (RESENDE,

## 11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

2016; MENDES *et al.*, 2011; DALLAVECCHIA *et al.*, 2004). Os suportes são classificados em orgânicos e inorgânicos e de acordo com a sua morfologia são porosos, não porosos e de estrutura de gel (MENDES *et al.*, 2011). Não existe um método de imobilização que pode ser utilizado em todas as enzimas (RESENDE, 2016). A escolha do método deve levar em consideração as seguintes características: ser o mais simples de executar, o mais viável economicamente, o que permita que a enzima tenha uma boa atividade catalítica, o que a enzima tenha regeneração e inativação, a toxicidade dos reagentes e que tenha boa estabilidade operacional (RESENDE, 2016).

Atualmente a indústria de laticínios tem desenvolvido produtos com baixo teor de lactose, para atender a consumidores que possuem intolerância a lactose (LONGO, 2006; PEREIRA, 2013). A intolerância a lactose atinge 70% da população adulta mundial e é causada pela má absorção da lactose no sistema digestivo (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998; SWAGERTY; WALLING; KLEIN, 2002). A enzima lactase é responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose para transporte através da membrana celular (SWAGERTY; WALLING; KLEIN, 2002).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo a imobilização enzimática da lactase comercial, utilizando álcool polivinílico e gel de agarose. Foi realizado testes em diferentes temperaturas e pH como meio operacional, para observar qual imobilização teve melhor rendimento e se o produto ao final estava com o teor de lactose permitido para ser classificado como um produto sem lactose.

### 2 Materiais e Métodos

O substrato utilizado foi leite pasteurizado tipo A de marca comercial, comprado em mercado na cidade de Uberaba no estado de Minas Gerais, o substrato em questão possuía pH inicial de 6,8.

Todo o ensaio foi feito com variação de temperatura de 10°C, iniciando em 30°C e

terminando em 100°C. A variação de pH foi de 1 em 1, iniciando em 3 e terminado em 8.

A variação de temperatura foi realizada com o auxílio de banho maria da marca TECNAL e as variações de pH foram feitas com adição de Hidróxido de Sódio ( $\text{NaOH}$ ) e Ácido Clorídrico ( $\text{HCl}$ ) ambos em concentrações de 0,5 mol/L e utilizando PHmetro digital PG2000 Gehaka.

A enzima liofilizada  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* da marca Lactosil foi utilizada no presente trabalho com concentração Lactase - 10.000 FCC ALU (Unidades de lactase) 100 mg de enzima bruta e 1,9 gramas de carboidratos e apresenta-se na forma de um pó branco ou levemente amarelado. A lactase é solúvel em água, insolúvel em etanol, acetona e isopropanol. Uma unidade FCC de Lactase (FCC LU) é a quantidade de enzima que vai liberar 1 micromol de o-nitrofenol/minuto, a 37° C, a um pH de 4,5, sob as condições de teor recomendadas pelo fabricante na proporção de 1 sachê de 2 gramas para 1000 ml de leite.

Todos os ensaios experimentais foram feitos individuais, amostras eram pesadas e imobilizadas uma a uma. Para o suporte enzimático utilizou-se álcool polivinílico (PVOH 92 - 95%), produto em forma de pó granulado, de odor inodoro, cor branco-amarelado, densidade 0,61 – 0,67 g/cm<sup>3</sup> e característica higroscópica. Para o preparo do suporte pesou-se uma amostra de 1 grama de PVOH em balança analítica e hidratou-se com água destilada em proporção de 1/1 m/m. A adição da água só acontecia após a adição da enzima no PVOH.

Após a hidratação do PVOH agitando continuamente com ajuda de uma espátula de aço, formou-se uma esfera semissólida.

Para o segundo suporte foi utilizado solução Amies Agar gel-COPAN da marca Transysem, disponibilizado por uma empresa de biotecnologia animal sediada na cidade de Uberaba-MG, que tem por finalidade o envio de amostras em Swab para detecção de campilobacteriose genital bovina.

## 11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

O suporte em Amies Agar gel consistiu em pesar amostras de 1 grama em béquer e em seguida adicionar a enzima e agitar por alguns segundos com auxílio de uma espátula/a de alumínio fazendo assim sua total diluição.

Os ensaios de laboratório para determinação da hidrólise da lactose do leite em glicose e galactose utilizando  $\beta$ -galactosidase foram realizados em diferentes temperaturas. O leite foi fracionado em 50 ml usando uma proveta de vidro e colocado em Erlenmeyer de 250 ml, em seguida foram colocados em banho maria, a enzima foi adicionada ao ensaio após o leite adquirir a temperatura desejada.

Dando sequência ao experimento, as amostras foram mantidas a temperatura constante por 15 minutos, em seguida, retiradas e colocadas em banho de gelo e sequencialmente analisadas.

O experimento se repetiu nas temperaturas inicial de 30°C, variando de 10°C até a temperatura de ebulição aproximadamente 100°C.

O segundo ensaio experimental foi conduzido em condições experimentais de 60°C, os resultados obtidos foram em grau de hidrólise da lactose na temperatura em questão. O leite utilizado apresentou pH inicial de 6,8, as medições ocorreram em pHmetro digital. O comportamento dos ensaios foi acompanhado por um período de 15 minutos e em seguida feito a medição em espectrofotômetro pela hidrólise da lactose utilizando o método GOD-PAP, glicose oxidase. Os valores obtidos foram subtraídos de um valor inicial de 1,1586.

Para o ensaio as amostras de leite foram divididas em Erlenmeyer de 250 ml e identificados com siglas para designar seus determinados pH, sendo  $E_1=3$  e sequencialmente até o pH final de 8.

A acidificação do meio ocorreu com a adição de solução de ácido clorídrico com concentração de 0,5 mol/l, uma pequena quantidade foi adicionada agitando constantemente a solução em seguida mensurado o pH. Para os ensaios alcalinos

uma quantidade de hidróxido de sódio a 0,5 mol/l foi adicionada e aferido o pH para ajuste do mesmo.

As amostras foram fracionadas em 17 ml de leite, adicionadas em béqueres e feito a proporção de enzima e suporte para uma amostragem menor. No final foram identificadas com os determinados ensaios e em seguida levados a banho maria, a enzima foi adicionado ao ensaio após o leite adquirir a temperatura desejada. Dando sequência ao experimento as amostras foram mantidas a temperatura constante por 15 minutos, retiradas e colocadas em banho de gelo e sequencialmente analisadas.

A lactose é um dissacarídeo, que ao sofrer hidrólise, forma como produtos glicose e galactose. Os dois monossacarídeos são unidos por uma ligação carbono-1 da galactose e o carbono-4 da glicose (ZADOW, 1984).

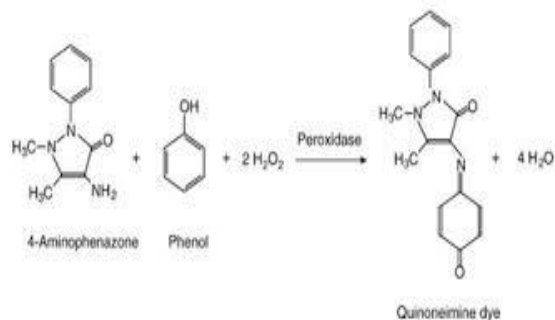
Os ensaios experimentais de hidrólise do leite têm por objetivo principal determinar a concentração de glicose presente na amostra após o período de exposição a determinadas temperaturas e pH para detecção da melhor atividade enzimática. Todas as amostras foram analisadas pelo kit de glicose oxidase método GOD-PAP.

O kit contém um reagente R1 com a composição de tampão fosfato 182,42 mmol/l pH 7,0, GOD- Glicose oxidase >15000 U/l, POD-Peroxidase >1200 U/l, 4- aminoantipirina 0,3 mmol/l, fenol 10mmol/ e solução para preparo do padrão STD a base de azida sódica 0,02% e solução de glicose equivalente a uma concentração de 100mg.

O princípio do método consiste na oxidação da glicose pela enzima oxidase existente na amostra, em presença de oxigênio, produzindo peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase catalisa a oxidação do fenol pelo peróxido de hidrogênio formado em presença de 4-aminoantipirina produzindo um composto de cor rosa (quinonimina), reação indicada na Figura 1, que apresenta máximo de absorção em 505 nm. A intensidade de cor é proporcional a concentração de glicose na amostra.

## 11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

Figura 1: Método GOD-PAP glicose oxidase



Fonte: Reza (2015).

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro 700plus da marca Femto, feitas em triplicata com cubetas de vidro de volume útil 2 ml e comprimento de onda de 505 nm. Os procedimentos técnicos seguiram as orientações especificadas pela fabricante do reagente glicose R1 Biotécnica.

### 3 Resultados

A hidrólise do leite utilizando enzima liofilizada  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* da marca Lactosil foi utilizada no presente trabalho com concentração Lactase - 10.000 FCC ALU (Unidades de lactase), o experimento permitiu o estudo da hidrólise da lactose sob diversas condições operacionais.

#### Condições operacionais em variações de temperatura

Primeiramente foi realizado uma análise do leite em temperatura ambiente para quantificar a glicose inicial. O resultado obtido da absorvidade deste ensaio foi de 1,1586.

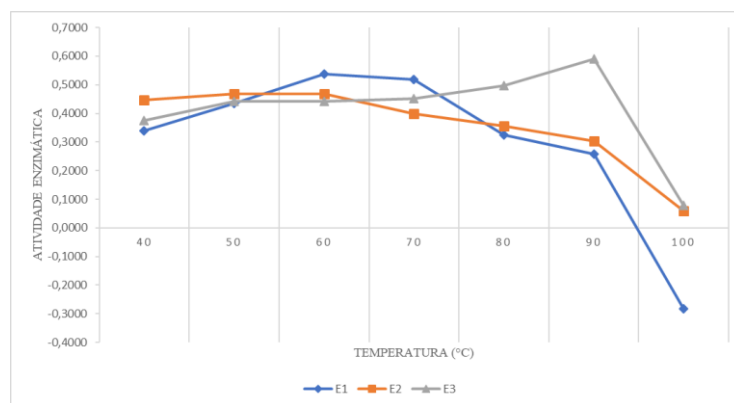
O valor inicial foi então utilizado para o cálculo dos demais ensaios com variações de 10°C. Os resultados posteriores foram subtraídos do valor inicial da glicose.

Nos ensaios experimentais observou-se que os melhores rendimentos nos experimentos E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> foi a 60°C, sendo considerada essa a temperatura ótima e próxima ao valor literal, para o experimento E<sub>3</sub> o valor de máxima conversão foi a 90 °C. O PVOH, um promissor polímero sintético, tem sido usado para imobilização celular. É um polímero atrativo para uso como suporte para imobilização, pois

é de baixo custo, é produzido em larga escala e é inofensivo a biomateriais como enzimas, células e tecidos (ARIGA *et al.*, 1994). Os valores foram plotados em gráfico para melhor observação da variação da atividade enzimática, como observado no Gráfico 1.

No experimento E<sub>2</sub> houve pouca discrepância em comparação ao E<sub>1</sub>, que por ser livre o contato da enzima com o substrato e a formação do complexo enzima substrato foi mais eficiente a temperatura de 60°C. No entanto o ensaio E<sub>2</sub> definido como oclusão ou aprisionamento de enzima em espaços intersticiais da rede polimérica (enzima confinada no interior de miscelas), obteve rendimentos favoráveis em comparação ao E<sub>1</sub>, porém com o aumento da temperatura o suporte não se mostrou eficiente fazendo com que a atividade enzimática caísse gradualmente.

Gráfico 1: Influência da temperatura na atividade enzimática



Fonte: Acervo do autor.

E<sub>1</sub>- Enzima livre

E<sub>2</sub>- Imobilização com amies agarose gel

E<sub>3</sub>- Imobilização com PVOH

#### Condições operacionais em variações de pH

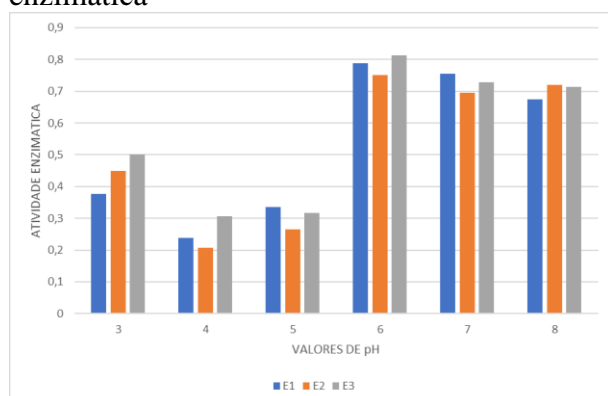
O segundo ensaio experimental mostrou que em todos as faixas de pH houve atividade enzimática, em ambos os ensaios a melhor faixa de pH foi 6, valores entre 1 e 5 tiveram as piores atividades enzimáticas, e os melhores

## 11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

rendimentos foram na faixa de 6 a 8, como mostrado no Gráfico 2.

A análise mostra que o grau de hidrólise foi aproximado quando a reação ocorreu em pH 6 e 7. Nos ensaios de pH ácido os valores para o grau de hidrólise foram baixos, melhorando gradualmente com a diminuição da acidez, e valores de grau 1 em acidez proporcionou diferentes valores de hidrólise.

Gráfico 2: Influência do pH na atividade enzimática



Fonte: Acervo do Autor.

E<sub>1</sub>- Enzima livre

E<sub>2</sub>- Imobilização com amies agarose gel

E<sub>3</sub>- Imobilização com PVOH

### 4 Discussão

As enzimas estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo estes ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Existe então, uma necessidade de estabilizar a enzima contra essa inativação para utilizá-la em meio orgânico. Faz-se então necessário o emprego de um método para que a mesma não perca sua atividade catalítica e sua estereo seletividade. Frente a este problema, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas para fornecer a estabilidade para as enzimas e facilitar sua recuperação e utilização (VIEIRA 1999).

Para Vieira (1999) é importante ressaltar alguns efeitos da imobilização de enzimas, existe uma série de vantagens e desvantagens, dentre as vantagens estão:

- A imobilização pode aumentar o potencial de uma enzima, como catalisador em escala industrial.
- A imobilização pode ser utilizada como uma estratégia para estabilizar enzimas, e pode reduzir ou não ter efeito na sua estabilidade.

### 5 Conclusão

Podemos concluir com o presente trabalho que todos os ensaios experimentais permitiram analisar a estabilidade do imobilizador e as influências nas condições operacionais de temperatura e pH.

- As variações de temperatura interferiram diretamente na atividade enzimática, obtendo melhor hidrólise de lactose em temperatura de 60 graus nos experimentos E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> e nos ensaios de E<sub>3</sub> próximo da temperatura de 90°C.

- Nos ensaios de variação de pH, a hidrólise de lactose obteve valores baixos em pH baixo, entre 3 e 5, e teve as melhores atividades enzimáticas em pH 6 e 8, sendo que em todos os experimentos a melhor hidrólise de lactose ocorreu em pH 6.

- A utilização de suportes enzimáticos orgânicos e inorgânicos possibilitou a comparação de estabilidade e proteção da enzima. O álcool polivinílico apresentou estabilidade em temperaturas próximas da desnaturação e o método de adsorção da enzima apresentou proteção, no entanto, houve baixa hidrólise em temperaturas entre 30 a 70°C em comparação aos outros ensaios enzimáticos.

## 11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

### Referências

ABBI. **Biotecnologia Industrial**. 2017. Associação Brasileira de Biotecnologia Industrial. Disponível em: <<http://www.abbi.org.br/pt/biotecnologia-industrial/>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

ARROYO, M. **Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications**. Madrid, 1996.

DALLA-VECCHIA, Roberto;  
NASCIMENTO, Maria da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 623-630, ago. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422004000400017&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000400017&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 12 set. 2017.

EMBRAPA. **Enzimas: a chave da biotecnologia**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2015.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Roca, 1998.

MENDES, Adriano A. *et al.* **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial**. Quím. Nova, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422011000500019&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000500019&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 13 set. 2017.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, Goiânia, v.3, n.5, ano 3, jan./jun. 2009.

PEREIRA, Mônica Cecília Santana *et al.* LÁCTEOS COM BAIXO TEOR DE LACTOSE: UMA NECESSIDADE PARA PORTADORES DE MÁ DIGESTÃO DA LACTOSE E UM NICHOS DE MERCADO. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.l.], v. 67, n. 389, p. 57-65, dez. 2013. ISSN 2238-6416. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/riilct/article/view/227>>. Acesso em: 14 set. 2017.

RESENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada À Agro&Indústria – Fundamentos e Aplicações**. v. 4. São Paulo: Blucher, 2016.

REZA.M. **INTERFERENSI OBAT DALAM ANALISA**. Disponível em: <<http://rezaankes.blogspot.com.br/2015/07/interferensi-obat-dalam-analisa.html#>>. Acesso em: 30 out. 2017

SWAGERTY JR, D. L.; WALLING, A D.; KLEIN, R. M. Lactose intolerance. **American Family Physician**, v. 65, n. 9, p. 1845–1850, 2002.

VIEIRA, M. A. **Imobilização de enzimas em suportes sólidos e aplicações sintéticas**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/6356>>. Acesso em: 14 set. 2017.