

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Screening de Suportes para Imobilização de β – Galactosidases

Raieli Segalla¹, Rosicler Colet^{1*}, Cindy Elena Bustamante Vargas¹, Ilizandra Aparecida Fernandes¹, Jamile Zeni¹, Ivana Correa Ramos Leal², Maurício Moura da Silveira³, Rogério Marcos Dallago¹, Geciane Toniazco Backes¹ e Eunice Valduga¹

¹Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI Erechim)
Caixa Postal 743 – 99709-910 Erechim – RS, *E-mail: rosicler.colet@yahoo.com.br

²Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
27933-378, Macaé, RJ, Brasil.

³Universidade de Caxias do Sul (UCS), Instituto de Biotecnologia
95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil

RESUMO

A imobilização da enzima apresenta-se como uma alternativa atraente, pois possibilita produzir biocatalisadores mais estáveis e com boa especificidade ao substrato, possibilidade de reutilização e maior viabilidade econômica. Nesta perspectiva, o objetivo do estudo foi realizar um screening de suportes para a imobilização de β -galactosidase em matrizes de alginato/gelatina/fostato de cálcio, alginato de sódio/carvão ativado, poliuretano e poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato). O melhor resultado foi obtido com o suporte de poliuretano com atividade de β -galactosidase de 12 U/g e rendimento de imobilização de 70 %.

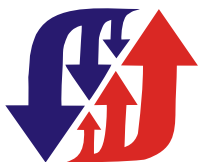
Palavras-chave: β -galactosidase, imobilização, poliuretano.

INTRODUÇÃO

A enzima β -galactosidase, popularmente conhecida como lactase (E.C.3.2.1.23), atua na hidrólise da lactose, para obtenção de produtos lácteos com baixo teor deste açúcar; na produção de Galacto-Oligossacarídeos (GOS); na melhoria da qualidade sensorial de produtos como doce de leite, sorvete e leite condensado, na melhor biodegradabilidade do soro de queijo, entre outros (KLEIN, 2010; PANESAR *et al.*, 2010; FAI e PASTORE, 2015).

Desta forma, as lactases pertencem ao grupo de biocatalisadores cuja imobilização tem despertado crescente interesse, devido ao amplo potencial de aplicação na indústria de alimentos (KLEIN, 2010). A imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente, pois possibilita a produção de biocatalisadores mais estáveis e com boa especificidade ao substrato, eliminando assim, algumas restrições quanto ao uso das enzimas em processos industriais (ZANIN e MORAES, 2004).

Devido às diferentes características, composição química, propriedades do substrato, do produto e finalidade de aplicação do produto obtido, não há um método de imobilização universal, aplicável a todos os biocatalisadores. Dessa forma é necessário escolher o procedimento mais simples e barato, resultando em imobilização, retenção de atividade e alta estabilidade operacional (CAO, 2005). Nesta perspectiva, o objetivo do presente estudo foi o *screening* de suportes para a imobilização da enzima β – galactosidase em matriz de alginato de sódio/gelatina/CaCl₂, alginato de sódio/carvão ativado, Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e poliuretano.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

Enzimas

Para o estudo foi utilizada a enzima β – galactosidase proveniente de *Kluyveromyces lactis* (Lactozyme® 2600 L G3665 – Sigma Aldrich®), adquirida na forma líquida e a de *Aspergillus oryzae* (Lactase from *Aspergillus oryzae* G5160 Sigma Aldrich®), adquirida na forma liofilizada.

Screening de suportes

A β – galactosidase comercial de *K. lactis* na forma líquida, foi imobilizada utilizando-se alginato de sódio/gelatina/ fosfato de cálcio (AGPCa), segundo a metodologia adaptada de Shen *et al.* (2011); alginato de sódio/carvão ativado segundo a metodologia de Richetti *et al.* (2012), com modificações; poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) seguiu-se metodologia descrita por Fernandes *et al.* (2014).

As β – galactosidasas comerciais de *K. lactis* e *A. oryzae* foram imobilizadas em suporte de poliuretano (PU) segundo as metodologias de Silva *et al.* (2013), Fernandes *et al.* (2014) e Bustamente-Vargas *et al.* (2015), com algumas adaptações.

Rendimento de imobilização

O rendimento foi calculado segundo Lima *et al.* (2013) e Fernandes *et al.* (2014), com algumas modificações. Levando em consideração a atividade total da enzima livre em solução (a qual considera o volume de enzima oferecido no ensaio de imobilização) e a atividade total da enzima imobilizada (o qual considera a massa total da imobilização produzida).

Avaliação da atividade da β -galactosidase

Foram utilizadas 0,05 g de β -galactosidase imobilizada, para 2500 μ L do substrato cromogênico o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG - 3 mM) em solução tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0). A reação foi conduzida, incubando-se a 50°C por 7 min. Após o tempo de incubação foi retirada uma alíquota (1000 μ L) do meio reacional e adicionado 2000 μ L de carbonato de sódio 100 mM para cessar a reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Agilent Technologies 8453®) a 410 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ mol do o-nitrofenol do método colorimétrico de hidrólise do ONPG por minuto sob as condições do ensaio (NAGY *et al.*, 2001), com modificações.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

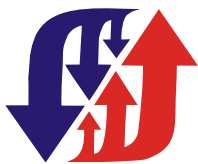
Imobilização de β – galactosidase de *K. lactis*

Matriz de alginato/ gelatina/ fosfato de cálcio (AGPCa)

O suporte de AGPCa não foi adequado para a enzima β – galactosidase de *K. lactis*, pois a enzima apresentou baixa atividade (0,45 U/g), rendimento (~1 %) e recuperação (~0,6 %) após a imobilização.

Suporte de alginato de sódio e carvão ativado

As matrizes formadas apresentaram estrutura rígida e estável, porém não foi possível visualizar a formação de coloração amarela, a partir da hidrólise de ONPG em o-nitrofenol



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

(ONP), após 20 min de reação. Desta forma, não sendo considerado suporte adequado para a enzima β – galactosidase de *K. lactis*.

Imobilização em suporte de poliuretano (PU)

Com o suporte de imobilização de PU não foi possível observar a formação de cor amarela, oriunda da formação de o-nitrofenol (ONP), a partir da reação de hidrólise do substrato ONPG com β – galactosidase nos ensaios testados.

Imobilização em suporte de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV)

A Tabela 1 apresenta a atividade da enzima (U/g), o rendimento de imobilização – RI (%) e a recuperação – R (%) em função da proporção de enzima utilizada em solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 e em H₂O destilada utilizando o suporte PHBV. Observa-se que a β – galactosidase de *K. lactis* apresentou uma atividade de 457,99 U/g (979,8 U/mL atividade da enzima livre). Porém, o rendimento de imobilização e a recuperação foram considerados baixos de aproximadamente 5 e 8 %, respectivamente.

Imobilização de β – galactosidase de *A. oryzae* em suporte de poliuretano

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos da análise da distribuição da enzima na estrutura do PU, após a polimerização, dividida em três partes longitudinais (superior, médio e inferior). Observou-se que a porção de enzima imobilizada referente à parte inferior (ensaio 3) apresentou maior atividade de 11,82 U/g e rendimento de 70 %, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das demais frações. Demonstrando, que durante a formação da matriz, mesmo com a homogeneização, a enzima tende a se depositar na parte inferior do recipiente.

Tabela 1 – Avaliação da distribuição de β – galactosidase na estrutura da matriz de PU, por corte longitudinal individual.

Ensaio	Corte longitudinal	Atividade de β – galactosidase (U/g)*	RI (%)*
1	Superior	8,82 ^b ±0,851	52,16 ^b ±5,03
2	Médio	9,69 ^b ±0,249	57,27 ^b ±1,47
3	Inferior	11,82 ^a ±0,631	69,90 ^a ±3,73

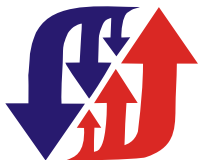
* Média \pm DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste de Tukey). Atividade da enzima livre 17,71 U/mg; suporte imobilizado 0,05 g e 2,5 mL de substrato ONPG 3 mM; tempo de reação 7 min.

CONCLUSÕES

O suporte de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) mostrou-se adequado para imobilização de *Kluyveromyces lactis* e a matriz de poliuretano para a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. O poliuretano torna-se uma estratégia de imobilização, de baixo custo e com ponteciais de utilização pelas indústrias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPERGS.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bustamante-Vargas CE, De Oliveira D, Nyari NLD, Valduga E, Soares MBA, Backes GT, Dallago RM. 2015. In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. *J Mol Catal B Enzym* 122:35–43.
- Cao L. 2005. Immobilised enzymes: science or art: Current Opinion. *Chem Biol* 9:217–226.
- Fai AEC, Pastore GM, 2015. Galacto-oligosacarídeos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas. *Sci Agropecu* 6:69-81.
- Fernandes IA, Nyari NLD, Ficanha AMM, Paulazzi AR, Zeni J, Dallago RM. 2014. Efeito da estabilidade de estocagem da lipase comercial de *Candida antarctica* B (calB) na forma livre e imobilizada por confinamento em suporte de poliuretano. Em XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014. Florianópolis, Brasil.
- Klein MP. 2010. Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose. Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Lima AF, Cavalcante KF, Freitas MF, Rodrigues THS, Rocha MVP, Gonçalves LRB. 2013. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. *Process Biochem* 48:443–452.
- Nagy GN, Kiss TN, Szentirmai, A, Biro S. 2001. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. *Protein Express Purif* 21:24–29.
- Panesar PS, Kumari S, Panesar R. 2010. Potential applications of immobilized β -Galactosidase in food processing industries. *Enzyme Res* 2010:1-16.
- Shen Q, Yanga R, Hua X, Ye F, Zhang W, Zhao W. 2011. Gelatin-templated biomimetic calcification for β – galactosidase immobilization. *Process Biochem* 46:1565–1571.
- Silva MF, Rigo D, Mossi V, Dallago RM, Henrick P, Kuhn GO, Rosa CD, De Oliveira D, De Oliveira JV, Treichel H. 2013. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. *Food Biop Process* 91:54-59.
- Zanin GM, Moraes FF. 2004. Enzimas como Agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa edição, cap. 4, pp.35-85.