

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE β -GALACTOSIDASE EM DIFERENTES FAIXAS DE TEMPERATURA E PH

RENATA FIALHO TEIXEIRA¹; MATEUS SICUPIRA²; MARÍLIA POLLNOW BONINI³
CAROLINE COSTA MORAES⁴, ANA PAULA MANERA⁵

¹Universidade Federal do Pampa – renatafialhot@gmail.com

²Universidade Federal do Pampa – mateusoliveira00@hotmail.com

³Universidade Federal do Pampa – mariliabonini@unipampa.edu.br

⁴Universidade Federal do Pampa – caroline.moraes@unipampa.edu.br

⁵Universidade Federal do Pampa – ana.manera@unipampa.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas produzidas por todos os organismos vivos. Consideradas catalisadores biológicos altamente específicos, por atuarem em condições parcialmente moderadas, tornam-se ideal para utilização na tecnologia de alimentos em que a indústria necessita modificar matérias-primas alimentícias sem destruir seus nutrientes essenciais (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2011). A aplicação industrial de enzimas é estabelecida pela especificidade, atividade, estabilidade de armazenamento, disponibilidade e custos que apresentam, sendo sua atividade determinada pela concentração de enzima e substrato presentes, bem como, presença, concentração e tipos de cofatores e inibidores, pH, temperatura e tempo de reação (COURI; DAMASO, 2017).

Nesse contexto, a β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) ou lactase, é uma importante enzima utilizada industrialmente em aplicações tecnológicas onde, a de *Aspergillus niger* encontra particular interesse devido à sua estabilidade em baixos valores de pH e temperaturas elevadas (OLIVEIRA, 2005). Além disso, a importância desta enzima é reforçada pela sua atividade de galactosiltransferase, responsável pela síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS), estes que podem ser adicionados aos alimentos tornando-os funcionais, trazendo assim, diversos efeitos benéficos aos consumidores (CRUZ et al., 1999). Tendo em vista a importância na utilização da enzima β -galactosidase na indústria de alimentos, o trabalho teve por objetivo determinar a atividade enzimática, bem como, avaliar o potencial de produção para a síntese de GOS da enzima obtida pelo fungo filamentos, *Aspergillus niger*, através de reação enzimática em diferentes condições de temperatura e pH.

2. METODOLOGIA

Os ensaios reacionais com a enzima β -galactosidase de origem fúngica, obtida de *Aspergillus niger*, foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa – Campus Bagé.

Para a determinação da atividade enzimática da β -galactosidase, o substrato empregado foi o 2-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG), cujo preparo foi realizado através da adição da solução tampão fosfato de potássio monobásico anidro 50 mM com cloreto de manganês tetra hidratado 0,1 mM. Os reagentes foram então pesados, dissolvidos em água e os valores de pH desejados foram ajustados com solução de hidróxido de potássio 2 N. Análises preliminares foram feitas de modo a determinar a diluição de enzima ideal para a obtenção de valores de absorvância na faixa entre 0,2 e 0,8.

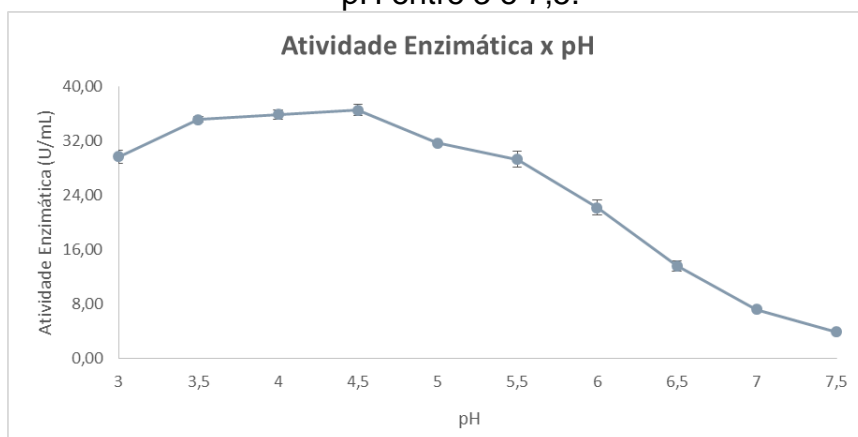
De acordo com o método utilizado por Inchaurredo et al. (1994), para a realização da análise da atividade enzimática em pH distintos, a temperatura do banho foi fixada em 40°C. No entanto, partindo do princípio que os melhores valores de atividade para enzimas de origem fúngica são obtidos em faixas de pH mais próximas do ácido, foram utilizados dez valores diferentes, sendo estes de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5. Primeiramente, foi feita a adição de 2 mL de ONPG em cinco tubos de ensaio para cada valor de pH estudado, os quais foram colocados no banho agitado à 40°C. A seguir, foi adicionado aos tubos 0,05 mL da enzima diluída, acionando o cronômetro para o tempo de reação de 5 min. Depois de esgotado o tempo, adicionou-se 0,5 mL da solução de carbonato de sódio 1 M, de modo que a reação fosse cessada. Paralelamente realizou-se um branco, onde a enzima foi substituída por água. Os tubos foram então retirados do banho e encaminhados ao espectrofotômetro, cuja leitura de absorvância a 420 nm foi determinada. Em seguida calculou-se o valor da atividade enzimática em que uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *o*-nitrofenol produzido por minuto, sob as condições do ensaio.

Após obtido o valor de pH ótimo para que houvesse máxima atividade da enzima, foram realizados nove ensaios a diferentes temperaturas, sendo estas de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70°C, a fim de determinar a faixa de temperatura ótima da enzima, de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da média dos valores da atividade enzimática da β -galactosidase obtidos nos ensaios realizados a temperatura constante de 40°C com diferentes faixas de pH de 3 a 7,5, foi possível obter o gráfico da atividade enzimática vs. pH (Figura 1).

Figura 1. Curva da atividade enzimática da lactase a 40°C em valores de pH entre 3 e 7,5.



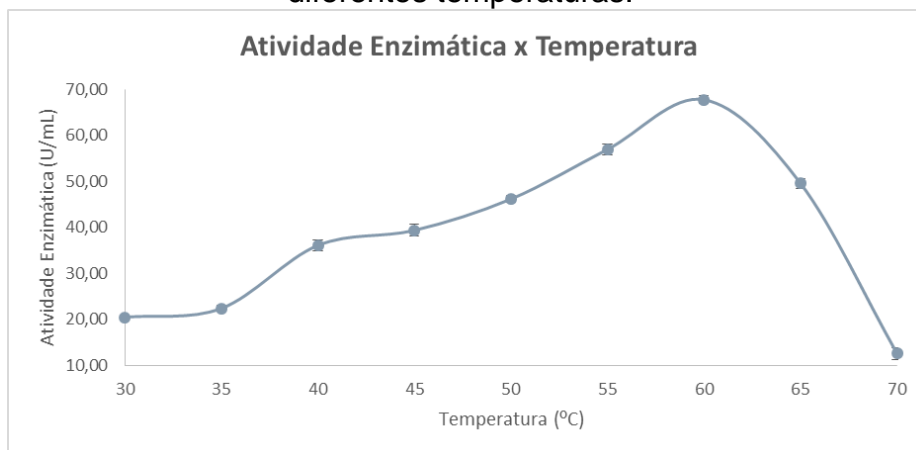
Fonte: Autores (2016).

Segundo Barbosa e Araújo (2007), em geral, as preparações comerciais de lactases provenientes de fungos, especialmente *A. niger* e *A. oryzae*, são importantes quando as condições operacionais estão em pH entre 2,5 e 4,5, com temperatura ótima entre 30 e 40°C e em processos alimentícios. Lima, Lima e Gerald (1982), ao estudarem a mesma enzima de *A. niger*, também observaram que na faixa de pH entre 2,6 e 5,4, a atividade da mesma foi bastante elevada, evidenciando uma faixa de maior estabilidade, sendo seu pH ótimo atingido em

4,4. No presente trabalho, verificou-se que, à medida que o pH foi alterado para valores próximos da neutralidade (pH 7), a atividade da enzima começou a diminuir, sendo a maior redução observada em pH básico. Em contrapartida, o pH ótimo verificado pela máxima atividade enzimática ($36,5 \text{ U.mL}^{-1}$), foi atingido em 4,5, o que corrobora com o encontrado em ambos os estudos.

A partir da obtenção do valor de pH ótimo para máxima atuação da lactase (pH 4,5), foi possível avaliar a atividade enzimática em diferentes temperaturas, visando obter a temperatura ótima da enzima (Figura 2).

Figura 2. Gráfico da atividade enzimática da lactase em pH 4,5 em diferentes temperaturas.



Fonte: Autores (2016).

De acordo com Carminatti (2001), as reações enzimáticas são fortemente dependentes de uma temperatura ótima que influencia diretamente a atividade da enzima, aumentando a velocidade da reação e, por consequência, a conversão de substrato em produtos. Temperaturas abaixo desta faixa inibem sua atividade e, em temperaturas muito superiores, ocorre a inativação da enzima, devido à desnaturação da mesma.

No presente estudo, a temperatura ótima encontrada em pH 4,5 foi obtida a 60°C, no entanto, as temperaturas de 55 e 65°C apresentaram valores próximos ao ideal, o que está de acordo com o relatado por Lima, Lima e Gerald (1982), os quais verificaram que a atividade enzimática da lactase de *Spicaria sp* e *Aspergillus niger* foi relativamente baixa para ambos os micro-organismos, devido ao fato de que a temperatura não foi suficiente para efetuar a reação enzimática de hidrólise do substrato ONPG. Contudo, observando a atividade da enzima na faixa entre 35 e 65°C, constataram um aumento até o valor máximo estudado, ou seja, a temperatura ótima foi atingida a 65°C para ambas; em valores de temperatura acima de 65°C, a atividade enzimática diminuiu consideravelmente, indicando uma rápida desnaturação pelo calor.

4. CONCLUSÕES

Ao estudar o pH e temperatura ótimos para a enzima β -galactosidase de *A. niger* foi possível observar a influência ocasionada nos valores da atividade enzimática frente a pequenas alterações. O pH ótimo utilizado para a obtenção da melhor temperatura foi de 4,5 com atividade máxima de $36,5 \text{ U.mL}^{-1}$, sendo a temperatura ótima de 60°C e atividade de $67,7 \text{ U.mL}^{-1}$. Em temperaturas de 30 e 70°C, os valores encontrados foram menores ou iguais a $20,0 \text{ U.mL}^{-1}$, demonstrados pelo início da curva e seu decréscimo final, possivelmente

ocasionados pela baixa temperatura inicial utilizada, insuficiente para alcançar o ótimo da reação, bem como, pela inativação da enzima por desnaturação proteica, respectivamente.

Dessa forma, foi constatado que variações nas condições operacionais de temperatura e pH, bem como, a diferença entre as enzimas provenientes de micro-organismos de mesmo gênero e/ou espécie, apresentam influência considerável no valor obtido para a atividade enzimática máxima.

Agradecimentos ao Programa de Desenvolvimento Acadêmico (PDA Pesquisa – Unipampa) ao CNPq e à FAPERGS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, M. R.; ARAÚJO, E. H. Estudo da produção da enzima lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentoso *Aspergillus niger*. **Horizonte Científico**, v.1, n.1, p. 1-22, 2007.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001, 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COURI, S.; DAMASO, M. C. T. **Enzimáticos**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Acessado em 11 out. 2017. Online. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CO NT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html#

CRUZ, R. et al. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Braz Bioresour Technol**, v. 2, p.165, 1999.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Enzimas: natureza e ação nos alimentos**, nº 16, 2011, p. 26-37. Acessado em 11 out. 2017. Online. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/166.pdf>

INCHAURRONDO, V. A. et al. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v.29, p.47-54, 1994.

LIMA, C. A. A.; LIMA, E. D. P. A.; GERALD, L. T. S. Obtenção e caracterização da enzima β -galactosidase de origem fúngica. **Agropecuária Técnica**, v. 3, n. 1, p. 73-80, 1982.

OLIVEIRA, C. C. M. **Produção de B-galactosidase por levedura recombinante: Desenvolvimento de um sistema de produção estável**. 2005, 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade do Minho, Braga.