



IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL DE *Aspergillus oryzae* EM NANOTUBOS DE CARBONO DE MÚLTIPLAS CAMADAS

MICHELE DUTRA ROSOLEN¹; ADRIANO GENNARI²; GIANDRA VOLPATO³;
CLAUCIA FERNANDA VOLKEN DE SOUZA²

¹Universidade Federal de Pelotas – michele.dutra@gmail.com

²Universidade do Vale do Taquari-UNIVATES - adriano.gennari@hotmail.com

²Universidade do Vale do Taquari-UNIVATES - claucia@univates.br

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul –
giandra.volpato@poa.ifrs.edu.br

1. APRESENTAÇÃO

A lactose é um carboidrato predominante no leite e sua absorção intestinal requer a hidrólise desse dissacarídeo em galactose e glicose pela enzima β -galactosidase. Em virtude dos baixos níveis de enzima no intestino, grande parte da população apresenta intolerância à lactose e dificuldades em consumir produtos lácteos (PANESAR et al, 2010). A prevalência da intolerância à lactose varia entre indivíduos adultos de 5% no nordeste da Europa a quase 100% na Ásia e Oriente Médio, sendo que no Brasil, os números variam entre 57 e 100% entre os adultos das diferentes etnias (MATTAR e MAZO, 2010).

A β -galactosidase ou lactase é uma enzima de grande importância na indústria de alimentos e dentre as suas aplicações está o melhoramento da doçura, solubilidade, sabor e digestibilidade dos produtos lácteos (JOCHEMS et al., 2011). Para aplicação em alimentos, várias fontes microbianas para obtenção dessa enzima têm sido estudadas, tais como, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis* (FREITAS et al., 2011).

Além disso, tem se verificado um crescente aumento no interesse por enzimas imobilizadas. Quando comparadas com as suas formas livres, essas enzimas são geralmente mais estáveis e mais fáceis de manusear. Ademais, os produtos da reação não estão contaminados pela biomolécula (útil especialmente para indústria farmacêutica e alimentícia) e são de fácil isolamento da solução (HOMAEI et al., 2013). Inúmeros sistemas de imobilização são investigados, mas poucos são expandidos em escala industrial, principalmente porque os suportes e métodos utilizados ainda são muito caros ou de difícil aplicação (GROSOVÁ et al., 2008). Os principais suportes citados na literatura para a imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* são celulose, quitosana, alginato de cálcio, sílica e alumina (HUSAIN, 2010).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi imobilizar a enzima β -galactosidase comercial produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae* em nanotubos de carbono de múltiplas camadas (MWCNTs, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*).

2. DESENVOLVIMENTO

Para a modificação dos MWCNTs utilizou-se uma mistura contendo H₂SO₄ e HNO₃ na proporção 3:1 (v:v) respectivamente, para cada 5,0 mg de nanotubos. Essa solução ácida contendo o suporte foi submetida a banho termostático (MA 156, MARCONI), sob agitação, a temperatura ambiente por 1,0 h. Após esse tempo, lavou-se o suporte modificado (MWCNTs-AC) com NaOH 0,01 M até obter-se pH neutro. Em seguida, lavou-se mais duas vezes com água ultra pura.



A separação dos nanotubos da água das lavagens foi realizada com o auxílio de uma centrífuga (M 320R, HETTICH ZENTRIFUGEN) a 2510 x g, 4,0 °C por 5,0 min. Por fim, secou-se os MWCNTs-Ac à vácuo a 50 °C por 24 h, seguido de estocagem para análises futuras.

Além da modificação ácida, realizou-se a modificação dos MWCNTs com etilenodiamina (EDA) e glutaraldeído (GLU). O processo de modificação para ambos os reagentes ocorreram da mesma forma. Adicionou-se 5,0 mL de cada reagente para cada 5,0 mg de MWCNTs, respectivamente. Essas soluções foram mantidas, sob agitação em banho termostático, a temperatura ambiente por 8,0 h. Logo após, as duas soluções (MWCNTs-EDA e MWCNTs-GLU) foram lavadas duas vezes com água ultra pura. A separação dos nanotubos da água foi realizada com o auxílio de uma centrífuga a 2510 x g, 4,0 °C por 5,0 min. Por fim, secou-se os MWCNTs-EDA e MWCNTs-GLU à vácuo a 50 °C por 24 h, seguido de estocagem para análises futuras.

Realizou-se a imobilização da enzima β -galactosidase (20.000 U) em 1,0 g de MWCNTs modificados ou não, segundo ANSARI e HUSAIN (2012). Alíquotas do sobrenadante e da suspensão foram coletadas periodicamente e realizaram-se os ensaios de atividade enzimática ao longo de 24,0 h do processo de imobilização. A β -galactosidase imobilizada (MWCNTs-AC-GAL) foi separada por centrifugação a 2510 x g por 5,0 min, seguida de duas lavagens com água ultrapura e estocada em solução tampão a 4,0 °C para análises futuras.

A eficiência de imobilização foi definida pela razão (percentual) entre a atividade enzimática no derivado obtido e a atividade enzimática presente na enzima livre.

3. RESULTADOS

O processo de imobilização da enzima β -galactosidase em MWCNTs com diferentes tratamentos foram estudados. O tempo de imobilização foi definido em 3 h de reação, tendo em vista que a partir da terceira hora os rendimentos de imobilização em MWCNTs funcionalizados e não funcionalizados mantiveram-se constantes. Os resultados do rendimento e da eficiência dos MWCNTs modificados por diferentes tratamentos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Enzima β -galactosidase imobilizada em MWCNT modificados por diferentes tratamentos após 3 h de reação.

Tratamento	Rendimento (%)	Eficiência (%)
MWCNTs-Ac	96,90 \pm 0,84 ^a	79,65 \pm 2,34 ^a
MWCNTs-EDA	52,05 \pm 1,63 ^b	25,80 \pm 3,50 ^c
MWCNTs-GLU	53,26 \pm 0,29 ^b	27,75 \pm 3,19 ^c
MWCNTs	51,49 \pm 0,32 ^b	37,45 \pm 1,46 ^b

* Cada valor representa a media de três experimentos independentes, realizados em triplicata, com desvio padrão da média. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) para valores da mesma coluna.



Destaca-se que o rendimento da modificação ácida (96,09%) apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais.

4. AVALIAÇÃO

ANSARI et al. (2013) ao imobilizarem β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em MWCNTs funcionalizados com glutaraldeído obtiveram 92,5% da atividade original. Já MUBARAK et al (2014) ao imobilizarem celulase em MWCNTs funcionalizados com tratamento ácido alcançaram 97,58% da atividade inicial. MISSON et al. (2015) também demonstraram sucesso na modificação com tratamento ácido em nanofibras de poliestireno na imobilização da enzima β -galactosidase com 60% de rendimento.

Os resultados de imobilização apresentados no presente trabalho indicam que o favorecimento da ligação da enzima nos grupamentos carboxila (-COOH) e hidroxilas (-OH) gerados nas paredes do suporte, tornam as forças de ligação mais fortes, favorecendo o processo de imobilização (PRIETO et al., 2014).

Assim, conclui-se que a enzima comercial β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em MWCNTs, não-funcionalizados e funcionalizados por diferentes tratamentos. Entre os tratamentos realizados (glutaraldeído, etilenodiamina e mistura de $H_2SO_4:HNO_3$), os parâmetros de imobilização, rendimento e eficiência foram significativamente maiores para a β -galactosidase em MWCNTs funcionalizados pela mistura ácida (MWCNTs-Ac-Gal). Estes valores foram de 97 e 79%, respectivamente após 3 h de imobilização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSARI, S. A.; SATAR, R.; CHIBBER, S.; KHAN, M. J. Enhanced stability of *Kluyveromyces lactis* β –galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 258-263, 2013.
- FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β – Galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33-38, 2011.
- GROSSOVÁ, Z.; RPSBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry – a review. **Czech Journal of Food Science**. v. 26, n. 1, p. 1-14. 2008.
- HOMAEI, A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **J Chem Biol**, v. 6, p. 185–205, 2013.
- HUSAIN, Q. β Galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 30, p 41 – 62, 2010.
- JOCHEMS, P.; SATYAWALI, Y.; VAN ROY, S.; DIELS, L.; DEJONGUE, W. Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 580-588, 2011.
- MATTAR, R.; MAZO, D. F. C.; Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 230-236, 2010.
- MISSION, M.; JIN, B.; CHEN, H. ZHANG H. Enhancing enzyme stability and metabolic functional ability of β -galactosidase through functionalized polymer



nanofiber immobilization. **Bioprocess and Biosystem Eng.** v. 38, p. 1915-1923, 2015.

MUBARAK, N. M.; WONG, J. R.; TAN, K. W.; SAHU, J. N.; ABDULLAH, E. C.; JAYAKUMAR, N. S.; GANESAN, P. Immobilization of cellulose enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 124, 2014.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential applications of immobilized β -Galactosidase in food processing industries. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1 - 16, 2010.

PRIETO, L. M.; RICORDI, R. G.; KUHN, R. C.; FOLETTO, E. L.; MAZUTTI, M. A.; BURKERT, C. A. V. Evaluation of β -galactosidase adsorption in to pre-treated carbon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2014.

STRUMEYER, D. H.; CONSTANTINIDES, A.; FREUDENBERGER, J. Preparation and characterization of α -amylase immobilized on collagen membranes. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 498-502, 1974.