HIDRÓLISE DA LACTOSE E FORMAÇÃO DE GLICOSE PELA B-GALACTOSIDASE IMOBILIZADA DE *BACILLUS LICHENIFORMIS*

LAFIA, A. T.[1]; RIBEIRO, A. A. P[1]; FALLEIROS, L. N. S. S. [1]; GUIDINI, C. Z. [1]

[1]Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Patos de Minas, MG 38700-126, Brasil.

RESUMO

A intolerância à lactose é a incapacidade de digerir a lactose e os produtos sem lactose ou contendo quantidade reduzida são produzidos para atender as necessidades dessas pessoas. A produção de produtos lácteos com redução de lactose é feita utilizando a enzima β-galactosidase que tem a capacidade de quebrar a lactose em glicose e galactose. Enzimas são biocatalisadores de alto custo e muito instáveis. O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade hidrolítica da β-galactosidase de *Bacillus licheniformis*, na sua forma livre, imobilizada e imobilizada reticulada em resina de troca iônica. O rendimento da imobilização foi de 62%. A enzima livre mostrou uma atividade hidrolítica alta, mas não reutilizável. Enquanto a enzima imobilizada mostrou uma boa atividade e foi utilizada 5 vezes sucessivamente sem perder sua atividade, apresentando diferencia significativa entre usos. Quando a enzima imobilizada foi reticulada com glutaraldeído (2g/L) houve uma diminuição significativa na sua atividade, mas apresentou maior estabilidade em 5 usos sucessivos sem diferencia significativa. A imobilização é um processo benéfico pela recuperação enzimática e sua reutilização, sendo mais estáveis pela reticulação com glutaraldeído.

Palavras-chave: Enzima, Glutaraldeido, Estabilidade, Resina

INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas que catalisam as reações bioquímicas, mais aceitáveis que os catalisadores químicos. Elas apresentam alta atividade catalítica, são muito seletivas, específicas e biodegradáveis, com maior aceitabilidade ambiental. As enzimas são amplamente encontradas na natureza, em plantas, animais e microrganismos (LIU et al., 2018; THANGARAJ e SOLOMON, 2019). Em ponto de vista industrial, as enzimas microbianas são importantes nas indústrias de alimentos, sendo mais estáveis do que as enzimas vegetais e animais (RAVEENDRAN et al., 2018).

Na indústria alimentícia, principalmente em laticínios, a hidrólise da lactose é um processo biotecnológico muito importante para produzir produtos lácteos sem lactose ou com teor reduzido para pessoas com intolerância à lactose. A enzima β-galactosidase da família das hidrolases, catalisa a hidrólise da lactose em glicose e galactose (RAVEENDRAN et al., 2018). As β-galactosidases, podem também catalisar a reação de transgalactosilação, para a

formação de galacto-oligossacarídeos, prebióticos que melhoram a saúde intestinal (GAO et al., 2019).

Os maiores problemas com enzimas são seus altos custos de aquisição e baixas estabilidades operacionais. A imobilização enzimática é a técnica mais utilizada para contornar esses problemas (GONÇALVES FILHO et al., 2019). O uso de enzimas imobilizadas apresenta vários benefícios quando comparada ao uso da enzima livre. Os benefícios incluem maior estabilidade operacional, possibilidade de recuperação e uso contínuo da enzima, redução de custos e ausência do biocatalisador no produto final (DAMIN et al., 2021). As enzimas após a imobilização tornam-se insolúveis, o que facilita muito a recuperação e sua reutilização (SIGURDARDÓTTIR et al., 2018). Algumas aplicações industriais importantes de enzimas imobilizadas incluem, lipase imobilizada na hidrólise de triacilgliceróis em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol (COELHO e ORLANDELI, 2020), uso de β-galactosidases imobilizada na hidrolise de lactose em laticínios (KURIBAYASHI et al., 2021), uso de quimotripsina imobilizada para síntese peptídica (BAYRAMOGLU et al., 2020) e utilização da D-Glucose/xilose isomerase imobilizada na produção do xarope de milho para adoçar bebidas (BASSO e SERBAN, 2019) entre outros.

A imobilização enzimática é um processo físico ou químico que consiste em confinar enzimas em uma determinada região ou espaço com ampla retenção de sua atividade catalítica em muitos ciclos de usos (THANGARAJ e SOLOMON, 2019). Existem vários métodos de imobilização enzimática, divididos em dois grupos, métodos físicos (adsorção e aprisionamento) e métodos químicos (ligação covalente e ligação cruzada) (LIU et al., 2018).

Além da imobilização, as enzimas podem ser reticuladas usando reagentes bifuncionais para sintetizar os agregados enzimáticos reticulados. Glutaraldeído, isocianato e N,N'- etileno glicerol-bis maleimida são os reagentes bifuncionais comumente usados, sendo o glutaraldeído o mais usado para aumentar a estabilidade da enzima imobilizada (LIU et al., 2018). Kuribayashi et al. (2021), obtiveram maior estabilidade operacional em β-galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada e reticulada com glutaraldeído (3,5g/L). A enzima β-galactosidase de *Bacillus licheniformis* é uma enzima pouca estudada, não se encontra muitas informações na literatura sobre essa enzima. Bilal et al. (2019) também obtiveram boa estabilidade da enzima lacase fúngica, imobilizada covalentemente em grânulos de quitosana e reticulada com 2% de glutaraldeído.

O objetivo deste trabalho foi imobilizar a β-galactosidase de *Bacillus licheniformis* em resina de troca iônica Duolite A-568 por adsorção e avaliar a atividade da enzima livre, imobilizada e imobilizada reticulada com glutaraldeído (2g/L) em relação à produção de glicose após hidrolise da lactose.

MATERIAL E MÉTODOS

Unidade experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas, onde foram realizados os experimentos com a enzima na forma livre e imobilizada. A resina de troca iônica Duolite A-568 utilizada como suporte de imobilização foi cedida pela Dow Chemical Company (Califórnia, Estados Unidos). A enzima utilizada foi a β-galactosidase de *Bacillus licheniformis* na forma líquida, da marca Novozymes (Bagsværd, Dinamarca), cedida pela empresa Granolab/ Granotec Nutrição e Biotecnologia (Araucária, Brasil).

Imobilização da β-galactosidase e reticulação

O processo de imobilização foi realizado utilizando uma massa de 0,5 g de resina, previamente ativada, incubada em 10 mL de solução enzimática com concentração de enzima de 953 U, tampão BR com força iônica 40 mM e pH 4,0, sob agitação de 150 rpm em mesa rotativa à temperatura ambiente (aproximadamente 25ºC). O processo de reticulação foi realizado com glutaraldeído (2g/L) depois da reticulação.

Rendimento da imobilização

O rendimento da imobilização foi determinado pela Equação 1 como descrito por Sheldon e Van Pelt (2013).

$$\text{Rendimento de imobilização} = 100 \text{ x } \frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} \quad (1)$$

Onde:
Atividade imobilizada = Atividade da enzima livre – Atividade do sobrenadante
Atividade inicial = Atividade da enzima livre

Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose, realizada em um reator de mistura com um volume de 75mL com uma solução 50g·L^{-1} de lactose (PA), preparado em tampão lático pH 6,5, conforme descrito por Santiago *et al*. (2004). Para cada experimento foram tomadas cinco amostras do meio reacional no intervalo de três em três minutos (3, 6, 9, 12 e 15min). Cada amostra foi colocada em um tubo de ensaio e imediatamente imersa em água quente a 80 °C por 10 minutos para inativar as enzimas, assim interrompendo a atividade enzimática. A glicose formada foi dosada pelo método da glicose-oxidase (BAO et al., 2004) utilizando o kit Glicose Liquiform da Labtest.

Para o cálculo da concentração de glicose formada foi utilizada a Equação 2, segundo o fabricante.

$$Glicose = \frac{Absorbância\ teste}{Absorbância\ padrão} x\ 100\ mg.dL^{-1} \quad (2)$$

A unidade de atividade enzimática U foi definida como micromol de glicose produzida por minuto (μmol.min^{-1}). Para o cálculo da atividade enzimática (seja na forma livre ou imobilizada) foi seguida a Equação 3.

$$AE = \frac{GFM}{0{,}18} \times V \quad (3)$$

Onde:

AE - atividade enzimática (μmol.min^{-1});

GFM - glicose formada por minuto (mg.mL^{-1}.min^{-1});

0,18 - Massa molar da glicose (mg.μmol^{-1}) e

V - volume total do reator (mL).

Análise estatística

Os dados foram coletados em duplicata e analisados usando o software Statistica® 7.0, que foi utilizada para fazer a analise de variância pelo teste de Tukey a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento da imobilização foi de 62%, valor inferior aos encontrados (70%) por Gennari et al. (2021) na imobilização da β-galactosidase de *Kluyveromyces sp* em celulose. Utilizando agarose-glioxila revestido com PEI como suporte de imobilização, Neto et al. (2021) obtiveram 61% de rendimento da enzima β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. O rendimento da imobilização depende do método e do suporte da imobilização, entre outros. Quando β-galactosidase foi imobilizada em celulose magnética, o maior rendimento foi 63% (GENNARI et al., 2022).

Em todas as condições de hidrólise (Tabela 1, 2 e 3) foi constatado que quanto mais tempo a enzima passa no reator mais glicose é produzida. Maiores tempos de contatos da enzima com a lactose resultam em maiores hidrólises assim produzindo grande quantidade de glicose. Quando a β-galactosidase foi incubada durante 120 min à temperatura ambiente com soro de leite produziu 476 μg de glicose, enquanto quando incubada por 24 h a 4°C produziu 1286 μg de glicose (KESSI e ÁRIAS, 2019).

A hidrólise da lactose pela enzima livre foi maior (Tabela 1) que à das enzimas imobilizadas (Tabela 2 e 3) de 3 a 15 minutos. As enzimas livres como têm seus sítios ativos totalmente livres e sem passar por nenhum estresse provocado pela imobilização possuem maiores atividade hidrolítica comparadas às enzimas ligadas a um suporte de imobilização. A enzima livre pode ser usada uma só vez porque fica solúvel e irrecuperável para ser reutilizada. Wolf et al. (2021) observaram maior atividade em enzimas β-D-galactosidases livres que nas enzimas imobilizadas em hidrogéis. Kessi e Árrias (2019) também observaram uma maior atividade da β-galactosidase livre que aquela imobilizada em pó de membrana de casca de ovo de galinha.

Tabela 1- Produção de glicose (µmol/min) pela β-galactosidase livre.

Tempo (min)	Glicose (µmol/min)
3	13±0
6	22±0
9	28±0
12	35±0
15	39±1

A formação de glicose pela enzima imobilizada se encontra na Tabela 2. Os valores de glicose apresentaram uma diferença significativa (5%) nos diferentes tempos de hidrolise. A enzima imobilizada manteve mais de 70% de sua atividade inicial em relação à produção de glicose em 5 usos sucessivos em cada tempo. A enzima imobilizada além de ser reutilizável várias vezes, apresenta uma boa estabilidade. A β-galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em nanocompósito manteve mais de 80% da sua atividade inicial em 10 usos sucessivos (SHAFI et al., 2021). A β-galactosidase imobilizada covalentemente em nanotubos de carbono manteve 92% da sua atividade mesmo após sua 10ª reutilização sucessiva (KHAN e HUSAIN, 2020). Armazenado a 4 °C durante 250 dias, a enzima β-galactosidase de *Lens culinaris* imobilizada em nanotubos de carbono manteve mais de 90% da sua atividade residual (YADAV et al., 2019).

Tabela 2- Produção de glicose (µmol/min) pela β-galactosidase imobilizada em 5 usos sucessivos.

Tempo (min)	1° uso	2° uso	3° uso	4° uso	5° uso
3	5,5±0^{a}	4,0±0^{a}	3,5±0^{a}	3,5±0^{a}	3,5±0^{a}
6	11,0±1^{a}	8,0±0^{ab}	7,5±0^{ab}	6,5±0^{b}	6,0±1^{b}
9	16,0±0^{a}	12,0±0^{ab}	11,0±0^{b}	10,5±0^{b}	9,5±1^{b}
12	21,5±0^{a}	15,5±0^{b}	15,0±1^{b}	15,0±0^{b}	12,5±1^{b}
15	26,0±0^{a}	20,0±1^{b}	19,5±0^{b}	19,5±0^{b}	17,0±1^{b}

Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não se diferem entre estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Como mostra a Tabela 3 houve uma queda na produção de glicose comparada a da enzima livre (Tabela 1) e somente imobilizada (Tabela 2), mas houve uma maior estabilidade da enzima β-galactosidase imobilizada reticulada com glutaraldeído (2g/L) em 5 usos sucessivos. A estabilização enzimática pelo glutaraldeído ocorre via ligação covalente multiponto. Durante a estabilização toda a superfície da enzima é modificada com glutaraldeído, o que pode afetar as propriedades da enzima como baixa atividade (VAZQUEZ-ORTEGA et al., 2018). Os valores de glicose produzidos foram estatisticamente iguais, sem diferença significativa (5%) em cada tempo de hidrolise em relação aos usos. Kuribayashi et al. (2021) também observaram uma maior estabilidade da β-galactosidase imobilizada e reticulada com 3,5% de glutaraldeído em 8 usos sucessivos, mas apresentou menor atividade que a enzima apenas imobilizada. Neto et al. (2021) obtiveram uma estabilidade de mais de 90 % em 7 usos sucessivos durante 360 minutos com β-galactosidase reticulada com glutaraldeído. O glutaraldeído é um bom agente reticulante para aumentar a estabilidade da β-galactosidase.

Tabela 3- Produção de glicose (µmol/min) pela β-galactosidase imobilizada reticulada com glutaraldeído (2g/L) em 5 usos sucessivos.

Tempo (min)	1° uso	2° uso	3° uso	4° uso	5° uso
3	0,54±0,11[a]	0,42±0,05[a]	0,52±0,00[a]	0,52±0,02[a]	0,51±0,16[a]
6	1,57±0,10[a]	1,43±0,19[a]	1,57±0,14[a]	1,68±0,20[a]	1,28±0,19[a]
9	2,88±0,11[a]	2,34±0,05[a]	2,50±0,11[a]	2,52±0,02[a]	2,18±0,23[a]
12	3,80±0,17[a]	3,49±0,23[a]	3,71±0,28[a]	3,34±0,06[a]	3,27±0,31[a]
15	4,91±0,19[a]	4,64±0,05[a]	4,81±0,10[a]	4,72±0,08[a]	4,22±0,44[a]

Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não se diferem entre estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

CONCLUSÕES

A imobilização é uma técnica adequada e econômica para reduzir os custos envolvidos na produção e na obtenção de enzimas, principalmente a β-galactosidase. Uma vez que a enzima imobilizada pode ser recuperada e reutilizada na produção industrial, assim diminui os custos de produção de laticínios sem lactose. Para aumentar a estabilizada diante nas condições extremas de uso, o glutaraldeído na concentração de 2g/L, pode ser utilizada como agente reticulante em β-galactosidase de *Bacillus licheniformis.*

REFERÊNCIAS

BAO, J., KOUMATSU, K., FURUMOTO, K., YOSHIMOTO, M., FUKUNAGA, K., & NAKAO, K. Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor. ***Biochemical Engineering Journal***, v.22, n.1, p.33-41, 2004. https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.08.001

BASSO, ALESSANDRA; SERBAN, SIMONA. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. ***Molecular Catalysis***, v. 479, p. 110607, 2019. https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607

BAYRAMOGLU, GULAY; SALIH, BEKIR; ARICA, M. YAKUP. Catalytic activity of immobilized chymotrypsin on hybrid silica-magnetic biocompatible particles and its application in peptide synthesis. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 190, n. 4, p. 1224-1241, 2020. https://doi.org/10.1007/s12010-019-03158-z

BILAL, M., JING, Z., ZHAO, Y., & IQBAL, H. M. Immobilization of fungal laccase on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads and its bio-catalytic potential to degrade bisphenol A. ***Biocatalysis and Agricultural Biotechnology***, v.19, p.101174. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101174

COELHO, ANA LETICIA SILVA; ORLANDELLI, RAVELY CASAROTTI. Immobilized microbial lipases in the food industry: A systematic literature review. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, v. 61, n. 10, p. 1689-1703, 2021. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1764489

DAMIN, B. I. S.; KOVALSKI, F. C.; FISCHER, J.; PICCIN, J. S. & DETTMER, A. Challenges and perspectives of the β-galactosidase enzyme. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 105, n. 13, p. 5281-5298, 2021. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11423-7

GAO, X.; WU, J. & WU, D. Rational design of the beta-galactosidase from Aspergillus oryzae to improve galactooligosaccharide production. ***Food chemistry***, v. 286, p. 362-367, 2019. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.212

GENNARI, A., SIMON, R., DE MOURA SPEROTTO, N. D., BIZARRO, C. V., BASSO, L. A., MACHADO, P., ... & DE SOUZA, C. F. V. One-step purification of a recombinant beta-galactosidase using magnetic cellulose as a support: Rapid immobilization and high thermal stability. ***Bioresource Technology***, v.345, p.126497, 2022. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126497

GENNARI, A., SIMON, R., DE ANDRADE, B. C., TIMMERS, L. F. S. M., MARTINS, V. L. M., RENARD, G., ... & DE SOUZA, C. F. V. Production of beta-galactosidase fused to a cellulose-binding domain for application in sustainable industrial processes. ***Bioresource Technology***, v.326, p.124747, 2021. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124747

GONÇALVES FILHO, D.; SILVA, A. G. & GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. ***Applied microbiology and biotechnology***, v.103, n.18, 7399-7423, 2019. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6

KESSI, E.; ARIAS, J. L. Using natural waste material as a matrix for the immobilization of enzymes: chicken eggshell membrane powder for β-galactosidase immobilization. ***Applied biochemistry and biotechnology***, v. 187, n. 1, p. 101-115, 2019. https://doi.org/10.1007/s12010-018-2805-4

KHAN, MARYAM; HUSAIN, QAYYUM. Multiwalled carbon nanotubes bound beta-galactosidase: It's activity, stability and reusability. In: Methods in Enzymology. Academic Press, 2020. p. 365-405. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.10.018

KURIBAYASHI, L. M.; DO RIO RIBEIRO, V. P.; DE SANTANA, R. C.; RIBEIRO, E. J.; DOS SANTOS, M. G.; FALLEIROS, L. N. S. S. & GUIDINI, C. Z. Immobilization of β-galactosidase from Bacillus licheniformis for application in the dairy industry. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v.105, n.9, 3601-3610, 2021. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11325-8

LIU, D.; M.; CHEN, J.; SHI, Y. & P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. ***TrAC Trends in Analytical Chemistry***, v. 102, p. 332-342, 2018. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011

NETO, C. A. C. G., E SILVA, N. C. G., DE OLIVEIRA COSTA, T., DE ALBUQUERQUE, T. L., GONÇALVES, L. R. B., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., & ROCHA, M. V. P. The β-galactosidase immobilization protocol determines its performance as catalysts in the kinetically controlled synthesis of lactulose. ***International Journal of Biological Macromolecules***, v.176, p.468-478, 2021. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.078

RAVEENDRAN, S., PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; ... & PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. ***Food technology and biotechnology,*** v. 56, n. 1, p. 16, 2018. http://dx-doi.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.17113/ftb.56.01.18.5491

SANTIAGO, P. A., MARQUEZ, L. D. S., CARDOSO, V. L., et al. "Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com Kluyveromyces marxianus", ***Food Science and Technology***, v. 24, n. 4, p. 567–572, dez. 2004. DOI: 10.1590/S0101-20612004000400015. Disponível em: http://www.scielo.br/j/cta/a/3KzKkFnVSbfMQHTFpBXMBCf/?lang=pt. Acesso em: 25 jan. 2022.

SIGURDARDÓTTIR, S. B.; LEHMANN, J.; OVTAR, S.; GRIVEL, J. C.; NEGRA, M. D.; KAISER, A. & PINELO, M. Enzyme immobilization on inorganic surfaces for membrane reactor applications: mass transfer challenges, enzyme leakage and reuse of

materials**.** ***Advanced Synthesis & Catalysis***, v. 360, n. 14, p. 2578-2607, 2018. https://doi.org/10.1002/adsc.201800307

SHAFI, AZRA; AHMED, FAIZAN; HUSAIN, QAYYUM. β-Galactosidase mediated synthesized nanosupport for the immobilization of same enzyme: Its stability and application in the hydrolysis of lactose. ***International Journal of Biological Macromolecules***, v. 184, p. 57-67, 2021. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.034

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. ***Chemical Society Reviews***, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013. https://doi.org/10.1039/C3CS60075K

THANGARAJ, BASKAR; SOLOMON, PRAVIN RAJ. Immobilization of lipases–a review. Part I: enzyme immobilization. ***ChemBioEng Reviews***, v. 6, n. 5, p. 157-166, 2019. https://doi.org/10.1002/cben.201900016

VAZQUEZ-ORTEGA, P. G., ALCARAZ-FRUCTUOSO, M. T., ROJAS-CONTRERAS, J. A., LÓPEZ-MIRANDA, J., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R.. Stabilization of dimeric β-glucosidase from Aspergillus niger via glutaraldehyde immobilization under different conditions. ***Enzyme and microbial technology***, v.110, p.38-45, 2018. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.12.007

WOLF, MARIANE; TAMBOURGI, ELIAS BASILE; PAULINO, ALEXANDRE TADEU. Stability of β-D-galactosidase immobilized in polysaccharide-based hydrogels. Colloids and Surfaces A: ***Physicochemical and Engineering Aspects***, v. 609, p. 125679, 2021. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125679

YADAV, A., PANDEY, SK, AGRAWAL, DC, MISHRA, H., SRIVASTAVA, A., & KAYASTHA, AM. Nanotubos de carbono nanocompósito 3D de dissulfeto de molibdênio como novos nanoscaffolds para imobilizar Lens culinaris β-galactosidase (Lsbgal): estabilidade robusta, reutilização e bioconversão efetiva de lactose em soro de leite. ***Química de alimentos*** , v.297 , p.125005, 2019. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125005