



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE SUBMETIDA A
DIFERENTES PROCESSOS: PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E ALTAS PRESSÕES**

Anna Rafaela Cavalcante Braga

Profa. Dra. Susana Juliano Kalil
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2012

ANNA RAFAELA CAVALCANTE BRAGA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE SUBMETIDA A
DIFERENTES PROCESSOS: PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E ALTAS PRESSÕES**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, na área de Bioprocessos em Alimentos, pela Universidade Federal do Rio Grande.

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil
ORIENTADORA

RIO GRANDE, RS

2012

Às mulheres que me inspiram diariamente: Vilma Cavalcante e Susana Kalil

Dedico

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram indispensáveis para o desenvolvimento desse trabalho, no entanto, meu amado marido Ítalo Braga foi e é mais que essencial não só para o desenvolvimento desse trabalho, mas pro meu crescimento pessoal. Está presente em todas as minhas conquistas e tem parcela grande de participação em tudo que me deixa feliz, te amo muito. Agradeço imensamente a minha filha Thaís, razão maior do meu viver e por quem eu quero ser uma pessoa melhor diariamente, tu é a luz da minha vida.

À minha mãe por ter me proporcionado tantos ensinamentos e ser responsável pela minha essência e criação, te amo muito.

À minha amiga, orientadora, Susana Kalil, nem caberia no papel o quanto tenho a te agradecer, a pessoa mais sábia que eu conheço, obrigada por me deixar absorver um pouquinho do teu conhecimento.

À minha querida Ana Sanzo, por ser um pouco minha mãe nesses anos de jornada em Rio Grande.

À Helen Treichel, que tanto me ajudou e que se tornou uma amiga mais que especial, fico muito feliz de ter te conhecido e por ter aprendido tanta coisa legal contigo.

À Joana, minha amiga, companheira, uma pessoa ímpar, com um coração puro e gargalhada gostosa, você deixou tudo bem mais leve pra mim... muito obrigada.

Ao meu amigo Ailton Lemes, por me ensinar a arte de sorrir do nada... fico feliz por conviver contigo.

À Luisa Sala, minha eterna IC que se tornou uma grande amiga durante esse tempo de pós-graduação, espero que essa amizade seja para o resto de nossas vidas.

À Micheli e ao Gilberto, meus amigos, meus irmãos, vocês foram e são minha família e sei que posso contar com vocês pro que der e vier e por isso sou muito agradecida mesmo, amo vocês.

Ao Rafa e à Fê pelos infinitos momentos de alegria e diversão, agradeço pela convivência e pela amizade.

Ao meu pai preto Ricardo, aos meus avós, aos meus tios, tias, primos, ao meu pai e minhas irmãs, enfim toda minha imensa família pelo carinho e amor incondicional, eu sinto muito a falta de vocês.

Aos meus irmãos Ramon e Juninho, pelo simples fato de vocês existirem.

Aos meus queridos do LMB: Deborah, Juliana Biscoito, Felipe, Elida, Sibebe, Marina, Bibiana, Alexandre, Fabrício, Ju Gettens, Gabi, Felipe Younan, Daiane, Manu, Gabriel por me aguentarem e me ajudarem sempre que precisei.

Agradeço às minhas queridas IC's, sem vocês eu estaria perdida em meio a tantas atividades enzimáticas (Djuly, Suelen, Vanessa, Janaína, Cecília, Jéssica, Karla e Kamila). Ao meu povo de Erechim, que acrescentaram muito à minha vida, não só profissionalmente, mas também pessoalmente (Vladimir, Debora, Marco, Silvana, Diane, Vini...) em especial às amigas que ganhei durante essa jornada Marceli e Simone.

Aos meus alunos e amigos em Santo Antônio da Patrulha, vocês fizeram parte de uma etapa importantíssima de aprendizado na minha vida.

Aos membros da banca Profa. Dra. Débora de Oliveira, Profa. Dra. Helen Treichel, Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong, Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon, Profa. Dra. Christiane Saraiva Ogradowski, Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert pelas contribuições com o trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos. À Fapergs e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos meus professores, amigos e à FURG, agradeço por todas as oportunidades, pela torcida de muitos pelo meu sucesso e por todos os momentos que juntos me formam a doutora que passarei a ser.

Finalmente aos meus cachorrinhos, Sunny e Penny, que recarregam minhas baterias, são meus antidepressivos naturais e fontes diárias de alegrias.

*"Eu sou de uma terra que o povo padece
Mas não esmorece e procura vencer.
Da terra querida, que a linda cabocla
De riso na boca zomba no sofrê
Não nego meu sangue, não nego meu nome.
Olho para a fome, pergunto: que há?
Eu sou brasileiro, filho do Nordeste,
Sou cabra da Peste, sou do Ceará."*

RESUMO

A aplicação de diferentes processos para maximizar o uso industrial dos bioprodutos tem sido alvo de diferentes grupos de pesquisa. A enzima β -galactosidase, em particular, tem uma grande importância, pois tem um enorme potencial de aplicação em vários campos, como alimentos, biorremediação, biossensores, diagnóstico e tratamento de doenças. O presente estudo engloba o uso de processos de purificação, imobilização e aplicação de altas pressões em β -galactosidase obtida a partir de *Kluyveromyces marxianus* e suas influências nas propriedades enzimáticas. A enzima foi obtida por cultivo submerso, em meio previamente otimizado. Inicialmente, realizou-se o estudo de condições de purificação de β -galactosidase usando cromatografia de troca iônica em única etapa cromatográfica, variando os parâmetros da eluição: pH, modo de eluição, volumes de leito, sal para eluição da enzima. Treze ensaios foram realizados e o melhor resultado apresentou um fator de purificação de 8,2 vezes e uma recuperação de 95,1%, no qual o KCl se mostrou uma alternativa interessante como sal de eluição. Considerando esses resultados, foi realizada a caracterização enzimática e a verificação da produção de galacto-oligosacarídeos (GOS) pela enzima em diferentes graus de purificação. Os resultados mostraram a importância do processo de purificação, considerando a aplicação dessas enzimas. As enzimas purificadas mostraram uma maior temperatura ótima, bem como menores valores de K_m , e, portanto, maior afinidade pelo substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) que os extratos enzimáticos brutos para ambas as cepas. A produção de GOS também foi maior quando a síntese foi realizada com as enzimas purificadas, apresentando um aumento de mais de 30%. A imobilização da enzima e o uso de altas pressões também foram estudados. Durante o estudo da imobilização foi primeiramente realizada uma seleção de suportes e técnicas de imobilização para β -galactosidase. O suporte Eupergit® C se mostrou como mais promissor. Portanto, foi realizado um planejamento experimental para incrementar sua eficiência de imobilização. O melhor resultado obtido alcançou eficiência de imobilização de 15,6%, aproximadamente 5 vezes melhor do que o resultado obtido nos estudos iniciais. Ainda foram realizadas cinéticas de ligação para avaliar a capacidade de ligação enzima/suporte, que levou a um aumento na eficiência de imobilização (22%). Na melhor condição a enzima pode ser reutilizada por 3 ciclos de hidrólise sem perder sua atividade. Finalmente, o efeito do uso de fluidos pressurizados CO₂, propano, *n*-butano e gás liquefeito de petróleo (GLP), na atividade e estabilidade da enzima β -galactosidase foi avaliado. O *n*-butano pressurizado foi o fluido que mais aumentou a atividade residual da enzima. Em termos de estabilidade de armazenamento, a enzima tratada por *n*-butano se manteve com a mesma atividade após 120 dias sob refrigeração, o que não foi observado nas enzimas tratadas com os outros fluidos estudados. Avaliando a caracterização da enzima, também se pôde observar um aumento na estabilidade térmica, através dos valores de meia-vida ($t_{1/2}$) e a constante de desnaturação térmica (K_d), da enzima após a pressurização. Os processos aplicados, no geral, melhoram as propriedades da enzima em estudo demonstrando a importância da aplicação dos mesmos para ampliação do uso industrial de β -galactosidase.

Palavras-chave: β -galactosidase, caracterização enzimática, cromatografia de troca iônica, Eupergit® C e fluidos pressurizados.

ABSTRACT

The different process to maximize the use of industrial bioproducts has been the subject of various research groups. The enzyme β -galactosidase, in particular, presents great importance as it has a huge application potential in various fields such as food, bioremediation, biosensors, diagnosis and treatment of diseases. This study involves the use of purification processes, immobilization and application of high pressure in β -galactosidase obtained from *Kluyveromyces marxianus* and their influence on the enzymatic properties. The enzyme was obtained by submerged cultivation in medium previously optimized. Initially, the study of conditions for β -galactosidase purification using ion exchange chromatography in a single chromatographic step varying the elution parameters: pH, elution mode, bed volumes, salt for elution of the enzyme. Thirteen trials were performed and the best result showed a purification factor of 8.2 times and a recovery of 95.1%, in which the KCl was showed as an interesting alternative to be the elution salt. Considering these results, we performed enzymatic characterization and verification of production of galacto-oligosaccharides (GOS) by the enzyme at different degrees of purification. The results showed the purification process importance, considering the enzyme application. The purified enzyme showed an optimal temperature higher as well as lower K_m values, and therefore greater affinity for the substrate *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) that crude enzyme extract for both strains. The production of GOS was also higher when synthesis was performed with the purified enzyme, an increase of over 30%. The immobilized enzyme and the use of high pressure were also studied. During the study of immobilization first was performed a selection of supports and immobilization techniques for β -galactosidase. Eupergit® C proved to be the most promising support. Therefore, an experimental design was carried out to increase its efficiency of immobilization. The best result achieved immobilization efficiency of 15.6%, approximately five times better than the result obtained in the initial studies. Binding kinetics was performed to evaluate the binding ability of the enzyme/support, leading to an increase of the efficiency of immobilization (22%). In the best condition the enzyme could be reused by 3 cycles of hydrolysis without losing its activity. Finally, the effect of using pressurized fluids CO₂, propane, *n*-butane and liquefied petroleum gas (LPG), the activity and stability of the enzyme β -galactosidase was evaluated. The *n*-butane was pressurized fluid that increased residual activity of the enzyme. In terms of storage stability, the enzyme treated with *n*-butane maintained the same activity after 120 days under refrigeration, which was not observed in the other treated with the enzymes studied fluids. Evaluating the characterization of the enzyme was also able to observe an increase in thermal stability over the half-life values ($t_{1/2}$) and thermal denaturation constant (K_d) of the enzyme after pressurization. The procedures applied in general, improve the properties of the enzyme under study demonstrating the importance of applying them to expansion of industrial use of β -galactosidase.

Key-words: β -galactosidase, enzyme characterization, ion exchange chromatography, Eupergit® C and pressurized fluids.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
CAPÍTULO I	15
INTRODUÇÃO GERAL	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
CAPÍTULO II	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. Enzima β -galactosidase.....	21
3.2. Produção de β -galactosidase	22
3.3. Purificação de bioprodutos	23
3.3.1. Precipitação com sulfato de amônio.....	24
3.3.3. Purificação de β -galactosidase.....	27
3.4. Imobilização enzimática	29
3.4.1. Imobilização de β -galactosidase	34
3.5. Aplicação de fluidos pressurizados	35
3.6. Caracterização enzimática.....	37
3.7. Considerações Finais	40
CAPÍTULO III	41
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	41
ARTIGO 1: PURIFICAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE EM UMA ÚNICA ETAPA: INFLUÊNCIA DE SAIS E OUTROS PARÂMETROS DE ELUIÇÃO ..	42
Micro-organismo	44
Preparo do inóculo.....	45
Cultivo submerso	45
Extração da enzima	45
Parâmetros para purificação de β -galactosidase.....	45
Fator de purificação e recuperação de β -galactosidase	46
Determinação de biomassa	46
Determinação da atividade enzimática	46
Determinação da proteína.....	46
ARTIGO 2: PROPRIEDADES CINÉTICAS E TÉRMICAS DE β -GALACTOSIDASE BRUTA E PURIFICADA COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS	57
Micro-organismo	60
Preparo do Inóculo.....	60
Cultivo submerso	60
Extração da enzima	60
Purificação da enzima β -galactosidase.....	61
Efeito do pH na atividade de β -galactosidase.....	61
Efeito da temperatura na atividade de β -galactosidase	61
Cinética da desnaturação térmica e determinação da energia de desnaturação	61

Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	62
Determinação de K_m	63
Determinação da atividade enzimática	63
Hidrólise da lactose e capacidade de produção de galacto-oligossacarídeos	63
ARTIGO 3: IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE PARCIALMENTE PURIFICADA.....	77
Micro-organismo	79
Preparo do Inóculo.....	79
Produção da enzima β -galactosidase	79
Extração da Enzima	79
Purificação da enzima β -galactosidase por precipitação com sulfato de amônio	80
Imobilização da enzima.....	80
Imobilização com alginato de cálcio	80
Imobilização com alginato de sódio, carvão ativado e gluteraldeído	80
Imobilização em Accurel.....	81
Imobilização com Montmorilonita natural.....	81
Imobilização com Eupergit® C	81
Maximização da imobilização utilizando Eupergit® C como suporte	81
Determinação de cinéticas de ligação enzima/suporte	82
Caracterização da enzima imobilizada em Eupergit® C.....	83
Determinação do pH ótimo	83
Determinação da temperatura ótima.....	83
Cinética da desnaturação térmica e determinação da energia de desnaturação	83
Determinação do parâmetro cinético K_m	84
Determinação da biomassa	84
Determinação da atividade enzimática	84
Determinação das proteínas	84
Reuso da enzima	85
ARTIGO 4: EFEITO DE ALTAS PRESSÕES NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE	102
Micro-organismo	105
Preparo do Inóculo.....	105
Produção da enzima β -galactosidase	105
Extração da Enzima	105
Purificação da enzima β -galactosidase por precipitação com sulfato de amônio	106
Tratamento da enzima a alta pressão.....	106
Caracterização da enzima	107
Determinação do pH ótimo	107
Determinação da temperatura ótima.....	107
Cinética da desnaturação térmica e determinação da energia de desnaturação	107
Determinação de K_m	108
Determinação da biomassa	108
Determinação da atividade enzimática	109
CAPÍTULO IV	118

CONCLUSÕES GERAIS.....	118
4. CONCLUSÕES GERAIS	119
5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	120
CAPÍTULO V	121
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Métodos de imobilização de enzimas.....	32
---	----

ARTIGO 1

Figura 1. Histograma da purificação de β -galactosidase usando NaCl como sal de eluição: degrau (0,1 M) combinado com gradiente linear (0,1-1 M) como modo de eluição, 30 vezes o volume de coluna (94 mL), velocidade de 40 cm.h ⁻¹ , pH de lavagem e eluição de 6,5.....	49
Figura 2. Histograma da purificação de β -galactosidase usando KCl como sal de eluição: degrau (0,1 M) combinado com gradiente linear (0,1-1 M) como modo de eluição, 30 vezes o volume de leito (94 mL), velocidade de 40 cm.h ⁻¹ , pH de lavagem e eluição de 6,5.....	50
Figura 3. Histograma da purificação de β -galactosidase usando (NH ₄) ₂ SO ₄ como sal de eluição: degrau (0,1 M) combinado com gradiente linear (0,1-1 M) como modo de eluição, 30 vezes o volume de coluna (94 mL), velocidade de 40 cm.h ⁻¹ , pH de lavagem e eluição de 6,5.....	51

ARTIGO 2

Figura 1. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de <i>K. marxianus</i> ATCC 16045 bruta.....	69
Figura 2. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de <i>K. marxianus</i> ATCC 16045 purificada por precipitação com sulfato de amônio.....	69
Figura 3. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de <i>K. marxianus</i> ATCC 16045 purificada por cromatografia de troca iônica.....	70
Figura 4. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de <i>K. marxianus</i> CCT 7082 bruta.....	70
Figura 5. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de <i>K. marxianus</i> CCT 7082 purificada por precipitação com sulfato de amônio.....	71
Figura 6. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de <i>K. marxianus</i> CCT 7082 purificada por cromatografia de troca iônica.....	71

ARTIGO 3

Figura 1. Superfície de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função da concentração do tampão e da quantidade de suporte.	88
Figura 2. Superfície de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função do pH e da quantidade de suporte.....	88
Figura 3. Superfície de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função do tempo de reação e da quantidade de suporte.....	89
Figura 4. Superfície de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função do pH e da concentração do tampão.	89
Figura 5. Superfície de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função do tempo de reação e do pH.	90
Figura 6. Superfície de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função do tempo de reação e da concentração do tampão.	90
Figura 7. Cinética de ligação da β -galactosidase no suporte Eupergit® C em pH 7,5 e temperatura de 10 °C e tampão com diferentes molaridades.....	92
Figura 8. Reuso da enzima β -galactosidase imobilizada em Eupergit® C em reações de hidrólise da lactose.....	94

ARTIGO 4

Figura 1. Diagrama esquemático do aparato para o tratamento da enzima com fluidos pressurizados: (A) reservatório do solvente; (B) banho termostático; (C) bomba de	
---	--

injeção; (D) reator de tratamento; (E) transdutor de pressão; (F) indicador de pressão e (G) válvula micrométrica.	106
Figura 2. Estabilidade enzimática após o tratamento a altas pressões	113

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1. Resultados dos diferentes processos de purificação de *Erro!* **Indicador não definido.**
- Tabela 2. Reprodutibilidade do processo de purificação de β -galactosidase 51

ARTIGO 2

- Tabela 1. Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica da enzima β -galactosidase bruta e purificada de *K. marxianus* ATCC16045 e CCT 7082 65
- Tabela 2. Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da desnaturação térmica do extrato bruto e purificado da β -galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082 e ATCC 16045 de 30-55 °C..... 68

ARTIGO 3

- Tabela 1. Resultados preliminares da imobilização da β -galactosidase utilizando diferente técnicas e suportes 85
- Tabela 2. Matriz do Planejamento 2^4 para imobilização de β -galactosidase com valores reais e codificados utilizando Eupergit® C como suporte 86
- Tabela 3. Efeitos principais das variáveis sobre a eficiência de imobilização enzimática..... 86
- Tabela 4. Análise de variância do planejamento experimental completo 2^4 87
- Tabela 5. Eficiência de imobilização da condição ótima do planejamento..... 91
- Tabela 6. Resultados obtidos nos ensaios cinéticos do suporte Eupergit® C com concentrações de tampão de 1,5; 2,0 e 2,5 M..... 93
- Tabela 8. Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica da enzima β -galactosidase imobilizada 95

ARTIGO 4

- Tabela 1. Efeito de diferentes fluidos pressurizados na atividade da enzima β -galactosidase 110
- Tabela 2. Matriz do planejamento completo (valores reais e codificados) com a resposta em termos de atividade de β -galactosidase submetida à GLP pressurizado..... 110
- Tabela 3. Efeitos das variáveis de processo na atividade de β -galactosidase submetida à GLP pressurizado 110
- Tabela 4. Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica da enzima β -galactosidase liofilizada de *K. marxianus* CCT 7082 tratada e não tratada com *n*-butano 112

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das modernas técnicas biotecnológicas nos últimos anos nos permite prever um crescimento do mercado de enzimas industriais. As enzimas são catalisadores biológicos extremamente atrativos, tanto por sua especificidade como pela superioridade catalítica em relação a catalisadores químicos. Apesar das excelentes perspectivas que as enzimas apresentam sua aplicação industrial não é imediata porque, apesar das vantagens mencionadas, as enzimas apresentam outras características que, embora desejáveis para a operação da máquina celular, limitam a sua utilização em escala industrial (EIJSSINK et al., 2005).

As principais dificuldades se devem, primeiro, à solubilidade destas no meio de reação, que inviabiliza economicamente sua separação dos produtos, uma vez que a enzima está presente em baixas concentrações no meio, dada a sua potente ação como catalisador. O segundo problema diz respeito à instabilidade operacional das enzimas. Como consequência dessas barreiras, somente algumas enzimas vêm sendo aplicadas como catalisadores em processos industriais. Esta escassez de processos enzimáticos em escala industrial é o resultado da ausência de estudos integrais que apontem soluções aos problemas existentes quando se propõe a consecução de reações enzimáticas (ASRAF & GUNASEKARAN, 2010).

A enzima β -galactosidase, em particular, é importante, pois tem um potencial de aplicação em vários campos, como alimentos (SANTIAGO et al., 2004; SANTOS et al., 2009), biorremediação (JOCHEMS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011), biossensores (SEZGINTURK & DINÇKAYA, 2008), diagnóstico e tratamento de doenças (FERRAZ et al., 2004; FERRAZ et al., 2007). É uma enzima hidrolítica com capacidade de ação como transferase para grupos galactosil, atuando no resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar seus monossacarídeos glicose e galactose. Entre os micro-organismos, as leveduras têm sido utilizadas como fonte de β -galactosidase, uma vez que a enzima por elas produzida apresentam um pH ótimo adequado para hidrólise de lactose de leite e soro de leite (AKTAS et al., 2006; BANSAL et al., 2008; BRAGA et al., 2012).

O sítio ativo da β -galactosidase possui habilidade tanto para hidrolisar a lactose quanto para transgalactosilar a galactose e por isso vem sendo utilizada para a produção de galacto-oligossacarídeos (GOS). Estes são oligossacarídeos não digeríveis utilizados como ingrediente em alimentos, por apresentarem efeito prebiótico. A reação enzimática de produção de GOS é denominada transgalactosilação e é realizada a partir de substratos ricos em lactose (MARTINS & BURKERT, 2009).

Os processos envolvendo a aplicação dessa enzima incluem sua produção (ALVES et al., 2010; BRAGA et al., 2012; MANERA et al., 2008), recuperação e purificação (LEMES,

2011; MEDEIROS et al., 2012), imobilização (ALVES, 2008; CAMPELLO et al., 2012), aplicação de fluidos pressurizados (MANERA et al., 2011), nano-encapsulamento (PAN et al., 2009), dentre outros. Esses processos modificam as propriedades e características da enzima, sendo fundamental a avaliação da influência dos mesmos antes da aplicação deles.

Para efetuar um estudo integral que aponte soluções aos problemas existentes, especificamente para a enzima β -galactosidase, é essencial a avaliação de diferentes processos isolados e/ou combinados aplicados a essa enzima. A abordagem de processos de purificação, imobilização e aplicação de altas pressões para β -galactosidase, bem como sua caracterização pode indicar direções para a aplicação industrial eficiente e em larga escala dessa enzima.

Em termos de purificação, existe, de modo geral, uma grande necessidade de estudar técnicas eficientes e inovadoras que possibilitem a ampliação de escala e que sejam aplicáveis ao extrato enzimático obtido a partir de processos fermentativos. Além disso, é importante a obtenção de altos fatores de purificação e rendimento para viabilizar o uso industrial da enzima purificada. Das técnicas para purificação de proteínas, em particular enzimas, algumas tem se destacado ao longo dos anos, como a precipitação e posterior diálise (HEIDTMANN et al., 2012; KANWAR et al., 2002), cromatografia de troca iônica (MEDEIROS et al., 2012; SILVEIRA et al., 2008), sistema aquoso bifásico (LEMES, 2011), dentre outras.

Combinado às técnicas de purificação, estudos envolvendo a imobilização das enzimas devem ser realizados a fim de atender a necessidade por processos enzimáticos integrados em escala industrial. A imobilização de enzimas é etapa importante em bioprocessos, pois permite superar as desvantagens da solubilidade no meio reacional e da instabilidade operacional no uso industrial das mesmas, tornando-as catalisadores ideais para a produção e transformação de compostos, seja na indústria alimentícia, de química fina ou farmacêutica (HERNAIZ & CROUT, 2000). Adicionalmente, pode-se viabilizar o uso contínuo, bem como a reutilização do suporte, ao utilizarmos uma técnica eficiente de imobilização.

Nos últimos anos, os fluidos pressurizados começaram a ser estudados como meio potencial para a catálise enzimática (ANDRADE et al., 2008; CENI et al., 2010; KUHN et al., 2011; KUHN et al., 2010; MANERA et al., 2012). O uso de solventes não aquosos para reações enzimáticas são atrativos por várias razões. Uma enzima em um solvente não aquoso pode possuir interações solvente/enzima similares àquelas de seu meio nativo e, então, mostrar atividade maior quando comparada a água pura. Os substratos podem, também, ser mais solúveis em um solvente não aquoso, fazendo com que as taxas de reação sejam maiores neste tipo de solvente. Quando alguns destes solventes orgânicos

(CO₂, butano, propano) são pressurizados, têm-se outras vantagens no emprego em reações enzimáticas, tais como: o fato da termoestabilidade de biomoléculas em fluidos pressurizados ser maior que na água além da possibilidade de reciclagem do solvente (BENDER et al., 2010; CENI et al., 2010). Além do estudo realizado por Manera et al. (2011) onde os autores avaliaram a aplicação de altas pressões na célula permeabilizada de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando célula permeabilizada, não há relatos sobre atividade enzimática e estabilidade da enzima β -galactosidase quando submetida a altas pressões hidrostáticas e, portanto, o comportamento dessa enzima frente à fluidos pressurizados precisa ser explorado para que se promova o emprego e difusão desse tipo de processo para larga escala.

Com base no acima exposto, e considerando a carência de um estudo aprofundando, envolvendo diversas etapas e processos para otimização da aplicação e uso escalonado da enzima β -galactosidase, desenvolveu-se o presente trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter e avaliar a influência de diferentes processos nas propriedades da enzima β -galactosidase através da caracterização da mesma.

2.2 Objetivos específicos

Purificar a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando cromatografia de troca iônica em leito fixo avaliando seus principais parâmetros;

Determinar as propriedades cinéticas e termodinâmicas da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082, comparando a enzima do extrato bruto e purificado, bem como verificar a produção de galacto-oligossacarídeos das mesmas;

Avaliar diferentes métodos e suportes de imobilização, bem como caracterizar a enzima β -galactosidase parcialmente purificada de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 após sua imobilização utilizando o método mais promissor;

Avaliar o efeito do tratamento da enzima β -galactosidase com altas pressões em diferentes fluidos pressurizados, bem como verificar sua estabilidade de armazenamento e termoestabilidade.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma breve revisão da literatura referente à diferentes processos aplicados em bioprodutos, no que concerne a sua produção, purificação, imobilização, aplicação de altas pressões técnicas e caracterização. Uma atenção particular é dada à enzima β -galactosidase tendo com isso por objetivo fundamentar a pesquisa para o uso de diferentes processos que visam maximizar a aplicação e o escalonamento industrial desta enzima.

3.1. Enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase (β -D-galactosideo galactohidrolase, EC 3.2.1.23) é classificada como uma hidrolase, com capacidade de transferase para grupos galactosil, atuando no resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1-4Glc) para formar glicose e galactose. A β -galactosidase pode ser obtida por uma ampla variedade de fontes, como micro-organismos, plantas e animais, e de acordo com sua fonte, suas propriedades diferem notadamente (GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985).

O substrato natural para estas enzimas mais comumente encontrado é a lactose, principal açúcar do leite e de vários produtos lácteos. A lactose é um dissacarídeo com poder adoçante e solubilidade relativamente baixa. Um grande número de pessoas não digere apropriadamente esse carboidrato, devido à falta ou não funcionamento da β -galactosidase intestinal, essa grande parcela da população sofre com disfunções intestinais – gases, dores abdominais e diarreia – se suas dietas contiverem lactose (LADERO et al., 2000).

A degradabilidade desse açúcar é bem menor quando o mesmo é comparado aos seus produtos de hidrólise, glicose e galactose. Quando a lactose é indesejada, a hidrólise da mesma é um processo promissor na indústria de alimentos para o desenvolvimento de novos produtos sem lactose na sua composição. A hidrólise do mesmo pode evitar a textura arenosa devido aos cristais de lactose sendo uma estratégia interessante para redução de custos em edulcorantes para a indústria de laticínios (JURADO et al., 2002).

A hidrólise enzimática da lactose pode ser aplicada no soro ou no leite sem tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as propriedades sensoriais e nutricionais, além de aumentar sua doçura. Portanto, a hidrólise enzimática é mais interessante para a indústria de alimentos quando comparada à hidrólise ácida (LADERO et al., 2006).

Além de realizar a hidrólise da lactose, a enzima β -galactosidase pode catalisar reações de transgalactosilação com formação de galacto-oligossacarídeos (GOS) que são considerados ingredientes prebióticos em alimentos e têm demonstrado a promoção do

crescimento e estabelecimento de bifidobactérias no intestino e consequente manifestação dos efeitos benéficos no organismo humano (HSU et al., 2007a).

O interesse econômico na β -galactosidase produzida por leveduras é oriundo das possibilidades do seu emprego, em produtos direcionados para intolerantes à lactose. Tal deficiência afeta grande parte da população mundial, como é o caso, por exemplo, de populações negras da África Central, EUA e Brasil (MARTINS et al., 2002).

3.2. Produção de β -galactosidase

Diversos autores vêm desenvolvendo pesquisas para que se possam determinar as melhores condições, tanto do ponto de vista econômico como ambiental, para produção de bioprodutos. Para tanto, observa-se um maior interesse nas variáveis: pH, fonte energética, concentração iônica, temperatura, e condições de cultivo (AKTAS et al., 2006; BOERIS et al., 2012; BRAGA et al., 2012; HSU et al., 2007c; JURADO et al., 2004; NOR et al., 2001).

Rech et al. (1999) determinaram as condições ideais de crescimento para as leveduras *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 e *K. marxianus* CBS 6556, empregando soro de leite como substrato para a produção de β -galactosidase. O pH e temperaturas ideais de crescimento foram 5,5 e 35-37 °C, para ambos os microrganismos. O meio de cultura ideal foi o soro de leite in natura (7% p/v) para a cepa CBS 6556 e soro de leite suplementado com extrato de levedura (1% p/v) para a cepa 712. As duas cepas apresentaram um pico de atividade nas 10 h de fermentação, a atividade obtida foi 4 e 5 U.mL⁻¹, respectivamente. Por utilizar um meio de cultura mais simples e de baixo custo, a levedura *K. marxianus* CBS 6556 foi submetida para testes de otimização do processo com soro de leite concentrado (21% p/v), resultando em 10 U.mL⁻¹ em 15 h de fermentação.

Rajoka et al. (2004) verificaram a produção β -galactosidase na presença de lactose, galactose, celobiose, xilose, arabinose, sacarose e glicose em frascos agitados utilizando a levedura *K. marxianus* NIBGE Y-1. O tipo de substrato e a temperatura foram às variáveis que influenciaram diretamente no crescimento específico e na produção da enzima. Lactose (2% p/v) apresentou maior rendimento na produtividade específica, seguida por galactose, sacarose, celobiose, xilose, arabinose e glicose. As temperaturas testadas estavam na faixa entre 22-45 °C, os valores máximos para a produtividade foram 35 °C para temperatura e 5,5 para pH.

Hsu et al. (2005) estudaram a produção de β -galactosidase em fermentador, por microrganismos do gênero *Bifidocacterium longum* CCRC 15708, organismo probiótico, além das condições de cultura que afetam a produção dessa enzima. Os resultados do estudo mostraram que a produção de β -galactosidase por *Bifidocacterium longum* CCRC

15708 tem alta atividade específica. Após a otimização da composição do meio de cultura e condições de crescimento foi verificada uma atividade máxima de 18,6 U.mL⁻¹.

Hsu et al. (2007c) verificaram as condições de crescimento e produção de β -galactosidase por *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 em fermentador de 5 L verificando a influência da temperatura de cultivo (27-42 °C), pH do meio (4,5-7,5) e velocidade de agitação (5-200 rpm). A atividade máxima de β -galactosidase foi de cerca de 10 U.mL⁻¹. obtida sob a temperatura de 37 °C, pH de 6,5 e sob 100 rpm de velocidade de agitação.

Manera et al. (2008) selecionaram a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 como a melhor produtora da enzima β -galactosidase, posteriormente os autores otimizaram o meio de cultura para a produção desta enzima atingindo uma atividade enzimática máxima de 10,6 U.mL⁻¹. A partir desse estudo Alves et al.(2010) maximizaram a produção de β -galactosidase em fermentador utilizando também a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.

Braga et al. (2012) otimizaram um meio de cultura utilizando co-produtos industriais na produção da enzima β -galactosidase *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, atingindo 10,4 U.mL⁻¹.

Todos esses dados apresentados na literatura demonstram um grande interesse na obtenção desse bioproduto para aplicação industrial, portanto, é extremamente importante avaliar a aplicação dos processos posteriores a sua produção pra ampliar e otimizar o escalonamento da β -galactosidase.

3.3. Purificação de bioprodutos

O interesse crescente pelos processos de purificação de biomoléculas deve-se principalmente ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza. A indústria de alimentos também apresentou aumento no uso de biomoléculas, como enzimas e proteínas, principalmente em cervejarias e em outros processos de fermentação. A purificação de determinada biomolécula envolve uma série de etapas convenientemente ordenadas, visando à obtenção do máximo de rendimento e pureza, além de custos compatíveis com os de mercado (ZUNIGA et al., 2003).

Muitas das enzimas obtidas a partir de distintos tipos de organismos podem ter um uso comercial, para o qual devem ser separadas das células em que são produzidas e posteriormente purificadas (ZUNIGA et al., 2003).

A maioria das enzimas são proteínas, portanto os métodos para purificá-las estão baseados nas propriedades destas, sendo que as características mais empregadas para separação de uma enzima em uma mistura são: solubilidade, densidade e distribuição de

carga, grau de hidratação, tamanho, forma, grupo reativo específico e estabilidade relativa (ADHIKARI et al., 2010).

Todas as etapas de extração e purificação de enzimas precisam ser monitoradas em termos de atividade enzimática e teor de proteína. Assim, além de métodos envolvendo proteínas e suas propriedades, outros grupamentos químicos podem ser analisados quanto à sua ocorrência, dependendo da reação que a enzima catalisa. Em geral, a estimativa da atividade enzimática se faz acompanhada da quantificação do teor de substrato consumido, ou da quantidade de produto formado após um tempo de atuação do preparado em condições fixas do meio, tais como pH, temperatura e força iônica (ALCÂNTARA et al., 2006).

Dado as variadas características das biomoléculas, não existe um processo de purificação que tenha aplicação geral. Estes devem ser selecionados de modo a promoverem melhor fator de purificação do bioproduto de interesse. Dentre as diversas técnicas, as mais empregadas no processo de purificação de proteínas são a precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, ultrafiltração e sistema aquoso bifásico (AGUILAR et al., 2006).

3.3.1. Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação ocorre quando uma substância, previamente solúvel, se torna insolúvel. Esse fenômeno é ocasionado devido a mudanças crucial em um parâmetro químico ou físico do ambiente. Como a recuperação de um precipitado requer apenas separação sólido-líquido (filtração, centrifugação), a precipitação intencional de uma classe de substâncias de interesse tem sido uma ferramenta poderosa na biosseparação (HILBRIG & FREITAG, 2003).

A precipitação de proteínas pode ser realizada pelo uso de solventes, sais orgânicos ou polímeros. O mecanismo de precipitação de proteínas com sais decorre de um aumento da força iônica do sistema. Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas à solução contendo proteínas, ocorre uma interação destas com as cargas provenientes da dissociação do sal e conseqüente diminuição da interação inter-proteínas, aumentando a solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, verifica-se um efeito oposto. As moléculas de água interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo desta forma, a desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação inter-proteínas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso e, conseqüentemente, a ocorrência de precipitação. Esse processo é também conhecido por "*salting-out*" (HILBRIG & FREITAG, 2003).

A precipitação de proteínas pelo gradativo aumento da concentração de sais é um processo muito importante para a separação de misturas complexas dessas biomoléculas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína. O sulfato de amônio tem sido o sal mais comumente utilizado nos ensaios de precipitação de proteínas por conta de algumas de suas características como: alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade. Sabe-se que proteínas são bem preservadas em soluções de sulfato de amônio e tem-se reportado que em 80% dos procedimentos de purificação proteica utiliza-se pelo menos uma técnica de precipitação (ITO & QI, 2010).

Esse método ainda tem como vantagens sua simplicidade, rapidez e facilidade de uso mesmo quando se tem grandes volumes a serem processados. Além disso, apresenta baixo custo mesmo em alta pureza, baixa toxicidade e previne o crescimento de bactérias na solução, também reduz o volume do material utilizado, o que é normalmente um ponto importante a ser considerado (KANWAR et al., 2002).

3.3.2. Cromatografia de troca iônica

Diferentes formatos de processos cromatográficos estão disponíveis para purificação de proteínas, incluindo: troca iônica, afinidade, interação hidrofóbica e exclusão por tamanho, que são geralmente operados em uma coluna de leito fixo. A cromatografia de troca iônica é o método de purificação de proteínas mais comumente empregado, onde a separação ocorre de acordo com a carga das biomoléculas. Além disso, é utilizado com muita efetividade pelas indústrias de bioquímica fina e farmacêutica para o escalonamento dos processos de isolamento de proteínas (ZUNIGA et al., 2003).

A cromatografia de troca iônica baseia-se na distribuição dos componentes a serem separados em uma fase estacionária, ou ligante, e uma fase móvel que conduz esse componente pela fase estacionária. Em sua forma mais simples a fase estacionária consiste em um leito empacotado dentro de uma coluna. A mistura de componentes entra na coluna cromatográfica junto com a fase móvel e cada componente individual é fixado pelo sistema a diferentes taxas dependendo da sua interação com a fase estacionária e vazão da fase móvel (GROSH & CUI, 2000).

Essa técnica cromatográfica é comum em comparação com outros métodos de purificação e apresenta as seguintes características: fácil ampliação de escala, alta resolução, alta capacidade de adsorção e versatilidade. Tem ainda diversas aplicações analíticas e preparativas, tanto em pesquisas quanto em indústrias (ZUNIGA et al., 2003).

A separação por cromatografia de troca iônica é um processo de purificação robusto. Ela é desenvolvida através da escolha de diferentes resinas e parâmetros que visam selecionar aquelas mais apropriadas para uma investigação detalhada do comportamento de retenção

e de dependência das variáveis do processo. Incluem tamanho de partícula, pH, tipo e concentração de sal, solventes, vazão, forma e comprimento do gradiente bem como a temperatura de operação (MORAES, 2006).

Grande variedade de matrizes, grupos funcionais e condições de adsorção/dessorção estão disponíveis para serem empregados na purificação de biomoléculas. A escolha dos fatores envolvidos deve ser feita de acordo com a finalidade a que se destina (ZUNIGA et al., 2003).

A matriz de um trocador é constituída de um material poroso, natural ou sintético, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos trocadores iônicos. As matrizes, quanto ao material que as formam, são classificadas em inorgânicas e orgânicas, sendo naturais ou sintéticas. Por serem, em geral, mais eficientes são amplamente utilizadas como matrizes, resinas orgânicas altamente polimerizadas, com ligações cruzadas. Dependendo do grupo trocador ligado covalentemente à matriz, os trocadores são classificados em aniônicos e catiônicos. Os trocadores aniônicos, como o próprio nome indica, trocam ânions e apresentam, portanto, grupos iônicos positivos ligados à matriz. Os trocadores catiônicos, inversamente, trocam cátions e apresentam grupos iônicos negativos ligados à matriz (COLLINS et al., 2006).

De modo geral, pode-se dizer que o suporte ideal para cromatografia de troca iônica deve possuir características como: insolubilidade a fase móvel, ter um mínimo de interação não específica, permitindo a imobilização por covalência do ligante e formação do complexo com a molécula, permeabilidade a macromoléculas biológicas (matrizes porosas facilitam a formação do complexo quando a afinidade molécula-ligante é fraca), alta superfície específica (aumento do produto complexado), reatividade química para imobilização do ligante (mínimo de grupos ativos para a fixação do ligante), estabilidade química na imobilização, adsorção, lavagem, eluição e regeneração (para uso repetitivo do adsorvente), resistência a ataque microbiológico e enzimático, além de alta hidrofiliabilidade (AHAMED et al., 2008).

Os tipos de grupos ligados à matriz classificam os trocadores iônicos em fortes, médios e fracos. Os trocadores iônicos fortes são aqueles completamente ionizados em amplas faixas de pH. Os trocadores iônicos fracos e médios são aqueles em que o grau de dissociação é influenciado pelo pH, portanto, a capacidade destes trocadores varia em função desse parâmetro (AZEVEDO et al., 2009).

Esta técnica pode ser desenvolvida, aplicada e utilizada em nível laboratorial e ampliada à escala industrial, principalmente em setores como as indústrias alimentícias e farmacêuticas que requerem um alto grau de pureza destes componentes utilizados tanto no

processamento como na composição de alimentos, medicamentos e setor de análises clínicas.

3.3.3. Purificação de β -galactosidase

A enzima β -galactosidase tem sido largamente estudada em diversos aspectos, no entanto, observa-se uma escassez de dados em relação à purificação dessa enzima quando comparamos os dados levantados sobre a produção da enzima e síntese de galactooligosacarídeos da mesma. Dickson et al. (1979), purificaram por cromatografia de afinidade, e caracterizaram β -galactosidase de uma cepa de *Kluyveromyces lactis*. Os autores obtiveram fator de purificação de 80 vezes e um rendimento global de 27%.

Silva e Franco (1999) desenvolveram um novo método de extração e purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*. Em sistema aquoso bifásico, ativaram quimicamente PEG 4000, com cloreto de tresila, e acoplaram o ligante biospecífico p-aminofenil- β -D-tiogalactopiranosídeo (AGPG) ao PEG 4000 ativado. Num sistema 6 % PEG-AGPG e 8% dextrana os autores obtiveram um coeficiente de partição de 2.330 na fase de topo com 50% de recuperação da enzima.

A purificação e caracterização de β -galactosidase de *Aspergillus aculeatus* foi estudada por Van Casteren et al. (2000). A purificação envolveu a dessalinização em Bio-Gel P-10 (Bio-Rad Laboratories) seguida por separação em DEAE Sepharose Fast Flow[®], MonoS HR 5:5 e Superdex 200 HR 10:30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala). A purificação total da enzima foi de aproximadamente 15 vezes com rendimento total de 15%.

Enéas-Filho et al. (2001) isolaram e purificaram parcialmente a enzima β -galactosidase de cotilédones de dois cultivares de feijão de corda. O processo de purificação consistiu de fracionamento com sulfato de amônio, precipitação ácida, seguida pela associação de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex com cromatografia de afinidade em coluna de Lactosyl-Sepharose. Com a combinação dessas técnicas o fator de purificação variou de 3,4 a 54 vezes.

Fernandes et al. (2002) reportaram a purificação, caracterização e avaliação preliminar de β -galactosidase da bactéria *Pseudoalteromonas* sp., isolada em uma amostra de água do mar da Antártica. A enzima foi purificada com altos rendimentos (62%) por um esquema rápido de purificação envolvendo extração em sistema aquoso bifásico, seguido por cromatografia de interação hidrofóbica e ultrafiltração.

A purificação e caracterização de uma β -galactosidase recombinante com atividade de transgalactosilação de *Bifidobacterium infantis* HL96 foi avaliada por Hung & Lee (2002). O extrato celular foi precipitado com sulfato de amônio (20-50%), seguido de cromatografia aniônica em coluna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia). As frações com atividade enzimática foram

aplicadas a uma coluna Superose-12 HR 10/30 (Pharmacia). A recuperação total do processo foi de 46% com um fator de purificação de 15,5 vezes.

Cho et al. (2003) purificaram uma β -galactosidase com capacidade de produção de galacto-oligosacarídeos da levedura *Bullera singularis* KCTC 7534. A enzima foi precipitada com sulfato de amônio (40-60%) e purificada através de cromatografia de troca iônica (DEAE FF) seguida por outra etapa cromatográfica em coluna (Hiprep 16/10) de quaternário de amônio (Q) Fast Flow (FF). A enzima purificada teve uma recuperação total de 16% com 96 vezes de fator de purificação.

Alcântara et al. (2006) estudaram e purificaram β -galactosidase de cotilédones de *Hymenaea courbaril* através da precipitação com sulfato de amônia em 60% de saturação, seguida de cromatografia de troca iônica, utilizando uma resina aniônica DEAE. Em seguida purificaram o mesmo extrato em uma coluna de permeação em gel obtendo um aumento de 6,4 vezes na atividade específica e 40% de recuperação.

Grunenvaldt et al.(2006) verificaram que a melhor porcentagem de saturação para obter uma maior purificação da enzima β -galactosidase a partir de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 é a saturação com sulfato de amônio em 70% e uma relação volume de ressuspensão/volume inicial de 0,6.

Nakkharat & Haltrich (2006) utilizaram duas etapas cromatográficas (cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade) para purificar a enzima BGL1 com atividade β -glicosidase e β -galactosidase de um fungo termófilo *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. Os autores obtiveram uma recuperação global de 37,8% com um fator de purificação de 10,2 vezes.

Li e et al. (2009) purificaram e caracterizaram a enzima β -galactosidase de *Bacillus megaterium* 2-37-41 com atividade de transgalactosilação. Nesse estudo os autores purificaram a enzima através da precipitação com sulfato de amônio (20-60%) seguido de duas etapas cromatográficas (cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade) e obtiveram como resultados uma recuperação de 7,1% e um fator de purificação global de 10,2 vezes.

Silva (2009) purificou a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistema aquoso bifásico e separação por membranas. Na purificação por SAB utilizando polietileno glicol 8000 e tampão fosfato de potássio obteve um fator de purificação de 10,1 vezes e recuperação de 175,2%. Já na ultrafiltração, a membrana que apresentou melhores resultados foi a de 50 KDa, permitindo uma recuperação de 63,3% e fator de concentração de 7,6 vezes, constatando que a mudança de pH e força iônica da solução enzimática não melhoraram a separação.

Lemes (2011) avaliou a purificação de β -galactosidase estabelecendo o “*design*” do processo. Nesse estudo as condições otimizadas para a purificação e recuperação da enzima utilizando sistema aquoso bifásico, foram obtidas com o sistema composto por uma concentração de 14% de polietilenoglicol de massa molar 4000 e 15% de tampão fosfato de potássio em pH 7,0, com valores de fator de purificação e recuperação de 3,8 vezes e 101,7%, respectivamente. A utilização da técnica de ultrafiltração possibilitou a concentração do extrato enzimático em até 8,1 vezes, indicando sua viabilidade para redução do volume inicial nas etapas de purificação. A UF apresentou grande potencial, pois atingiu elevados valores de recuperação da enzima, em torno de 112,7%. O “*design*” que apresentou o melhor fator de purificação global foi a sequência formada pelo sistema aquoso bifásico, diafiltração, cromatografia de troca iônica e diafiltração/ultrafiltração, com um fator de purificação global de 10,8 vezes e uma recuperação global de 41,3%.

Medeiros et al. (2012) estudaram a adsorção e purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica utilizando resina aniônica Q Sepharose Fast Flow, obtendo fatores de purificação de 12 vezes e rendimento de 85,5% com pH de eluição de 5,5 e volume para gradiente salino igual a vinte vezes o volume do leito.

Apesar de sua importância, a literatura apresenta poucos dados sobre a recuperação e purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*. Isso evidencia a necessidade de estudos que investiguem os aspectos relacionados à purificação dessa enzima a fim de obter informações mais aprofundadas que otimizem sua utilização em escala industrial.

3.4. Imobilização enzimática

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, pode ser interessante a proteção das enzimas da interação com o meio de reação, pois o mesmo pode, em alguns casos, provocar sua inativação. Frente a este problema, a imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (VILLENEUVE et al., 2000).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo na imobilização. Esse processo pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, no entanto, não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (ALPTEKIN et al., 2010).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A aplicação dos métodos de imobilização das enzimas depende de fatores essenciais do processo, como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo uma condição adequada para atender às necessidades da reação. O principal fator é selecionar um suporte adequado, o que é definido como uma parte não-catalítica da imobilização de enzimas, na qual a parte catalítica é ligada. Assim, o método escolhido deve atender às duas necessidades, a catalítica, expressa em eficiência, produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a processos de controle e separação (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A imobilização pode afetar a estabilidade, o pH, a temperatura ótima, as constantes cinéticas e a velocidade máxima de reação da enzima. As enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens em relação às enzimas solúveis. Entre elas, pode-se citar a capacidade de reutilização da enzima, maior facilidade de separação do produto final, diminuindo as etapas posteriores. Permite também a operação contínua, facilita o controle da reação, reduz o volume desta e possibilita uma alta concentração catalítica no reator. A reação pode ser interrompida no momento desejado pela simples remoção da enzima, em processos de batelada, ou pelo ajuste do tempo de residência, em reatores contínuos. O processo de imobilização ainda permite a modificação favorável das propriedades catalíticas de algumas enzimas, as quais passam a apresentar maior estabilidade frente às variações de pH e temperatura (DE ASSIS et al., 2004).

Sabe-se que não existem técnicas universais ou totalmente eficientes de imobilização, mas sim uma gama de possibilidades e aplicações. A partir da literatura pode-se perceber que os métodos de imobilização apresentam o propósito de reter altas concentrações de enzimas (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000).

Tão importante quanto o método de imobilização é a escolha do suporte. Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como as relativas à possibilidade de regeneração do material. O processo de imobilização e o uso repetido e contínuo do derivado, algumas vezes, requerem o uso de operações como filtração, centrifugação e agitação, portanto, o suporte deve ter boa resistência mecânica. Outra característica importante é a estabilidade térmica do suporte, pois dependendo do seu coeficiente de expansão, pode sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima sob expansão ou contração, quando submetido a variações de temperatura (DE ASSIS et al., 2004).

O suporte deve ser quimicamente resistente nas condições de ativação, durante o processo de imobilização e nas condições em que se processa a reação, deve possuir grupos químicos que podem ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação da enzima sem desnaturá-la. A natureza hidrofílica do suporte também deve ser levada em conta, pois são mais desejáveis suportes com características hidrofílicas de modo a se obter uma boa difusividade do substrato, além de permitir a estabilização da enzima. Os suportes de natureza hidrofóbica costumam diminuir a estabilidade e a atividade da enzima imobilizada por um mecanismo semelhante à desnaturação das enzimas em solventes orgânicos (ALAGOZ et al., 2010).

A Figura 1 resume os principais métodos de imobilização de enzimas. Na retenção em gel as enzimas são incluídas em cavidades interiores ou em malhas de um polímero sintético ou polissacarídeo, formando uma estrutura suficientemente rígida para prevenir perda da enzima e ainda permitir o livre movimento do substrato no interior do gel. O entrelaçamento pode ser efetuado adicionando o biocatalisador a um polímero, submetendo esta mistura a cátions polivalentes em uma reação de troca iônica, formando uma malha polimérica com o biocatalisador no interior dos espaços vazios. Como exemplos: géis de colágeno, ágar, alginato e fibras (SOBRAL et al., 2003).

Alguns polímeros gelificam por geleificação iônica, geleificação térmica ou por uma combinação desses dois mecanismos. A preparação de esferas ou cápsulas através da geleificação iônica envolve a geleificação de uma solução polimérica aquosa com um íon de baixa massa molar, onde polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo. Mediante essa técnica, o material de recheio é extrusado como gota gelificada dentro de uma solução. Entre os hidrocolóides utilizados encontram-se pectinas de baixo teor de esterificação, carragena e alginato de cálcio, todos requerendo um íon para a reticulação da matriz. A principal vantagem do gel de alginato é sua habilidade de ser termoestável, podendo ser armazenado à temperatura ambiente (HAIDER & HUSAIN, 2007).

O alginato pode ser considerado como da família dos copolímeros que apresenta dois monômeros, α -L-ácido-galurônico (G) e β -D-ácido manurônico (M). É extraído de algas marrons como *Laminaria digitata* e *Macrocystis pyrifera*. É um polissacarídeo altamente degradável quando aquecido por tempo prolongado. Sua viscosidade aumenta a pH abaixo de 4,0 e, também, pela presença de íons cátion, como os quais pode formar géis (LEE & HEO, 2000).

O entrelaçamento em alginato de cálcio é um método rápido, atóxico, de fácil reprodutibilidade e de baixo custo. Na presença de cátions monovalentes o alginato forma sais em água, mas na presença de cátions polivalentes como Ca^{++} , Ba^{++} , Sr^{++} é formado um

polímero inerte através de reação de troca iônica, formando uma malha polimérica com o biocatalisador no interior dos espaços vazios, propriedade esta usada para a inclusão de enzimas na matriz do alginato (FREITAS et al., 2011).

Outro método de imobilização importante é o encapsulamento. Neste método as enzimas são rodeadas e separadas do meio de reação através de membranas, sendo permeáveis apenas ao substrato e ao produto. Este método consiste na preparação de um sistema emulsionado, onde a enzima fica aprisionada no interior de micelas ou ainda através de uma membrana fibrosa semipermeável. Problemas relacionados com difusão são maiores neste processo, podendo até ocorrer ruptura da membrana se houver acúmulo de produto. Como exemplo: nylon, sílica e nitrato de celulose (KLEIN et al., 2009).

A adsorção é um método simples que envolve interações químicas fracas entre a enzima e a superfície do suporte. Neste caso, as forças envolvidas geralmente são eletrostáticas, como força de Van der Waals e pontes de hidrogênio. Apesar de essas ligações serem fracas, são suficientes em número para garantir razoáveis ligações. Como vantagens deste método têm-se: a simplicidade, o baixo custo e a rapidez; como desvantagens, a possibilidade de perda do biocatalisador em função da dessorção da enzima como resultado de ligações do substrato, contaminantes ou produtos de reação com o suporte. Como exemplo: carvão ativado, hidróxido de alumínio (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Além desses suportes, as resinas poliméricas como Accurel EP 100, constituídas por polipropileno, e materiais contendo grupos hidrófobos de ligações como octil-agarose são exemplos de suportes que vêm se destacando (SANJAY & SUGUNAN, 2005).

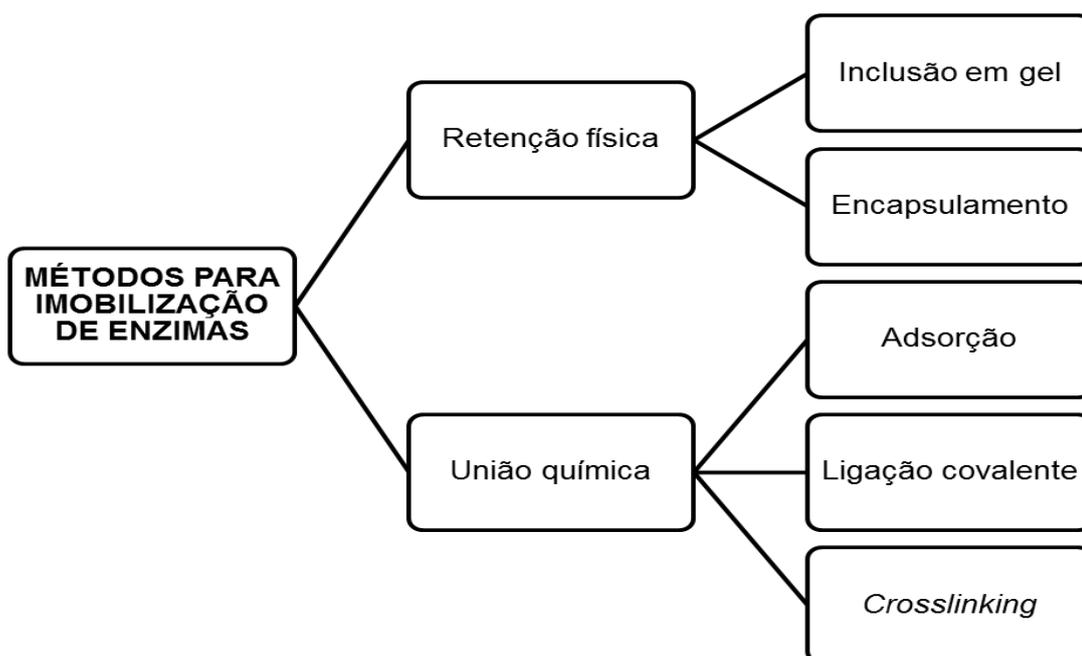


Figura 1. Métodos de imobilização de enzimas - Adaptado de Panesar et al. (2010).

A argila montmorilonita também tem se destacado como suporte para imobilização de enzimas. O uso de argilas como suportes para imobilização consiste na presença de grupos silanol que, após ativação por diferentes grupos funcionais, atuam como sítios de ligação para espécies bioativas. Além disso, as argilas possuem a possibilidade de serem sintetizadas, podendo, dessa forma, fornecer uma série reprodutível de materiais inorgânicos sólidos cujas propriedades físicas e/ou químicas podem ser alteradas de forma sistemática para identificar o suporte inorgânico mais adequado para uma determinada aplicação como suporte biocatalítico (SANJAY & SUGUNAN, 2005).

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros. O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

A ligação covalente envolve a formação de uma ligação entre a enzima e o suporte, sendo mais estáveis que as citadas nas técnicas de adsorção. As ligações são normalmente formadas entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e grupos pertencentes aos resíduos de aminoácidos da superfície da enzima. Inicialmente os grupos funcionais do suporte são ativados por algum reagente e posteriormente procede-se com a adição da enzima para promover a ligação covalente (KLEIN *et al.*, 2009). Dentre os materiais utilizados como suporte destacam-se celulose, dextrana, amido, agarose, zircônio e nióbio.

Um suporte que tem se destacado para a imobilização de enzimas é o Eupergit C[®], que é um polímero acrílico esférico (partículas com 150 µm de diâmetro) contendo grupos epóxi como componentes reativos (0,8 µM de grupos epóxi por g de peso seco). Estes grupos funcionam como componentes ativos para a ligação covalente de ligantes contendo grupos amino, mercapto, ou hidroxila. A ligação covalente de um ligante não introduz qualquer alteração de carga elétrica no interior da matriz ou do ligante, ou seja, nenhuma carga elétrica é perdida ou gerada sobre a ligação, que está acomodando moléculas de proteína e permite a imobilização de enzimas com elevado rendimento. No entanto, a conversão de grupos amino primário da proteína em grupo amino secundário irá alterar a ionização em determinados valores de pH (ALAGOZ *et al.*, 2010; KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000).

Devido à sua estrutura, Eupergit[®] C é estável química e mecanicamente, ao longo de um intervalo de pH de 0 a 14, e não se estende ou encolhe até mesmo sobre mudanças

drásticas de pH. Esse suporte também apresenta excelente estabilidade mecânica, uma vez que não apresentou nenhum desgaste após 650 ciclos de operação em reatores de mistura com volumes de substrato de até 1000 L (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000). É altamente compatível com reatores, não exige equipamentos especiais, podendo ser utilizado em reator agitado, tanque ou de leito fixo. Esse suporte se liga às proteínas via os grupos oxiranos que reagem em pHs neutros e alcalinos com grupos amino das moléculas proteicas. Também pode se ligar às enzimas via grupos sulfidrila e via grupos carboxila em faixas ácidas e neutras de pH. Portanto, Eupergit® C pode se ligar covalentemente a enzimas na faixa de pH de estabilidade da mesma para evitar perdas de sua atividade. Devido à elevada densidade de grupos oxirano na superfície do Eupergit® C, as enzimas são imobilizadas em vários locais da sua estrutura. Este fenômeno é considerado um fator importante para o funcionamento e alta estabilidade de enzimas ligadas a Eupergit® C (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000).

Apesar de existirem diversos protocolos de imobilização, o desenvolvimento de novos protocolos que melhorem as propriedades enzimáticas durante a imobilização ainda é um excelente objetivo (BARON, 2008).

3.4.1. Imobilização de β -galactosidase

Muitos estudos têm reportado a imobilização da enzima β -galactosidase, e muitas respostas ainda não foram alcançadas, portanto, a avaliação de diferentes métodos e suportes faz-se necessária para avançarmos na aplicação industrial dessa enzima.

Giacomini et al. (1998) imobilizaram a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em dois suportes diferentes, agarose e sílica. Dos dois suportes avaliados a sílica reteve maior quantidade de enzima que agarose. Os resultados mostraram que 100% da solução enzimática se ligou, no entanto, apenas 34% apresentando atividade, indicando uma desnaturação durante a imobilização.

Tanriseven & Dogan (2002) utilizaram gluteraldeído como agente “crosslinking” na imobilização da β -galactosidase em alginato e gelatina, e obtiveram um rendimento de 56%.

Alves (2008) utilizou o processo de imobilização em alginato de cálcio para a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* apresentando um rendimento de aproximadamente 70 %.

A otimização da imobilização da enzima β -galactosidase de *Pisum sativum* (semente de ervilha) foi estudada utilizando dois suportes, Sephadex G-75 e quitosana, a eficiência de imobilização alcançada foi de 75,7% e 75,2%, respectivamente (DWEVEDI & KAYASTHA, 2009a).

Jochems et al. (2011) imobilizaram a enzima β -galactosidase por adsorção sobre uma membrana de matriz mista contendo dióxido de zircônio e a máxima β -galactosidase adsorvida nestas membranas foi de 1,6 g/m².

Freitas et al. (2011) imobilizaram a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e gluteraldeído, tendo obtido uma eficiência de imobilização de 30%.

Ansari e Husain (2012) avaliaram a imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em concanavalina A Celite 545 como suporte de bioafinidade, os autores obtiveram rendimento da atividade enzimática de 71% de ligações cruzadas.

Torres e Batista-Vieira (2012) imobilizaram a enzima β -galactosidase de *Bacillus circulans* utilizando suportes acrílicos epóxi-ativados avaliando a influência das condições de imobilização sobre o rendimento do processo. As condições ideais para imobilização atingiram rendimento de imobilização de 100% e os rendimentos de atividade da enzima de 83%.

A β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* foi alvo de um estudo avaliando a imobilização da mesma em Eupergit® C. Através de um planejamento experimental, os autores atingiram rendimento de imobilização de 85% (CAMPELLO et al., 2012).

A literatura apresenta diversos estudos sobre a imobilização da enzima β -galactosidase. No entanto, a maioria utilizando enzimas comerciais e não produzidas por leveduras, recuperadas e purificadas. Isso evidencia a necessidade de estudos nessa direção bem como envolvendo sua utilização industrial.

3.5. Aplicação de fluidos pressurizados

O uso de fluidos pressurizados como meio de reação tem sido intensamente estudado devido às propriedades favoráveis destes fluidos, que podem acelerar a transferência de massa das reações, facilitar a separação e a recuperação de produtos e/ou reagentes (KNEZ & HABULIN, 2002).

Por conta dessas características favoráveis, os fluidos pressurizados obtiveram atenção como meio potencial para a catálise enzimática, sendo a partir de então intensificados os estudos com esse fim. O uso de solventes não aquosos para reações enzimáticas são atrativos por várias razões. Uma enzima em um solvente não aquoso pode possuir interações solvente/enzima, similares àsquelas de seu meio nativo e, então, mostrar atividade maior quando comparada ao uso de água pura como meio de reação. Os substratos podem, também, ser mais solúveis em um solvente não aquoso, fazendo com que as taxas de reação sejam maiores neste tipo de solvente. Quando alguns destes solventes orgânicos são pressurizados, têm-se outras vantagens no emprego em reações enzimáticas. Como

exemplo a termoestabilidade de biomoléculas em fluidos pressurizados é maior que na água e existe a possibilidade de reciclagem do solvente (MANERA et al., 2012).

Muitas enzimas, quando expostas à alta pressão, têm sua estrutura tridimensional alterada de maneira significativa, levando à desnaturação e consequente perda da atividade enzimática, porém a alta pressão também pode induzir ao aumento da estabilidade e atividade das enzimas (EISENMENGER & REYES-DE-CORCUERA, 2009).

Vários autores têm proposto o mecanismo detalhado do comportamento das enzimas em solventes pressurizados, mas as conclusões têm sido contraditórias. Alguns declaram que as enzimas perdem sua atividade durante a reação por causa da pressurização, outros alegam que o processo de despressurização é o fator relevante na perda de atividade das enzimas (KUHN et al., 2010).

Penniston (1971) observou que em sistemas aquosos, pressões abaixo de 1000 bar não apresentaram efeito significativo na atividade enzimática. Randolph et al. (1985), usando espectroscopia de ressonância magnética a alta pressão, não observaram qualquer mudança significativa na estrutura da colesterol oxidase em misturas de CO₂ – solvente a 35 °C entre 1 e 113 bar. Affleck et al. (1994) mostraram não haver mudança conformacional considerável na subtilisina a 700 bar em *n*-hexano. Em contraste, estudos usando espectroscopia de fluorescência mostraram que a tripsina sofreu uma mudança conformacional em CO₂ supercrítico durante a despressurização. Contudo, nenhum dado de atividade foi reportado para determinar os efeitos de tais mudanças estruturais (Oliveira, 1999).

A hipótese mais aceita com relação à perda de atividade enzimática em meio supercrítico sugere que a taxa de despressurização do fluido supercrítico e o conteúdo de água do solvente tem um efeito direto na taxa de desnaturação e que enzimas que contêm pontes de dissulfeto são menos propensas à desnaturação.

Oliveira et al. (2006a) investigaram a influência da temperatura (35 - 75°C), pressão (10 - 280 bar), tempo de exposição (1 - 6 horas) e a taxa despressurização (2 - 50 bar.min⁻¹ para propano e *n*-butano e 10 - 200 kg/m³.min para dióxido de carbono) na atividade das enzimas lipolíticas Novozym 435 e Lipozyme IM. Os resultados mostraram que a Lipozyme IM apresentou perda de atividade para os três solventes, sendo esta perda maior na presença de dióxido de carbono (0,5 - 13%), seguida pelo propano (1,1 - 8,9%), já para o *n*-butano a enzima teve apenas uma pequena perda de atividade (0,5 - 3,6%). A Novozym 435 apresentou perda da atividade na presença de CO₂ (1,3 - 8,9%), mas teve um ganho de atividade, que variou de 1,7 a 14% e 1,8 a 21,5%, quando submetida ao propano e *n*-butano, respectivamente.

Fricks et al. (2006) estudaram a influência do CO₂ pressurizado sobre a atividade específica da peroxidase (POD) de rabanete (*Raphanus ativus L.*) em que a atividade foi determinada usando guaiacol como substrato e os resultados mostraram que o tratamento do concentrado enzimático com CO₂ a alta pressão pode ser um caminho promissor para o aumento da atividade de POD.

Andrade et al. (2008) avaliaram a influência do tratamento com CO₂ e propano pressurizado sobre a atividade específica de D-hidantoinase parcialmente purificada de feijão adzuki (*Vigna angularis*). O tratamento do extrato enzimático em CO₂ e propano pressurizados mostrou boa estabilidade desta enzima nos dois solventes.

Ceni et al. (2010) apresentaram a produção de transesterificação enzimática de 1-gliceril benzoato com *n*-butano pressurizado, utilizando uma lipase comercial imobilizada os resultados mostraram que a estratégia adotada para a concepção experimental mostrou-se útil para a otimização da reação de conversão em *n*-butano pressurizado.

A influência do tratamento de fluidos pressurizado sobre a atividade enzimática da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada em montmorilonita natural foi avaliada (KUNH et al., 2011) e em geral, os resultados mostraram que as alterações de atividade da enzima de forma significativa, dependendo das condições experimentais investigados, permitindo a seleção de condições de operação adequadas para aplicação vantajosa deste biocatalisador em reações de hidrólise.

Na literatura observada, somente o trabalho desenvolvido por Manera et al. (2011) envolvia a enzima β -galactosidase, onde os autores avaliaram o efeito de fluidos supercríticos (CO₂, propano e *n*-butano) na estabilidade, atividade de β -galactosidase em células permeabilizadas de *K. marxianus*. Os autores observaram que a atividade e a biocatálise da enzima tratada foi sempre maior que da enzima não tratada. Seus resultados indicaram também que o *n*-butano foi o fluido que mais favoreceu a atividade enzimática bem como a formação de GOS. Mostrando, portanto, que o tratamento com *n*-butano é promissor e pode ser de interesse industrial (MANERA et al., 2011).

3.6. Caracterização enzimática

Estudos de desnaturação térmica ajudam a entender a relação entre estrutura e função de uma enzima em particular. O objetivo das tecnologias enzimáticas é estudar a capacidade da enzima de adaptar características para atender exigências do processo nas suas condições. A desnaturação enzimática tem um papel significativo nos processos biotecnológicos. As enzimas são desnaturadas de diversas maneiras para um estado inativado, sendo esta a principal restrição em muitos bioprocessos. A desnaturação é

definida como um processo onde as estruturas secundária, terciária e quaternária da proteína muda sem a quebra de ligações covalentes (NAIDU & PANDA, 2003).

O estudo da atividade e estabilidade de enzimas é um aspecto importante a ser considerado. Com estes dados podem-se fornecer informações da estrutura da enzima e ajudar a aperfeiçoar a viabilidade econômica de processos industriais (YU & LI, 2006). A estabilidade de uma enzima é função de diversos fatores como temperatura, do pH, da força iônica e natureza do substrato, presença ou ausência de substrato, concentração da enzima e outras proteínas no sistema, tempo de incubação (WHITAKER, 1994).

Temperatura e pH influenciam na velocidade de reação de catálise enzimática. Os sítios ativos das enzimas são frequentemente compostos de grupos ionizáveis que devem estar na forma iônica própria para manter a conformação do sítio ativo, do contrário a enzima é desnaturada. Considerando que frequentemente a enzima é uma proteína, ela tende a perder atividade com tempo sendo que essa perda é maior com o aumento da temperatura (WHITAKER, 1994).

O pH ótimo de uma enzima depende de vários parâmetros experimentais, incluindo tempo de reação, temperatura, natureza e concentração de substrato, natureza e concentração do tampão, força iônica do meio, e pureza da enzima (ORTEGA et al., 2004).

Além desses parâmetros (pH e temperatura ótimos), é importante estudar-se a cinética e termodinâmica de enzimas, através da determinação de: meia-vida, constante de desnaturação térmica, energia de ativação, K_m e $v_{máx}$, dentre outros.

De acordo com Whitaker (1994), a energia de ativação (E_a) para transformação de reagentes em produtos em reações enzimáticas está compreendida entre 6,0 e 15 $Kcal.mol^{-1}$. Segundo Yu & Li (2006), quanto menor a energia de ativação menor será a barreira de energia para catálise.

No estudo de estabilidade da enzima, a meia vida da enzima é definida como sendo o tempo necessário para perder 50% de sua atividade inicial. O valor para a constante cinética de desnaturação térmica (K_d) para cada temperatura, também é importante para avaliação das propriedades das enzimas. O K_d é inversamente proporcional à estabilidade da enzima, ou seja, quanto menor o K_d maior é a estabilidade da enzima. Como K_d é função da temperatura segundo a equação de Arrhenius pode-se determinar a energia de ativação para reação de desnaturação E_d . Segundo Whitaker (1994), os valores de E_d para enzimas estão compreendidas entre 50-150 $kcal.mol^{-1}$.

Além das propriedades acima citadas a determinação dos parâmetros cinéticos podem fornecer informações importantes para utilização industrial de enzimas como afinidade da mesma com o substrato e o perfil de velocidade da reação, para o cálculo de K_m e $V_{máx}$ pode-se utilizar o método gráfico de Lineweaver-Burk. Além dos parâmetros cinéticos

podem-se determinar os parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH , ΔS) para a enzima, com o objetivo de conhecer melhor o comportamento da mesma para sua utilização em processos industriais (NAIDU & PANDA, 2003).

A energia livre de Gibbs (ΔG) de uma enzima é diferente para cada estado: forma nativa e desnaturada, e indica o quanto a conformação inicial ainda está preservada ou ativa. A desnaturação só ocorre quando ΔG assume valor negativo, indicando que o estado atual apresenta menos energia disponível, devido à desnaturação, quando comparado com o estado inicial (ORTEGA et al., 2004).

Com base na teoria da transição do estado, a colisão entre essas moléculas fornece energia suficiente para romper uma barreira. Essa barreira é a energia de ativação para que a reação ocorra, e pode ser determinada através dos valores experimentais das taxas de reação obtidas a diferentes temperaturas (ORTEGA et al., 2004).

A variação de ΔG de um estado para outro prediz a taxa de reação, ou seja, o aumento da concentração de substrato ligado aos sítios ativos da enzima diminui a energia livre do sistema, ou ainda, a desnaturação da enzima diminui a disponibilidade de sítios reativos, portanto a energia livre de Gibbs é composta pela energia de ligação e energia de ativação (NAIDU & PANDA, 2003).

Entalpia é uma forma de energia denominada de função de estado por depender basicamente do estado em que a variável se encontra e não pelo caminho percorrido até o estado atual. Por esse motivo a variação de entalpia de um processo é medida hipoteticamente tomando etapas da reação. Quando a etapa final recebe muito mais energia que o estado inicial, o valor de ΔH será positivo, o que geralmente acontece em processos de desnaturação enzimática (ORTEGA et al., 2004).

A entropia (ΔS) de um sistema aumenta com o aumento da temperatura, indicando que as moléculas estão mais agitadas e que há menos ordem, além de ocorrer a quebra de número considerável de ligações consideradas fracas como pontes de hidrogênio. Os grupos polares vão perdendo a capacidade de ordenar as moléculas de água e a liberdade dos grupos apolares expostos pelo desdobramento da proteína aumenta o sentido da desordem (ORTEGA et al., 2004).

Além a determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos, é comum, quando se trabalha com enzimas utilizadas na indústria alimentícia, expressar sua inativação utilizando os parâmetros D e z (KLIBANOV, 1983). O valor D ou valor de redução decimal (em minutos) é definido como o tempo que a enzima deve ser incubada em uma dada temperatura para que se mantenha 10% de atividade residual. Como a β -galactosidase é utilizada para hidrólise da lactose e a mesma pode ser adicionada a produtos lácteos que podem sofrer tratamento térmico, é conveniente expressar graficamente o logaritmo de D

em função da temperatura. O cálculo de z é a determinação do intervalo de temperatura requerido para que a curva de desnaturação térmica atravesse um ciclo logarítmico (KLIBANOV, 1983).

Samoshina & Samoshin (2004) apresentam uma revisão com 111 artigos publicados entre 1952 e 2004, sobre propriedades enzimáticas e parâmetros cinéticos da β -galactosidase de diversas fontes, destes 67 são sobre enzimas de fungos, 44 sobre enzimas de leveduras e dentre estes apenas 4 são sobre a enzima de *Kluyveromyces marxianus*. Confirmando que os dados são escassos em relação ao estudo das propriedades enzimáticas e parâmetros cinéticos para a enzima β -galactosidase de *K. marxianus*.

Jurado et al. (2004), Manera (2006) e Alves (2008) estudando β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces marxianus*, respectivamente, observaram uma temperatura ótima de 37°C. Brady et al. (1995), caracterizando a β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* quanto à estabilidade térmica, obteve um tempo de meia vida de 7 horas a 30 °C. Manera (2006) obteve uma meia vida de 14,4 h a 35 °C ao caracterizar a β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* quanto à estabilidade térmica.

3.7. Considerações Finais

Tendo em vista a importância da β -galactosidase em vários aspectos como: hidrólise da lactose, produção de galacto-oligossacarídeos, resolução de problemas tecnológicos, dentre outros, é de extrema importância à obtenção do maior número possível de informações sobre essa enzima e a realização de estudos envolvendo suas diversas formas de aplicação.

Ao submetermos a enzima β -galactosidase a diferentes processos, como por exemplo, diferentes técnicas de purificação, imobilização e o tratamento utilizando altas pressões, com o objetivo de melhorar seu desempenho catalítico pode-se observar diferentes efeitos nas mesmas. Esses processos podem ou não melhorar características como termoestabilidade, meia vida, afinidade com o substrato e estabilidade de armazenamento. É de extrema importância, portanto, a investigação desses parâmetros para determinar as melhores condições visando a aplicação industrial da enzima β -galactosidase, com esse intuito o presente trabalho foi desenvolvido.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1: PURIFICAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE EM UMA ÚNICA ETAPA: INFLUÊNCIA DE SAIS E OUTROS PARÂMETROS DE ELUIÇÃO

PURIFICAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE EM UMA ÚNICA ETAPA: INFLUÊNCIA DE SAIS E OUTROS PARÂMETROS DE ELUIÇÃO

Resumo

β -Galactosidase é uma enzima industrialmente importante, utilizada para catalisar a hidrólise da lactose em seus monossacarídeos, galactose e glicose. A purificação dessa enzima pode aumentar sua especificidade e melhorar sua atuação nos produtos lácteos, principalmente destinados a pessoas intolerantes à lactose. Dentre as técnicas de purificação de bioprodutos, em especial proteínas, a cromatografia de troca iônica é uma das principais e vem se destacando nos últimos anos. No presente trabalho foi realizada a purificação da enzima β -galactosidase em uma única etapa cromatográfica, variando alguns parâmetros da eluição: pH, modo de eluição, volumes de eluição, bem como o estudo do sal de eluição mais eficiente para esta enzima. O KCl demonstrou ser uma excelente alternativa como sal de eluição para a β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, corroborando com a importância da variação dos parâmetros de eluição para maximizar a recuperação e purificação de enzimas.

Palavras-chave: cromatografia de troca iônica, KCl, *Kluyveromyces marxianus*, recuperação, fator de purificação.

Introdução

β -Galactosidases são enzimas muito promissoras do ponto de vista industrial, podendo ser utilizadas na hidrólise da lactose no leite e soro de leite para minimizar os problemas de saúde e até ambientais provocados por este açúcar quando o mesmo é descartado pela indústria de laticínios. Além disso, a sua utilização na síntese de galacto-oligossacarídeos é relevante para a saúde humana, proporcionando benefícios nutricionais (GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985).

A obtenção de bioprodutos, como a enzima β -galactosidase, utilizando processos fermentativos requer diversas etapas, dentre elas o estágio de “*downstream*”. Os processos de recuperação e purificação de bioprodutos são complexos e podem representar cerca de 80% dos custos de obtenção do produto (ABRANCHES et al., 2005). Assim, são necessários estudos para reduzir os custos associados a essa etapa do processo para garantir sua viabilidade econômica.

Dentre as técnicas para purificação de proteínas, em particular enzimas, algumas têm se destacado ao longo dos anos, como a precipitação e posterior diálise, cromatografia de troca iônica (CTI), sistema aquoso bifásico, entre outras (KALIL et al., 2005; KANWAR et al., 2002; TANUJA et al., 1997).

A cromatografia de troca iônica é uma das técnicas cromatográficas mais eficientes para a purificação de proteínas em bioprocessos, incluindo 75% dos sistemas de purificação. Pode ser utilizada com muita efetividade para o escalonamento dos processos de isolamento de enzimas, pois é uma técnica versátil, apresenta alta resolução e capacidade de adsorção. Adicionalmente, apresenta custos relativamente baixos, devido à possibilidade de realização de vários ciclos de regeneração das resinas (ANSPACH et al., 1999).

O objetivo do processo de purificação é obter o máximo de recuperação com o menor custo, em outras palavras, um processo “*downstream*” otimizado que proporcione a obtenção de um produto final com a qualidade e grau de purificação requeridos sem grandes perdas no seu rendimento. Para um processo de purificação eficiente com técnicas cromatográficas, diversos parâmetros como a fase móvel, as configurações da coluna, a resina e as variáveis operacionais (pH, alimentação, força iônica) devem ser consideradas (ISHIHARA et al., 2007).

O estudo das condições de adsorção, bem como de eluição, é extremamente importante, considerando que essas variáveis irão determinar a separação da proteína de interesse dos outros contaminantes presentes no extrato enzimático obtido na fermentação. Por exemplo, quando se utiliza eluição em gradiente linear na CTI, o declive do gradiente e a vazão, bem como o comprimento da coluna, influenciam o comportamento de separação de uma forma complexa. Portanto, se o processo não é bem entendido, não será fácil a escolha das condições ideais para obtenção da resolução requerida, um processo com tempo permissível e consumo de tampão desejado.

Diversos estudos (KALIL et al., 2005; LEMES, 2011; MEDEIROS et al., 2012; SILVEIRA et al., 2008) têm utilizado a resina de troca iônica Q Sepharose Fast Flow® para purificar proteínas, em particular a enzima β -galactosidase. Esta resina é composta por partículas de 90 μm altamente reticuladas com 6% de partículas de agarose, apresentando elevada estabilidade química e física. As características excepcionais de escoamento desse trocador de íons o tornam a primeira escolha para a separação de misturas brutas que compõem o extrato obtido da fermentação nos estágios iniciais de um esquema de purificação (SILVEIRA et al., 2008). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de diferentes sais e outros parâmetros de eluição na purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em uma única etapa cromatográfica.

Material e Métodos

Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, selecionado por Manera et al. (2008) como melhor produtor da enzima β -galactosidase.

Preparo do inóculo

O micro-organismo foi cultivado em meio composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (1,0), (NH₄)₂SO₄ (1,2), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (10,0), preparado em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 5,5 (PINHEIRO et al., 2003). As condições de cultivo foram 30 °C, 180 rpm por 24 h (MANERA et al., 2008).

Cultivo submerso

Após o crescimento do inóculo, este foi adicionado ao meio de cultivo em uma relação de 10% (v/v). Os cultivos foram realizados em meio composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (17,0), (NH₄)₂SO₄ (8,8), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (28,2), preparado em tampão fosfato de potássio. O cultivo foi realizado em agitador orbital a 30 °C, 180 rpm por 96 h (MANERA et al., 2008).

Extração da enzima

O extrato enzimático foi distribuído em frascos de 50 mL contendo 25 mL de suspensão celular (40 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato de potássio 50 mM com MnCl₂.4H₂O 0,1 mM, pH 6,6) (MEDEIROS et al., 2012) e 27,5 g de pérolas de vidro (r<0,4 mm), respeitando uma relação 1 mL de suspensão celular e 1,1 g de pérolas de vidro (MEDEIROS et al., 2008). A suspensão foi agitada por 40 min em agitador tipo vórtex com intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo, obtendo-se o extrato bruto com células. Para obtenção do extrato bruto clarificado, a suspensão celular foi centrifugada sob refrigeração (5200 x g) por 10 min a 4 °C e o sobrenadante, livre de células, utilizado nas etapas posteriores.

Parâmetros para purificação de β-galactosidase

A cromatografia de troca iônica foi realizada em coluna C10/20 GE Helthcare contendo resina aniônica (Q Sepharose Fast Flow[®]) previamente equilibrada em tampão fosfato de potássio 25 mM pH 7,5. A coluna foi alimentada com 15 mL de extrato enzimático a uma vazão de 20 cm.h⁻¹, utilizando uma bomba peristáltica.

A cromatografia de troca iônica foi conduzida de acordo com cada ensaio, sendo que os parâmetros avaliados foram: modo de eluição, velocidade de eluição, volume de eluição, sal de eluição, pH de lavagem e pH de eluição para obter-se elevados fatores de purificação, juntamente com altas recuperações. Em todos os ensaios foi utilizado o tampão fosfato de potássio, nas condições específicas de cada ensaio.

Foram realizados um total de 13 ensaios, sendo coletadas frações para leitura da absorvância a 280 nm, determinação da atividade enzimática (U.mL⁻¹) e concentração de proteína (mg.mL⁻¹).

Fator de purificação e recuperação de β -galactosidase

O fator de purificação (FP) e recuperação (RP) foram calculados através da Equação 1 e 2, respectivamente.

$$FP = \frac{\text{Atividade específica de cada fração purificada}}{\text{Atividade específica da enzima bruta}} \quad (1)$$

$$RP = \frac{\text{Atividade da enzima purificada} \times \text{volume purificado}}{\text{Atividade da enzima bruta} \times \text{volume alimentado}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo atividade específica a relação entre a atividade enzimática ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) e a concentração de proteína ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) da enzima presente nas frações.

Determinação de biomassa

A concentração celular foi estimada por leitura da absorvância a 620 nm, e convertida para massa de célula seca através de curva padrão (RECH et al., 1999).

Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato de acordo com Inchaurredo et al., (1994). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *o*-nitrofenol por minuto, a 37 °C e pH 6,6.

Determinação da proteína

A determinação da proteína foi realizada segundo metodologia de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

Resultados e Discussão

A purificação de β -galactosidase por cromatografia de troca iônica foi estudada variando-se os principais parâmetros de eluição e o processo foi avaliado por meio do fator de purificação e da recuperação da enzima. Cada um dos treze ensaios foi realizado sob condições específicas e todos foram realizados com o mesmo extrato enzimático. Diferentes estratégias foram utilizadas para maximizar os resultados obtidos.

Os parâmetros estudados foram responsáveis por uma ampla variação na purificação de β -galactosidase, o fator de purificação variou de 2,3 a 8,2 vezes e a recuperação de 48,4 a 103,9%, demonstrando assim a importância da avaliação da etapa de eluição para maximização do processo.

Tabela 1. Resultados dos diferentes processos de purificação de β -galactosidase usando cromatografia de troca iônica

Ensaio	Modo de eluição	Sal de eluição	Volumes de leite	pH de alimentação	pH de lavagem	pH de eluição	Velocidade (cm.h ⁻¹)	RP	FP
1	Gradiente (0 – 1 M)	NaCl	30	7,5	7,5	5,5	20	51,0	3,3
2	Gradiente (0 – 1 M)	NaCl	30	7,5	7,5	5,5	40	59,5	4,2
3	Gradiente (0 – 1 M)	NaCl	20	7,5	7,5	5,5	40	67,2	4,2
4	Degrau (1 M)	NaCl	20	7,5	7,5	5,5	40	103,9	3,2
5	Degrau (2 M)	NaCl	20	7,5	7,5	5,5	40	83,0	3,3
6	Gradiente (0 – 1 M)	NaCl	20	7,5	5,5	5,5	40	70,8	6,8
7	Gradiente (0 – 1 M)	NaCl	20	7,0	5,5	5,5	40	70,0	3,4
8	Gradiente (0 – 1 M)	NaCl	20	7,5	5,0	5,0	40	48,4	2,3
9	Degrau (0,1 M)+ gradiente (0,1-1 M)	NaCl	20	7,5	5,5	5,5	40	71,3	6,5
10	Degrau (0,1 M)+ gradiente (0,1-1 M)	NaCl	20	7,5	6,5	6,5	40	71,1	7,5
11	Degrau (0,1 M)+ gradiente (0,1-1 M)	NaCl	30	7,5	6,5	6,5	40	75	7,5
12	Degrau (0,1 M) + gradiente (0,1-1 M)	KCl	30	7,5	6,5	6,5	40	95,1	8,2
13	Degrau (0,1 M) + gradiente (0,1-1 M)	(NH ₄) ₂ SO ₄	30	7,5	6,5	6,5	40	72,1	3,0

No ensaio 1 (Tabela 1) foi utilizada a melhor condição obtida por Medeiros et al., (2012). Esses autores purificaram a enzima β -galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082 por cromatografia de troca iônica em leito fixo (resina Q Sepharose Fast Flow[®]) utilizando um planejamento experimental completo 2², obtendo uma recuperação de 85,5 % e fator de purificação de 12 vezes. Vale ressaltar que as condições de extração da enzima do presente trabalho foram modificadas em relação ao trabalho de Medeiros et al., (2012) a fim de possibilitar a ampliação de escala do processo. Com a modificação do processo de extração, o perfil de proteínas presentes no extrato enzimático também mudou e, portanto, o resultado de fator de purificação (3,3 vezes) e recuperação (51%) obtidos foram diferentes e inferiores dos obtidos por Medeiros et al., (2012).

Os primeiros ensaios (1, 2 e 3) foram realizados utilizando gradiente linear como modo de eluição e apesar de não apresentarem resultados promissores em relação ao fator de purificação, os mesmos serviram de base para os próximos experimentos. No ensaio 2 aumentou-se a velocidade de eluição visando o incremento do fator de purificação. Considerando o ensaio 3, em que utilizou-se uma eluição mais abrupta pela diminuição dos volumes de leite, se manteve o mesmo fator de purificação do ensaio 2, com o pequeno aumento da recuperação da enzima.

Artolozaga et al. (1998), estudando a purificação da enzima β -galactosidase, observaram que o uso de gradiente linear melhoraram os resultados, mas o uso de degrau é mais simples, sendo uma vantagem para ampliação de escala do processo. Para avaliarmos o modo de eluição degrau foram então realizados os ensaios 4 e 5 (Tabela 1). Utilizou-se altas molaridades de NaCl, isso fez com que houvesse uma máxima recuperação da enzima, no entanto, o fator de purificação não foi expressivo. Isto se deve ao fato de que na eluição degrau a concentração salina não é aumentada gradativamente, assim, uma grande quantidade de proteínas é desorvida junto com a enzima de interesse, diminuindo o grau de pureza da mesma. Por outro lado, como a enzima desorve em uma concentração salina abaixo de 1 M, se obtém altas recuperações neste tipo de eluição.

Um dos objetivos mais importantes na ampliação de escala de processos de concentração e purificação é a obtenção de altos fatores de purificação sem comprometer a recuperação. Com base nisso, como a eluição no modo degrau não proporcionou fatores de purificação satisfatórios, foram realizados novos experimentos usando gradiente linear (ensaios 6, 7 e 8) variando os demais parâmetros do processo, com o objetivo de maximizar o fator de purificação da enzima.

No ensaio 6 diminuiu-se o pH de lavagem de 7,5 para 5,5, o que acarretou em um aumento expressivo no fator de purificação e um pequeno aumento na recuperação em relação ao ensaio 3, onde também foi utilizado gradiente linear como modo de eluição. Assim, pode-se dizer que o pH de 5,5 favoreceu a desorção da enzima. O ensaio 6 foi, portanto, o ensaio com modo de eluição gradiente linear que atingiu o maior fator de purificação. Os parâmetros desse ensaio foram: 20 volumes de coluna, velocidade de 40 cm.h^{-1} , pH de lavagem e de eluição de 5,5, resultando em uma recuperação de 70,7% e fator de purificação de 6,8 vezes. Nagy et al. (2001) produziram, purificaram e caracterizaram a enzima β -galactosidase de *Penicillium chrysogenum*. Os melhores resultados obtidos, considerando a cromatografia de troca iônica, apresentaram uma recuperação de 31% e um aumento de 4 vezes na atividade específica da enzima, portanto, os resultados alcançados no ensaio 6 se mostraram então, superiores.

Ao diminuir o pH de alimentação para 7,0 (ensaio 7) e diminuir o pH de eluição para 5,0 (ensaio 8), não se obteve melhor fator de purificação. Ou seja, o pH 7,5 de alimentação, juntamente com o pH 5,5 de eluição, resultam em uma maior purificação, considerando esses ensaios.

Uma estratégia utilizada anteriormente por Moraes e Kalil (2009) é a combinação do modo degrau ao gradiente linear, com o objetivo de reduzir as proteínas contaminantes mais fracamente adsorvidas através de uma etapa de pré-eluição, utilizando sal com baixa molaridade, seguida de eluição em gradiente linear. Essa estratégia se mostrou promissora visto que os melhores resultados alcançados no presente trabalho foram obtidos com essa

combinação (ensaios 9 a 12). Isso demonstra a importância do estudo da etapa de eluição para a remoção de proteínas indesejáveis, principalmente quando se usa CTI como única etapa de purificação.

De todos os experimentos realizados utilizando NaCl como sal de eluição, as condições que promoveram o maior fator de purificação foram as do experimento 11, que foi realizado com modo de eluição degrau (0,1 M) combinado com gradiente linear (0,1-1 M), volume de coluna de 30 vezes, velocidade de eluição de 40 cm.h⁻¹, pH de lavagem e eluição de 6,5. Sob essas condições, obteve-se uma recuperação de 75,0% e fator de purificação de 7,5 vezes, como apresentado na Figura 1.

Foram testados, também, diferentes sais de eluição, sendo que esses experimentos foram realizados nas mesmas condições do ensaio 11. Além do NaCl, sal de eluição mais comumente utilizados para cromatografia de troca iônica, foram avaliados o KCl e o (NH₄)₂SO₄.

As figuras 1, 2 e 3 apresentam os histogramas da purificação de β-galactosidase e o perfil da atividade recuperada, absorvância a 280 nm e da concentração de sal durante as etapas de adsorção, lavagem e eluição para os ensaios 11, 12 e 13, nas quais os diferentes sais de eluição foram avaliados.

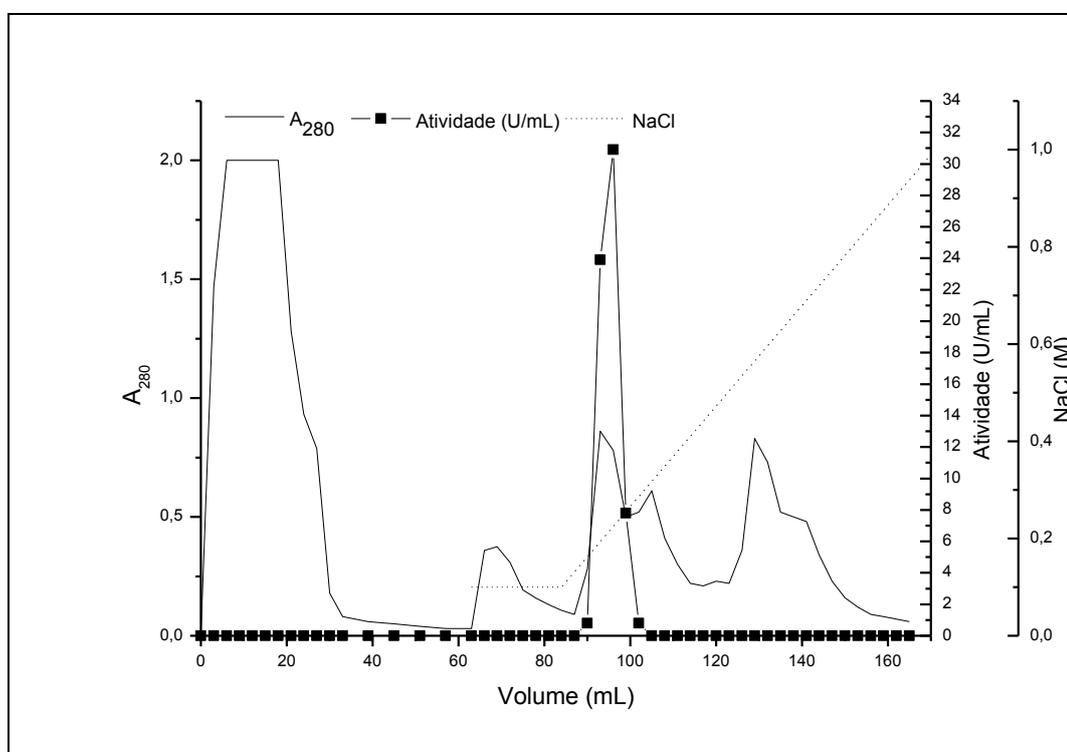


Figura 1. Histograma da purificação de β-galactosidase usando NaCl como sal de eluição: degrau (0,1 M) combinado com gradiente linear (0,1-1 M) como modo de eluição, 30 vezes o volume de coluna (94 mL), velocidade de 40 cm.h⁻¹, pH de lavagem e eluição de 6,5

Dentre os sais de eluição avaliados, o KCl foi o melhor para purificação de β -galactosidase utilizando cromatografia de troca iônica, alcançando uma recuperação de 95,1% e um fator de purificação de 8,2 vezes (Figura 2).

As figuras 1 e 2 apresentam perfis cromatográficos similares. Pode-se observar pelos mesmos que parte das proteínas que não são de interesse foram removidas durante as etapas de lavagem e a pré-eluição. Durante a eluição a enzima β -galactosidase foi desorvida, por ambos os sais de eluição, entre as concentrações de 0,2-0,3 M, juntamente com algumas proteínas contaminantes. Concentrações acima de 0,3 M desorveram as proteínas contaminantes mais fortemente ligadas ao trocador iônico.

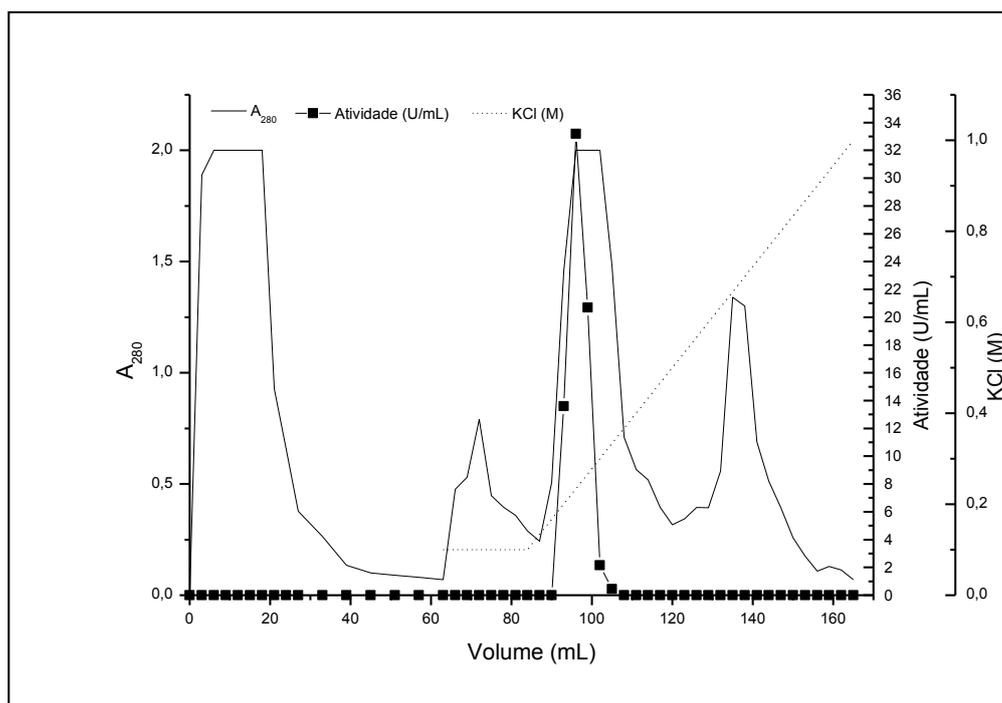


Figura 2. Histograma da purificação de β -galactosidase usando KCl como sal de eluição: de grau (0,1 M) combinado com gradiente linear (0,1-1 M) como modo de eluição, 30 vezes o volume de leite (94 mL), velocidade de 40 cm.h⁻¹, pH de lavagem e eluição de 6,5

Considerando o sulfato de amônio como sal de eluição, nas mesmas condições, obteve-se uma recuperação de 72,1% e um fator de purificação de 3 vezes (Figura 3).

Pode-se perceber que o sulfato de amônio não separou de maneira eficiente a enzima alvo, considerando as condições específicas utilizadas. As maiores atividades obtidas coincidem com o pico de proteínas totais (leitura a 280 nm), impossibilitando a separação da β -galactosidase.

Alguns dados da literatura associam ao KCl um efeito protetor à enzima β -galactosidase. Isto pode ter contribuído para um melhor desempenho na purificação dessa

enzima ao utilizarmos esse sal na eluição, pois o mesmo pode ter evitado uma ocasional desnaturação da enzima quando em contato com o sal (LADERO et al., 2006).

Os sais NaCl e KCl apresentaram um perfil de purificação semelhante (Figura 1 e 2), mas o KCl apresentou um maior fator de purificação e maior recuperação quando comparado ao NaCl.

Para verificarmos a reprodutibilidade do processo de purificação, um novo extrato bruto clarificado foi obtido e o melhor experimento (ensaio 12) foi novamente realizado, em triplicata. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

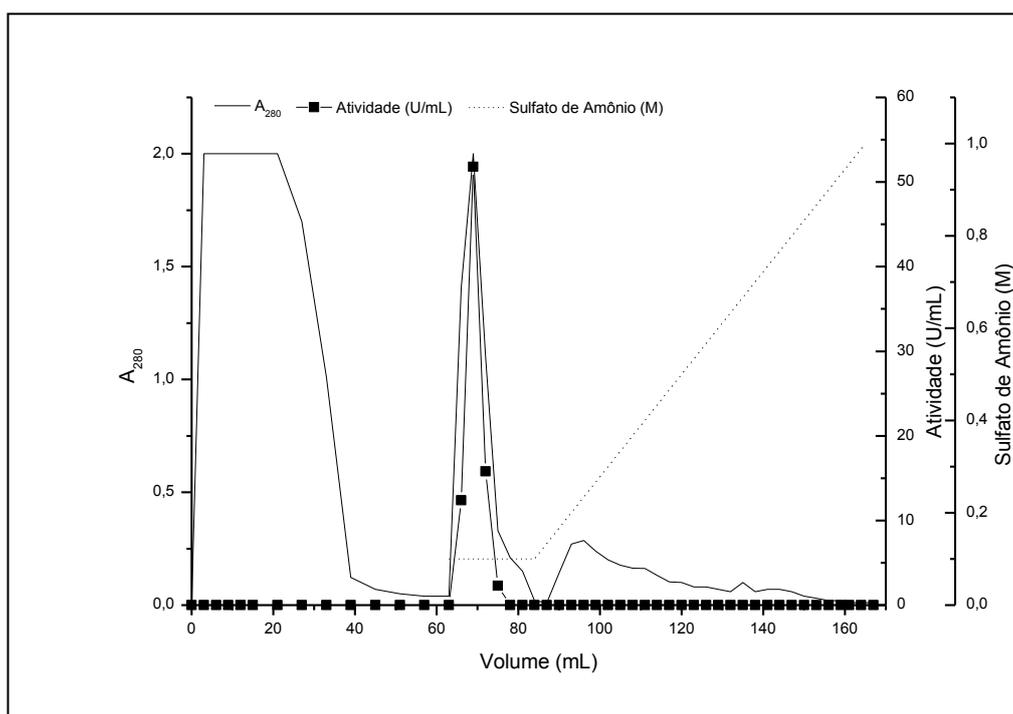


Figura 3. Histograma da purificação de β -galactosidase usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como sal de eluição: degrau (0,1 M) combinado com gradiente linear (0,1-1 M) como modo de eluição, 30 vezes o volume de coluna (94 mL), velocidade de 40 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$, pH de lavagem e eluição de 6,5

Tabela 2. Reprodutibilidade do processo de purificação de β -galactosidase

Réplica	Fator de purificação (FP)	Média e desvio FP	Recuperação (%)	Média e desvio RP (%)
1	8,1		93	
2	8,4	8,1 \pm 0,20	97	93 \pm 3
3	7,9		89	

Os resultados da Tabela 2 mostram uma pequena variabilidade nos resultados, demonstrando que o método de purificação nas condições avaliadas é reprodutível. Os perfis cromatográficos também foram reproduzidos em todos os experimentos.

São poucos os trabalhos observados na literatura que utilizam uma única etapa cromatográfica para a purificação de bioprodutos. No entanto, os resultados apresentados mostram que ao variarmos os parâmetros de processo pode-se obter excelentes resultados, evitando etapas preliminares e posteriores o que pode reduzir custos, otimizar o tempo de processo e simplificar a operacionalidade.

Os resultados aqui obtidos para a purificação de β -galactosidase utilizando cromatografia de troca iônica apresentaram melhores resultados do que os relatados por Artolozaga et al. (1998), que obtiveram uma recuperação de 63,3% um fator de purificação de 6,3 vezes.

Ao avaliarmos os resultados obtidos com os apresentados por Alcântara et al. (2006), pode-se observar superioridade tanto no fator de purificação quanto na recuperação da enzima β -galactosidase. Esses autores purificaram β -galactosidase de cotilédones de mudas de *Hymenaea courbaril*, sulfato de amônio foi adicionado para que a enzima fosse precipitada (30-60% de saturação), posteriormente o extrato foi alimentado em uma coluna de troca iônica com resina DEAE-celulose (2,5 x 76 cm) e as frações purificadas foram submetidas à cromatografia de permeação em gel em coluna Sephacryl S-200 (1 x 90 cm). Os resultados obtidos ao final de todas as etapas foram um fator de purificação de 13,5 vezes e uma recuperação de 0,63%. Considerando os dados obtidos com a etapa de cromatografia de troca iônica, esse estudo alcançou um fator de purificação de 7,6 vezes e uma recuperação de 35,7%.

Li et al. (2009) purificaram e caracterizaram uma β -galactosidase de *Bacillus megaterium*. Neste caso, os autores purificaram a enzima usando sulfato de amônio (20-60% de saturação) seguido de duas etapas cromatográficas que resultaram em um fator de purificação de 10,2 vezes e uma recuperação de 7,1%. O presente trabalho obteve resultados similares com apenas uma etapa de purificação, isso pode ser atribuído ao estudo intenso dos parâmetros, variando um fator a cada ensaio.

Medeiros et al. (2012) purificaram a enzima β -galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082 por cromatografia de troca iônica em leito fixo utilizando um planejamento experimental 2^2 , obtendo uma recuperação de 85,5 % e fator de purificação de 12 vezes, sendo o NaCl o sal de eluição utilizado.

No presente estudo a enzima produzida foi obtida pelo mesmo micro-organismo e a etapa de eluição realizada com o mesmo sal (NaCl) que Medeiros et al. (2012). No entanto, os resultados aqui obtidos diferiram, obtendo-se valores inferiores de recuperação e fator de purificação. A diferença entre os resultados pode ter sido ocasionada pela utilização de um método de extração diferente de Medeiros et al. (2008), como foi dito anteriormente, estes autores utilizaram pérolas de vidro e sonificação, no presente estudo foi utilizado pérolas de vidro e agitação em vórtex. Essa mudança no método de extração pode ter dado origem a

um extrato enzimático com uma concentração de contaminantes e impurezas diferentes, o qual pode ter afetado diretamente o processo de purificação. Para alcançarmos resultados maximizados, buscou-se utilizar diferentes sais de eluição, como o KCl.

Apesar do cloreto de sódio ser o sal de eluição mais utilizado em processo de purificação, alguns autores utilizaram diferentes sais de eluição na purificação usando cromatografia de troca iônica. Cho et al. (2003) avaliaram a purificação de β -galactosidase de *Bullera singularis* KCTC 7534 utilizando precipitação com sulfato de amônio (40-60% de saturação) e duas etapas cromatográficas, tendo o KCl como sal de eluição. A enzima purificada alcançou um fator de purificação de 11,4 vezes com uma recuperação de 85,9%, considerando a etapa cromatográfica de troca iônica.

Conclusões

Visando a aplicação da enzima β -galactosidase em larga escala, é essencial o estudo da purificação da mesma em única etapa cromatográfica, pois, eliminando outras etapas de “*downstream*” pode-se minimizar custos e perdas de rendimento e ainda assim obter a enzima purificada. Os resultados obtidos permitiu a purificação da enzima em única etapa de purificação alcançando excelentes resultados (fator de purificação 8,2 vezes e uma recuperação de 95,1%). A variação dos diferentes parâmetros avaliados (modo de eluição, velocidade de eluição, volume de coluna na eluição, pH de lavagem e pH de eluição) resultou no incremento do fator de purificação e recuperação. O KCl se mostra como uma boa alternativa como sal de eluição dessa enzima, corroborando com a importância da mudança nos parâmetros para inovação e obtenção de melhores resultados.

Referências

ABRANCHES, R.; MARCEL, S.; ARCALIS, E.; ALTMANN, F.; FEVEREIRO, P. e STOGER, E. Plants as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. **Journal of Biotechnology** v. 120, n. 1, p. 121-134, Oct 17 2005.

ALCÂNTARA, P. H. N.; MARTIM, L.; SILVA, C. O.; DIETRICH, S. M. C. e BUCKERIDGE, M. S. Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaeacourbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 44, p. 619-627, 2006.

ANSPACH, F. B.; CURBELO, D.; HARTMANN, R.; GARKE, G. e DECKWER, W. D. Expanded-bed chromatography in primary protein purification. **Journal of Chromatography A** v. 865, n. 1, p. 129-144, Dec 31 1999.

ARTOLOZAGA, M. J.; JONAS, R.; SCHNEIDER, A. L.; FURLAN, S. A. e CARVALHO-JONAS, M. F. One step partial purification of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CDB 002 using STREAMLINE-DEAE. **Bioseparation** v. 7, n. 3, p. 137-143, May 1 1998.

CHO, Y.-J.; SHIN, H. J. e BUCKE, C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*. **Biotechnology Letters** v. 25, n. 24, p. 2107-2111, Dec 1 2003.

GEKAS, V. e LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry** v. 20, p. 1-12, 1985.

INCHAURRONDO, V. A.; YAUTORNO, O. M. e VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry** v. 29, p. 47-54, 1994.

ISHIHARA, T.; KADOYA, T. e YAMAMOTO, S. Application of a chromatography model with linear gradient elution experimental data to the rapid scale-up in ion-exchange process chromatography of proteins. **Journal of Chromatography A** v. 1162, n. 1, p. 34-40, Aug 24 2007.

KALIL, S. J.; MAUGERI-FILHO, F. e RODRIGUES, M. I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry** v. 40, n. 2, p. 581-586, Feb 2005.

KANWAR, L.; GOGOI, B. K. e GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas lipase* in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. **Bioresource Technology** v. 84, n. 3, p. 207-211, Sep 2002.

LADERO, M.; RUIZ, G.; PESSELA, B. C. C.; VIAN, A.; SANTOS, A. e GARCIA-OCHOA, F. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme. **Biochemical Engineering Journal** v. 31, n. 1, p. 14-24, Aug 1 2006.

LEMES, A. C. **Purificação de β -galactosidase: design do processo**. 2011.

LI, Y. M.; WANG, H. M.; LU, L. L.; LI, Z. Y.; XU, X. D. e XIAO, M. Purification and Characterization of a Novel beta-Galactosidase with Transglycosylation Activity from *Bacillus megaterium* 2-37-4-1. **Appl.Biochem.Biotech.** v. 158, n. 1, p. 192-199, Jul 2009.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. e RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** v. 193, p. 265-275, 1951.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technol.Biotechnol** v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; DE SOUZA MARTINS, D.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Ultrasonic waves and glass pearls: A new method of extraction of β -galactosidase for use in laboratory. **Quimica Nova** v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, F. O.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Purification of β -galactosidase by ion exchange chromatography: a study of the elution using an experimental design. **Chemical Engineering & Technology** v. *in press* 2012.

MORAES, C. C. e KALIL, S. J. Strategy for a protein purification design using C-phycoerythrin extract. **Bioresource Technology** v. 100, n. 21, p. 5312-5317, Nov 2009.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A. e BIRO, S. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification** v. 21, p. 24-29, 2001.

PINHEIRO, R.; BELO, I. e MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology** v. 37, n. 1, p. 438-442, 2003.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A. e AYUB, M. A. Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 23, p. 91-96, 1999.

SILVEIRA, S. T.; QUINES, L. K. D. M.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Separation of phycoerythrin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. **Bioprocess and Biosystems Engineering** v. 31, n. 5, p. 477-482, Aug 2008.

TANUJA, S.; SRINIVAS, N. D.; RAGHAVA RAO, K. S. M. S. e GOWTHAMAN, M. K. Aqueous Two-phase Extraction for Downstream Processing of Amyloglucosidase. **Process Biochemistry** v. 32, n. 8, p. 635-641, 1997.

**ARTIGO 2: PROPRIEDADES CINÉTICAS E TÉRMICAS DE β -GALACTOSIDASE BRUTA
E PURIFICADA COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE
GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

*(Kinetics and Thermal Properties of Crude and Purified β -Galactosidase with Potential for the
Production of Galacto-oligosaccharides – Artigo aceito na revista Food Technology and
Biotechnology em 06/09/2012)*

PROPRIEDADES CINÉTICAS E TÉRMICAS DE β -GALACTOSIDASE DE BRUTA E PURIFICADA COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Resumo

β -galactosidase é uma enzima que catalisa a hidrólise da lactose. Tem potencial importância devido às suas várias aplicações na indústria de alimentos e laticínios envolvendo ingredientes para redução de lactose. As propriedades da enzima β -galactosidase, bruta e purificada, de duas diferentes fontes, *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 foram estudadas. O pH e temperatura ótimos, energia de ativação da desnaturação (E_d), a estabilidade térmica e os parâmetros cinéticos e termodinâmicos foram determinados, bem como a habilidade de hidrolisar lactose e produzir galacto-oligossacarídeos (GOS). Os resultados mostraram a importância do processo de purificação, considerando a aplicação dessas enzimas. As enzimas purificadas mostraram uma maior temperatura ótima, bem como menores valores de K_m , e, portanto, maior afinidade pelo substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) que os extratos enzimáticos brutos para ambas as cepas. A produção de GOS também foi maior quando a síntese foi realizada com as enzimas purificadas, apresentando um aumento de mais de 30% para ambas as linhagens.

Palavras-chave: Cinética de inativação, Propriedades térmicas, Parâmetros termodinâmicos.

Introdução

A β -galactosidase (β -D-galactosídeo galactohidrolase, EC 3.2.1.23) é uma importante enzima que hidrolisa a lactose (dissacarídeo abundante no leite) em glicose e galactose, apresentando um grande potencial devido suas diversas aplicações como ingrediente redutor de lactose em alimentos direcionados à intolerantes à lactose e na indústria alimentícia em geral (GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985).

As principais aplicações de β -galactosidase incluem a melhora das características sensoriais dos alimentos pelo aumento de sua solubilidade, formação de galacto-oligossacarídeos, bem como a conversão do soro de leite em diferentes produtos agregando valor aos mesmos (MAHONEY, 1998).

Galacto-oligossacarídeos (GOS) são oligossacarídeos não digeríveis, que compreendem entre 2-20 moléculas de galactose e uma de glicose e são reconhecidos como prebióticos por conta dos mesmos estimularem a proliferação de bactérias ácido-lácticas e

bifidobactérias no intestino humano (MARTINS & BURKERT, 2009). Por essa razão uma grande atenção vem sendo dada à produção de GOS, especialmente através da transgalactosilação enzimática, devido à síntese realizada quimicamente ser lenta (HSU et al., 2007a). GOS podem ser sintetizados a partir da lactose quando esse açúcar age como acceptor e a transgalactosilação é catalisada pela enzima β -galactosidase.

A β -galactosidase é largamente encontrada na natureza, distribuída entre animais, vegetais e microrganismos, sendo que suas características variam de acordo com a sua origem. As mais importantes β -galactosidasas, em termos de interesse tecnológico, são produzidas por leveduras do gênero *Kluyveromyces*, são intracelulares e suas sínteses são induzidas por lactose e galactose, reprimidas pela glicose e na sua maioria são obtidas por cultivo submerso (MARTINS & BURKERT, 2009).

A estabilidade enzimática é um aspecto importante a ser considerado em processos biotecnológicos. Mecanismos de desnaturação podem ser complexos, pois as enzimas têm estruturas altamente definidas e qualquer mudança na sua forma ativa pode afetar sua atividade específica. Informações sobre a estabilidade enzimática sob condições de operações pode auxiliar na otimização da viabilidade econômica do processo enzimático (MARTINS & BURKERT, 2009).

A atividade e estabilidade térmica de enzimas são influenciadas por diversos fatores ambientais (temperatura, pH, meio de reação, agitação) que podem afetar fortemente a estrutura tridimensional específica ou a conformação espacial da proteína (MAHONEY, 1998). Também é relevante estimar e analisar os parâmetros termodinâmicos, desde que os mesmos podem ajudar no entendimento dos prováveis mecanismos de desnaturação, que são extremamente importantes nos processos enzimáticos (JURADO et al., 2004).

Diversos estudos determinaram alguns parâmetros e propriedades cinéticas da enzima β -galactosidase, como a constantes de desnaturação (K_d), meia vida ($t_{1/2}$), energia de desnaturação e constantes cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) (ALVES, 2008; HEIDTMANN et al., 2012; MANERA, 2006). No entanto, poucos são os trabalhos apresentados na literatura considerando as propriedades térmicas e cinéticas comparando enzimas brutas e purificadas. O processo de purificação pode modificar as características e conformação das enzimas, portanto, suas propriedades catalíticas e de síntese podem também serem diferentes. Isso pode ser associado à remoção de ligantes e/ou proteínas que tem um efeito protetor na enzima bruta, a remoção desses componentes pode diminuir a estabilidade térmica ou afinidade com o substrato, por outro lado, o processo de purificação pode aumentar a capacidade de síntese bem como a especificidade da enzima purificada.

Portanto, é de extremo interessante o conhecimento das propriedades enzimáticas da enzima bruta e purificada para determinar que grau de purificação é o melhor para cada aplicação específica.

Nesse contexto, este trabalho visou avaliar as propriedades enzimáticas, (determinado pH ótimo, temperatura ótima, energia de ativação da desnaturação, estabilidade térmica da enzima), a constante cinética de desnaturação térmica, a meia vida e a energia de ativação da reação de desnaturação, o parâmetro cinético K_m , os parâmetros termodinâmicos, além da capacidade de hidrolisar lactose e produzir GOS da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082, tanto seu extrato bruto quanto purificado.

Material e Métodos

Micro-organismo

O micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e o microrganismo *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foram selecionados previamente por Braga et al., (2012) e Manera et al. (2008), respectivamente, como melhores produtores da enzima.

Preparo do Inóculo

O inóculo onde o micro-organismo foi cultivado foi composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (1,0), (NH₄)₂SO₄ (1,2), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (10,0), preparado em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 5,5 (PINHEIRO et al., 2003). As condições de cultivo foram 30 °C, 180 rpm por 24 h (MANERA et al., 2008).

Cultivo submerso

Após o crescimento do inóculo, este foi adicionado ao meio de cultivo em uma relação 10% (v/v). Os cultivos foram realizados em meio composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (17,0), (NH₄)₂SO₄ (8,8), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (28,2), preparado em tampão fosfato de potássio. O cultivo foi realizado em agitador rotatório a 30 °C, 180 rpm por 96 h (MANERA et al., 2008).

Extração da enzima

O extrato enzimático foi distribuído em frascos de 50 mL contendo 25 mL de suspensão celular (40 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato de potássio 50 mM com MnCl₂.4H₂O 0,1 mM, pH 6,6) (MEDEIROS et al., 2012) e 27,5 g de pérolas de vidro ($r < 0,4$ mm), respeitando uma relação 1 mL de suspensão celular e 1,1 g de pérolas de vidro (MEDEIROS et al., 2008). A suspensão foi agitada por 40 min em agitador tipo vórtex com intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo, obtendo-se o extrato bruto com células. Para obtenção do

extrato bruto clarificado, a suspensão celular foi centrifugada sob refrigeração (5200 x g) por 10 min a 4 °C e o sobrenadante, livre de células, utilizado para as etapas posteriores.

Purificação da enzima β -galactosidase

Os extratos enzimáticos de ambas as linhagens foram purificados por precipitação, diálise e cromatografia de troca iônica. A etapa de precipitação foi realizada como segue: sulfato de amônio foi adicionado à solução contendo β -galactosidase até 70% de saturação, essa solução foi mantida refrigerada por 14 horas e então centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, rico em β -galactosidase, foi dissolvido em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,6, e finalmente dialisada contra o mesmo tampão.

O extrato contendo β -galactosidase da etapa anterior (precipitação seguida de diálise) foi alimentado em coluna coluna C10/20 empacotada com 4 cm de leito da resina Q Sepharose Fasta Flow™ (GE Healthcare) equivalente a um volume de 3,14 mL. A temperatura foi mantida a 10 °C. A resina foi previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 25 mM pH 7,5, e a coluna alimentada com 15 mL de extrato enzimático a uma velocidade de 20 cm.h⁻¹. Foram coletadas frações de 3 mL na saída da coluna. Todas as frações foram analisadas quanto à atividade enzimática e absorvância a 280 nm. Na etapa de eluição, as frações mais concentradas também foram analisadas quanto à proteína total.

Efeito do pH na atividade de β -galactosidase

Para o estudo da influência do pH na atividade enzimática a 37 °C, foram utilizados quatro tampões: tampão citrato fosfato 0,1 M (pH 2,6; 4,6; 6,3), tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 3,6; 4,6; 5,6), tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,3; 7,3; 8,0) e tampão tris-HCl 0,1 M (pH 7,3; 8,0; 9,0).

Efeito da temperatura na atividade de β -galactosidase

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada através da atividade de β -galactosidase nas temperaturas de 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60 °C, mantendo o pH fixo no de análise (tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,6).

Cinética da desnaturação térmica e determinação da energia de desnaturação

No sentido de investigar a cinética de desnaturação térmica da β -galactosidase, o extrato enzimático livre de células foi incubado em diferentes temperaturas (35, 37, 40, 45, 50 e 55 °C). Alíquotas foram retiradas e resfriadas em intervalos de tempos pré-determinados para os ensaios. A atividade residual foi expressa em percentual em relação à atividade inicial. A partir de um gráfico de logaritmo semi-natural da atividade versus tempo,

a constante de desnaturação (K_d) foi calculada e as meia-vidas foram estimadas usando a equação 1. A meia vida ($t_{1/2}$) é definida como o tempo no qual a atividade residual atinge 50% do valor inicial.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (1)$$

A dependência da temperatura do K_d foi analisada usando o gráfico de Arrhenius. A energia de desnaturação foi calculada a partir da equação de Arrhenius como sendo:

$$\ln K_d = \ln A - \frac{E_d}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (2)$$

Onde E_d é a energia de desnaturação do estado de transição da desnaturação enzimática, A é uma constante e R é a constante universal dos gases.

O valor da energia de desnaturação (E_d) foi estimado através da intercessão do gráfico entre $\ln(K_d)$ e $1/T$.

Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Através da análise dos dados calculamos os parâmetros termodinâmicos da desnaturação da β -galactosidase estudada. A dependência da temperatura com a constante de desnaturação pode ser expressa como:

$$K_d = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^*}{RT}\right) \quad (3)$$

$$\ln\left(\frac{K_d}{T}\right) = \ln\left(\frac{k}{h}\right) + \frac{\Delta S^*}{R} - \left(\frac{\Delta H^*}{R}\right) \frac{1}{T} \quad (4)$$

Onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta, h (6.6262×10^{-34} Js) é a constante de Plank e k (1.3806×10^{-23}) é a constante de Boltzmann.

Os valores de ΔH^* and ΔS^* foram calculados a partir da inclinação e da interceção do gráfico de $\ln(K_d/T)$ versus $1/T$ respectivamente. ΔG^* foi estimado através a relação abaixo:

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (5)$$

Também foram calculados os parâmetros D e z para expressar a inativação da enzima em estudo, sendo o valor D calculado pela Equação 6.

$$D = \frac{A - 2,3026}{K_d} \quad (6)$$

E o valor z , intervalo de temperatura requerido para que a curva de desnaturação térmica atravessasse um ciclo logarítmico, foi calculado de acordo com a Equação 7.

$$\log \frac{D_2}{D_1} = \frac{T_1 - T_2}{z} \quad (7)$$

Determinação de K_m

A cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas segue Michaelis-Menten (Equação 8).

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (8)$$

A constante cinética K_m foi calculada usando Lineweaver Burk (Equação 9), gráfico de $1/V$ versus $1/S$ foram plotados com diferentes substratos. A determinação para ambas as constantes foi realizada utilizando ONPG (1-10 mM) como substrato.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (9)$$

Determinação da atividade enzimática

A atividade da β -galactosidase foi determinada usando como substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar $1\mu\text{mol}$ de *o*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio.

Hidrólise da lactose e capacidade de produção de galacto-oligossacarídeos

As enzimas bruta e purificada obtidas de ambas as fontes foram utilizadas na hidrólise da lactose e produção de galacto-oligossacarídeos. Cada enzima (solução contendo 8 U.mL^{-1}) foi adicionada a uma solução de lactose (350 g.L^{-1} de lactose em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ M}$, pH $7,0$). Os frascos foram incubados em banho agitado com temperatura controlada em 40°C , por 24 h . Foram retiradas amostras em intervalos de tempos determinados e imediatamente imersos em banho de água fervente por 5 min para inativação da enzima antes da análise dos açúcares. O meio de síntese foi analisado quanto sua composição em carboidratos por cromatografia líquida de alta performance com detector de pulso amperométrico (HPLC-PAD) usando um cromatógrafo Dionex (EUA) e uma coluna CarboPac PA-1 equilibrada com NaOH 150 mM , e eluída com NaOH 20 mM a uma velocidade de 1 mL.min^{-1} (MANERA et al., 2010)

Resultados e Discussão

Como muitos extratos enzimáticos brutos, no extrato bruto da enzima β -galactosidase se observa uma alta concentração de proteínas. As enzimas brutas obtidas de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082 mostraram uma atividade específica inicial ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de 2,4 e 4,1, respectivamente. No entanto, após as etapas de purificação a atividade específica ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram 19,1 e 19,3 para as linhagens ATCC 16045 e CCT 7082, respectivamente. O aumento da atividade específica indica que as enzimas de ambas as linhagens tiveram retirados compostos proteicos indesejáveis.

O efeito do pH na atividade da enzima obtida de *K. marxianus* CCT 7082 e ATCC 16045 foi investigado tanto para o extrato bruto quanto purificado. O pH ótimo foi de 7,3 para todas as enzimas obtidas por ambas as fontes e o tampão que mostrou excelentes resultados para todas as enzimas foi fosfato de sódio 0,1 M, embora o tampão Tris-HCl 0,1 M também tenha mostrado valores elevados de atividades para o extrato bruto de CCT 7082.

Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores reportados na literatura. Em um estudo repostado por Brady et al. (1995), o pH ótimo para β -galactosidase de *K. marxianus* foi determinado como sendo 7,5. Resultados similares foram observados por Jurado et al., em que o pH ótimo para a mesma enzima, a partir de *K. fragilis* foi de 7,0.

A partir dos dados obtidos pode-se perceber que as enzimas purificadas foram bem mais sensíveis a mudanças de pH que as enzimas brutas. Quando a faixa de pH analisada estava fora do ótimo, as enzimas purificadas de ambas as cepas mostraram uma diminuição significativa na atividade, o que não foi o obtido para as enzimas brutas. Essa diferença na sensibilidade ao pH pode ser atribuída a remoção de proteases e/ou fragmentos proteicos, que podem ser considerados como estabilizantes ou contaminantes, que estariam presentes nas enzimas brutas e poderiam promover essa susceptibilidade na diminuição da atividade considerando as faixas de pH fora do ótimo das enzimas. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com Lai et al. (2008) que estudaram a enzima superóxido dismutase bruta e purificada sendo observado o mesmo comportamento.

Comparando as linhagens, a enzima bruta obtida da cepa ATCC 16045 mostrou uma temperatura ótima mais alta que a obtida da cepa CCT 7082, no entanto, após o processo de purificação, ambas as linhagens apresentaram a mesma faixa ótima de temperatura.

As enzimas brutas obtidas das cepas CCT 7082 e ATCC 16045 apresentaram como temperatura ótima de 37 °C e 50 °C, respectivamente. A temperatura ótima das enzimas purificadas para CCT 7082 e ATCC 16045 foi 45 °C e 50 °C, respectivamente. A cepa CCT 7082 mostrou um grande incremento na temperatura ótima após a purificação, mostrando uma tendência a ser termicamente mais estável.

Resultados similares foram reportados em diversos estudos, Brady et al. (1995) obtiveram como temperatura ótima de 40 e 50 °C para a β -galactosidase de *K. marxianus*. Além disso, Kim et al. (2004) obtiveram como temperatura ótima 37-40 °C para a enzima β -galactosidase. Valores também similares aos observados para a enzima bruta de CCT 7082, no presente estudo.

A desnaturação térmica é conhecida como sendo um processo da mudança na conformação secundária, terciária e quaternária da proteína sem haver quebra das ligações covalentes (NAIDU & PANDA, 2003). A constantes de desnaturação (K_d) para a enzima β -galactosidase bruta e purificada de ambas as linhagens estão apresentadas na Tabela 1.

A meia-vida da enzima purificada obtida da linhagem ATCC 16045 aumentou em quase todas as temperaturas avaliadas quando comparada com a enzima bruta. Considerando a faixa ótima de temperatura a meia vida aumentou mais de 2 vezes. A enzima obtida da cepa CCT 7082 mostrou o mesmo comportamento, mas o aumento na meia-vida foi mais significativo aumentando mais de 20 vezes após o processo de purificação na faixa ótima de temperatura.

Uma comparação entre as meia-vidas das enzimas brutas e purificadas de ambas as linhagens, em diferentes temperaturas, mostraram que a enzima obtida de *K. marxianus* ATCC 16045 foi mais estável que a CCT 7082. No entanto, se considerarmos apenas a enzima bruta a enzima da cepa CCT 7082 (37 °C) foi mais estável na sua temperatura ótima que a enzima da ATTCC 16045 (50 °C).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica da enzima β -galactosidase bruta e purificada de *K. marxianus* ATCC16045 e CCT 7082

Temperatura (°C)	K_d				$t_{1/2}$			
	ATCC 16045		CCT 7082		ATCC 16045		CCT 7082	
	*a	**b	*a	**b	*a	**b	*a	**b
30	-	-	0,0002	0,0001	-	-	57,7	115,5
35	0,0003	0,0001	0,0008	0,0001	38,5	115,5	10,5	115,5
37	0,0003	0,0001	0,0048	0,0003	38,5	115,5	2,1	38,5
40	0,0004	0,0002	0,0290	0,0006	28,9	57,8	0,9	19,3
45	0,0253	0,0014	0,3992	0,0061	0,46	8,3	0,08	1,9
50	0,830	0,0480	-	0,0861	0,14	0,24	-	0,13
52	-	0,2746	-	0,1159	-	0,04	-	0,10
55	0,3129	0,3815	-	0,4176	0,04	0,03	-	0,03
60	-	0,9886	-	1,2011	-	0,01	-	0,01

*a: enzima bruta; **b: enzima purificada

Alcántara et al. (2006) estudando lipase bruta e purificada obtiveram resultados similares aos obtidos no presente estudo. A lipase parcialmente purificada de *Rhizomucor miehei* apresentou um ganho na estabilidade térmica comparada a enzima bruta (8,6 e 1,8 vezes

maior, considerando a meia vida a 37 e 50 °C, respectivamente). Lai et al. (2008) observaram que a enzima superperóxido dismutase purificada foi levemente mais estável termicamente que a bruta, estando esses dados também de acordo com o presente trabalho.

Por outro lado, Naidu e Panda (2003) demonstraram que enzimas pectolíticas brutas foram mais estáveis que as parcialmente purificadas. E, de acordo com os autores, isso poderia ser atribuído a interações entre os compostos enzimáticos, outras proteínas além da enzima alvo, e/ou a combinação do acima citado. Essa discrepância entre os dados obtidos para diferentes enzimas comprovam a importância do estudo das propriedades de enzimas brutas e purificadas, pois dependendo da aplicação e da enzima a purificação da mesma pode ou não ser empregada.

As energias de ativação para a reação de desnaturação (E_d) da enzima bruta de CCT 7082 e ATCC 16045 foi de 422,5 kJ.mol⁻¹ e 327,7 kJ.mol⁻¹, respectivamente, e as E_d das enzimas purificadas mostraram valores de mesma ordem E_d para a enzima purificada de ATCC 16045 foi 400,8 kJ.mol⁻¹ e para CCT 7082 foi de 351,3 kJ.mol⁻¹. Segundo Whitaker (1994), as energias de ativação para reação de desnaturação (E_d) de enzimas estão compreendidas entre 200-600 kJ.mol⁻¹. Comparando esses valores com os dados encontrados nesse estudo, pode-se observar que a E_d , para ambas as cepas estão compreendidas dentro da faixa citada.

Para determinar o potencial industrial da β -galactosidase é essencial o estudo de diferentes cepas para comparar seus parâmetros com cepas já estudadas. Também é importante entender a relação estrutura-estabilidade das enzimas. Além disso, a determinação dos parâmetros termodinâmicos ajuda na compreensão do provável mecanismo de desnaturação que é de grande importância nos processos enzimáticos (ORTEGA et al., 2004).

A variação na entalpia (ΔH^*) e entropia (ΔS^*), para a desnaturação térmica de β -galactosidase, que foram calculadas usando a teoria de transição do estado encontra-se apresentadas na Tabela 2.

Considerando que uma ligação de ponte de hidrogênio ou hidrofóbica, remova um grupo CH₂- do contato com o solvente, que seria o equivalente a cerca de 5,4 kJ.mol⁻¹ (PACE, 1992) a formação do estado de transição nas β -galactosidasas de ATCC e CCT 7082, seriam acompanhadas da quebra em torno de 60 e 58 ligações não-covalentes, respectivamente.

Como apresentado na Tabela 2, com o aumento da temperatura, ocorre um pequeno decréscimo nos valores da energia livre de Gibbs (ΔG^*) ocorreram para ambas às cepas tanto no extrato bruto como purificado. Todos os valores de ΔG^* estão na ordem de

magnitude esperada para desnaturação proteica (BUSTO et al., 1999). Ustok et al., (2010) reportaram resultados similares com valores de ΔG^* de 105-99.7 kJ.mol⁻¹ para enzima β -galactosidase produzida por culturas artesanais de iogurte.

Efeitos estruturais são principais fatores que influenciam os valores numéricos de ΔH^* e ΔS^* (ORTEGA et al., 2004). A Tabela 2 mostra os valores de ΔH^* e ΔS^* obtidos no presente estudo para ambas as linhagens, esses valores, no geral, estavam de acordo com os esperados para a desnaturação térmica de enzimas. Altos valores de entalpia também são característicos da desnaturação proteica e os valores de ΔS^* próximos de zero indicam que a desnaturação térmica não ocasionou variações relevantes na estrutura terciária da enzima (NAIDU & PANDA, 2003).

É comum, quando se trabalha com enzimas utilizadas na indústria alimentícia, expressar sua inativação utilizando os parâmetros D e z. O valor D ou valor de redução decimal (em minutos) é definido como o tempo que a enzima deve ser incubada em uma dada temperatura para que se mantenha 10% de atividade residual e é calculada de acordo com a Equação 6. Como a β -galactosidase é utilizada para hidrólise da lactose e a mesma pode ser adicionada a produtos lácteos que podem sofrer tratamento térmico, é conveniente plotar o logaritmo de D em função da temperatura (KLIBANOV, 1983).

O cálculo de z (intervalo de temperatura requerido para que a curva de desnaturação térmica atravessasse um ciclo logarítmico) foi calculado pela Equação 7, sendo o valor do mesmo 6,41; 5,7 e 6,73; 6,42 °C para CCT 7082 (bruta e purificada) e ATCC 16045 (bruta e purificada), respectivamente. O valor z foi menor para enzimas purificadas do que para as enzimas brutas mostrando que as enzimas purificadas são mais sensíveis a mudanças na temperatura que as enzimas brutas.

O K_m foi determinado medindo a atividade da β -galactosidase utilizando faixas de concentrações do substrato ONPG. Estas faixas foram suficientes para que nos últimos pontos de análise a atividade enzimática permanecesse constante. Esses valores se encontram apresentados na Tabela 2, tanto para o extrato bruto quanto o purificado para ambas as linhagens.

O valor estimado de K_m para o extrato bruto de CCT 7082 foi cinco vezes maior (menor afinidade) que o obtido de ATCC 16045. Isso pode indicar que a enzima bruta de ATCC 16045 tem maior afinidade pelo substrato ONPG que o extrato bruto de CCT 7082. O valor de K_m para enzima bruta provinda da cepa ATCC 16045 é de mesma magnitude que β -galactosidases obtidas de outras fontes microbianas. Zhou & Chen (2001) e Nagy et al. (2001) obtiveram valores de K_m de β -galactosidases de *K. lactis* e *Penicillium chrysogenum* de 1,7 e 1,8 mM, respectivamente, ao utilizaram o substrato ONPG.

Tabela 2. Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da desnaturação térmica do extrato bruto e purificado da β -galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082 e ATCC 16045 de 30-55 °C

Enzima	ΔG^* (kJ.mol ⁻¹)	ΔH^* (kJ.mol ⁻¹)	ΔS^* (kJ.mol ⁻¹ .K)	D	K _m (mM)
ATCC 16045 bruta	108,2-94,2	323,9	0,700	7,4-7666,7	3,3
ATCC 16045 purificada	87,4-72,2	400,8	1,010	6,1-23000	2,3
CCT 7082 bruta	107,0-94,8	313,8	0,682	8,7-11500	9,9
CCT 7082 purificada	81,6-68,6	351,3	0,870	5,5-7666,7	3,3

Os valores de K_m para a enzima purificada de ATCC 16045 foi pouco menor que o obtido para a enzima bruta, mostrando comportamento similar em relação à afinidade com o substrato ONPG. No entanto em relação à enzima obtida da cepa CCT 7082, observa-se que o valor de K_m para a enzima purificada foi bem menor que o da bruta, indicando melhor afinidade da purificada em relação ao substrato ONPG. Esse comportamento pode estar relacionado com a remoção de proteínas contaminantes no extrato enzimático, que poderiam estar competindo com a enzima de interesse.

As enzimas brutas e purificadas adicionadas a uma solução de lactose foram incubadas para determinação do grau de hidrólise da lactose e da produção de GOS (Figuras 1, 2 e 3 para ATCC 16045 e 4, 5 e 6 para CCT 7082).

Pode-se observar que sob as condições estudadas, ambas as enzimas brutas hidrolisaram a lactose em glicose e galactose e produziram GOS. A hidrólise da lactose aumentou até 10 horas de reação, no ponto o qual aproximadamente 90% da lactose foi convertida.

A maior produção de GOS ocorreu entre 3 e 4 horas, alcançando valores de 40 e 54 g.L⁻¹ para as enzimas brutas de *K. marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082, respectivamente. Após esse tempo de reação houve também um decréscimo na concentração de GOS devido a sua hidrólise.

As enzimas parcialmente purificadas tanto pra linhagem ATCC 16045 como para CCT 7082 mostraram comportamento semelhantes entre si, tendo ambas as maiores produções de GOS após 4h de reação. Os valores alcançados foram de 61 e 69,4 g.L⁻¹ para as enzimas parcialmente purificadas de *K. marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082, respectivamente. Após esse tempo de reação houve também um decréscimo na concentração de GOS devido a sua hidrólise.

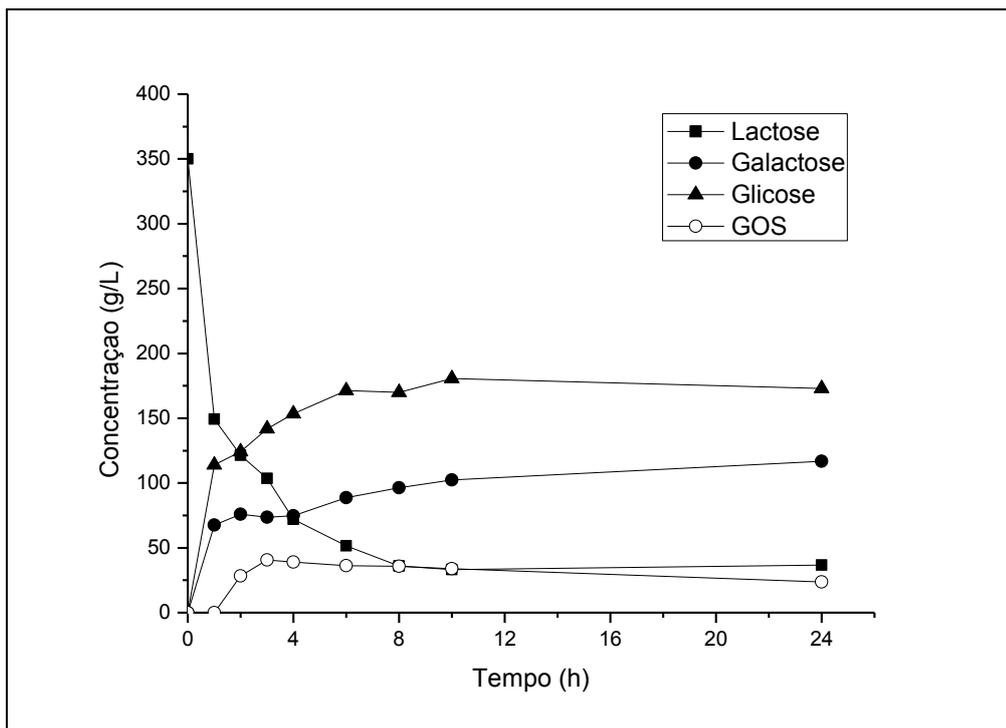


Figura 1. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de *K. marxianus* ATCC 16045 bruta

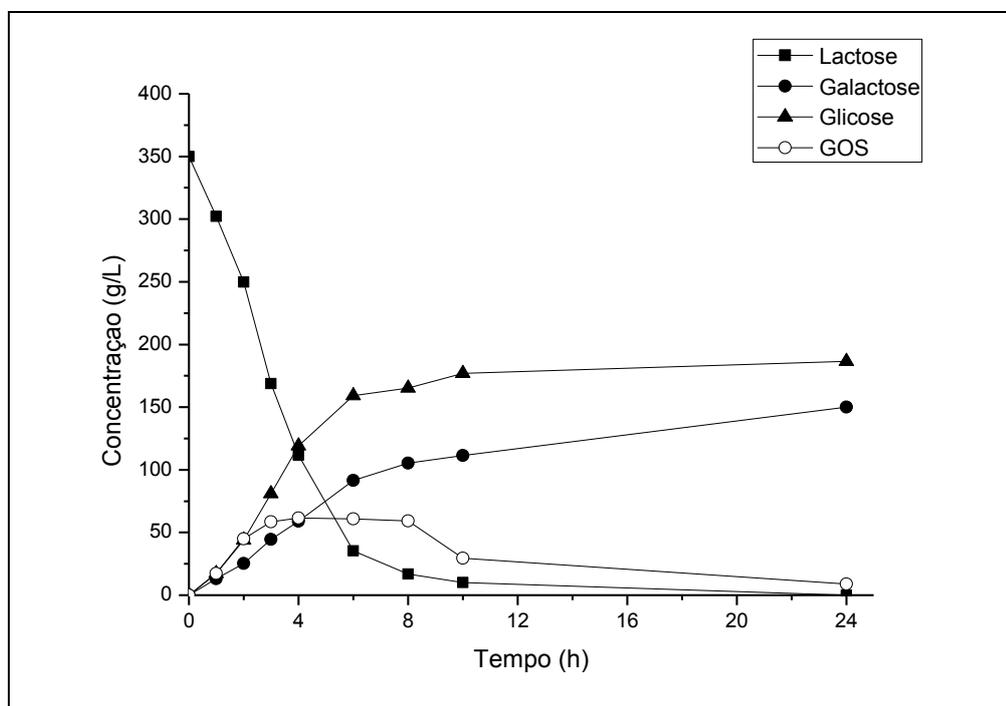


Figura 2. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de *K. marxianus* ATCC 16045 purificada por precipitação com sulfato de amônio

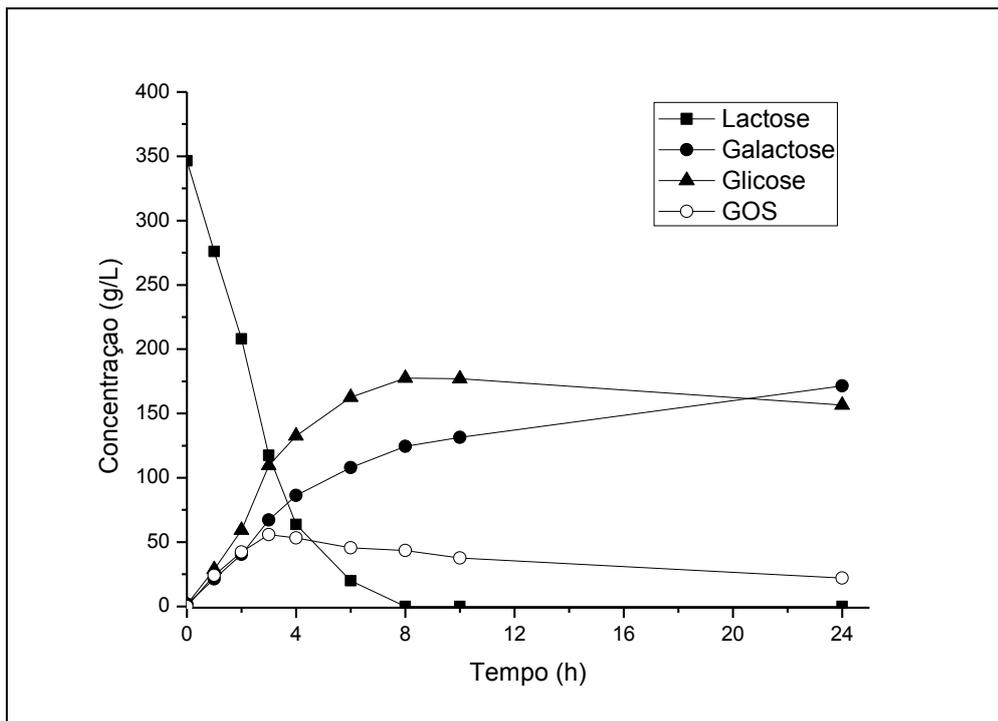


Figura 3. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de *K. marxianus* ATCC 16045 purificada por cromatografia de troca iônica

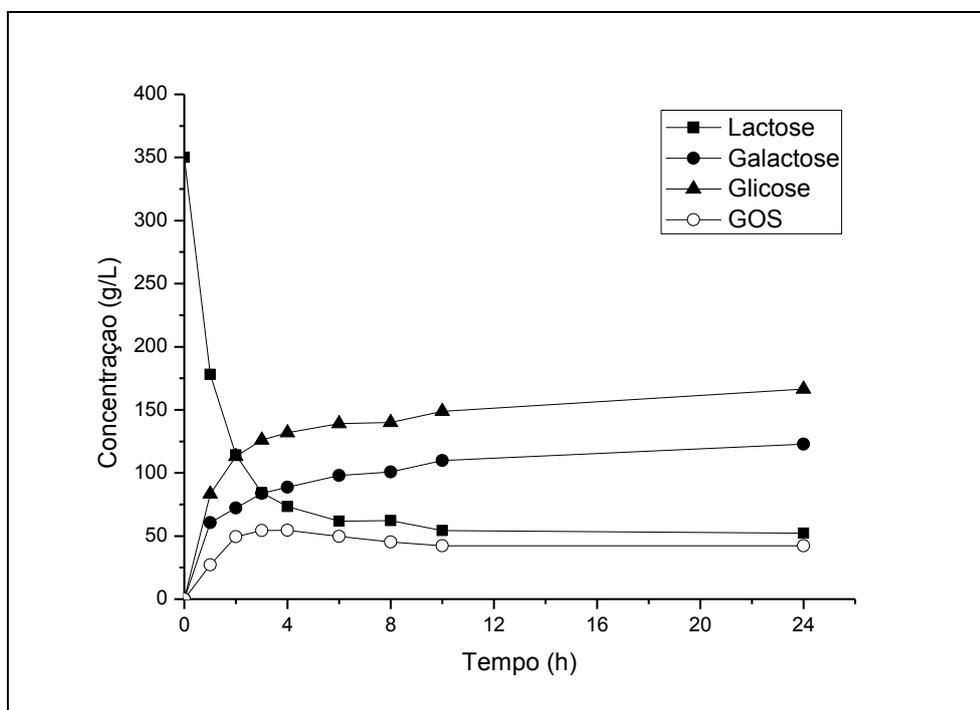


Figura 4. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de *K. marxianus* CCT 7082 bruta

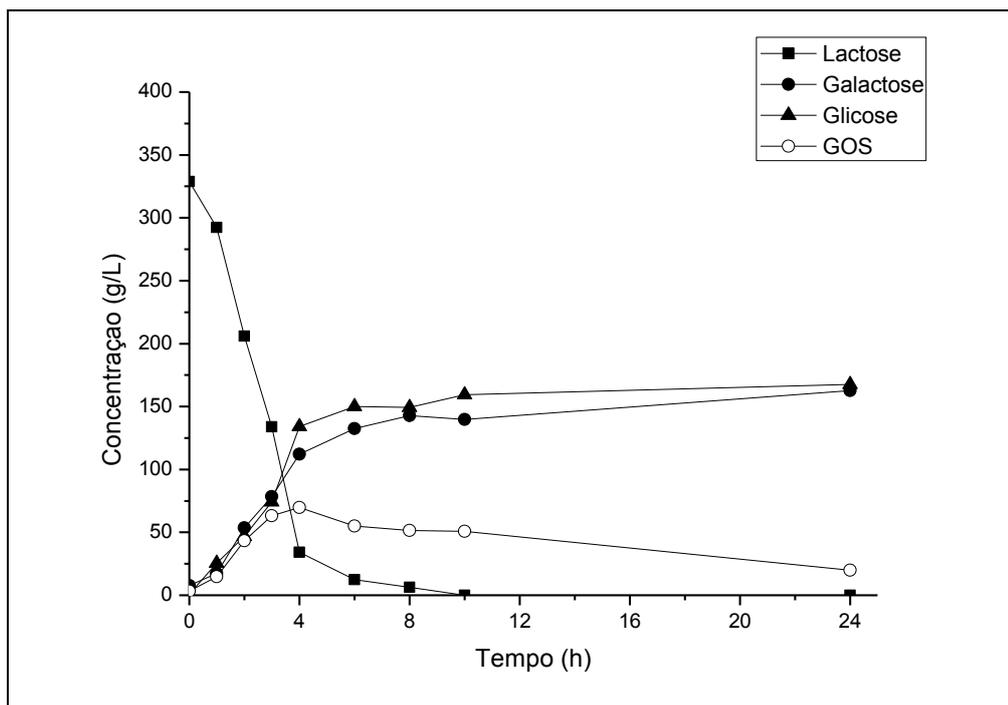


Figura 5. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de *K. marxianus* CCT 7082 purificada por precipitação com sulfato de amônio

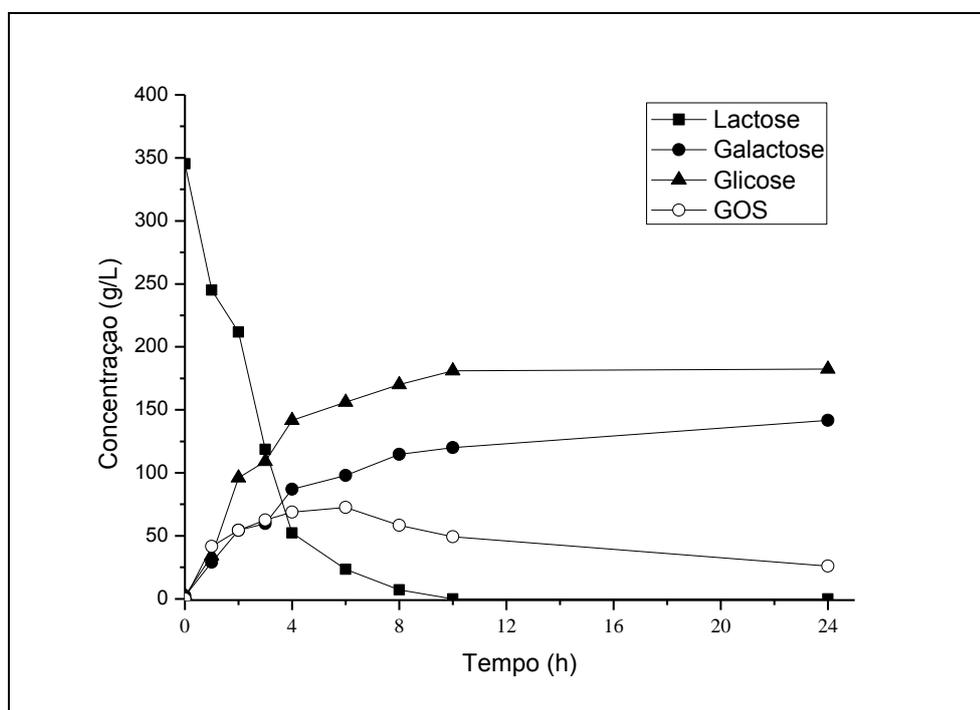


Figura 6. Hidrólise da lactose e produção de GOS para enzima de *K. marxianus* CCT 7082 purificada por cromatografia de troca iônica

Quanto às enzimas purificadas por cromatografia de troca iônica pode-se verificar um perfil similar para a hidrólise da lactose em glicose e galactose e produção de GOS. No entanto, a maior produção de GOS ocorreu entre 4 e 6 horas, obtendo-se uma melhor produção que as enzimas brutas, alcançando valores de 55 e 72 g.L⁻¹ para as enzimas purificadas de *K. marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082, respectivamente.

Ao avaliarmos os valores de GOS, observa-se que a enzima de ambas as linhagens tem um ganho considerável na produção de GOS, quando purificamos a enzima, mostrando um aumento de mais de 30%. Esse aumento considerável ocorre independente do método de purificação, tanto os valores de síntese de GOS para as enzimas parcialmente purificadas e purificadas por cromatografia de troca iônica apresentam esse incremento importante. Portanto, para aplicação industrial na produção de GOS não há diferença quanto ao uso da enzima parcialmente purificada ou purificada por cromatografia de troca iônica.

Ambas as enzimas das duas cepas mostraram máxima atividade a pH neutro, sugerindo que as enzimas são candidatas ideais para a hidrólise da lactose no leite, e seriam promissoras para aplicação da produção de leites com baixo teor de lactose enriquecidos com GOS.

Conclusões

As propriedades de duas enzimas β -galactosidase, bruta e purificada, obtidas de diferentes fontes, *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, foram determinadas. Os resultados mostraram a importância do processo de purificação, considerando a aplicação dessas enzimas. As enzimas purificadas mostraram uma temperatura ótima mais alta.

Em relação às propriedades cinéticas, as enzimas purificadas mostraram valores mais baixos de K_m , portanto, as mesmas mostraram melhor afinidade ao substrato ONPG que as enzimas brutas. A produção de GOS também foi melhor quando se utilizou as enzimas purificadas, corroborando com a importância da purificação de enzimas em processos biotecnológicos.

O processo de purificação apresentou como desvantagem uma diminuição brusca da atividade enzimática em função da variação da variação de pH e temperatura para além de suas faixas ótimas. Além disso, o valor z das enzimas purificadas diminuiu em relação às enzimas brutas mostrando uma maior sensibilidade quando mudamos a temperatura do meio de reação. Essas constatações corroboram e demonstram a importância do estudo e da determinação das propriedades de enzimas como a β -galactosidase tanto bruta como purificada, já que a mesma é usada em processos biotecnológicos onde se deve

consideram as informações obtidas para sua aplicação, assegurando a viabilidade econômica e de processo.

Referências

ALCANTARA, P. H. N.; MARTIM, L.; SILVA, C. O.; DIETRICH, S. M. C. e BUCKERIDGE, M. S. Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 44, n. 11-12, p. 619-627, Nov 2006.

ALVES, F. G. **Produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada.** 2008. Universidade Federal do Rio Grande.

BRADY, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, L. e MCHALE, A. P. Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. **Enzyme and Microbial Technology** v. 17, n. 8, p. 696-699, Aug 1995.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A. e KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food and Bioprocess Technology** v. *in press*, p. 1-11, 2012.

BUSTO, M. D.; APENTEN, R. K.; ROBINSON, D. S.; WU, Z.; CASEY, R. e HUGHES, R. K. Kinetics of thermal inactivation of pea seed lipoxygenases and the effect of additives on their thermostability. **Food Chemistry** v. 65, p. 323-329, 1999.

GEKAS, V. e LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry** v. 20, p. 1-12, 1985.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C. e KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Techenology** v. 15, n. 1, p. 1-9, 2012.

HSU, C. A.; LEE, S. L. e CHOU, C. C. Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. **J.Agric.Food Chem.** v. 55, p. 2225-2230, 2007.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G. e VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology** v. 34, n. 1, p. 33-40, Jan 5 2004.

KIM, C. S.; JI, E. S. e OH, D. K. A new kinetic model of recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 316, n. 3, p. 738-743, Apr 9 2004.

KLIBANOV, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. **Advanced Applied Microbiology** v. 29, p. 1-28, 1983.

LAI, L. S.; CHANG, P. C. e CHANG, C. T. Isolation and characterization of superoxide dismutase from wheat seedlings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 56, n. 17, p. 8121-8129, Aug 13 2008.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. **Food Chemistry** v. 63, n. 2, p. 147-154, Oct 1998.

MANERA, A. P. **Otimização do meio de cultura para produção da enzima β -galactosidase *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial da enzima.** 2006. Universidade Federal do Rio Grande.

MANERA, A. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J. e MAUGERI, F. Galacto-oligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. **International Journal of Food Engineering** v. 6, n. 6, p. 1-13, 2010.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technol. Biotechnol** v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.

MARTINS, A. R. e BURKERT, C. A. V. Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology** v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; DE SOUZA MARTINS, D.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Ultrasonic waves and glass pearls: A new method of extraction of β -galactosidase for use in laboratory. **Quimica Nova** v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, F. O.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Purification of β -galactosidase by ion exchange chromatography: a study of the elution using an experimental design. **Chemical Engineering & Technology** v. *in press* 2012.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A. e BIRO, S. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification** v. 21, p. 24-29, 2001.

NAIDU, G. S. N. e PANDA, T. Studies on pH and thermal inactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal** v. 16, p. 57-67, 2003.

ORTEGA, N.; DIEGO, D. S.; PEREZ-MATEOS, M. e BUSTO, M. D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry** v. 88, p. 209-217, 2004.

PACE, C. N. Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. **Journal of Molecular Biology** v. 226, p. 29-35, 1992.

PINHEIRO, R.; BELO, I. e MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology** v. 37, n. 1, p. 438-442, 2003.

USTOK, F. I.; TARI, C. e HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry** v. 119, n. 3, p. 1114-1120, Apr 1 2010.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food science**. 2. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.

ZHOU, Q. Z. K. e CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal** v. 9, p. 33-44, 2001.

**ARTIGO 3: IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE PARCIALMENTE
PURIFICADA**

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE PARCIALMENTE PURIFICADA

Resumo

A imobilização de enzimas é uma das etapas mais importantes na utilização das mesmas, pois permite superar as desvantagens da solubilidade no meio reacional e da instabilidade operacional no uso industrial das enzimas, além de permitir o reuso das mesmas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, utilizando diferentes suportes. Eupergit[®] C foi escolhido como mais promissor a partir de uma seleção de suportes. A partir dessa seleção foi realizado um planejamento experimental completo 2⁴, onde foram estudados os parâmetros: força iônica do tampão (0,5 a 1,5 M), tempo de reação (2 a 8 h), quantidade de suporte (200 a 400 mg) e pH (6,5 a 7,5) de imobilização. As eficiências de imobilização em atividade variaram de 2,9 a 15,6%, sendo a máxima alcançada na condição utilizando tampão fosfato 1,5 M, tempo de reação de 2 horas, 400 mg de Eupergit[®] C em pH 7,5. A maximização da imobilização realizada através das cinéticas de ligação resultaram em uma eficiência de imobilização em atividade de 22%. Posteriormente, avaliou-se o reuso da enzima, onde a mesma manteve mais de 50% de sua atividade inicial após cinco ciclos de utilização. As propriedades térmicas e cinéticas determinadas demonstraram estabilidade térmica superior da enzima imobilizada em relação à enzima livre.

Palavras-chave: cinéticas de ligação, Eupergit[®] C, constantes cinéticas, meia-vida.

Introdução

A indústria de laticínios tem investido fortemente no desenvolvimento e modificação de produtos à base de leite, visto que uma porção significativa da população mundial é intolerante à lactose e não pode usufruir dos benefícios de produtos lácteos. Além disso, a lactose tem seu uso limitado em produtos lácteos devido à sua baixa solubilidade e baixo poder adoçante e efeito laxante em altas concentrações (PAL et al., 2009).

Dentre as fontes de β -galactosidase destacam-se aquelas obtidas por micro-organismos, principalmente a partir de leveduras do gênero *Kluyveromyces*, que são considerados seguros, podendo ser utilizados na área de alimentos (BRADY et al., 1995; BRAGA et al., 2012; MAHONEY, 1998; MANERA et al., 2008).

Ambas as formas, solúvel e imobilizada, da enzima β -galactosidase são utilizadas para a hidrólise de lactose, no entanto, algumas propriedades da enzima solúvel, como a sua não reutilização, podem dificultar seu uso. A utilização de um catalisador relativamente dispendioso, tal como as enzimas, exige, em muitos casos, a sua recuperação e reutilização para tornar o processo economicamente viável. A ideia de reutilização de enzima significa

implicitamente que a estabilidade da preparação enzimática final deve ser suficientemente alta para permitir a sua reutilização (MATEO et al., 2007).

A imobilização de β -galactosidase é uma ferramenta muito poderosa para melhorar quase todas as suas propriedades, incluindo estabilidade, atividade, seletividade, especificidade e redução de inibição (PESSELA et al., 2007). No entanto, a imobilização eficiente ainda é considerada uma grande lacuna para utilização industrial dessa enzima (ASRAF & GUNASEKARAN, 2010).

Vale ressaltar que, dependendo das condições de imobilização e dos suportes empregados, a enzima apresentará diferentes propriedades finais, podendo alterar, por exemplo, sua estabilidade frente ao pH e temperatura (ALMEIDA et al., 2008).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a imobilização da enzima β -galactosidase obtida de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e parcialmente purificada em diferentes suportes, determinar as melhores condições de imobilização no suporte mais promissor, bem como caracterizar a enzima imobilizada e avaliar seu reuso.

Material e Métodos

Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 selecionado previamente por Manera et al. (2008) como o melhor produtor de β -galactosidase.

Preparo do Inóculo

O inóculo onde o micro-organismo foi cultivado foi composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (1,0), (NH₄)₂SO₄ (1,2), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (10,0), preparado em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 5,5 (PINHEIRO et al., 2003). As condições de cultivo foram 30 °C, 180 rpm por 24 h (MANERA et al., 2008).

Produção da enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase foi produzida através de cultivo submerso em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio de cultura otimizado por Manera et al. (2008) em agitador orbital, a 30 °C, 180 rpm por 96 h.

Extração da Enzima

O extrato enzimático foi distribuído em frascos de 50 mL contendo 25 mL de suspensão celular (40 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato de potássio 50 mM com MnCl₂.4H₂O 0,1 mM, pH 6,6) (MEDEIROS et al., 2012) e 27,5 g de pérolas de vidro (r<0,4 mm), respeitando uma relação

1 mL de suspensão celular e 1,1 g de pérolas de vidro (MEDEIROS et al., 2008). A suspensão foi agitada por 40 min em agitador tipo vórtex com intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo, obtendo-se o extrato bruto com células. Para obtenção do extrato bruto clarificado, a suspensão celular foi centrifugada sob refrigeração (5200 x g) por 10 min a 4 °C e o sobrenadante, livre de células, utilizado nas etapas posteriores.

Purificação da enzima β -galactosidase por precipitação com sulfato de amônio

Para a obtenção da enzima purificada foi utilizado o método de precipitação com sulfato de amônio. O extrato enzimático foi acrescido de sulfato de amônio em percentual de saturação de 70%. O meio precipitado foi centrifugado a 4 °C por 30 min, 5200 x g e separado o meio sobrenadante do precipitado (HEIDTMANN et al., 2012). O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio 50 mM com $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,1 mM pH 6,6, depois foi realizado o processo de diálise para remoção do sal utilizando-se o mesmo tampão de ressuspensão.

Imobilização da enzima

A β -galactosidase parcialmente purificada foi imobilizada através de diferentes métodos e utilizando diferentes suportes. Neste sentido, foram avaliadas cinco diferentes metodologias com a finalidade de avaliar o comportamento da enzima de interesse na tentativa de maximizar a eficiência de imobilização.

Imobilização com alginato de cálcio

Para o preparo da solução de gel adicionou-se 31 g de água destilada e 1,5 g de alginato de sódio, os quais foram aquecidos para a dissolução total do alginato. Após a dissolução do alginato de sódio e do resfriamento da solução de gel, adicionou-se a solução composta por 10 mL de solução enzimática. Para a formação das esferas, utilizou-se bomba peristáltica para o bombeamento do gel sobre uma solução de cloreto de cálcio 0,2 M. As esferas obtidas permaneceram em repouso a 4°C, nesta mesma solução “*over-night*”. A seguir, foram lavadas e estocadas sob refrigeração também em água destilada (ALVES, 2008).

Imobilização com alginato de sódio, carvão ativado e gluteraldeído

Para o preparo da solução de gel adicionou-se 16,5 g de água destilada e 0,75 g de alginato de sódio, os quais foram aquecidos para a dissolução total do alginato. Em seguida, adicionou-se 12,5 g de sacarose. Após a dissolução do alginato de sódio e do resfriamento da solução de gel, adicionou-se a solução composta por 5 mL de solução enzimática, 3,5

mL de glutaraldeído e 0,75 g de carvão ativado (RISSO et al., 2010). Para a formação das esferas, utilizou-se bomba peristáltica para o bombeamento do gel sobre uma solução de cloreto de cálcio 0,2 M em tampão acetato 0,1 M a pH 6,6 com 3,5% de glutaraldeído a 10°C, sob agitação.

As esferas obtidas permaneceram em repouso a 4°C, nesta mesma solução “*over-night*”. A seguir, foram lavadas com água destilada, e a sua última lavagem foi realizada em tampão acetato. Em seguida, foram imersas em solução de cloreto de cálcio 0,05 M em tampão acetato.

Imobilização em Accurel

Preparou-se 30 mL de uma solução enzimática (25 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M e 5 mL de enzima parcialmente purificada), a qual foi adicionada e mantida sob agitação magnética a 10 °C por 2 horas. Após o término do processo de adsorção, a solução foi filtrada a vácuo (SCHERER, 2010).

Imobilização com Montmorilonita natural

Adicionou-se 2g do suporte montmorilonita natural em 30 mL de uma solução contendo o extrato enzimático e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,6, (extrato enzimático/tampão 3:10). Esta solução foi mantida sob agitação magnética a 4 °C, por um tempo reacional de 10 minutos. Após o término do processo de adsorção, a solução foi filtrada a vácuo (COGHETTO et al., 2012).

Imobilização com Eupergit® C

Adicionou-se 400 mg de Eupergit® C a 400 µL de extrato enzimático parcialmente purificado dissolvido em tampão fosfato de potássio (10 mL; 0,1 M; pH 6,6; 0,1 mM de Mg²⁺). Esta solução foi mantida sob agitação a 25 °C, por um tempo reacional de 8 horas. Após o término do processo, a solução foi filtrada a vácuo (CAMPELLO et al., 2012).

Maximização da imobilização utilizando Eupergit® C como suporte

Um planejamento experimental completo 2⁴ com 16 ensaios e 4 réplicas no ponto central foi avaliado. Os seguintes fatores foram variados: quantidade de suporte (200 a 400 mg); concentração do tampão (0,5 a 1,5 M); pH de reação (6,5 a 7,5) e tempo de reação (2 a 8 h), conforme Tabela 1.

Os ensaios foram realizados em um reator de mistura encamisado (10 °C) com agitação mecânica (150 rpm) onde a enzima, o suporte e o tampão fosfato nas diferentes condições eram homogeneizados de acordo com o tempo de reação de cada experimento. Após a

imobilização, a solução foi filtrada sendo então determinada a atividade na enzima imobilizada e no sobrenadante. Como resposta obteve-se a eficiência de imobilização em atividade, ou seja, a enzima ativa, calculada através da Equação 1.

$$\% \text{Eficiência}_{\text{atividade}} = \left[\frac{U_{\text{imobilizada}} \times V_{\text{imobilizada}}}{U_{\text{entrada}} \times V_{\text{entrada}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Onde $U_{\text{imobilizada}}$ é a atividade enzimática na partícula e $V_{\text{imobilizada}}$ a quantidade de partícula; U_{entrada} é a atividade enzimática da enzima livre e V_{entrada} o volume inicial de enzima.

A eficiência de imobilização geral foi calculada através da Equação 2, que fornece a porcentagem de enzima ligada, estando ou não ativa.

$$\% \text{Eficiência}_{\text{imobilizada}} = \frac{[(U_{\text{entrada}} \times V_{\text{entrada}}) - (U_{\text{entrada}} - U_{\text{branco equilíbrio}}) \times V_{\text{entrada}}] - (U_{\text{saída}} \times V_{\text{entrada}})}{U_{\text{entrada}} \times V_{\text{entrada}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde U_{entrada} é a atividade enzimática da enzima livre e V_{entrada} o volume inicial de enzima; $U_{\text{branco equilíbrio}}$ é quantidade de enzima desnaturada; $U_{\text{saída}}$ é a atividade enzimática no sobrenadante.

A eficiência da imobilização para proteínas foi determinada através da Equação 3, relacionando a quantidade de proteína fornecida ao processo e a quantidade de proteína imobilizada.

$$\% \text{Eficiência}_{\text{proteína}} = \left[\frac{(C_{\text{entrada}} \times V_{\text{entrada}}) - (C_{\text{sobrenadante}} \times V_{\text{sobrenadante}})}{C_{\text{entrada}} \times V_{\text{entrada}}} \right] \times 100 \quad (3)$$

Onde C_{entrada} e $C_{\text{sobrenadante}}$ são as concentrações de proteínas contidas na solução enzimática e no filtrado, respectivamente; V_{entrada} e $V_{\text{sobrenadante}}$ são, respectivamente, os volumes de proteína em solução e no filtrado.

Determinação de cinéticas de ligação enzima/suporte

Os experimentos para a determinação da cinética de ligação no equilíbrio foram realizados em reatores de mistura, contendo o suporte, tampão na molaridade desejada, o extrato enzimático, em pH 7,5, a 10 °C, sob agitação de 150 rpm durante 120 minutos. Foram coletadas amostras em determinados intervalos de tempo, sendo estas filtradas para retirada do suporte e então determinada a atividade enzimática em solução, até atingir-se o

equilíbrio. Para cada condição, calculou-se a capacidade de ligação da enzima ao suporte no equilíbrio (Q^*) (Equação 4).

$$Q^* = \frac{\left[\left((U_{\text{entrada}} \times V_{\text{entrada}}) - \left((V_{\text{entrada}} - V_{\text{branco equilíbrio}}) \times V_{\text{entrada}} \right) - (U_{\text{saída}} \times V_{\text{entrada}}) \right) \right]}{\text{mg de suporte}} \quad (4)$$

Caracterização da enzima imobilizada em Eupergit® C

Foram determinadas algumas propriedades enzimáticas e os parâmetros cinéticos da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, parcialmente purificada imobilizada. A enzima foi caracterizada quanto ao pH ótimo, temperatura ótima; e foram determinados os parâmetros cinéticos (K_m) para o substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG).

Determinação do pH ótimo

Para o estudo da influência do pH na atividade enzimática a 37 °C, foram utilizados quatro tampões: tampão citrato fosfato 0,1 M (pH 2,6; 4,6; 6,3), tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 3,6; 4,6; 5,6), tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,3; 7,3; 8,0) e tampão tris-HCl 0,1 M (pH 7,3; 8,0; 9,0).

Determinação da temperatura ótima

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada através da atividade de β -galactosidase nas temperaturas de 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60 °C, mantendo o pH fixo no de análise (tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,6).

Cinética da desnaturação térmica e determinação da energia de desnaturação

No sentido de investigar a cinética de desnaturação térmica da β -galactosidase, o extrato enzimático livre de células foi incubado em diferentes temperaturas (37, 40, 45, 50, 55 e 60 °C). Aliquotas foram retiradas e resfriadas em intervalos de tempos pré-determinados para os ensaios. A atividade residual foi expressa em percentual em relação à atividade inicial. A partir de um gráfico de logaritmo semi-natural da atividade versus tempo, a constante de desnaturação (K_d) foi calculada e as meia-vidas foram estimadas usando a Equação 5. A meia vida ($t_{1/2}$) é definida como o tempo no qual a atividade residual atinge 50%.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (5)$$

A dependência da temperatura do K_d foi analisada usando o gráfico de Arrhenius. A energia de desnaturação foi calculada a partir da equação de Arrhenius como sendo:

$$\ln K_d = \ln A - \frac{E_d}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (6)$$

Onde E_d é a energia de desnaturação do estado de transição da desnaturação enzimática, A é uma constante e R é a constante universal dos gases. O valor da energia de desnaturação (E_d) foi estimado através da intercessão do gráfico entre $\ln(K_d)$ e $1/T$.

Determinação do parâmetro cinético K_m

A cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas segue Micaelis-Menten (Equação 7).

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (7)$$

O K_m foi calculado usando Lineweaver-Burk (Equação 8), gráfico de $1/V$ versus $1/S$ foram plotados. A determinação foi realizada utilizando ONPG (1-10 mM) como substrato.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (8)$$

Determinação da biomassa

A concentração de célula foi medida por densidade ótica a 620 nm, e convertida para gramas de célula seca por litro conforme curva padrão (RECH et al., 1999).

Determinação da atividade enzimática

A atividade da β -galactosidase foi determinada usando como substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) (INCHAURRONGO et al., 1994). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio.

Determinação das proteínas

Para a determinação da concentração de proteína foi utilizado o aparelho Qubit Fluorimeter (Kit Quant-iT Protein Assay), seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante. Para quantificar a proteína das amostras utilizou-se 190 μ L da solução tampão (fornecida pelo fabricante) e 10 μ L de amostra e após 15 minutos realizou-se a leitura.

Reuso da enzima

β -Galactosidase imobilizada em Eupergit® C foi utilizada sucessivamente em reações de hidrólise com lactose 200 mM (150 rpm por 30 min a 35° C) e a atividade da primeira reação foi considerada 100%. Após um ciclo, as mesmas partículas (enzima ligada ao suporte) foram removidas do meio de reação, lavadas com tampão fosfato de potássio 2 M com MgCl₂ 0,1 mM pH 7,5 e reutilizadas, sendo esse procedimento repetido por 8 ciclos de uso.

Resultados e Discussão

Diferentes técnicas e suportes foram avaliados para imobilização da enzima β -galactosidase parcialmente purificada. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1, onde pode-se verificar que para imobilização de β -galactosidase os resultados mais promissores foram com os suportes Eupergit® C e a argila montmorilonita natural. Um trabalho recente apontou que uma das lacunas no que diz respeito a estudos realizados com a enzima β -galactosidase seria a falta de uma metodologia eficiente da imobilização dessa enzima (ASRAF & GUNASEKARAN, 2010).

Tabela 1. Resultados preliminares da imobilização da β -galactosidase utilizando diferente técnicas e suportes

Método de Imobilização	Eficiência de Imobilização (%)
Alginato de Cálcio	1,1
Alginato de Sódio + Carvão Ativado	0,9
Accurel	0
Montmorilonita natural	1,3
Eupergit® C	3,4

A partir dos resultados obtidos na seleção do melhor método de imobilização e suporte para a enzima β -galactosidase, um planejamento experimental completo 2⁴ (16 ensaios, 4 pontos centrais) foi realizado com o suporte Eupergit® C tendo como variáveis: quantidade de suporte, concentração do tampão (força iônica), pH e o tempo de reação. A matriz do planejamento completo, valores codificados e reais bem como a resposta avaliada obtida para cada ensaio estão apresentadas Tabela 2.

Através da Tabela 2 pode-se observar que a eficiência de imobilização em atividade variou de 2,9 a 15,6%. O melhor ensaio dentre os estudados foi o ensaio 8, onde utilizou-se maior quantidade de suporte (400 mg), a maior força iônica, ou seja, a maior concentração de tampão (1,5), o maior pH e o menor tempo de reação.

Tabela 2. Matriz do Planejamento 2⁴ para imobilização de β-galactosidase com valores reais e codificados utilizando Eupergit® C como suporte

Ensaio	Quantidade de suporte (mg)	Concentração do tampão (M)	pH	Tempo de reação (h)	Eficiência em atividade (%)
1	-1 (200)	-1 (0,5)	-1 (6,5)	-1 (2)	6,1
2	1 (400)	-1 (0,5)	-1 (6,5)	-1 (2)	6,2
3	-1 (200)	1 (1,5)	-1 (6,5)	-1 (2)	7,6
4	1 (400)	1 (1,5)	-1 (6,5)	-1 (2)	11,4
5	-1 (200)	-1 (0,5)	1 (7,5)	-1 (2)	2,9
6	1 (400)	-1 (0,5)	1 (7,5)	-1 (2)	4,3
7	-1 (200)	1 (1,5)	1 (7,5)	-1 (2)	8,1
8	1 (400)	1 (1,5)	1 (7,5)	-1 (2)	15,6
9	-1 (200)	-1 (0,5)	-1 (6,5)	1 (8)	3,3
10	1 (400)	-1 (0,5)	-1 (6,5)	1 (8)	5,8
11	-1 (200)	1 (1,5)	-1 (6,5)	1 (8)	4,3
12	1 (400)	1 (1,5)	-1 (6,5)	1 (8)	5,2
13	-1 (200)	-1 (0,5)	1 (7,5)	1 (8)	4,1
14	1 (400)	-1 (0,5)	1 (7,5)	1 (8)	13,6
15	-1 (200)	1 (1,5)	1 (7,5)	1 (8)	7,3
16	1 (400)	1 (1,5)	1 (7,5)	1 (8)	10
17	0 (300)	0 (1,0)	0 (7,0)	0 (5)	4,1
18	0 (300)	0 (1,0)	0 (7,0)	0 (5)	4,7
19	0 (300)	0 (1,0)	0 (7,0)	0 (5)	4,2
20	0 (300)	0 (1,0)	0 (7,0)	0 (5)	4,1

Na Tabela 3 observa-se o efeito das variáveis e de suas interações sobre a eficiência de imobilização no planejamento experimental completo.

Tabela 3. Efeitos principais das variáveis sobre a eficiência de imobilização enzimática

Variável	Efeito (%)	Erro Padrão	t(3)	p
Média	6,64	0,06	103,46	0,000002
(1) Quantidade de suporte	3,55	0,14	24,71	0,000145
(2) Força Iônica	2,90	0,14	20,19	0,000265
(3) pH	2,00	0,14	13,92	0,000802
(4) Tempo de reação	-1,07	0,14	-7,48	0,004939
1 x 3	1,72	0,14	12,01	0,001242
2 x 3	1,12	0,14	7,83	0,004332
2 x 4	-2,90	0,14	-20,19	0,000265
3 x 4	2,10	0,14	14,62	0,000694

Para verificação da validade do modelo de eficiência de imobilização da β-galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em função das variáveis significativas codificadas, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), conforme apresentado na Tabela 4, de acordo com Rodrigues & lemma (2005).

Tabela 4. Análise de variância do planejamento experimental completo 2⁴

Fonte de variação	Soma quadrática	G.L.	Média Quadrática	F _{Calculado}
Regressão	192,72	8	24,09	4,30
Resíduo	61,67	11	5,61	
Erro puro	0,25	3		
Falta de ajuste	61,42	8		
Total	254,39	19		

$F_{0,95; 8; 11}: 0,29$ $R: 0,86$

Através da análise de variância e teste F (F calculado 1,3 vezes maior que o F tabelado) e do coeficiente de determinação foi verificado a validade do modelo para a eficiência em atividade como função das variáveis significativas codificadas. A Equação 9 representa o modelo gerado.

$$\text{Eficiência}_{\text{atividade}} = 6,6 + 1,8 \times X_1 + 1,5 \times X_2 + 1,0 \times X_3 - 0,5 \times X_4 + 0,9 \times X_1 \times X_3 + 0,6 \times X_2 \times X_3 - 1,5 \times X_2 \times X_4 + 1,1 \times X_3 \times X_4 \quad (9)$$

Onde X_1 : quantidade de suporte, X_2 : concentração de tampão, X_3 : pH, X_4 : tempo de reação.

A partir da obtenção do modelo foi possível construir as curvas de contorno para analisar as melhores condições das variáveis para a imobilização da β -galactosidase. Através das curvas de contorno, verifica-se que quando a quantidade de suporte e concentração de tampão foi máxima a eficiência de imobilização foi maximizada. O mesmo pode ser observado para a variável pH, quando a mesma se apresenta no maior nível, a resposta também é aumentada. Observa-se que ao relacionarmos as variáveis: tempo de reação e quantidade de suporte, os menores tempos de reação e as maiores quantidades de suporte ocasionam melhores resultados (Figuras 1 a 6).

O incremento da eficiência em atividade causada por altas quantidades de suporte pode ser explicado pelo aumento da superfície de ligação substrato/enzima no maior nível dessa variável (Figura 1).

A concentração de tampão no valor mais alto provocou um aumento na eficiência em atividade, indicando que o aumento na força iônica da solução favorece a ligação do suporte com a enzima.

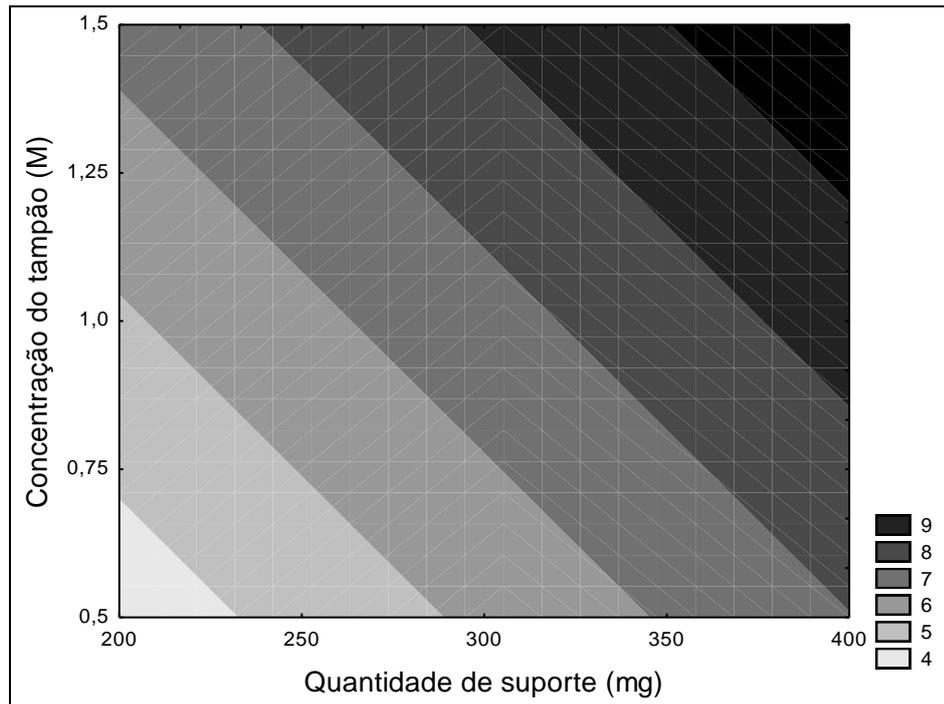


Figura 1. Curva de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função da concentração do tampão e da quantidade de suporte.

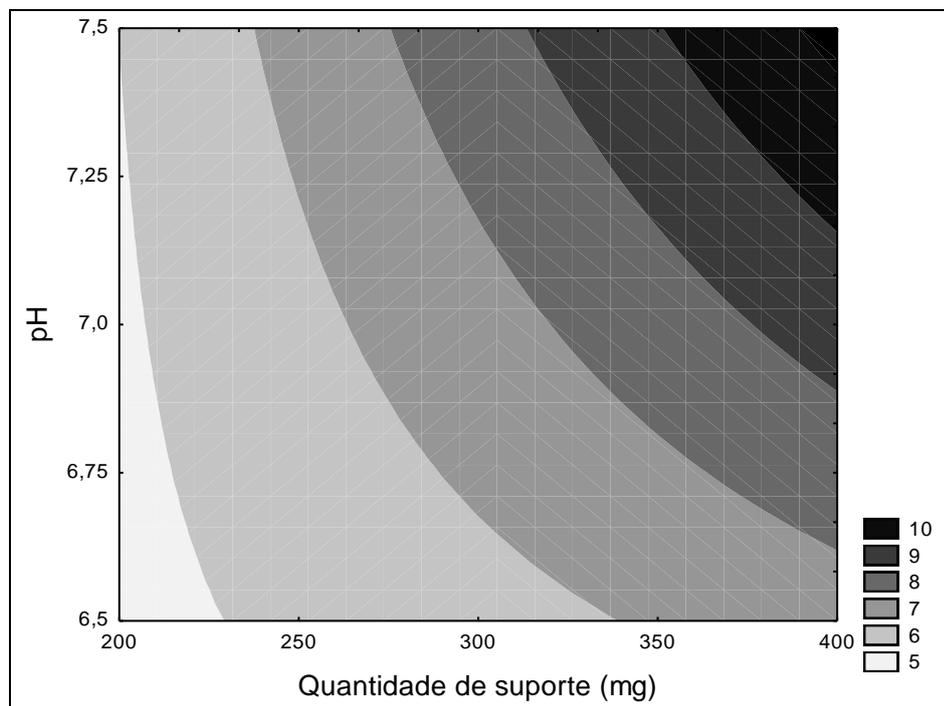


Figura 2. Curva de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função do pH e da quantidade de suporte.

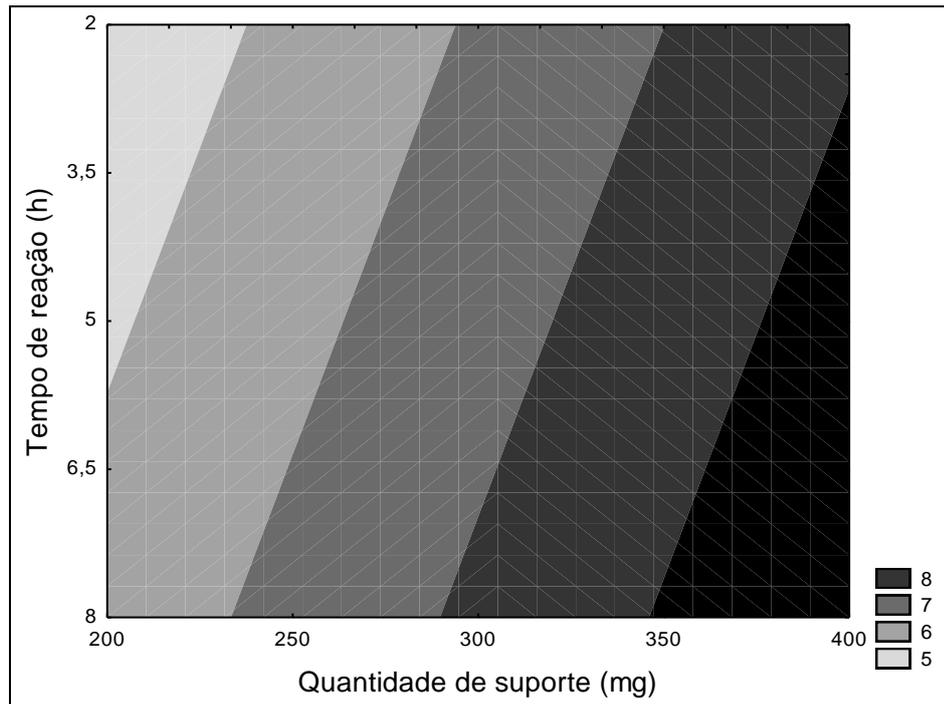


Figura 3. Curva de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função do tempo de reação e da quantidade de suporte.

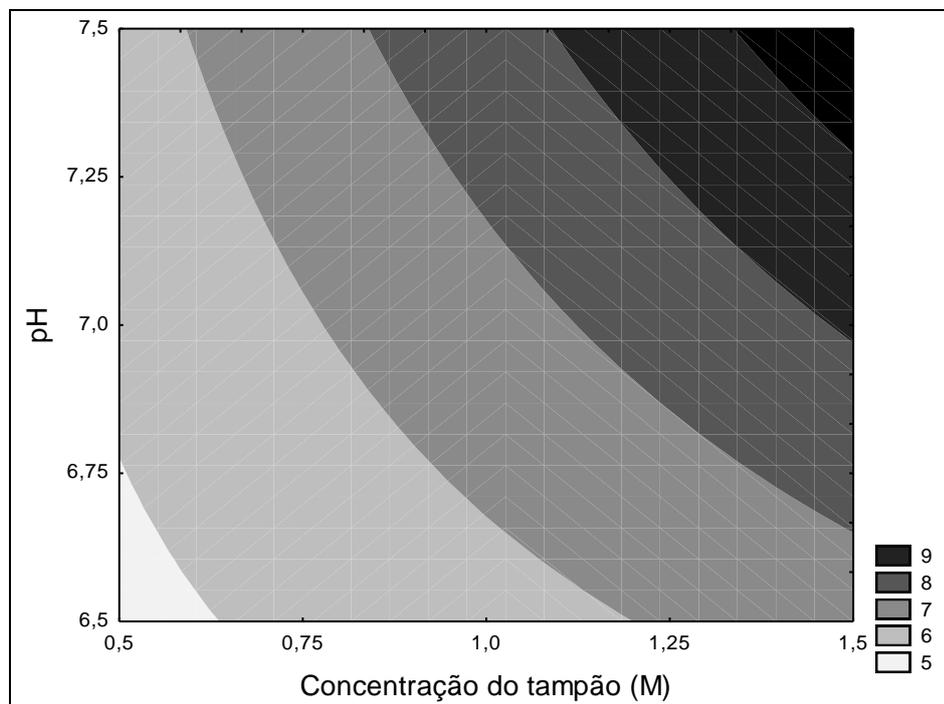


Figura 4. Curva de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função do pH e da concentração do tampão.

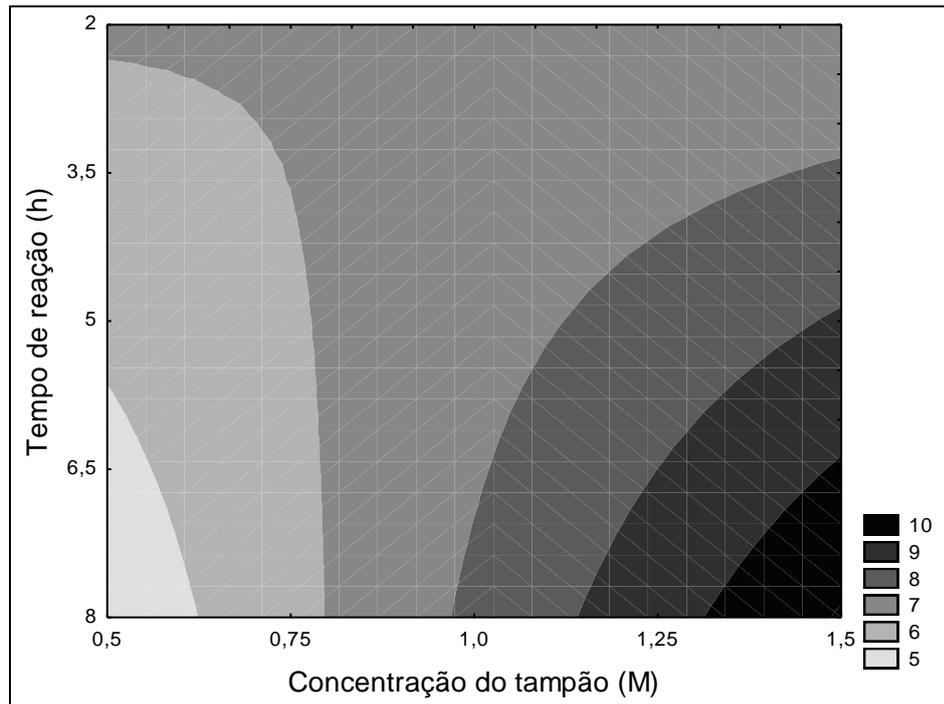


Figura 5. Curva de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função do tempo de reação e do pH.

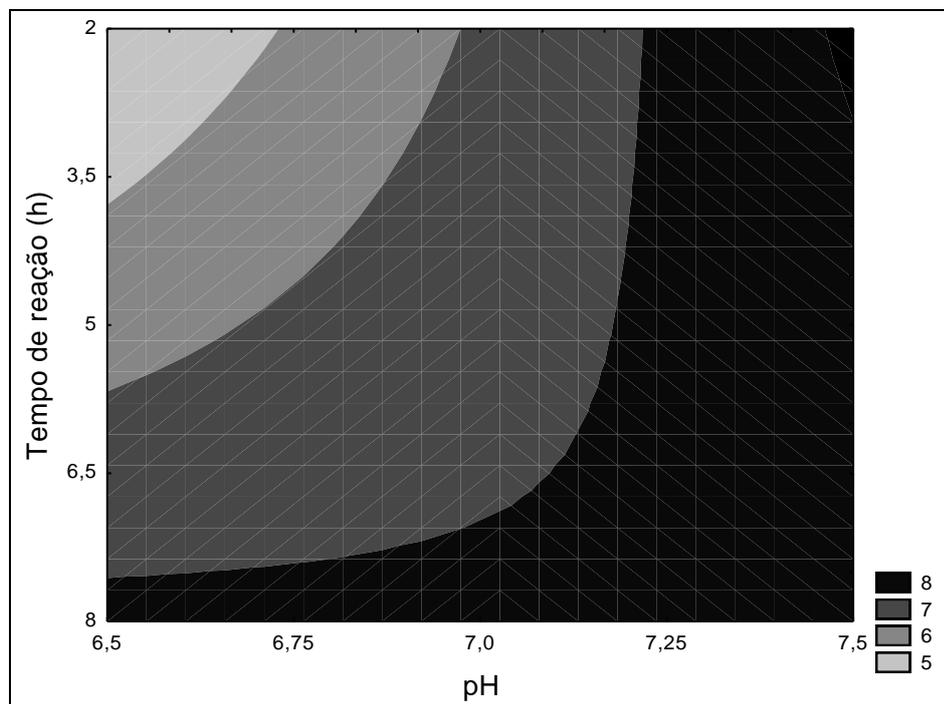


Figura 6. Curva de contorno para eficiência em atividade (%) de β -galactosidase como uma função do tempo de reação e da concentração do tampão.

Alptekin et al. (2010) ao descrever o suporte Eupergit® C, recomenda um meio reacional com alta força iônica (para forçar a adsorção hidrofóbica das proteínas) justamente por

conta da natureza hidrofóbica desse suporte. No entanto, uma alta força iônica pode causar desnaturação proteica, por isso, as faixas dessa variável devem ser cuidadosamente escolhidas para que se obtenha um equilíbrio entre uma máxima ligação enzima/suporte e uma mínima desnaturação da mesma.

A avaliação do pH considerou a desnaturação da enzima, que é maior quando se utiliza faixas extremas de pH. Através dos ensaios observou-se que um aumento no pH resultou em maiores eficiências em atividade, esse aumento teve um efeito inverso no estudo realizado por Campello et al., (2012) em que a variação de pH de 6,6 para 7,4 levou à uma diminuição média de 18,19% em rendimento de imobilização. A estreita faixa de pH utilizada pode ter acarretado nessa divergência entre os resultados obtidos e os apresentados por Campello et al., (2012).

Apesar de haver diversos trabalhos na literatura que investigam a imobilização de diferentes enzimas em Eupergit® C, são poucos os que estudaram a imobilização da enzima β -galactosidase utilizando esse suporte. Além disso, outra dificuldade para comparar os resultados é que enzimas de diferentes fontes microbianas apresentam diferentes características e propriedades.

Campello et al. (2012) investigou a imobilização da enzima β -galactosidase comercial (Lactozym 3000L) obtida de *Kluyveromyces lactis* em Eupergit® C. Altas eficiências de imobilização foi conseguida até 85%, podendo ser atribuído ao fato da enzima comercial possuir estabilizantes que favorecem a manutenção da ligação entre enzima e suporte, diferentemente da enzima obtida diretamente de cultivo ou fermentação.

A reprodutibilidade da imobilização foi avaliada a partir de três imobilizações realizadas na melhor condição alcançada nessa etapa (400 mg de suporte, tampão 1,5 M, pH 7,5 e 2 horas de tempo de reação). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Eficiência de imobilização da condição ótima do planejamento

Ensaio	Eficiência (%)	Média \pm Desvio (%)
1	15,4	
2	15,9	15,3 \pm 0,54
3	14,6	

Todos os experimentos do planejamento experimental foram realizados com uma relação fixa enzima/tampão de 1:6 e com um volume total de 10 ml (40 mg de suporte/mL de solução). A partir do melhor experimento (400 mg de suporte, tampão 1,5 M, pH 7,5 e 2 horas de tempo de reação) e considerando um ampliação de faixa da molaridade do tampão, foram realizadas cinéticas de ligação na tentativa de incrementar os valores de eficiência em atividade alcançados.

A Figura 7 mostra o comportamento da atividade enzimática adimensional da β -galactosidase na solução ao longo do tempo para os ensaios cinéticos realizados na temperatura de 10 °C.

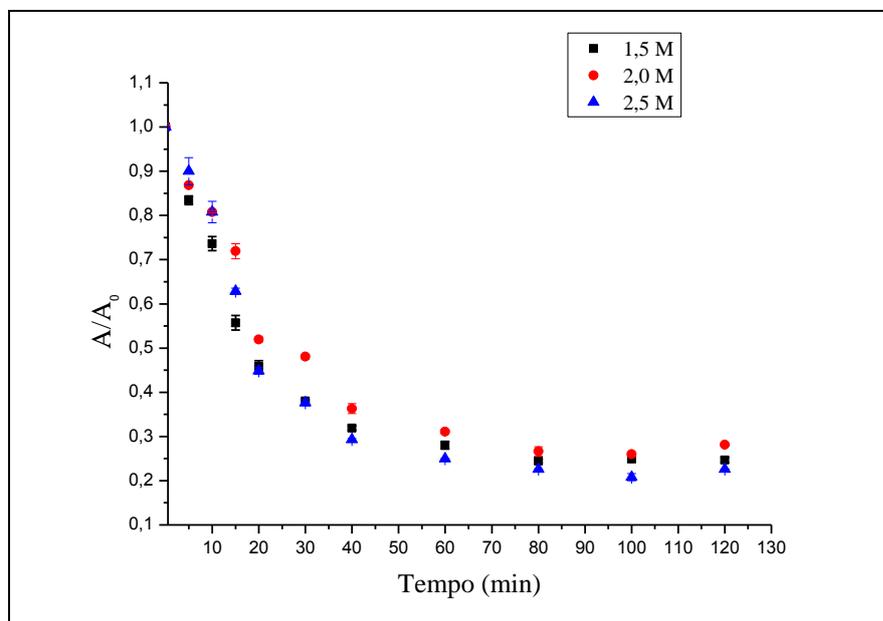


Figura 7. Cinética de ligação da β -galactosidase no suporte Eupergit® C em pH 7,5 e temperatura de 10 °C e tampão com diferentes molaridades

Observa-se que em todos os experimentos o equilíbrio foi atingido após 80 minutos, onde não há mais variação da atividade em solução, assim o processo de imobilização pode ser encerrado nesse tempo. O comportamento das curvas demonstra que a enzima possui uma alta afinidade com esse suporte, pois em apenas 5 minutos, 10 a 15 % da enzima em solução tinha sido ligada.

A Tabela 6 apresenta os resultados de capacidade de ligação no equilíbrio (Q^*) da β -galactosidase obtidos a partir dos dados das cinéticas com diferentes forças iônicas do tampão, além disso, apresenta as eficiências em atividade, de imobilização e em proteína.

A capacidade de ligação no equilíbrio (Q^*) foi estatisticamente igual para os tampões com molaridades 1,5 e 2,0 e diferentes para 2,5 M. A maior Q^* foi obtido no ensaio cinético em que o tampão apresentava molaridade 2,0 M, que foi em média 222,7 U/mg. Mesmo este não diferindo estatisticamente do ensaio com 1,5 M, apresentou menores desvios e um valor absoluto maior. Além disso, essa condição demonstrou as maiores eficiências em atividade e de imobilização, mostrando-se estatisticamente superior em relação às outras molaridades avaliadas.

Tabela 6. Resultados obtidos nos ensaios cinéticos do suporte Eupergit® C com concentrações de tampão de 1,5; 2,0 e 2,5 M

Concentração do tampão (M)	Desnaturação da β -galactosidase (%)	Q* (U.mg ⁻¹ suporte)	Eficiência em atividade (%)	Eficiência de imobilização (%)	Eficiência em proteína (%)
1,5	10,9 ^b ± 0,3	217,5 ^a ± 7,8	15,4 ^b ± 0,54	59,1 ^b ± 3,4	81,2
2,0	11,2 ^b ± 0,2	222,7 ^a ± 0,7	22,0 ^a ± 0,5	69,3 ^a ± 3,5	88,3
2,5	12,4 ^a ± 0,4	140,0 ^b ± 2,5	17,2 ^b ± 1,1	64,8 ^b ± 1,3	82,5

Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$)

Ao avaliarmos as diferentes concentrações salinas do tampão todos os resultados apresentados comprovam que a molaridade do tampão 2,0 M foi a condição mais promissora. O ensaio que utilizou o tampão 2,5 M apresentou uma maior desnaturação enzimática, que pode ter afetado a capacidade de ligação nessa condição.

A avaliação da eficiência em atividade nos fornece quanto da enzima ligada está ativa, ou seja, que reage com o substrato formando o produto. Já a eficiência de imobilização nos indica a enzima que está ligada ao suporte, mas não necessariamente ativa. A avaliação da diferença entre esses valores demonstra que nem toda a enzima ligada ao suporte estará biologicamente ativa.

Todas as respostas apresentadas são importantes e complementares, pois como se trata de imobilização de uma enzima, pode-se observar sua desnaturação quando a mesma se liga ao suporte e ainda alguns efeitos estéricos, incluindo o impedimento da ligação da enzima imobilizada com o substrato por indisponibilidade do sítio ativo, por exemplo. Esses fenômenos parecem ter ocorrido, e podem ser observados quando comparamos as respostas avaliadas.

Manta et al. (2003) avaliaram a imobilização da enzima β -galactosidase de maneira similar ao aqui proposto. Os autores consideram tanto a quantidade de proteína ligada, quanto às quantidades de enzima medida diretamente na partícula e por diferença. Essa avaliação mais ampla gera uma informação mais precisa, melhorando o entendimento do processo de imobilização.

Ates e Mehmetoglu (1997) imobilizaram a enzima β -galactosidase comercial com alginato de cálcio e cloreto de cobalto. Apesar dos autores terem alcançado uma alta eficiência de imobilização da enzima (83%) a utilização do Co^{2+} como agente formador do gel limita o uso da enzima na indústria de alimentos.

Apesar dos resultados aqui obtidos serem de grande contribuição na evolução das pesquisas da enzima β -galactosidase, estudos devem ser realizados posteriormente, buscando-se alternativas para um aumento na eficiência de imobilização dessa enzima,

como utilização de suportes que sejam mais adequados, uso de espaçadores para diminuição de efeitos estéricos, entre outras.

O uso de espaçadores na imobilização da enzima β -galactosidase foi descrito por Manta et al. (2003). Esses autores avaliaram o uso de polietileno glicol (PEG) quimicamente modificado como espaçador, resultando em uma eficiência em atividade de 33% para β -galactosidase, superior ao aqui observado. No entanto, a modificação química do PEG pode ser dispendiosa, dificultando assim, a operacionalidade da imobilização da enzima.

A reutilização da enzima é fator importante a ser considerado no processo de imobilização, principalmente se a mesma for aplicada industrialmente. O reuso da enzima β -galactosidase imobilizada em Eupergit[®] C na melhor condição estudada (quantidade de suporte: 400 mg, força iônica 2,0 M, pH 7,5 e 2 h de tempo de reação), mostrou que o sistema enzima/suporte manteve até 50% da atividade inicial após 5 ciclos de utilização, podendo então ser utilizado consecutivamente no processo industrial sem perdas por 3 ciclos (Figura 8). Esse resultado é extremamente relevante, devido à complexidade do uso industrial da β -galactosidase, por conta da sua instabilidade frente às adversidades do meio reacional e sua sensibilidade a mudanças durante os processos.

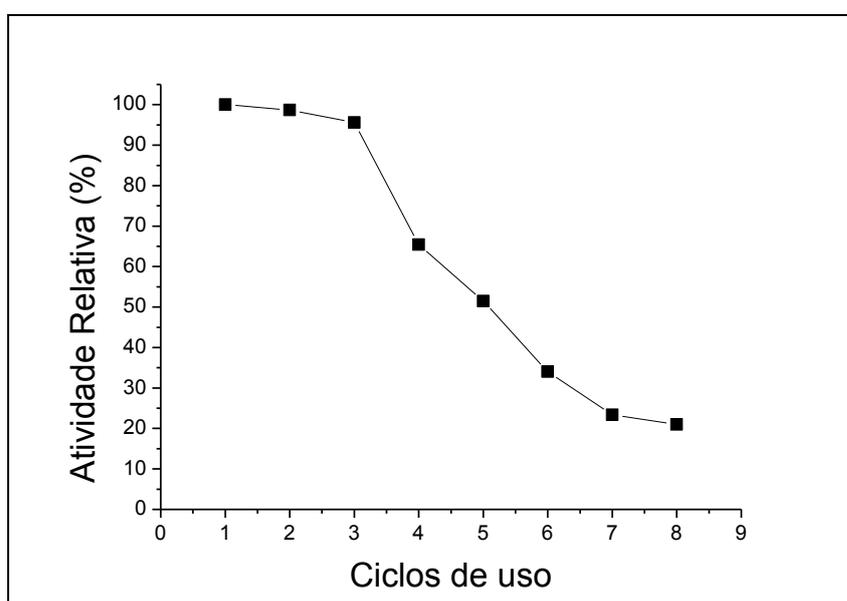


Figura 8. Reuso da enzima β -galactosidase imobilizada em Eupergit[®] C em reações de hidrólise da lactose

Ao imobilizar a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, Giacomini et al. (1998) avaliaram dois diferentes suportes quimicamente modificados (sílica e agarose) e reutilizaram a enzima imobilizada. Após um ciclo de reuso a mesma manteve apenas 25%

da atividade obtida no primeiro uso, mostrando a importância dos dados obtidos no presente trabalho.

A enzima β -galactosidase imobilizada em Eupergit® C foi caracterizada, onde a temperatura ótima da mesma foi 50 °C. Heidtmann et al. (2012) realizaram a caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio e obtiveram temperatura ótima de 45-50 °C. Ao compararmos os resultados pode-se observar que a imobilização não alterou a temperatura ótima da enzima.

O pH ótimo determinado foi 7,3, esse valor está na faixa apresentada para essa enzima por diversos autores na literatura (BURIN & BUERA, 2002; KIM et al., 2004; LADERO et al., 2000; LADERO et al., 2006).

As propriedades, como constante de desnaturação térmica (K_d) e meia vida, estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica da enzima β -galactosidase imobilizada

Temperatura (°C)	Enzima imobilizada		Enzima livre (Heidtmann et al., 2012)	
	K_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	K_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
37	0,00013	88,87	0,0015	7,7
40	0,0010	11,55	0,0063	1,8
45	0,0019	6,08	0,0775	0,1
50	0,0150	0,77		
55	0,0304	0,38		
60	0,0565	0,20		

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que, diferentemente dos dados obtidos para temperatura e pH ótimos, os quais não houve diferença entre a enzima livre e imobilizada, a constante de desnaturação térmica e meia vida das enzimas mostram diferenças. Os valores de meia vida obtidos para enzima imobilizada foram superiores em todas as temperaturas em relação aos apresentados por Heidtmann et al. (2012) para a enzima livre parcialmente purificada. Esses resultados demonstram que após a imobilização a enzima se encontra termicamente mais estável do que a enzima livre.

O parâmetro cinético K_m da enzima imobilizada foi 5,2 mM, considerando ONPG como substrato. Heidtmann et al. (2012) obtiveram K_m de 3,7 mM para a enzima livre, mostrando assim que a enzima imobilizada tem menor especificidade pelo substrato.

Geralmente, ocorre um aumento no valor de K_m após o processo de imobilização da enzima β -galactosidase (GIACOMINI et al., 1998; HAIDER & HUSAIN, 2009; ZHOU & CHEN, 2001), esses resultados também se repetiram no presente estudo e podem ser explicados pelo fato de enzimas imobilizadas não serem tão acessíveis ao substrato quanto

as enzimas livres. Portanto, uma maior concentração de substrato é necessária para aumentar sua interação com a enzima imobilizada, quando comparado com a livre. Além disso, alguns dos centros ativos são bloqueados após a imobilização o que reduz a velocidade da reação.

Conclusão

Os resultados obtidos fornecem subsídios para preencher a lacuna existente em processos para imobilizar e estabilizar de maneira eficiente a enzima β -galactosidase. A maximização da imobilização da β -galactosidase teve sua condição estabelecida utilizando Eupergit® C com 400 mg de suporte, força iônica de 2,0 M, pH 7,5 e o tempo de reação de 2 h. Nessas condições, obteve-se a eficiência de imobilização máxima de 22%. A enzima manteve até 50% da atividade inicial após 5 ciclos de utilização, podendo então ser utilizado consecutivamente no processo industrial sem perdas por 3 ciclos.

Referências

ALMEIDA, R. V.; BRANCO, R. V.; PEIXOTO, B.; LIMA, C. D. S.; ALQUERES, S. M. C.; MARTINS, O. B.; ANTUNES, O. A. C. e FREIRE, D. M. G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal** v. 39, n. 3, p. 531-537, May 1 2008.

ALPTEKIN, O.; TUKEL, S. S.; YILDIRIM, D. e ALAGOZ, D. Immobilization of catalase onto Eupergit C and its characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 64, n. 3, p. 177-183, Jul 2010.

ALVES, F. G. **Produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada.** 2008. Universidade Federal do Rio Grande.

ASRAF, S. S. e GUNASEKARAN, P. Current trends of β -galactosidase research and application. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology** v. 2, p. 880-890, 2010.

ATES, S. e MEHMETOGLU, U. A new method for immobilization of β -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. **Process Biochemistry** v. 32, n. 5, p. 433-436, Jun 1997.

BRADY, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, L. e MCHALE, A. P. Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. **Enzyme and Microbial Technology** v. 17, n. 8, p. 696-699, Aug 1995.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A. e KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food and Bioprocess Technology** v. *in press*, p. 1-11, 2012.

BURIN, L. e BUERA, M. D. β -Galactosidase activity as affected by apparent pH and physical properties of reduced moisture systems. **Enzyme and Microbial Technology** v. 30, n. 3, p. 367-373, Mar 13 2002.

CAMPELLO, G. S.; TRINDADE, R. A.; RÊGO, T. V.; BURKERT, J. F. D. e BURKERT, C. A. V. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Eupergit C and properties of the biocatalyst. **International Journal of Food Engineering** v. 8, n. 3, p. 1-19, 2012.

COGHETTO, C. C.; SCHERER, R. P.; SILVA, M. F.; GOLUNSKI, S.; PERGHER, S. B. C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. e TREICHEL, H. Natural montmorillonite as support for the

immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** v. 1, n. 4, p. 284-289, Oct 2012.

GIACOMINI, C.; VILLARINO, A.; FRANCO-FRAGUAS, L. e BATISTA-VIERA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 4, p. 313-327, 1998.

HAIDER, T. e HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by β -galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification** v. 48, n. 1, p. 576-580, Jan 2009.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C. e KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Techenology** v. 15, n. 1, p. 1-9, 2012.

INCHAURRONDO, V. A.; YAUTORNO, O. M. e VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry** v. 29, p. 47-54, 1994.

KIM, C. S.; JI, E. S. e OH, D. K. A new kinetic model of recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 316, n. 3, p. 738-743, Apr 9 2004.

LADERO, M.; RUIZ, G.; PESSELA, B. C. C.; VIAN, A.; SANTOS, A. e GARCIA-OCHOA, F. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme. **Biochemical Engineering Journal** v. 31, n. 1, p. 14-24, Aug 1 2006.

LADERO, M.; SANTOS, A. e GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology** v. 27, n. 8, p. 583-592, Nov 1 2000.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. **Food Chemistry** v. 63, n. 2, p. 147-154, Oct 1998.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technol. Biotechnol** v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.

MANTA, C.; FERRAZ, N.; BETANCOR, L.; ANTUNES, G.; BATISTA-VIERA, F.; CARLSSON, J. e CALDWELL, K. Polyethylene glycol as a spacer for solid-phase enzyme immobilization. **Enzyme and Microbial Technology** v. 33, n. 7, p. 890-898, Dec 2 2003.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M. e FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology** v. 40, n. 6, p. 1451-1463, May 2 2007.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; DE SOUZA MARTINS, D.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Ultrasonic waves and glass pearls: A new method of extraction of β -galactosidase for use in laboratory. **Quimica Nova** v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, F. O.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Purification of β -galactosidase by ion exchange chromatography: a study of the elution using an experimental design. **Chemical Engineering & Technology** v. *in press* 2012.

PAL, A.; PAL, V.; RAMANA, K. V. e BAWA, A. S. Biochemical studies of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Food Science and Technology-Mysore** v. 46, n. 3, p. 217-220, May 2009.

PESSELA, B. C. C.; LAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISENB, J. M. e FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology** v. 40, n. 2, p. 310-315, Jan 4 2007.

PINHEIRO, R.; BELO, I. e MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology** v. 37, n. 1, p. 438-442, 2003.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A. e AYUB, M. A. Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 23, p. 91-96, 1999.

RISSO, F. V. A.; MAZUTTI, M. A.; COSTA, F.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F. e RODRIGUES, M. I. Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic solutions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** v. 27, p. 507-516, 2010.

RODRIGUES, M. I. e IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos.** Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

SCHERER, R. **Estudo da imobilização de lipase comercial de pâncreas suíno em diferentes suportes inorgânicos.** 2010. Universidade Regional do Alto Uruguai e da Missões - Erechim.

ZHOU, Q. Z. K. e CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal** v. 9, p. 33-44, 2001.

**ARTIGO 4: EFEITO DE ALTAS PRESSÕES NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA
ENZIMA β -GALACTOSIDASE**

*(Effect of compressed fluids treatment on b-galactosidase
activity and stability– Artigo aceito na revista Bioprocess and Biosystems Engineering em
25/04/2012)*

EFEITO DE ALTAS PRESSÕES NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

Resumo

Enzimas quando expostas a alta pressão podem ter sua estrutura tridimensional alterada de maneira significativa, levando a desnaturação e consequente perda da atividade enzimática, porém a alta pressão também pode induzir ao aumento da estabilidade e atividade de algumas enzimas. Para se conduzir reações catalisadas por β -galactosidase a altas pressões, o comportamento da enzima em fluidos é de grande importância, considerando que a perda da atividade enzimática pode acarretar taxas de reação lentas e baixa formação de produto alvo. A β -galactosidase hidrolisa a lactose, sendo de grande importância para a indústria de alimentos podendo sintetizar galacto-oligossacarídeos. O objetivo desse estudo foi investigar o efeito do tratamento com fluidos pressurizados (dióxido de carbono, propano, *n*-butano e gás de petróleo liquefeito) na atividade e estabilidade de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, parcialmente purificada e liofilizada. O gás que melhor preservou a atividade enzimática com o decorrer do tempo foi o *n*-butano que manteve sua atividade por 120 dias enquanto a enzima não tratada e tratada com outros gases diminuiu no período estudado. A caracterização da enzima liofilizada não tratada e tratada com *n*-butano mostrou que a tratada foi mais estável termicamente, indicando que a pressurização da enzima com *n*-butano pode ser explorada para sua posterior aplicação na indústria de alimentos e em processos biotecnológicos.

Palavras chaves: dióxido de carbono, *Kluyveromyces marxianus*, *n*-butano, propano, GLP.

Introdução

β -Galactosidase (EC 3.2.1.23) é uma enzima que catalisa a hidrólise da lactose (dissacarídeo encontrada em leite em abundância) em glicose e galactose. Tem grande potencial devido a várias aplicações na indústria alimentícia e de laticínios envolvendo ingredientes com teores reduzidos de lactose (GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Entre as diversas aplicações da β -galactosidase, sua utilização principal inclui a melhoria da tecnológica e as características sensoriais dos alimentos, aumentando a sua solubilidade, a formação de galacto-oligossacarídeos (GOS), melhoria na assimilação de alimentos que contenham lactose para populações com intolerância a esse açúcar e a conversão de soro de leite em diferentes produtos com valor agregado (USTOK et al., 2010).

A produção de GOS pode ser considerada a principal aplicação industrial da enzima β -galactosidase. GOS são oligossacarídeos não digeríveis compostos de 2-20 moléculas de galactose e uma de glicose, que são reconhecidos como prebióticos uma vez que podem estimular a proliferação tanto de bactérias ácido-lácticas quanto de bifidobactérias no intestino humano. Por esta razão, muita atenção tem sido dada para a produção de GOS, especialmente pela via enzimática de transgalactosilação, uma vez que a síntese química de GOS é muito dispendiosa (HSU et al., 2007b).

β -Galactosidases são encontrados numa grande variedade de fontes - vegetal, animal e microbiana - e as características da enzima obtida variam de acordo com a sua origem. As β -galactosidases mais interessantes tecnologicamente são produzidas pelas leveduras do gênero *Kluyveromyces* e as mesmas são intracelulares. Sua síntese é induzida por galactose, reprimida por glicose e são obtidas principalmente através de cultivo submerso (LADERO et al., 2000).

A atividade e estabilidade térmica das enzimas são influenciadas por diversos fatores ambientais (temperatura, pH, meio de reação, agitação), o que pode afetar fortemente a estrutura tridimensional específica ou conformação espacial da proteína (JURADO et al., 2004).

Tem sido demonstrado que o uso de fluidos pressurizados pode ser uma alternativa aos convencionais solventes orgânicos, principalmente por conta de serem mais ecologicamente corretos. Os primeiros relatos de reações catalisadas por enzimas em fluidos supercríticos (CENI et al., 2010; KNEZ & HABULIN, 2002; KUHN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2006a) abriram um grande número de possibilidades para alterar alguns processos catalíticos. As vantagens de usar fluidos pressurizados ao invés de solventes orgânicos líquidos como meio de reação tem sido discutidas na literatura (KNEZ & HABULIN, 2002; OLIVEIRA et al., 2006b; OLIVEIRA et al., 2006a).

O CO₂ tem sido o fluido pressurizado mais amplamente estudado como meio solvente para as reações de enzimas. No entanto, uma grande desvantagem dessas aplicações pode ser atribuída a não polaridade do dióxido de carbono, que pode levar a uma dissolução incompleta de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos, afetando a atividade da enzima de forma negativa. No entanto, o CO₂ não é a única opção de fluido pressurizado em processos de biocatálise, outros fluidos como propano e *n*-butano também tem sido utilizados (CENI et al., 2010; KUHN et al., 2010; MANERA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2006a).

A fim de realizar as reações catalisadas por β -galactosidase a altas pressões, o comportamento da enzima frente a fluidos pressurizados é de extrema importância desde que a perda de atividade enzimática pode conduzir a baixas taxas de reação bem como reduzido rendimento dos produtos alvo. A estabilidade e atividade da enzima podem

dependem da própria enzima, das características do fluido pressurizado e de como o processo é conduzido. Além disso, a aplicação desse tipo de estudo em β -galactosidase não comercial aumenta a importância da avaliação de fluidos não convencionais sobre a atividade enzimática da mesma.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do tratamento com fluidos pressurizados (dióxido de carbono, propano, *n*-butano e gás liquefeito de petróleo – GLP) na atividade e estabilidade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 liofilizada.

Material e Métodos

Micro-organismo

O micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, depositado na Fundação Andre Tosello – Coleção de Culturas Tropicais (Campinas-SP, Brasil), foi selecionado previamente por Manera et al., (2008) como melhor produtor da enzima β -galactosidase.

Preparo do Inóculo

O inóculo onde o micro-organismo foi cultivado foi composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (1,0), (NH₄)₂SO₄ (1,2), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (10,0), preparado em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 5,5 (PINHEIRO et al., 2003). As condições de cultivo foram 30 °C, 180 rpm por 24 h (MANERA et al., 2008).

Produção da enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase foi produzida através de cultivo submerso em Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de meio de cultura otimizado por Manera et al., (2008) em agitador orbital, a 30 °C, 180 rpm por 96 h.

Extração da Enzima

O extrato enzimático foi distribuído em frascos de 50 mL contendo 25 mL de suspensão celular (40 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato de potássio 50 mM com MnCl₂.4H₂O 0,1 mM, pH 6,6) (MEDEIROS et al., 2012) e 27,5 g de pérolas de vidro (*r*<0,4 mm), respeitando uma relação 1 mL de suspensão celular e 1,1 g de pérolas de vidro (MEDEIROS et al., 2008). A suspensão foi agitada por 40 min em agitador tipo vórtex com intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo, obtendo-se o extrato bruto com células. Para obtenção do extrato bruto clarificado, a suspensão celular foi centrifugada sob refrigeração (5200 x g) por 10 min a 4 °C e o sobrenadante, livre de células, utilizado nas etapas posteriores.

Purificação da enzima β -galactosidase por precipitação com sulfato de amônio

Para a obtenção da enzima purificada foi utilizado o método de precipitação com sulfato de amônio. O extrato enzimático foi acrescido de sulfato de amônio em percentual de saturação de 70%. O meio precipitado foi centrifugado a 4 °C por 30 min, 5200 \times g e separado o meio sobrenadante do precipitado (HEIDTMANN et al., 2012). O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio 50 mM com $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM pH 6,6, depois foi realizado o processo de diálise para remoção do sal utilizando-se o mesmo tampão de ressusensão. Para o processo de liofilização a solução de enzima parcialmente purificada foi transferida para placas de Petri (9 cm de diâmetro, com filme líquido de 0,5 cm) e congelada por 24 h a -80 °C. As placas foram colocadas no liofilizador (Modulyo D, Thermo Scientific) e liofilizadas até um teor de umidade de 3% (FRICKS et al., 2006).

Tratamento da enzima a alta pressão

O equipamento utilizado, apresentado na Figura 1, (em todos os experimentos para avaliação da atividade da enzima expostos a alta pressão) consistiu basicamente de um reservatório de solvente, dois banhos termostáticos, uma bomba de injeção (ISCO 260D) e um reator de tratamento.

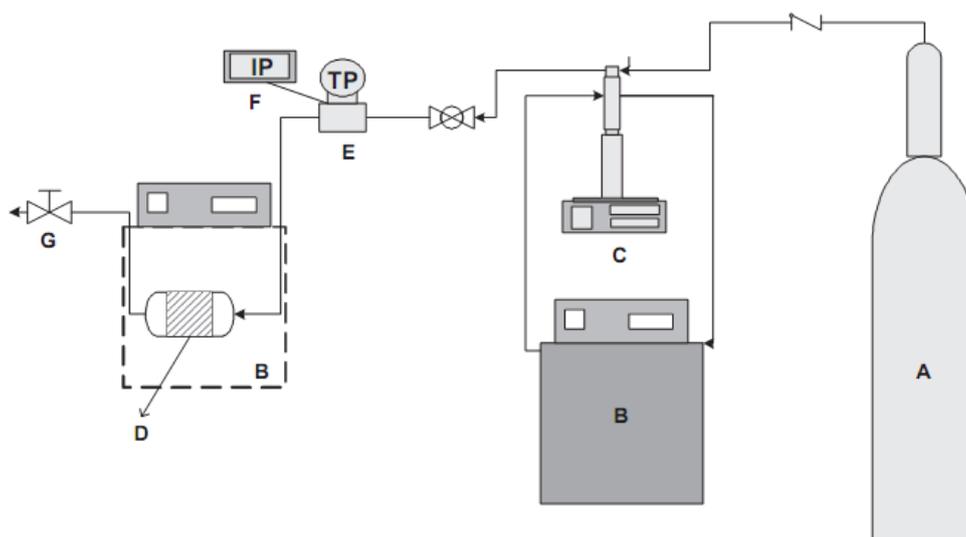


Figura 1. Diagrama esquemático do aparato para o tratamento da enzima com fluidos pressurizados: (A) reservatório do solvente; (B) banho termostático; (C) bomba de injeção; (D) reator de tratamento; (E) transdutor de pressão; (F) indicador de pressão e (G) válvula micrométrica.

A enzima liofilizada foi alimentada no reator. Posteriormente, o sistema foi pressurizado e mantido a temperatura e pressão constantes por um tempo pré-estabelecido. Após o tempo de tratamento o sistema foi despressurizado e a atividade enzimática foi medida. A atividade residual foi definida como a relação da atividade enzimática antes do tratamento (inicial) e depois do tratamento (final) com o fluido pressurizado.

Para avaliar os efeitos dos fluidos pressurizados na atividade da enzima β -galactosidase submetidos a dióxido de carbono, propano e *n*-butano pressurizados, foram avaliadas as condições previamente determinadas por Manera et al. (2011), apresentadas na Tabela 1. O GLP não tinha sido, até então, avaliado para o tratamento da enzima β -galactosidase, portanto, um planejamento experimental completo 2^3 foi utilizado (Tabela 2). Os ensaios foram realizados à temperatura fixa de 37 °C. O tempo de exposição (t) foi variado entre 1 e 6 h, a taxa de despressurização (R) de 20-100 bar.min⁻¹ e a pressão do sistema (P) de 30-270 bar. As atividades enzimáticas foram determinadas antes (atividade inicial) e após (atividade final), o processo de tratamento com fluidos pressurizados, tal como anteriormente descrito.

Caracterização da enzima

Foram determinadas algumas propriedades enzimáticas e os parâmetros cinéticos da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, parcialmente purificada e tratada com *n*-butano. As enzimas foram caracterizadas quanto ao pH ótimo, temperatura ótima, temperatura de estabilidade; e foram determinados os parâmetros cinéticos (K_m) para o substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG).

Determinação do pH ótimo

Para o estudo da influência do pH na atividade enzimática a 37 °C, foram utilizados quatro tampões: tampão citrato fosfato 0,1 M (pH 2,6; 4,6; 6,3), tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 3,6; 4,6; 5,6), tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,3; 7,3; 8,0) e tampão tris-HCl 0,1 M (pH 7,3; 8,0; 9,0).

Determinação da temperatura ótima

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada através da atividade de β -galactosidase nas temperaturas de 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60 °C, mantendo o pH fixo no de análise (tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,6).

Cinética da desnaturação térmica e determinação da energia de desnaturação

No sentido de investigar a cinética de desnaturação térmica da β -galactosidase, o extrato enzimático livre de células foi incubado em diferentes temperaturas (35, 37, 40, 45, 50 e 55 °C). Alíquotas foram retiradas e resfriadas em intervalos de tempos pré-determinados para os ensaios. A atividade residual foi expressa em percentual em relação à atividade inicial. A partir de um gráfico de logaritmo semi-natural da atividade versus tempo, a constante de desnaturação (K_d) foi calculada e as meia-vidas foram estimadas usando a equação 1. A meia vida ($t_{1/2}$) é definida como o tempo no qual a atividade residual atinge 50%.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (1)$$

A dependência da temperatura do K_d foi analisada usando o gráfico de Arrhenius. A energia de desnaturação foi calculada a partir da equação de Arrhenius como sendo:

$$\ln K_d = \ln A - \frac{E_d}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (2)$$

Onde E_d é a energia de desnaturação do estado de transição da desnaturação enzimática, A é uma constante e R é a constante universal dos gases.

O valor da energia de desnaturação (E_d) foi estimado através da intercessão do gráfico entre $\ln(K_d)$ e $1/T$.

Determinação de K_m

A cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas segue Micaelis-Menten (Equação 3).

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (3)$$

O K_m foi calculado usando Lineweaver Burk (Equação 4), gráfico de $1/V$ versus $1/S$ foram plotados com diferentes substratos. A determinação foi realizada utilizando ONPG (1-10 mM) como substrato.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4)$$

Determinação da biomassa

A concentração de célula foi medida por densidade ótica a 620nm, e convertida para gramas de célula seca por litro conforme curva padrão (RECH et al., 1999).

Determinação da atividade enzimática

A atividade da β -galactosidase foi determinada usando como substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) (INCHAURRONGO et al., 1994). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio.

Resultados e Discussão

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados obtidos pelo tratamento com os diferentes fluidos pressurizados na atividade na enzima β -galactosidase. A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento experimental 2³, realizado a fim de avaliar os efeitos das variáveis do processo (pressão, tempo de reação e despressurização) na atividade da enzima β -galactosidase tratada com GLP.

Na Tabela 2, verifica-se o planejamento experimental que foi realizado avaliando, simultaneamente, as variáveis nos intervalos mais utilizados para reações catalisadas por enzimas em fluidos pressurizados, a faixa ótima de atividade da enzima e os limites operacionais do equipamento (FRICKS et al., 2006; KUHN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2006b; OLIVEIRA et al., 2006a). Percebe-se que em nenhum dos ensaios foi observado um aumento na atividade da enzima após o tratamento com GLP pressurizado e a atividade residual variou 32,1 a 93,8%.

Manera et al. (2010) investigaram o efeito de fluidos pressurizados no tratamento de β -galactosidase de células permeabilizadas de *K. marxianus* CCT 7082. Os autores obtiveram atividades residuais variando de 111-211%, utilizando diferentes fluidos pressurizados. Estes valores elevados podem ter sido alcançados devido ao efeito protetor causado pela célula permeabilizadas em torno da enzima.

A fim de avaliar os efeitos das principais variáveis estudadas na atividade enzimática, os dados apresentados na Tabela 2 foram estatisticamente tratados, utilizando-se um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). A Tabela 3 mostra os efeitos destas variáveis na atividade de β -galactosidase após o tratamento com GLP, como se pode observar, a variável que apresenta a maior influência no comportamento da enzima é taxa de despressurização, que mostrou um efeito positivo, indicando que, nas condições do presente estudo, uma maior taxa de despressurização leva a um aumento na atividade da β -galactosidase ($p < 0,05$).

Além dos resultados obtidos com GLP pressurizado, também foram realizados ensaios nas condições previamente determinadas por Manera et al. (2010) utilizando três diferentes fluidos pressurizados (CO₂, propano e *n*-butano) e os resultados são mostrados na Tabela 1.

A partir dos dados apresentados na Tabela 1, é possível concluirmos que o maior aumento na atividade da β -galactosidase foi observado quando tratamos a mesma com *n*-butano. O tratamento com dióxido de carbono levou a uma perda de quase 30%, considerando a atividade inicial, por outro lado o propano pressurizado ocasionou uma melhoria modesta na atividade enzimática.

Tabela 1. Efeito de diferentes fluidos pressurizados na atividade da enzima β -galactosidase

Fluido pressurizado	Pressão	Tempo de reação	Despressurização	Atividade residual (%)
CO ₂	75 bar	1 h	10 kg/m ³ .min	71,7
Propano	30 bar	1 h	50 bar/min	103,2
<i>n</i> -Butano	10 bar	1 h	2 bar/min	109,6

Tabela 2. Matriz do planejamento completo (valores reais e codificados) com a resposta em termos de atividade de β -galactosidase submetida à GLP pressurizado

Ensaio	P (bar)	t (h)	R (bar/min)	Atividade enzimática residual (%)
1	30 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	32,1
2	270 (+1)	1 (-1)	20 (-1)	88,6
3	30 (-1)	6 (+1)	20 (-1)	36,3
4	270 (+1)	6 (+1)	20 (-1)	45,8
5	30 (-1)	1 (-1)	100 (+1)	61,6
6	270 (+1)	1 (-1)	100 (+1)	93,8
7	30 (-1)	6 (+1)	100 (+1)	87,5
8	270 (+1)	6 (+1)	100 (+1)	66,8
9	150 (0)	3,5 (0)	60 (0)	78,2
10	150 (0)	3,5 (0)	60 (0)	79,3
11	150 (0)	3,5 (0)	60 (0)	78,6

Tabela 3. Efeitos das variáveis de processo na atividade de β -galactosidase submetida à GLP pressurizado

GLP	Efeito	Erro padrão	t (2)	p
Média	68,0545	0,167874	405,3896	0,000006
(1) P (bar)	19,3750	0,393700	49,2125	0,000413
(2) t (min)	-9,9250	0,393700	-25,2095	0,001570
(3) R (bar/min)	26,7250	0,393700	67,8816	0,000217

Manera et al. (2010) mostraram que a atividade da enzima se altera dependendo das condições experimentais investigadas. Propano foi o fluido pressurizado que levou a um maior aumento da atividade. Diferindo dos dados obtidos no presente trabalho, que mostrou o *n*-butano como o fluido pressurizado mais promissor para manter a atividade enzimática.

A literatura consultada apresenta poucos estudos de tratamento com fluidos pressurizados para β -galactosidase, mas alguns autores utilizaram esta estratégia para outras enzimas, como segue. Kuhn et al. (2011) avaliaram o efeito do tratamento com

fluidos pressurizados sobre a atividade enzimática de inulinase de *K. marxianus* NRRL Y-757 imobilizada. Resultados mostraram que propano e GLP pressurizados melhoraram a atividade enzimática, alcançando atividades residuais de 200,7 e 218,7%, respectivamente.

Fricks et al. (2006) avaliaram a influência de CO₂ pressurizado sobre a atividade específica da enzima peroxidase. Os resultados mostraram que as atividades residuais variaram de 79,1 a 214,8%. O menor tempo de exposição foi mais eficaz para aumentar a atividade específica da enzima. Este fato foi também observado no presente estudo.

Oliveira et al. (2006a) estudaram a influência da temperatura, pressão, tempos de exposição e taxa de despressurização na atividade de lipase não comercial imobilizada a partir de *Yarrowia lipolytica* e submetida ao tratamento com diferentes fluidos pressurizados (dióxido de carbono, propano e *n*-butano. Os resultados apresentados mostraram que ocorreu perdas de atividade quando o tratamento foi conduzido com dióxido de carbono, corroborando os resultados apresentados neste estudo, enquanto que perdas insignificantes foram observadas na utilização propano e *n*-butano.

Estudos utilizando técnicas de imobilização também são realizados para aumentar a estabilidade da enzima β -galactosidase. Dwevedi e Kayastha (2009b) avaliaram a imobilização de β -galactosidase de ervilhas em pérolas de Sephadex e quitosana e como parte dos resultados apresentaram a estabilidade de armazenamento da enzima. Durante o tempo de estudo (10 dias), não houve perda na atividade da enzima imobilizada. Em nosso estudo, a enzima tratada com *n*-butano manteve a atividade por 120 dias.

Com base nos resultados apresentados na literatura, num sentido geral, pode-se inferir que a atividade da enzima após tratamento com fluidos pressurizados depende significativamente da enzima utilizada, bem como das condições experimentais aplicadas, ou seja, tempo de exposição, taxa de despressurização e pressão do sistema. Por isso, é extremamente importante avaliar cada enzima em condições específicas, a fim de maximizar sua aplicação industrial.

Para avaliar se o tratamento com *n*-butano melhora as características e propriedades enzimáticas da β -galactosidase, foi realizada a caracterização e determinação das propriedades cinéticas da enzima parcialmente purificada e da enzima tratada com *n*-butano.

Foi realizada a determinação da atividade ótima da enzima parcialmente purificada não tratada e da enzima parcialmente purificada e tratada com *n*-butano. A temperatura ótima para ambas as enzimas estudadas foi de 45 °C. O pH ótimo também foi determinado e para ambas as enzimas, o mesmo foi de 7,3. Esses resultados não mostram variação nesses parâmetros após o tratamento a altas pressões com o *n*-butano.

Outras propriedades, como constante de desnaturação térmica (K_d) e meia vida, foram estudadas e estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica da enzima β -galactosidase liofilizada de *K. marxianus* CCT 7082 tratada e não tratada com *n*-butano

Temperatura (°C)	K_d (min ⁻¹)		$t_{1/2}$ (h)	
	Enzima não tratada	Enzima tratada	Enzima não tratada	Enzima tratada
37	0,0022	0,00008	5,25	144,4
40	0,0092	0,0005	1,26	23,1
45	0,0898	0,0021	0,13	5,5
50	0,3259	0,0446	0,03	0,3
55	0,7179	0,1219	0,02	0,1

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que, diferentemente dos dados obtidos para temperatura e pH ótimos, os quais não houve diferença entre a enzima com e sem tratamento com *n*-butano, a constante de desnaturação térmica e meia vida das enzimas mostram diferenças. A meia vida em todas as temperaturas avaliadas foi maior para a enzima tratada que para a enzima não tratada mostrando uma tendência de maior estabilidade térmica posterior à pressurização com *n*-butano. Isso pode ser atribuído a alguma mudança na conformação da enzima acarretada pela alta pressão.

Para avaliarmos a especificidade da enzima com e sem tratamento foi determinado K_m para ambas as enzimas. O K_m foi de 7,6 e 2,7 para enzima não tratada e tratada, respectivamente. Após o tratamento com o *n*-butano houve uma diminuição do valor de K_m e, portanto, um aumento na especificidade da enzima.

As energias de desativação (E_d) de β -galactosidases de CCT 7082 não tratada e tratada com *n*-butano foram 275,6 e 342,4 kJ.mol⁻¹, respectivamente.

Após a etapa de tratamento de alta pressão utilizando diferentes fluidos pressurizados, tanto a enzima β -galactosidase tratada utilizando os diferentes fluidos pressurizados, bem como a enzima sem qualquer tratamento foram mantidas a 4 ° C e foram avaliadas quanto a sua estabilidade durante o tempo. A Figura 2 apresenta os resultados obtidos, sendo possível verificar-se que a atividade diminui gradualmente ao longo do tempo para a enzima tratada com GLP e propano, enquanto que a enzima tratada com *n*-butano manteve 96% da sua atividade inicial após tratamento de alta pressão por 120 dias.

Em relação ao CO₂, pode-se observar que houve uma redução de cerca de 40% na atividade inicial com tratamento com alta pressão após 90 dias. No entanto, é notório que, em geral, atividades residuais das enzimas tratadas em alta pressão foram sempre mais elevadas do que as apresentadas na amostra não tratada, exceto quando consideramos o GLP. Após 60 dias, enzima tratada com GLP teve um decréscimo mais rápido na atividade enzimática do que a enzima não tratada.

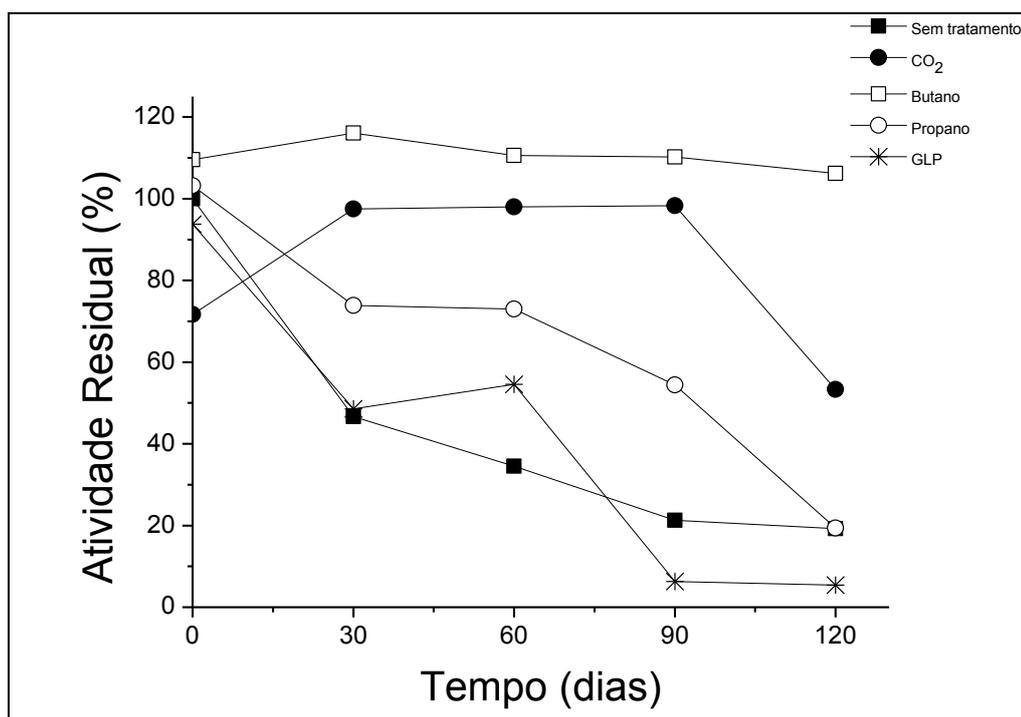


Figura 2. Estabilidade enzimática após o tratamento a altas pressões

A melhora na estabilidade pode ser comprovada quando avaliamos os dados apresentados na Tabela 4, pelo aumento na meia-vida, considerando a diferentes temperaturas avaliadas, de pelo menos 10 vezes após o tratamento com *n*-butano. Tais resultados são de grande importância tecnológica, uma vez que o tratamento de fluidos pressurizados, principalmente com *n*-butano, pode ser utilizado como etapa de processo para melhorar a estabilidade da enzima.

Conclusão

O presente trabalho mostrou a importância da avaliação de diferentes gases na pressurização de bioprodutos com o intuito de melhorar sua estabilidade de armazenamento.

Por meio da caracterização realizada foi verificado que a enzima tratada com *n*-butano foi mais estável termicamente que a enzima sem tratamento a altas pressões, indicando que a pressurização da enzima com *n*-butano pode ser explorada para sua posterior aplicação na indústria de alimentos e em processos biotecnológicos.

Referências

CENI, G.; DA SILVA, P. C.; LERIN, L.; CHARIN, R. M.; OLIVEIRA, J. V.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G. e DE OLIVEIRA, D. Enzyme-catalyzed production of 1-glycerol benzoate in compressed n-butane. **Enzyme and Microbial Technology** v. 46, n. 6, p. 513-519, May 5 2010.

DWEVEDI, A. e KAYASTHA, A. M. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology** v. 100, n. 10, p. 2667-2675, May 2009.

EISENMENGER, M. J. e REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: A review. **Enzyme and Microbial Technology** v. 45, n. 5, p. 331-347, Nov 5 2009.

FRICKS, A. T.; SOUZA, D. P. B.; OESTREICHER, E. G.; ANTUNES, O. A. C.; GIRARDI, J. S.; OLIVEIRA, D. +. e DARIVA, C. Evaluation of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide. **J.of Supercrit.Fluids** v. 38, n. 3, p. 347-353, Oct 2006.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C. e KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Techenology** v. 15, n. 1, p. 1-9, 2012.

HSU, C. A.; LEE, S. L. e CHOU, C. C. Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. **J.Agric.Food Chem.** v. 55, p. 2225-2230, 2007.

INCHAURRONDO, V. A.; YAUTORNO, O. M. e VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium.

Process Biochemistry v. 29, p. 47-54, 1994.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G. e VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and**

Microbial Technology v. 34, n. 1, p. 33-40, Jan 5 2004.

KNEZ, Z. e HABULIN, M. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. **J.of Supercrit.Fluids** v. 23, n. 1, p. 29-42, May 1 2002.

KUHN, G. O.; COGHETTO, C.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D. e OLIVEIRA, J. V. Effect of compressed fluids treatment on the activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 immobilized in montmorillonite. **Process Biochemistry** v. *in press*, n. 0 2011.

KUHN, G.; MARANGONI, M.; FREIRE, D. M. G.; SOARES, V. R. F.; DE GODOY, M. G.; DE CASTRO, A. M.; LUCCIO, M. D.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D. +. e OLIVEIRA, J. V. Esterification activities of non-commercial lipases after pre-treatment in pressurized propane. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology** v. 85, n. 6, p. 839-844, 2010.

LADERO, M.; SANTOS, A. e GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology** v. 27, n. 8, p. 583-592, Nov 1 2000.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. **Food Chemistry** v. 63, n. 2, p. 147-154, Oct 1998.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technol. Biotechnol** v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.

MANERA, A. P.; KUHN, G.; POLLONI, A.; MARANGONI, M.; ZABOT, G.; KALIL, S. J.; OLIVEIRA, D. D.; TREICHEL, H.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; MAZUTTI, M. A. e MAUGERI, F. Effect of compressed fluids treatment on the activity, stability and enzymatic reaction performance of β -galactosidase. **Food Chemistry** v. 125, n. 4, p. 1235-1240, Apr 15 2011.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; DE SOUZA MARTINS, D.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Ultrasonic waves and glass pearls: A new method of extraction of β -galactosidase for use in laboratory. **Quimica Nova** v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, F. O.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Purification of β -galactosidase by ion exchange chromatography: a study of the elution using an experimental design. **Chemical Engineering & Technology** v. *in press* 2012.

OLIVEIRA, D. **Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solventes orgânicos e CO₂ supercrítico**. 1999. Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, A. C.; DARIVA, C.; CUNHA, A. G.; BEVILAQUA, J. V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V. e FREIRE, D. Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 39, n. 1-4, p. 117-123, May 2 2006a.

OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C. e OLIVEIRA, J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **J. of Supercrit. Fluids** v. 38, n. 3, p. 373-382, Oct 2006b.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A. e AYUB, M. A. Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 23, p. 91-96, 1999.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L. e RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 24, p. 567-572, 2004.

USTOK, F. I.; TARI, C. e HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry** v. 119, n. 3, p. 1114-1120, Apr 1 2010.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÕES GERAIS

4. CONCLUSÕES GERAIS

A purificação da enzima em única etapa cromatográfica foi realizada obtendo fator de purificação e rendimento maximizados e com isso reduziu-se o número de etapas necessárias do processo de “*downstream*” permitindo a disseminação do uso de β -galactosidase purificada.

Os resultados obtidos com a caracterização da enzima bruta e purificada confirmam a importância da purificação enzimática para o aumento da sua estabilidade térmica. As enzimas purificadas de ambas as cepas estudadas também apresentaram melhores propriedades cinéticas e termodinâmicas. Dependendo do produto a que se destina, a enzima pode ser utilizadas em diferentes graus de purificação, pode-se perceber através dos resultados obtidos que a enzima parcialmente purificada pode ser utilizada em alimentos para intolerantes à lactose e produção de galacto-oligossacarídeos, já a enzima purificada por cromatografia de troca iônica pode ter uma aplicação mais fina como para fármacos.

Os estudos de imobilização permitiram maximizar a eficiência desse processo quando se utilizou Eupergit® C como suporte. Verificou-se um aumento na estabilidade térmica da enzima imobilizada em relação à livre, mostrando que a imobilização é essencial para aplicação industrial da mesma. Além disso, o estudo do reuso mostrou que a enzima manteve até 50% da atividade inicial após 5 ciclos de utilização e pode ser utilizada consecutivamente no processo industrial sem perdas por 3 ciclos.

O uso de altas pressões na enzima β -galactosidase mostrou a importância da avaliação de diferentes fluidos na pressurização de bioprodutos com o intuito de melhorar sua estabilidade de armazenamento. Por meio da caracterização realizada pode-se perceber que a enzima tratada com *n*-butano foi mais estável termicamente que a enzima sem tratamento a altas pressões, indicando que a pressurização da enzima com *n*-butano pode ser explorada para sua posterior aplicação na indústria de alimentos e em processos biotecnológicos.

5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a síntese de GOS após cada etapa estudada.
- Avaliar as mudanças estruturais após tratamento com fluidos pressurizados.
- Avaliar outras condições e suportes de imobilização.
- Avaliar a possibilidade de reutilização do suporte Eupergit® C.
- Estudar diferentes agentes estabilizantes (polióis, açúcares, etc) para melhorar a aplicabilidade industrial da enzima β -galactosidase. Imobilizar a enzima estabilizada.
- Imobilização da enzima em modo contínuo.
- Imobilização da enzima β -galactosidase em nanoestruturas.
- Avaliar a ação de espaçadores para o aumento da eficiência de imobilizadas em termos de atividade.

CAPÍTULO V
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, R.; MARCEL, S.; ARCALIS, E.; ALTMANN, F.; FEVEREIRO, P. e STOGER, E. Plants as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. **Journal of Biotechnology** v. 120, n. 1, p. 121-134, 2005.
- ADHIKARI, S.; MANTHENA, P. V.; SAJWAN, K.; KOTA, K. K. e ROY, R. A unified method for purification of basic proteins. **Analytical Biochemistry** v. 400, n. 2, p. 203-206, 2010.
- AFFLECK, R. A.; RUSSEL, A. J.; KAMAT, S. V. E. e CLARK, D. S. High pressure EPR studies of protein mobility in reversed micelles. **Biotechnology and Bioengineering** v. 43, n. 4, p. 342-348, 1994.
- AGUILAR, O.; ALBITER, V.; SERRANO-CARREN, L. e RITO-PALOMARES, M. Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase processes for the partial purification of penicillin acylase produced by *E. coli*. **Journal of Chromatography B** v. 835, n. 1-2, p. 77-83, 2006.
- AHAMED, T.; CHILAMKURTHI, S.; NFOR, B. K.; VERHAERT, P. D. E. M.; VAN DEDEM, G. W. K.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; EPPINK, M. H. M.; VAN DE SANDT, E. J. A. X. e OTTENS, M. Selection of pH-related parameters in ion-exchange chromatography using pH-gradient operations. **Journal of Chromatography A** v. 1194, n. 1, p. 22-29, 2008.
- AKTAS, N.; BOYACI, I. H.; MUTLU, M. e TANYOLAC, A. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). **Bioresource Technology** v. 97, n. 18, p. 2252-2259, 2006.
- ALAGOZ, D.; YILDIRIM, D.; ALPTEKIN, O. e TUKEL, S. S. Immobilization and Characterization of Hydroxynitrile Lyase From *Prunus armeniaca* onto Eupergit Supports. **Journal of Biotechnology** v. 150, Supplement, n. 0, p. 380, 2010.
- ALCÂNTARA, P. H. N.; MARTIM, L.; SILVA, C. O.; DIETRICH, S. M. C. e BUCKERIDGE, M. S. Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaeacourbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 44, p. 619-627, 2006.
- ALMEIDA, R. V.; BRANCO, R. V.; PEIXOTO, B.; LIMA, C. D. S.; ALQUERES, S. M. C.; MARTINS, O. B.; ANTUNES, O. A. C. e FREIRE, D. M. G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: isotherms, hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal** v. 39, n. 3, p. 531-537, 2008.

ALPTEKIN, O.; TUKEL, S. S.; YILDIRIM, D. e ALAGOZ, D. Immobilization of catalase onto Eupergit C and its characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 64, p. 177-183, 2010.

ALVES, F. G. **Produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada.** 2008. Universidade Federal do Rio Grande.

ALVES, F. G.; MAUGERI, F.; BURKERT, J. F. M. e KALIL, S. J. Maximization of β -galactosidase production: a simultaneous investigation of agitation and aeration effects. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 160, p. 1528-1539, 2010.

ANDRADE, J. M.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; ANTUNES, O. A. C. e DARIVA, C. Effect of treatment with compressed CO₂ and propane on d-hydantoinase activity. **The Journal of Supercritical Fluids** v. 46, n. 3, p. 342-350, 2008.

ANSARI, S. A. e HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food and Bioproducts Processing** v. 90, n. 2, p. 351-359, 2012.

ANSPACH, F. B.; CURBELO, D.; HARTMANN, R.; GARKE, G. e DECKWER, W. D. Expanded-bed chromatography in primary protein purification. **Journal of Chromatography A** v. 865, p. 129-144, 1999.

ARTOLOZAGA, M. J.; JONAS, R.; SCHNEIDER, A. L.; FURLAN, S. A. e CARVALHO-JONAS, M. F. One step partial purification of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CDB 002 using STREAMLINE-DEAE. **Bioseparation** v. 7, n. 3, p. 137-143, 1998.

ASRAF, S. S. e GUNASEKARAN, P. Current trends of β -galactosidase research and application. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology** v. 2, p. 880-890, 2010.

ATES, S. e MEHMETOGLU, U. A new method for immobilization of β -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. **Process Biochemistry** v. 32, n. 5, p. 433-436, 1997.

AZEVEDO, A. M.; ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; DE VRIES, J.; VISSER, T. J. e IRES-BARROS, M. R. Downstream processing of human antibodies integrating an extraction capture step and cation exchange chromatography. **Journal of Chromatography B** v. 877, n. 1-2, p. 50-58, 2009.

BANSAL, S.; OBEROI, H. S.; DHILLON, G. S. e PATIL, R. T. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of

four different methods of enzyme extraction on beta-galactosidase activity. **Indian Journal of Microbiology** v. 48, n. 3, p. 337-341, 2008.

BARON, A. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas pra utilização em biocatálise**. 2008. Universidade Federal do Paraná.

BENDER, J. P.; FEITEIN, M.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M. L. e OLIVEIRA, J. V. Phase behaviour of binary systems of lactones in carbon dioxide. **The Journal of Chemical Thermodynamics** v. 42, n. 1, p. 48-53, 2010.

BOERIS, V.; BALCE, I.; VENNAPUSA, R. R.; RODRIGUEZ, M. A.; PICÓ, G. e LAHORE, M. F. Production, recovery and purification of a recombinant β -galactosidase by expanded bed anion exchange adsorption. **Journal of Chromatography B** v. 900, n. 0, p. 32-37, 2012.

BRADY, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, L. e MCHALE, A. P. Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. **Enzyme and Microbial Technology** v. 17, n. 8, p. 696-699, 1995.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A. e KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food and Bioprocess Technology** v. *in press*, p. 1-11, 2012.

BURIN, L. e BUERA, M. D. β -Galactosidase activity as affected by apparent pH and physical properties of reduced moisture systems. **Enzyme and Microbial Technology** v. 30, n. 3, p. 367-373, 2002.

BUSTO, M. D.; APENTEN, R. K.; ROBINSON, D. S.; WU, Z.; CASEY, R. e HUGHES, R. K. Kinetics of thermal inactivation of pea seed lipoxygenases and the effect of additives on their thermostability. **Food Chemistry** v. 65, p. 323-329, 1999.

CAMPELLO, G. S.; TRINDADE, R. A.; RÊGO, T. V.; BURKERT, J. F. D. e BURKERT, C. A. V. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Eupergit C and properties of the biocatalyst. **International Journal of Food Engineering** v. 8, n. 3, p. 1-19, 2012.

CENI, G.; DA SILVA, P. C.; LERIN, L.; CHARIN, R. M.; OLIVEIRA, J. V.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G. e DE OLIVEIRA, D. Enzyme-catalyzed production of 1-glyceryl benzoate in compressed n-butane. **Enzyme and Microbial Technology** v. 46, n. 6, p. 513-519, 2010.

CHO, Y.-J.; SHIN, H. J. e BUCKE, C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*. **Biotechnology Letters** v. 25, n. 24, p. 2107-2111, 2003.

COGHETTO, C. C.; SCHERER, R. P.; SILVA, M. F.; GOLUNSKI, S.; PERGHER, S. B. C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. e TREICHEL, H. Natural montmorillonite as support for the immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** v. 1, n. 4, p. 284-289, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 1. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G. e SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova** v. 27, p. 623-630, 2004.

DE ASSIS, S. A.; FERNANDES, P.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. e FARIA OLIVEIRA, O. M. M. Screening of supports for the immobilization of pectinmethylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L). **Journal of Chemical Technology & Biotechnology** v. 79, n. 3, p. 277-280, 2004.

DICKSON, R. C.; DICKSON, L. R. e MARKIN, J. S. Purification and properties of an inducible beta-galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. 137.

DWEVEDI, A. e KAYASTHA, A. M. A β -galactosidase from Pea Seeds (PsBGAL): purification, stabilization, catalytic energetics, conformational heterogeneity, and its significance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 57, n. 15, p. 7086-7096, 2009a.

DWEVEDI, A. e KAYASTHA, A. M. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology** v. 100, n. 10, p. 2667-2675, 2009b.

EIJSSINK, V. G. H.; GASEIDNES, S.; BORCHERT, T. V. e VAN DEN BURG, B. Directed evolution of enzyme stability. **Biomolecular Engineering** v. 22, n. 1-3, p. 21-30, 2005.

EISENMENGER, M. J. e REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: A review. **Enzyme and Microbial Technology** v. 45, n. 5, p. 331-347, 2009.

ENÉAS-FILHO, J. O. A. Q.; BARBOSA, G. K. C.; SUDÁRIO, F. B.; PRISCO, J. T. e GOMES-FILHO, E. N. A. Isolation and partial purification of β -galactosidases from cotyledons of two cowpea cultivars. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** v. 13, p. 251-261, 2001.

FERNANDES, S.; GEUEKE, B.; DELGADO, O.; COLEMAN, J. e HATTI-KAUL, R. β -Galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 58, n. 3, p. 313-321, 2002.

FERRAZ, R. M.; ARIS, A.; GONZÁLEZ, G.; LÓPEZ-SANTIN, J.; VILLAVERDE, A. e ÁLVARO, G. Allosteric molecular sensing of anti-HIV antibodies by an immobilized engineered β -galactosidase. **Enzyme and Microbial Technology** v. 41, n. 4, p. 492-497, 2007.

FERRAZ, R. M.; ARÍS, A. e VILLAVERDE, A. Profiling the allosteric response of an engineered β -galactosidase to its effector, anti-HIV antibody. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 314, n. 3, p. 854-860, 2004.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÚO, G. C.; CARDOSO, V. L. e RIBEIRO, E. Z. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal** v. 58, n. 0, p. 33-38, 2011.

FRICKS, A. T.; SOUZA, D. P. B.; OESTREICHER, E. G.; ANTUNES, O. A. C.; GIRARDI, J. S.; OLIVEIRA, D. +. e DARIVA, C. Evaluation of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide. **J.of Supercrit.Fluids** v. 38, n. 3, p. 347-353, 2006.

GEKAS, V. e LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry** v. 20, p. 1-12, 1985.

GIACOMINI, C.; VILLARINO, A.; FRANCO-FRAGUAS, L. e BATISTA-VIERA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 4, p. 313-327, 1998.

GROSH, R. e CUI, F. F. Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane surface pretreatment. **Journal of Membrane Science** v. 167, p. 47-53, 2000.

GRUNENVALDT, F. L.; VEIGA, I. G. e KUHN, K. R. **Purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*, utilizando a técnica de precipitação.** 2006. Universidade Federal do Rio Grande.

HAIDER, T. e HUSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* [beta] galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 41, n. 1, p. 72-80, 2007.

HAIDER, T. e HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by β -galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification** v. 48, n. 1, p. 576-580, 2009.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C. e KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces*

process on a mixed-matrix membrane. **Enzyme and Microbial Technology** v. 49, n. 6, p. 580-588, 2011.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G. e VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology** v. 31, n. 3, p. 300-309, 2002.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G. e VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology** v. 34, n. 1, p. 33-40, 2004.

KALIL, S. J.; MAUGERI-FILHO, F. e RODRIGUES, M. I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry** v. 40, n. 2, p. 581-586, 2005.

KANWAR, L.; GOGOI, B. K. e GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas lipase* in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. **Bioresource Technology** v. 84, n. 3, p. 207-211, 2002.

KATCHALSKI-KATZIR, E. e KRAEMER, D. M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 10, n. 1-3, p. 157-176, 2000.

KIM, C. S.; JI, E. S. e OH, D. K. A new kinetic model of recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 316, n. 3, p. 738-743, 2004.

KLEIN, S.; KUHN, J.; AVRAHAMI, R.; TARRE, S.; BELIAVSKI, M.; GREEN, M. e ZUSSMAN, E. Encapsulation of Bacterial Cells in Electrospun Microtubes. **Biomacromolecules** v. 10, n. 7, p. 1751-1756, 2009.

KLIBANOV, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. **Advanced Applied Microbiology** v. 29, p. 1-28, 1983.

KNEZ, Z. e HABULIN, M. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. **J.of Supercrit.Fluids** v. 23, n. 1, p. 29-42, 2002.

KUHN, G. O.; COGHETTO, C.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D. e OLIVEIRA, J. V. Effect of compressed fluids treatment on the activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 immobilized in montmorillonite. **Process Biochemistry** v. 46, n. 12, p. 2286-2296, 2011.

KUHN, G.; MARANGONI, M.; FREIRE, D. M. G.; SOARES, V. F.; GODOY, M. G.; CASTRO, A. M.; LUCCIO, M. D.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D. e

OLIVEIRA, J. V. Esterification activities of non-commercial lipases after pre-treatment in pressurized propane. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology** v. 85, n. 6, p. 839-844, 2010.

LADERO, M.; RUIZ, G.; PESSELA, B. C. C.; VIAN, A.; SANTOS, A. e GARCIA-OCHOA, F. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme. **Biochemical Engineering Journal** v. 31, n. 1, p. 14-24, 2006.

LADERO, M.; SANTOS, A. e GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology** v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000.

LAI, L. S.; CHANG, P. C. e CHANG, C. T. Isolation and characterization of superoxide dismutase from wheat seedlings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 56, n. 17, p. 8121-8129, 2008.

LEE, K. Y. e HEO, T. R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology** v. 66, n. 2, p. 869-873, 2000.

LEMES, A. C. **Purificação de β -galactosidase: design do processo**. 2011.

LI, Y.; WANG, H.; LU, L.; LI, Z.; XU, X. e XIAO, M. Purification and characterization of a novel β -galactosidase with transglycosylation activity from *Bacillus megaterium* 2-37-4-1. **Appl Biochem Biotechnol** v. 158, n. 1, p. 192-199, 2009.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. e RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** v. 193, p. 265-275, 1951.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. **Food Chemistry** v. 63, n. 2, p. 147-154, 1998.

MANERA, A. P. **Otimização do meio de cultura para produção da enzima β -galactosidase *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial da enzima**. 2006. Universidade Federal do Rio Grande.

MANERA, A. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J. e MAUGERI, F. Galacto-oligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. **International Journal of Food Engineering** v. 6, n. 6, p. 1-13, 2010.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technol. Biotechnol** v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.

MANERA, A. P.; KUHN, G.; POLLONI, A.; MARANGONI, M.; ZABOT, G.; KALIL, S. J.; OLIVEIRA, D. D.; TREICHEL, H.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; MAZUTTI, M. A. e MAUGERI, F. Effect of compressed fluids treatment on the activity, stability and enzymatic reaction performance of β -galactosidase. **Food Chemistry** v. 125, n. 4, p. 1235-1240, 2011.

MANERA, A. P.; ZABOT, G. L.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; DE OLIVEIRA, D. +.; MAZUTTI, M. A.; KALIL, S. J.; TREICHEL, H. e FILHO, F. M. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides using pressurised fluids as reaction medium. **Food Chemistry** v. 133, n. 4, p. 1408-1413, 2012.

MANTA, C.; FERRAZ, N.; BETANCOR, L.; ANTUNES, G.; BATISTA-VIERA, F.; CARLSSON, J. e CALDWELL, K. Polyethylene glycol as a spacer for solid-phase enzyme immobilization. **Enzyme and Microbial Technology** v. 33, n. 7, p. 890-898, 2003.

MARTINS, A. R. e BURKERT, C. A. V. Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology** v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MARTINS, D. B. G.; SOUZA, C. G.; SIMOES, D. A. e MORAIS, M. A. The beta-galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. **Curr.Microbiol.** v. 44, n. 1, p. 379-382, 2002.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M. e FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology** v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; DE SOUZA MARTINS, D.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Ultrasonic waves and glass pearls: A new method of extraction of β -galactosidase for use in laboratory. **Química Nova** v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, F. O.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Purification of β -galactosidase by ion exchange chromatography: a study of the elution using an experimental design. **Chemical Engineering & Technology** v. *in press* 2012.

MORAES, C. C. **Extração e purificação de ficocianina de *Spirulina platensis***. 2006. Universidade Federal de Rio Grande.

MORAES, C. C. e KALIL, S. J. Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract. **Bioresource Technology** v. 100, n. 21, p. 5312-5317, 2009.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A. e BIRO, S. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification** v. 21, p. 24-29, 2001.

NAIDU, G. S. N. e PANDA, T. Studies on pH and thermal inactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal** v. 16, p. 57-67, 2003.

NAKKHARAT, P. e HALTRICH, D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with [beta]-glucosidase and [beta]-galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. **J.Biotechnol.** v. 123, n. 3, p. 304-313, 2006.

NOR, Z. M.; MELIH, I. T.; MEHRAB, M.; JENO, M. S.; MOO-YOUNG, M. e JERVIS, E. J. Improvement of intracellular β -galactosidase production in fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters** v. 23, n. 1, p. 845-849, 2001.

OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. M. R. e DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances** v. 29, n. 6, p. 600-609, 2011.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; DARIVA, C.; CUNHA, A. G.; BEVILAQUA, J. V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V. e FREIRE, D. Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 39, n. 1-4, p. 117-123, 2006a.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C. e OLIVEIRA, J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **J.of Supercrit.Fluids** v. 38, n. 3, p. 373-382, 2006b.

ORTEGA, N.; DIEGO, D. S.; PEREZ-MATEOS, M. e BUSTO, M. D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry** v. 88, p. 209-217, 2004.

PACE, C. N. Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. **Journal of Molecular Biology** v. 226, p. 29-35, 1992.

PAL, A.; PAL, V.; RAMANA, K. V. e BAWA, A. S. Biochemical studies of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Food Science and Technology-Mysore** v. 46, n. 3, p. 217-220, 2009.

PAN, C.; HU, B.; LI, W.; SUN, Y.; YE, H. e ZENG, X. Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 61, n. 3-4, p. 208-215, 2009.

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

PENNISTON, J. T. High hydrostatic pressure and enzymic activity: Inhibition of multimeric enzymes by dissociation. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 142, n. 1, p. 322-332, 1971.

PESSELA, B. C. C.; LAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISENB, J. M. e FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology** v. 40, n. 2, p. 310-315, 2007.

PINHEIRO, R.; BELO, I. e MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology** v. 37, n. 1, p. 438-442, 2003.

RAJOKA, M. I.; LATIF, F.; KHAN, S. e SHAHID, R. Kinetics of improved productivity of β -galactosidase by a cycloheximide-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters** v. 26, p. 741-746, 2004.

RANDOLPH, T. W.; BLANCH, H. W.; PRAUSNITZ, J. M. e WILKE, C. R. Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. **Biotechnology Letters** v. 7, n. 5, p. 325-328, 1985.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A. e AYUB, M. A. Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 23, p. 91-96, 1999.

RISSO, F. V. A.; MAZUTTI, M. A.; COSTA, F.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F. e RODRIGUES, M. I. Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic solutions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** v. 27, p. 507-516, 2010.

RODRIGUES, M. I. e IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

SAMOSHINA, N. M. e SAMOSHIN, V. V. The Michaelis constants ratio for two substrates with a series of fungal (mould and yeast) β -galactosidases. **Enzyme and Microbial Technology** v. 36, p. 239-251, 2004.

SANJAY, G. e SUGUNAN, S. Invertase immobilised on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching. **Catalysis Communications** v. 6, n. 1, p. 81-86, 2005.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L. e RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 24, p. 567-572, 2004.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R. e PASTORE, G. M. Production of galactooligosaccharide by *Scopulariopsis* sp. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos** v. 29, n. 3, p. 682-689, 2009.

SCHERER, R. **Estudo da imobilização de lipase comercial de pâncreas suíno em diferentes suportes inorgânicos**. 2010. Universidade Regional do Alto Uruguai e da Missões - Erechim.

SEZGINTURK, M. K. e DINÇKAYA, E. β -Galactosidase monitoring by a biosensor based on Clark electrode: Its optimization, characterization and application. **Biosensors and Bioelectronics** v. 23, n. 12, p. 1799-1804, 2008.

SILVA, A. P. R. **Purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistema aquoso bifásico e separação por membranas**. 2009. Universidade Federal do Rio Grande.

SILVA, M. E. e FRANCO, T. T. Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. 30.

SILVEIRA, S. T.; QUINES, L. K. D. M.; BURKERT, C. A. V. e KALIL, S. J. Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. **Bioprocess and Biosystems Engineering** v. 31, n. 5, p. 477-482, 2008.

SOBRAL, K.; RODRIGUES, R.; OLIVEIRA, R. R.; OLIVO, J.; DE MORAES, F. e ZANIN, G. Evaluation of supports and methods for immobilization of enzyme cyclodextringlycosyltransferase. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 108, n. 1, p. 809-819, 2003.

TANRISEVEN, A. e DOGAN, S. A novel method for the immobilization of β -galactosidase. **Process Biochemistry** v. 38, n. 1, p. 27-30, 2002.

TANUJA, S.; SRINIVAS, N. D.; RAGHAVA RAO, K. S. M. S. e GOWTHAMAN, M. K. Aqueous Two-phase Extraction for Downstream Processing of Amyloglucosidase. **Process Biochemistry** v. 32, n. 8, p. 635-641, 1997.

TORRES, P. e BATISTA-VIERA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 74, n. 3-4, p. 230-235, 2012.

USTOK, F. I.; TARI, C. e HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry** v. 119, n. 3, p. 1114-1120, 2010.

VAN CASTEREN, W. H. M.; EIMERMANN, M.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; VINCKEN, J. P.; SCHOLS, H. A. e VORAGEN, A. G. J. Purification and characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity

towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891. **Carbohyd.Res.** v. 329, n. 1, p. 75-85, 2000.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. e HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 9, p. 113-148, 2000.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food science**. 2. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.

YU, X. W. e LI, Y. Q. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 40, p. 44-50, 2006.

ZHOU, Q. Z. K. e CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal** v. 9, p. 33-44, 2001.

ZUNIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. M.; MINIM, L. A. e ROJAS, E. E. G. Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **Boletim Ceppa** v. 21, n. 1, p. 61-82, 2003.

APÊNDICE