

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

## ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE PROVENIENTE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082

**Susan Hartwig Duarte<sup>1</sup>; Lidiane Pereira Pereira<sup>1</sup>; Rosiele Couto Corrêa<sup>1</sup>; Fernanda Germano Alves<sup>1</sup>; Janaina Fernandes Medeiros Burkert<sup>2</sup>; Susana Juliano<sup>1</sup> Kalil<sup>\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, <sup>2</sup>Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Curso de Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande

\*Email: [susana.kalil@vetorial.net](mailto:susana.kalil@vetorial.net)

### RESUMO

A  $\beta$ -galactosidase é uma enzima de grande interesse industrial, pois os produtos da hidrólise da lactose, glicose e galactose não apresentam os inconvenientes causados por esse açúcar em produtos derivados lácteos, uma vez que a solubilidade de seus monossacarídeos é maior que a da lactose. A utilização de enzimas na indústria alimentícia é limitada devido a um fator operacional limitante: estabilidade operacional. Por esta razão, este trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade térmica da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. A enzima foi produzida por fermentação submersa com pH 6,0, 180 rpm, 30 °C por 96 horas; sendo extraída por pelo uso conjugado de ondas ultrassônicas e abrasão por pérolas de vidro. A estabilidade térmica da enzima foi estudada em termos de tempo de meia-vida incubando-se a suspensão enzimática nas temperaturas de 30 a 45 °C, sendo determinada a atividade enzimática ao longo do tempo. Os tempos de meia-vida foram 38,51; 6,42 e 2,03h para as temperaturas de 30, 35 e 37 °C, respectivamente. Os resultados mostram que a desnaturação térmica da  $\beta$ -galactosidase na faixa de 30-45 °C pode ser explicada pela cinética de primeira ordem, e a equação de Arrhenius pode ser aplicada para estabelecer uma relação entre a constante cinética de desnaturação térmica e a temperatura; sendo, neste estudo, a energia de ativação da reação de desnaturação de 102,75 kcal/mol.

Palavras-chave: fermentação, temperatura, tempo de meia-vida.

### 1 INTRODUÇÃO

Enzimas microbianas possuem vasta aplicação nos setores alimentício e farmacêutico por serem substâncias naturais, apresentarem elevada especificidade catalítica, atuarem em condições brandas de temperatura e pH e serem eficientes a baixas concentrações (SILVA et al., 1999).

Segundo Sener (2006), a lactose hidrolisada enzimaticamente é dependente da atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase, sendo esta testada a diferentes temperaturas para a obtenção da estabilidade térmica da enzima.

O estudo da estabilidade térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase é um aspecto importante a ser considerado em processos biotecnológicos, ajudando a aperfeiçoar a viabilidade econômica de processos industriais, principalmente de produtos lácteos, onde o substrato natural mais comumente encontrado é a lactose, açúcar predominante no leite.

Diante de tal importância, este trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Microrganismo**

O microrganismo utilizado para produzir a enzima  $\beta$ -galactosidase foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, previamente selecionado por Manera (2006).

### **2.2 Preparo do inóculo**

O meio de cultura utilizado foi conforme Pinheiro et al. (2003). As condições de cultivo foram 30 °C, 180 rpm por 14 horas, em incubador do tipo *shaker*.

### **2.3 Produção da enzima**

A enzima foi produzida por fermentação submersa em frascos agitados contendo meio de cultura otimizado por Manera (2006). A fermentação iniciou com 10% (v/v) de inóculo (NOR et al. 2001). As condições de cultivo foram 30 °C (PINHEIRO et al. 2003), 180 rpm, por 96h (MANERA, 2006).

### **2.4 Extração da enzima**

A  $\beta$ -galactosidase foi extraída pelo uso conjugado de ondas ultrassônicas e abrasão por pérolas de vidro, conforme proposto por Medeiros et al. (2005).

### **2.5 Estudo da estabilidade térmica da enzima**

A estabilidade térmica da  $\beta$ -galactosidase foi estudada em termos de tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), onde alíquotas de extrato enzimático foram incubadas nas temperaturas de 30, 35, 37, 40 e 45 °C.

### **2.6 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 adaptação da metodologia descrita por Rech et al. (1999).

### **2.7 Determinação da atividade enzimática**

A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi determinada usando *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopiranoside (ONPG) como substrato segundo Inchaurredo et al. (1994).

## **2.2 Resultados e discussão**

Segundo Contiero (1992), a estabilidade térmica da enzima é determinada através da utilização da equação de Arrhenius (Equação 1).

$$K = A \cdot e^{-E_a / RT} \quad (\text{Equação 1})$$

Os resultados obtidos de atividade enzimática em razão do tempo de incubação nas temperaturas de 30 a 45 °C mostraram um decréscimo da atividade enzimática com o tempo (dados não mostrados). Através destes dados foi possível construir o gráfico de  $\ln (V/V_0)$

*versus* tempo de incubação para cada temperatura estudada, onde  $V_0$  e  $V$  são a atividade inicial e atividade referente aos tempos de retirada de amostra, respectivamente. Desse gráfico, obteve-se o valor da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) para cada temperatura ( $T$ ).

Costuma-se expressar a estabilidade térmica em termos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), a qual é definida como sendo o tempo necessário para perder 50% da sua atividade inicial, ou seja:  $V/V_0 = 0,5$ ; podendo ser relacionado com a  $K_d$ , através da Equação 2.

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

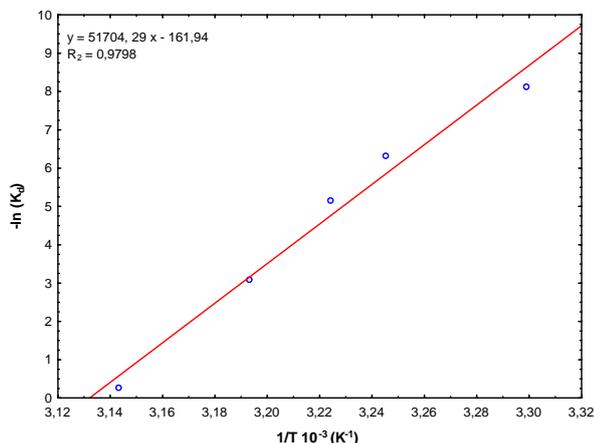
Os valores de  $K_d$  e  $t_{1/2}$  para cada temperatura estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Valores experimentais da constante de desnaturação térmica ( $K_d$ ) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da  $\beta$ -galactosidase em razão da temperatura

T (°C)	T (K)	1/T x 10 <sup>3</sup> (K <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (h)
30	303,15	3,299	0,0003	38,51
35	308,15	3,245	0,0018	6,42
37	310,15	3,224	0,057	2,03
40	313,15	3,193	0,0449	0,26
45	318,15	3,143	0,7727	0,01

Posteriormente, para a determinação da energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ), cujo valor calculado foi 102,75 kcal/mol graficou-se  $\ln(K_d)$  *versus* 1/T(K), obtendo-se uma reta correspondente à equação linearizada de Arrhenius (Equação 3), cujo gráfico encontra-se na Figura 1.

$$\ln K_d = \ln A - \frac{E_d}{R \cdot T} \quad \text{(Equação 3)}$$



**Figura 1** - Dados experimentais das constantes de desnaturação térmica ( $K_d$ ) em razão da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ).

Sendo a equação final de Arrhenius apresentada na Equação 4.

$$K_d = 2,14 \times 10^{70} e^{-51704,29/T} \quad \text{(Equação 4)}$$

Através dos dados apresentados na Tabela 3 observa-se que o valor para a constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) é inversamente proporcional à estabilidade da enzima, ou seja, quanto menor o valor de  $K_d$  maior é a estabilidade da enzima.

Segundo Whitaker (1994), as energias de ativação para a reação de desnaturação de enzimas ficam compreendidas entre 50-150 kcal/mol; comparando estes valores com os dados encontrados no presente trabalho, observa-se que estes estão compreendidos dentro da faixa citada.

### 3 CONCLUSÃO

O estudo da estabilidade da  $\beta$ -galactosidase mostrou que o tempo de meia-vida foram 38,51; 6,42 e 2,03h para as temperaturas de 30, 35 e 37 °C, respectivamente. A energia de ativação da reação de desnaturação foi de 102,75 kcal/mol.

A equação final de Arrhenius pode ser usada para determinar a taxa constante de degradação para a outras temperaturas e estabelecer as condições ótimas para processos de produção e purificação enzimática.

### 4 AGRADECIMENTO

A CAPES/ PROCAD, CNPq e PET-MEC/SESu.

### 5 LISTA DE REFERÊNCIAS

CONTIERO, J. **Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces marxianus***. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas, Campinas, SP 1992.

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

MANERA, A. P. **Otimização do meio de cultura para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial da enzima**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

MEDEIROS, F. O. et al. Diferentes técnicas de ruptura celular para extração de beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081. In: SIMPÓSIO DE ALIMENTOS PARA A REGIÃO SUL, IV. Passo Fundo, RS, 2005. **Anais...** Passo Fundo, RS, 2005.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M.  $\beta$ -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 438-442, 2003.

RECH, R. et al. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of beta-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

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

SENER, N.; APAR, D. K.; ÖZBEK, B. A modeling study on milk lactose hydrolysis and  $\beta$ -galactosidase stability under sonication. **Process Biochemistry**, 2006 – artigo impresso.

SILVA, M. E.; FRANCO, T. T. Purification of microbial  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. **Revista de Microbiologia**, Campinas, v. 30, 1999.