

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA B-GALACTOSIDASE DE *Aspergillus oryzae* EM RESINAS DE TROCA IÔNICA

LARISSA NAYHARA SOARES SANTANA¹, CARLA ZANELLA GUIDINI², ELOÍZIO JÚLIO RIBEIRO³.

RESUMO

Este trabalho apresenta como objetivo estudar o processo de imobilização da enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por adsorção, utilizando como suporte resinas de troca iônica Duolite A-568, Duolite S-761, Dowex Marathon A, Dowex Marathon C e Amberlite 252 Na. Através de resultados preliminares a resina Duolite A-568 apresentou melhor retenção de atividade enzimática, sendo assim foi utilizada no trabalho subsequente. A influência da concentração da enzima e do pH no processo de imobilização foi estudada empregando um Planejamento Composto Central (PCC) fixando tempo de 12 horas e temperatura de 25°C. As condições ótimas de imobilização foram pH 4,5 e concentração de β -galactosidase de 16 g/L. A atividade da enzima imobilizada após 30 usos foi de 51% em relação à inicial. A retenção da atividade enzimática pode ser otimizada utilizando agentes reticulantes, entretanto este estudo não foi realizado, ficando então como sugestão para trabalhos futuros.

PALAVRAS-CHAVE: β -galactosidase, imobilização, Duolite A-568, hidrólise da lactose.

ABSTRACT

In this work was studied the immobilization process of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase by adsorption and cross-linking with glutaraldehyde, using as carrier ions-exchangers such as Duolite A-568, Duolite S-761, Dowex Marathon A, Dowex Marathon C and Amberlite 252 Na. Through initial experiments, Duolite A-568 was choosed for the continuance of the work. The influence of the enzyme concentration and pH in the immobilization process was studied using a Central Composit Design (CCD) for a fixed time of 12 hours and temperature of 25°C . The optimal conditions for enzyme immobilization were pH 4,5 and galactosidase concentration 16 g/L. The residual activity of the immobilized enzyme after 30 uses was 51% as compared with the initial activity. The retention of activity can be optimized using cross linking process, however this study was not done, then getting as suggestion for future work.

KEYWORDS: β -galactosidase, lactose hydrolysis, immobilization, Duolite A-568.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Um aspecto muito importante para o uso de enzimas como catalisadores é sua alta especificidade, ou em relação ao substrato ou em relação a alguma ligação química, e isso implica em produtos de reação mais puros e maior conversão do substrato ao produto desejado, implicando em menores custos de separação do produto. Os catalisadores sintéticos normalmente não apresentam esta alta especificidade, o que implica em produtos secundários no meio reacional.

Tanto os catalisadores químicos, como os biológicos, perdem gradualmente sua atividade ao participar das reações que catalisam. As enzimas, de um modo geral, são mais frágeis, porém à temperatura ambiente, são mais ativas que os catalisadores sintéticos.

Apesar das inúmeras vantagens das enzimas como catalisadores, o uso das mesmas em aplicações industriais tem sido limitado, porque a maioria das enzimas são relativamente instáveis, seu custo é alto e a recuperação da enzima ativa no processo final é difícil. Para eliminar as desvantagens do uso das enzimas como catalisadores e com o objetivo de obter catalisadores altamente ativos e estáveis, surgiu o processo de imobilização das enzimas.

Assim a imobilização de enzimas tem como finalidade reter sua atividade catalítica, quer por ligação a um suporte insolúvel em água, quer por retenção das moléculas da enzima através de uma barreira física, como no uso de membranas de ultrafiltração.

A imobilização de enzimas teve sua primeira aplicação industrial em 1960 no Japão, na produção de aminoácidos. A tecnologia de enzimas imobilizadas em geral tem se expandido lentamente, devido à complexidade do tema. No caso da hidrólise de lactose em produtos de laticínio, tem-se citações de poucos processos bem sucedidos, tais como o processo Valio, na Finlândia, com β -galactosidase imobilizada em resinas, mas todas as informações técnicas são mantidas em sigilo (www.valio.com).

Neste trabalho é proposto um estudo do processo de imobilização da enzima β -galactosidase, oriunda de *Aspergillus oryzae*, em resinas de troca iônica comerciais. Esta enzima hidrolisa a lactose do leite em glicose e galactose, melhorando a aceitação do mesmo por pessoas intolerantes à lactose e melhorando também as características físicas dos produtos de laticínio, evitando a cristalização da lactose em produtos concentrados e ou resfriados. Este processo de hidrólise pode utilizar a catálise por ácidos inorgânicos a temperaturas da ordem de 150°C, porém não é recomendado na produção de alimentos, por produzir produtos incompatíveis com os alimentos, além de levar a produtos com alteração de cor.

Uma outra aplicação da enzima β -galactosidase é na produção de galactooligossacarídeos, um processo totalmente dominado pela cinética da reação, que se

baseia na capacidade galactosiltransferase da referida enzima. Os galactooligossacarídeos são considerados alimentos funcionais, com ação prebiótica, com importância crescente na área de nutrição e saúde.

A enzima β -galactosidase para uso comercial é bastante cara e isto dificulta seu uso. No Brasil já existe nos supermercados leite com baixo teor de lactose, obtido da mistura da enzima livre ao leite antes de sua embalagem e após a sua esterilização, mas isto encarece o produto e a enzima é consumida juntamente com o leite. Além do mais, a enzima continuando ativa no leite, leva a outras reações seqüenciais.

Com um processo bem sucedido, a enzima β -galactosidase imobilizada pode ser utilizada para a produção de leite com baixo teor de lactose para consumo direto e também para a obtenção de produtos lácteos menos suscetíveis à cristalização, barateando muito o custo de produção.

Entre as diversas técnicas de imobilização disponíveis, o processo por adsorção tem um potencial comercial mais elevado do que outros métodos, isto porque o processo de adsorção é mais simples, menos oneroso, mantém uma alta atividade catalítica, e mais importante, o suporte pode ser reutilizados várias vezes após a inativação do enzima imobilizada. A imobilização da enzima em resina de troca iônica é efetuado através de um procedimento simples, quando comparados com outros métodos de imobilização. Ela envolve basicamente interações iônicas e eletrostáticas. Embora a ligação entre as forças enzima e o suporte são mais fortes do que na adsorção, as condições de imobilização são moderadas, as alterações conformacionais são pequenas, resultando em uma alta atividade enzimática. Existem muitas vantagens, tais como a recuperação do suporte, baixo custo e disponibilidade do mesmo.

Embora a imobilização enzimática tenha sido estudada por muitos anos, o surgimento de trabalhos de investigação publicados e documentos de revisão indicam um contínuo interesse nesta área, mais de 550 trabalhos relacionados à imobilização das enzimas foram publicados em 2005 (MARQUEZ et. al, 2008).

A hidrólise enzimática da lactose em leite e produtos derivados é um dos mais importantes processos biotecnológicos na indústria de processamento de alimentos (GEKAS e LEIVA, 1985; MAHONEY, 1998; LADERO et al, 2000; JURADO et al, 2002; SERIO et al 2003; GAUR et al, 2006). Esta hidrólise leva aos monossacarídeos glicose e galactose é de interesse dos pontos de vista nutricional e tecnológico. Esse tratamento torna o leite adequado para a alimentação de indivíduos intolerantes à lactose, além disso, a hidrólise parcial da lactose (20-30%) previne a cristalização da mesma em numerosos produtos de laticínio, tais

como doce de leite, leite concentrado integral congelado, leite evaporado, caldas de soro e formulações para sorvetes (LADERO et al, 2000; JURADO et al, 2002).

Além das vantagens da hidrólise da lactose propriamente dita, as β -galactosidases são também galacto-transferases, enriquecendo os produtos lácteos com galactooligossacarídeos, constituindo assim, a razão para importantes pesquisas nos últimos anos (REUTER et al, 1999; MAHONEY, 1998; ALMEIDA e PASTORI, 2001; ALBAYRAK, 2002; GAUR et al, 2006).

A ingestão direta (oral) de lactase por pessoas com deficiência desta enzima tem sido feita, mas tem provocado reações alérgicas (BÓDALO et al., 1991), e os suplementos disponíveis no mercado não tem se mostrado adequados para a solução de problemas de má absorção e intolerância à lactose (O'CONNELL, 2006).

A lactose ocorre no leite numa proporção de 5% aproximadamente, é hidrolisada a esses monossacarídeos pela lactase em seres humanos e pela β -galactosidase em bactérias e leveduras (O'CONNELL, 2006; SZCZODRAK, 2000). Para a redução do teor desse dissacarídeo no leite e seus derivados, dois processos de hidrólise da lactose tem sido aplicados. O primeiro é o uso de ácidos e altas temperaturas (150 °C) e o segundo é o uso de β -galactosidases, no intervalo de temperatura de 4 a 40 °C. O uso de enzimas permite condições mais brandas de temperatura e pH e não implicam em desnaturação de proteínas em solução, o escurecimento do produto e a formação de subprodutos, aspectos comuns nos processos de hidrólise ácida. Para a indústria alimentícia, o melhor processo é o enzimático (GEKAS e LEIVA, 1985; LADERO et al, 2000). Pelo processo enzimático, na maioria dos casos, são utilizadas enzimas livres e estas deixam o reator juntamente com o produto, não sendo possível a sua reutilização. Nos últimos anos, tem-se estudado bastante a imobilização da referida enzima, com o objetivo de diminuir os custos de produção de hidrolisados de leite e derivados (JURADO et al, 2002; SERIO, 2003; GAUR et al, 2006; HAIDER e HUSAIN, 2007).

Mais recentemente tem aumentado muito o interesse pelo uso de oligossacarídeos como alimento funcional, na qualidade de prebióticos. Oligossacarídeos são açúcares constituídos de duas a vinte unidades de monossacarídeos, encontrados naturalmente em algumas frutas e vegetais dos quais sua extração apresenta rendimentos muito baixos, e também podem ser produzidos pela hidrólise de alguns polissacarídeos ou sintetizados enzimaticamente (MANNING e GIBSON, 2004).

O trato gastrointestinal, particularmente o cólon, é fortemente povoado por bactérias. Muitas espécies são benignas, embora várias sejam patogênicas. Bifidobactérias e

lactobacillus são benéficas e a intervenção na dieta alimentar visando o favorecimento das mesmas tem sido objetivo de muitos estudos. Prebiótico é um ingrediente não vivo, não metabolizado pelo homem e seletivamente metabolizado pelas bactérias do intestino. Tal ingrediente melhora a saúde por estimular o número e/ou as atividades das bifidobactérias e dos lactobacillus. Uma microflora ótima no intestino pode aumentar a resistência às bactérias patogênicas, abaixar o teor de amônia no sangue, aumentar o estímulo a respostas imunes, melhorar absorção de cálcio, reduzir o nível do colesterol LDL, aumentar a síntese de vitaminas e reduzir o risco de câncer de cólon (MANNING e GIBSON, 2004; SANGEETHA et al, 2005; GAUR, 2006).

Dentre os oligossacarídeos de interesse comercial, destacam-se os galactooligossacarídeos, que são uma mistura de oligossacarídeos formados de glicose e galactose. Tais compostos, chamados fatores bifidogênicos, são fermentados por um número limitado de bactérias do cólon intestinal, levando a alterações no ecossistema do em favor de algumas bactérias, tais como as bifidobactérias. Devido aos possíveis benefícios à saúde associados com o consumo destes compostos, seu uso como ingredientes de alimentos tem crescido rapidamente, particularmente no Japão e na Europa (MANNING, 2004; SANGEETHA et al, 2005).

Sua síntese química é complicada, de modo que a síntese pela enzima β -galactosidase tem sido a rota mais pesquisada. Esta enzima catalisa a hidrólise da lactose numa reação direta e a síntese dos galactooligossacarídeos pela reação inversa, também conhecida como transgalactolização (MAHONEY, 1998; GAUR, 2006).

A síntese enzimática de galactooligossacarídeos tem sido estudada por vários pesquisadores, usando a enzima β -galactosidase de várias fontes, tanto na sua forma livre, como em diferentes formas imobilizadas. A síntese tem sido considerada um exemplo de reação cineticamente controlada, cuja conversão de lactose a oligossacarídeos depende da concentração inicial de lactose, pH, temperatura, concentração de glicose e galactose no meio reacional e do tempo de reação. A concentração dos galactooligossacarídeos aumenta com o tempo de reação até atingir um valor máximo, decrescendo a seguir, podendo ser totalmente hidrolisados à glicose e galactose pela ação hidrolítica da β -galactosidase (MAHONEY, 1998; ALBAYRAK e YANG, 2002a; ALBAYRAK e YANG, 2002b; GAUR, 2006).

Dentre as fontes de β -galactosidasas destacam-se as leveduras *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactics* e *Kluyveromyces marxianus*, consideradas as melhores fontes da referida enzima para aplicação em leite, visto que sua faixa ótima de pH está em torno de 6,5.

Já as β -galactosidases de *Aspergillus niger* e *oryzae* apresentam pH ótimo de ação na faixa ácida.

Baseado na importância da reação de hidrólise de lactose, tanto ao nível de produção de leite “in natura”, como na produção de derivados lácteos, esta proposta de trabalho apresenta como objetivo geral, estudar a imobilização da enzima β -galactosidase em resinas comerciais, tais como Duolite A-568, Duolite S-761, Marathon A e Marathon C, avaliando sua atividade e estabilidade em relação a variações pH, temperatura, para a enzima imobilizada que apresentar maior atividade, dentre as obtidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

A enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.2.1.23) da marca Sigma foi utilizada no presente trabalho, diluída em concentrações adequadas em diferentes tampões, conforme o valor de pH desejado. Para a faixa de pH de 3,0 a 5,5, usou-se tampão acetato, para a faixa de 6,0 a 8,0, tampão fosfato. As resinas de troca iônica Duolite A-568, Duolite S-761, Marathon A e Marathon C foram obtidas da Hom Hass. Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

As resinas foram ativadas com a metodologia descrita abaixo de acordo com seus respectivos fabricantes.

- Dowex Marathon A: foi ativada com seis volumes de hidróxido de sódio 3% por volume de leito de resina;

- Dowex Marathon C: foram ativadas com cinco volumes de ácido sulfúrico 5% por volume de leito de resina;

- Duolite A-568 e Duolite S-761: foram ativadas com uma solução de ácido clorídrico 1M, seguindo de hidróxido de sódio 1M e lavando-se com água destilada na troca de solução e ao final da ativação. Em todas as etapas utilizaram-se 10 volumes de solução por volume de resina.

2.2. Determinação da atividade enzimática para enzima imobilizada

A atividade catalítica da β -galactosidase imobilizada foi determinada pelo método das velocidades iniciais da reação de hidrólise de lactose, em um microrreator de mistura contendo 100 mL de solução de lactose 50 g/L em pH 4,5 a 35°C, com as partículas de enzima imobilizada retidas em um cesto de aço inox. A glicose formada era dosada pelo

método da glicose-oxidase (BAO et al. 2004). A unidade de atividade (U) foi definida como grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de enzima imobilizada.

2.3. Determinação de glicose

A glicose, em todos os experimentos, foi dosada pelo método da glicose-oxidase, utilizando-se kits sistema para diagnóstico. Este método é específico para a glicose e se baseia na oxidação da mesma, de acordo com a seguinte reação, catalisada pela glicose-oxidase:



O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4- amino- antipirina e fenol, sob a ação da peroxidase, formando uma antipirilquinonimina, cuja intensidade de sua cor vermelha, é proporcional à concentração de glicose no meio. Esse composto de tonalidade vermelha apresenta a sua máxima absorção de luz na faixa de 505nm.

2.4. Dosagem de lactose

A lactose foi analisada indiretamente pela dosagem da glicose formada através da reação de hidrólise ácida da lactose.

2.5. Escolha das resinas para a imobilização de β -galactosidase

As resinas de troca iônica foram testadas como suporte para imobilização de β -galactosidase pelo método de adsorção.

Primeiramente as resinas foram ativadas e após realizado um teste de imobilização de β -galactosidase preliminar. Em todos os experimentos incubou-se 10 mL de solução de β -galactosidase a 1 g/L em tampão acetato com pH 4,5 e 0,5 g de resina, durante 2 horas e sob agitação de 50 rpm à 25 °C em incubadora rotativa. Após a imobilização, as resinas foram lavadas com tampão acetato pH 4,5 e utilizadas para determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais de reação, conforme item 2.2 em solução de lactose de 50 g/L, pH 4,5 a 35°C.

2.6. Testes preliminares da influência do tempo e das variáveis consideradas significativas no processo de imobilização

Após os resultados de testes com os suportes para a imobilização de β -galactosidase, conforme item 2.5, definiu-se a resina Duolite A-568 como o suporte para a imobilização do trabalho subsequente, pois apresentou melhor retenção de atividade enzimática no processo.

Posteriormente, foi proposto um Planejamento Fatorial Completo (1) para o estudo das variáveis consideradas significativas no processo, sendo um planejamento dois níveis, com três réplicas centrais e três variáveis totalizando 11 experimentos, utilizando-se o software Statistica 7.0. As variáveis foram: pH, concentração de enzima e tempo de imobilização. O pH variou de 4 a 8, concentração de enzimas de 5 a 15 g/L e tempo de imobilização de 0,5 a 2 horas. As faixas de concentração e pH escolhidas para cada variável foram obtidas pelos testes preliminares e com base na literatura dos trabalhos de BÓDALO et al., (1991), TANRISEVEN e DOGAN (2002) e FREITAS et al., (2007). Foram utilizados os tampões acetato 10^{-1} M na faixa de pH 4 a 5,5, citrato-fosfato 10^{-1} M para faixa de pH de 6 à 7 e o tampão bórico 10^{-1} M para faixa de pH de 7,5 à 8. A temperatura de imobilização foi fixada em 25°C com agitação de 50 rpm em incubadora rotativa e a atividade foi calculada conforme item 2.2.

Com os resultados do primeiro Planejamento Fatorial Completo (1) observou-se que a faixa escolhida não abrangeu a região com atividades máximas, então, propôs-se um segundo Planejamento Fatorial Completo (2) levando em consideração a tendência de melhor resultado do primeiro planejamento. As novas faixas para essas variáveis são: pH de 2 a 4, concentração de enzimas de 15 a 25 g/L e tempo de 2 a 12 horas. Foram utilizados os tampões ácido clorídrico-cloreto de potássio 10^{-1} M para o pH 2, citrato-fosfato 10^{-1} M para faixa de pH de 3 a 3,5 e acetato 10^{-1} M para o pH 4.

Após a imobilização, os biocatalisadores foram lavados com tampão acetato 4,5 e utilizados para determinação das taxas iniciais conforme item 3.2, a 35°C, pH 4,5 e solução de lactose de 50 g/L.

2.7. Influência do pH e concentração de enzima no meio de imobilização

Após a análise dos resultados dos dois Planejamentos Fatoriais Completos, conforme item 2.6 e por questões econômicas fixou-se o tempo de imobilização em 12 horas, por este já estar dentro da área otimizada.

Posteriormente, foi proposto um Planejamento Composto Central (PCC) para otimizar o processo de imobilização de β -galactosidase. As variáveis consideradas foram pH e

concentração de enzima do meio, com três réplicas centrais totalizando 11 experimentos e α de ortogonalidade de 1,14744. Neste planejamento, a concentração de enzima situou-se na faixa de 6,82 (- α) a 25,18 g/L (α) e o pH variou entre 3,35 (- α) a 5,65 (α). Foram utilizados os tampões citrato-fosfato 10^{-1} M para faixa de pH de 3 a 3,5 e acetato 10^{-1} M para o pH 4 a 5,65.

A imobilização foi realizada incubando-se 10 mL de uma solução de β -galactosidase com 0,5 g de resina durante 12 horas, nas condições definidas pelo PCC, com agitação de 50 rpm em incubadora rotativa e temperatura de 25°C. Ao final da imobilização a determinação da atividade do biocatalisador foi realizada conforme item 2.2, usando uma concentração de lactose de 50 g/L no meio reacional.

As equações codificadas do pH e concentração de enzima são apresentadas nas Equações 1 e 2, respectivamente.

$$X_1 = \frac{pH - 4,5}{1} \quad (1)$$

$$X_2 = \frac{[E] - 16}{8} \quad (2)$$

2.8. Estudo da enzima imobilizada em relação ao número de usos

Neste estudo foi usada uma amostra de enzima imobilizada nas condições ótimas conforme item 2.7. A amostra foi lavada com tampão acetato pH 4,5 e realizadas 30 determinações subsequentes de atividade. Entre cada reação, a amostra de enzima imobilizada era lavada com tampão acetato pH 4,5 e assim calculada a atividade relativa à inicial. A atividade foi calculada conforme item 2.2, sob as seguintes condições de reação: 35°C, pH 4,5, concentração inicial de lactose de 50 g/L e tempo de reação de 15 minutos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Escolha do suporte

Testes preliminares foram feitos em relação à retenção de atividade, de acordo com o item 2.5, nas resinas Duolite A-568, Duolite S-761, Dowex Marathon A e Dowex Marathon C.

As resinas Dowex Marathon A e Dowex Marathon C não apresentaram atividade enzimática, já as resinas Duolite A-568 e Duolite S-761 apresentaram atividade, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Resultado preliminar para escolha da resina na imobilização da enzima β -galactosidase.

Resinas	Atividade (U*)
Dowex Marathon A	0
Dowex Marathon C	0
Duolite A-568	0,098
Duolite S-761	0,031

U*=(glicose/L.min.gresina)

Observando os resultados na Tabela 1, pode-se notar que a resina Duolite A-568 apresentou uma melhor retenção de atividade enzimática (U), com base nestes dados foi escolhida a resina Duolite A-568 para o trabalho subsequente.

MARQUEZ et al., (2007) imobilizaram invertase em resinas de troca iônica para hidrólise de sacarose e observaram uma maior retenção enzimática na resina Duolite A-568.

3.2. Escolha do tempo e das faixas para estudo da imobilização de β -galactosidase

Dois Planejamentos Fatoriais Completos foram utilizados para estudo da imobilização de β -galactosidase, foi possível escolher as faixas das variáveis e o tempo de imobilização conforme item 2.6. Os resultados das atividades enzimáticas obtidos pelo Planejamento Fatorial Completo (1) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento fatorial completo (1).

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)			
	pH	Concentração de β -galactosidase (g/L)	Tempo (h)	Atividade (U*)
1	4 (-1)	5 (-1)	0,5 (-1)	0,243
2	8 (1)	5 (-1)	0,5 (-1)	0,162
3	4 (-1)	15 (1)	0,5 (-1)	0,403
4	8 (1)	15 (1)	0,5 (-1)	0,182
5	4 (-1)	5 (-1)	2 (1)	0,353
6	8 (1)	5 (-1)	2 (1)	0,186
7	4 (-1)	15 (1)	2 (1)	0,470
8	8 (1)	15 (1)	2 (1)	0,240
9	6 (0)	10 (0)	1,25 (0)	0,317
10	6 (0)	10 (0)	1,25 (0)	0,304
11	6 (0)	10 (0)	1,25 (0)	0,320

$$U^* = (\text{g}_{\text{glicose}} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{resina}})$$

Analisando a Tabela 2 pode-se observar que a atividade variou de 0,162 a 0,470 U. Sendo o maior valor de atividade no experimento 7, com atividade de 0,470 U, mostrando que a tendência de melhores atividades ocorre em pH menor que 4 (-1), concentração de β -galactosidase maior que 15g/L (+1) e tempo de imobilização maior que 2 horas (+1). Esta tendência pode ser confirmada no experimento 2 que apresenta a menor atividade alcançada de 0,162 U, com pH 8, concentração de enzima 5 g/L e tempo de 0,5 horas. Os resultados obtidos de atividade enzimática foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. A Tabela 3 mostra os parâmetros lineares e as interações das três variáveis estudadas (X_1 = pH, X_2 = concentração de enzimas e X_3 = tempo), representando o modelo completo ajustado.

Tabela 3 – Resultado da regressão múltipla com todos os parâmetros.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,2890	0,0087	0,000005
X ₁ (L)	-0,0874	0,0102	0,0010
X ₂ (L)	0,0439	0,0102	0,0127
X ₃ (L)	0,0324	0,0102	0,0338
X ₁ X ₂	-0,0254	0,0102	0,0678
X ₁ X ₃	-0,0119	0,0102	0,3094
X ₂ X ₃	-0,0011	0,0102	0,9176

Após a realização da regressão múltipla dos resultados da Tabela 3, obteve-se a Equação 3 completa com todos os parâmetros mostrados na Tabela 3.

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade} = & 0,2890 - 0,08741X_1 + 0,0439X_2 + 0,0324X_3 \\
 & - 0,0254X_1X_2 - 0,0119X_1X_3 + 0,0011X_2X_3
 \end{aligned} \quad (3)$$

Foram considerados parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$), devido a grande variedade inerente aos processos bioquímicos. Observa-se na Tabela 3 que as variáveis significativas do modelo foram: pH, concentração de enzima e tempo nos seus termos lineares (X₁ (L), X₂ (L) e X₃ (L)) bem como interações pH/concentração de enzima X₁X₂. Com a eliminação dos parâmetros não significativos, obtiveram-se os seguintes parâmetros apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultado da regressão múltipla com os parâmetros significativos

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,2890	0,0082	0
X ₁ (L)	-0,0874	0,0097	0,0001
X ₂ (L)	0,0439	0,0097	0,0039
X ₃ (L)	0,0324	0,0097	0,0153
X ₁ X ₂	-0,0254	0,0097	0,0391

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 4.

$$\begin{aligned} \text{Atividade} = & 0,2890 - 0,0874 X_1 \\ & + 0,0439 X_2 + 0,0324 X_3 - 0,0254 X_1 X_2 \end{aligned} \quad (4)$$

O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,95, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da atividade da enzima imobilizada, mostrando que 95% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica. A Figura 2 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 3 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

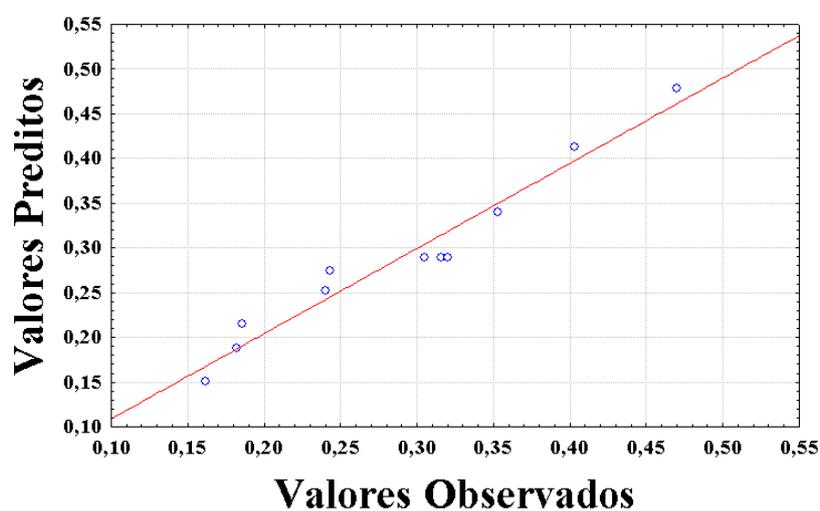


Figura 2 – Valores preditos em função dos valores observados

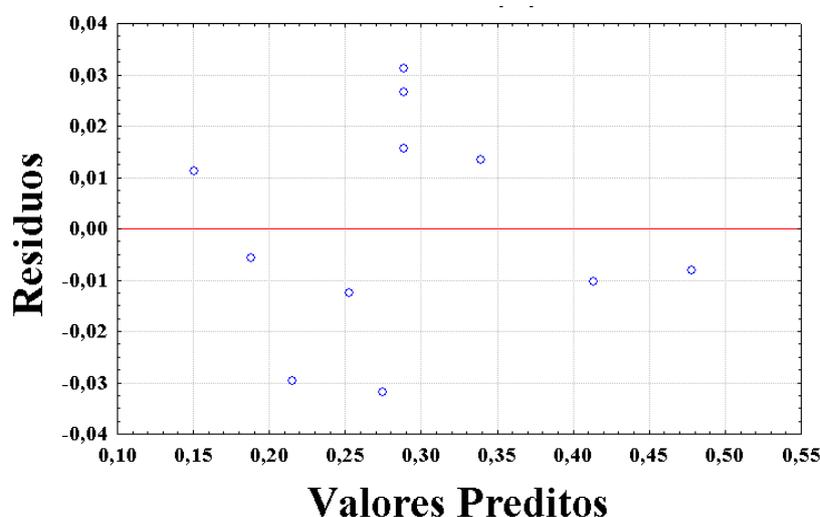


Figura 3 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática

Analisando a Figura 2, observa-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentam valores bem próximos aos valores fornecidos pela equação empírica. Na Figura 3, nota-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do traçado no ponto zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. O modelo mostrou-se significativo e com isso construíram-se as superfícies de resposta, analisando-se de duas em duas, e definindo a melhor tendência de acordo com as maiores atividades. As superfícies estão representadas nas Figuras 4, 5 e 6.

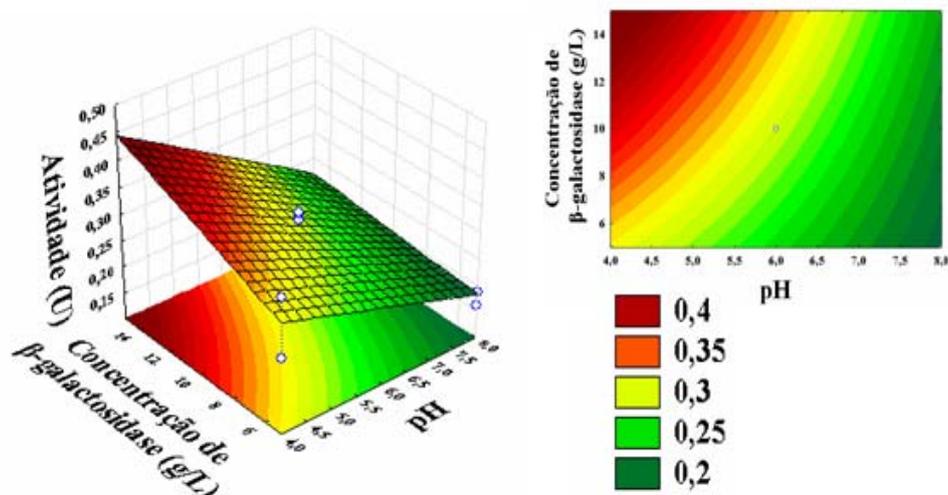


Figura 4 – Superfície de resposta da influência da concentração de enzima e pH na atividade enzimática.

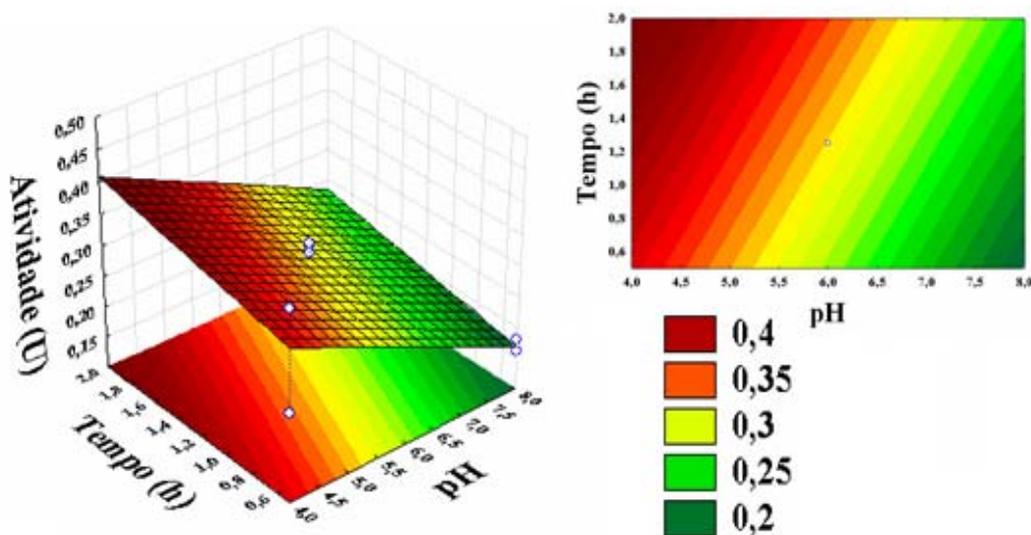


Figura 5 – Superfície de resposta da influência do tempo de imobilização e pH na atividade enzimática

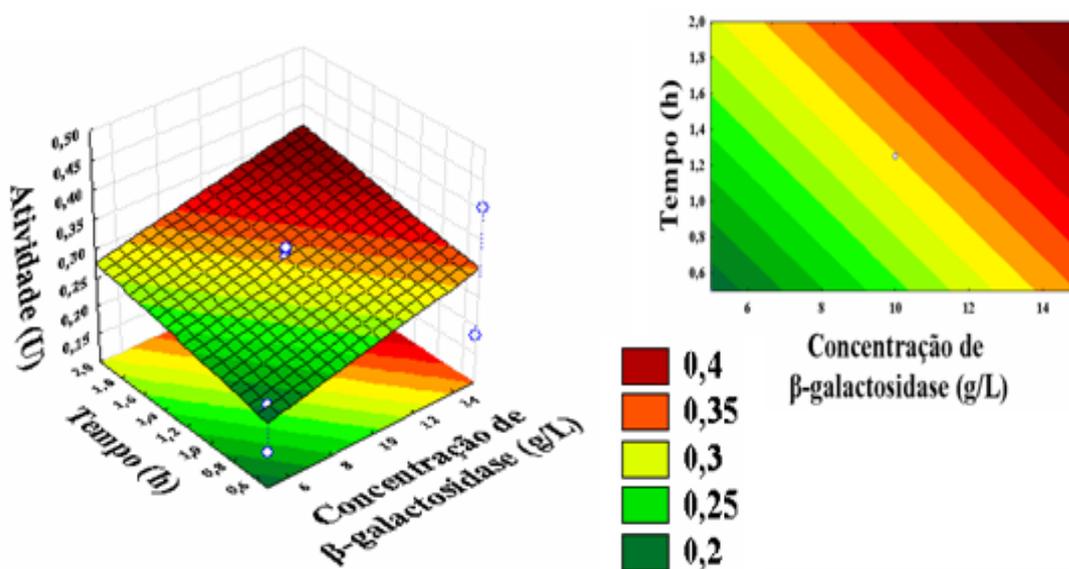


Figura 6 – Superfície de resposta da influência do tempo de imobilização e concentração de enzima na atividade enzimática

A partir dos resultados do Planejamento Fatorial Completo (1) na Tabela 2 e através das superfícies de resposta nas Figuras 4, 5 e 6, pode-se analisar que as faixas tenderam para uma maior concentração de enzima, maior tempo e menor pH. Desta forma foi realizado o segundo planejamento. Os resultados das atividades enzimáticas obtidos pelo Planejamento Fatorial Completo (2) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento fatorial completo (2)

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)			
	pH	Concentração de β -galactosidase (g/L)	Tempo (h)	Atividade (U^*)
1	2 (-1)	15 (-1)	2 (-1)	0,020
2	4 (1)	15 (-1)	2 (-1)	0,500
3	2 (-1)	25 (1)	2 (-1)	0,070
4	4 (1)	25 (1)	2 (-1)	0,540
5	2 (-1)	15 (-1)	12 (1)	0,402
6	4 (1)	15 (-1)	12 (1)	0,600
7	2 (-1)	25 (1)	12 (1)	0,496
8	4 (1)	25 (1)	12 (1)	0,640
9	3 (0)	20 (0)	7 (0)	0,456
10	3 (0)	20 (0)	7 (0)	0,462
11	3 (0)	20 (0)	7 (0)	0,451

$$U^* = (\text{g}_{\text{glicose}} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{resina}})$$

No segundo Planejamento Fatorial Completo (2), pode-se observar na Tabela 5 que a atividade variou de 0,02 a 0,640 U, sendo o maior valor de atividade no experimento 8, com 0,640 U. Isso mostra que a melhor atividade está relacionada a pH maior que 4, alta concentração de β -galactosidase e tempo de imobilização situado em uma região ótima de 12 horas. Para o experimento 1 no qual a atividade foi a menor obtida (0,02) nota-se que o pH foi de 2 (-1), concentração de enzima de 15 g/L (-1) e tempo de 2 horas (-1).

Os resultados obtidos de atividade enzimática foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. A Tabela 6 mostra os parâmetros lineares e as interações das três variáveis estudadas, sendo X_1 a variável pH, X_2 a variável concentração de enzimas e X_3 a variável tempo.

Tabela 6 – Resultado da regressão múltipla com todos os parâmetros

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,4215	0,0111	0,000003
X ₁ (L)	0,1618	0,0130	0,0002
X ₂ (L)	0,0282	0,0130	0,0958
X ₃ (L)	0,1262	0,0130	0,0006
X ₁ X ₂	-0,0082	0,0130	0,5635
X ₁ X ₃	-0,0762	0,0130	0,0042
X ₂ X ₃	0,0052	0,0130	0,7111

Após a realização da regressão múltipla, com os resultados da Tabela 5, obteve-se a Equação 5 completa com todos os parâmetros relacionados na Tabela 6.

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade} = & 0,4215 + 0,1618X_1 + 0,0282X_2 + 0,1262X_3 \\
 & - 0,0082X_1X_2 - 0,0762X_1X_3 + 0,0052X_2X_3
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

Os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$). Observa-se na Tabela 6 que as variáveis significativas do modelo foram pH, concentração de enzima e tempo nos seus termos lineares (X₁(L), X₂(L) e X₃(L)) e as interação pH/tempo X₁X₃. Com a eliminação dos parâmetros não significativos, obtiveram-se os seguintes parâmetros apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultado da regressão múltipla com os parâmetros significativos

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,4215	0,0096	0
X ₁ (L)	0,1618	0,0113	0,00007
X ₂ (L)	0,0282	0,0113	0,04711
X ₃ (L)	0,1262	0,0113	0,00003
X ₁ X ₃	-0,0762	0,0113	0,00052

O modelo reduzido com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 6.

$$\begin{aligned} \text{Atividade} = & 0,4215 + 0,1618 X_1 \\ & + 0,0282 X_2 + 0,1262 X_3 - 0,0762 X_1 X_3 \end{aligned} \quad (6)$$

O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,98, o qual indica uma juste adequado aos dados experimentais na obtenção da atividade da enzima imobilizada, mostrando que 98% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica. A Figura 7 ilustra a representação dos valores preditos em função observados e a Figura 8 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

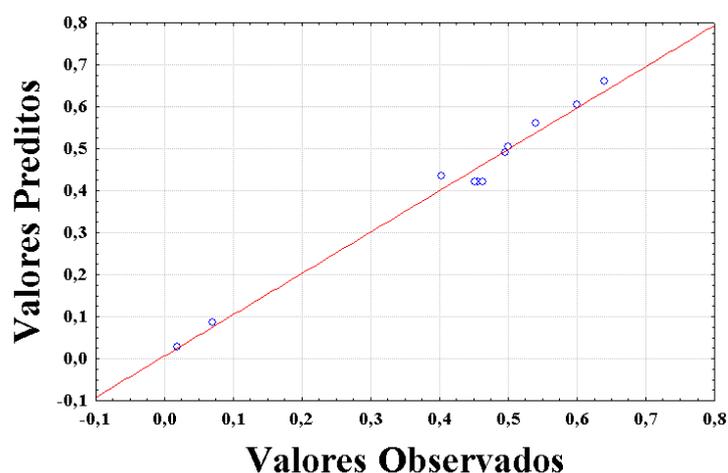


Figura 7 – Valores preditos em função dos valores observados

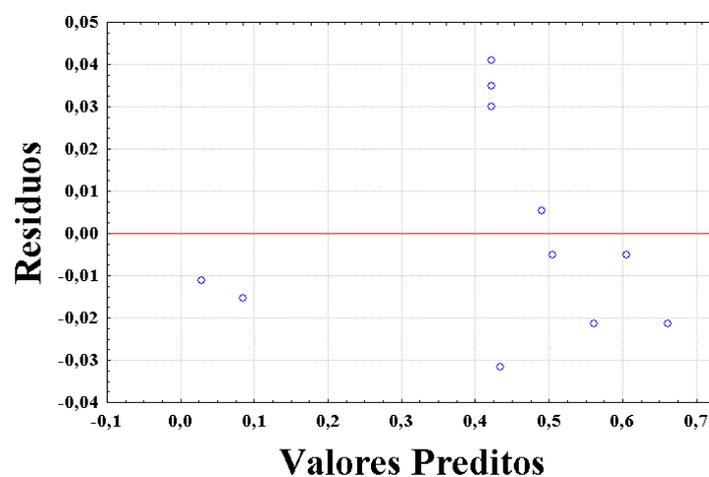


Figura 8 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática

Analisando a Figura 7, observa-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentam valores bem próximos aos valores fornecidos pela equação empírica. Na Figura 8, nota-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do traçado no ponto zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. O modelo mostrou-se significativo, com isso construíram-se as superfícies de resposta, analisando-se de duas em duas, e definindo a melhor tendência de acordo com as maiores atividades. As superfícies estão representadas nas Figuras 9, 10 e 11.

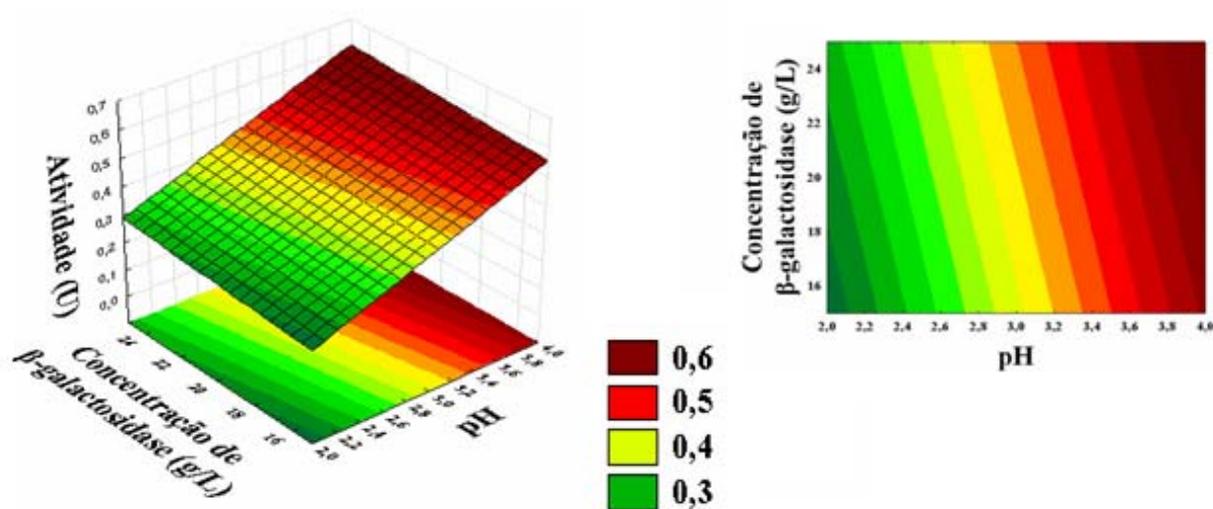


Figura 9 – Superfície de resposta da influência da concentração de enzima e pH na atividade enzimática

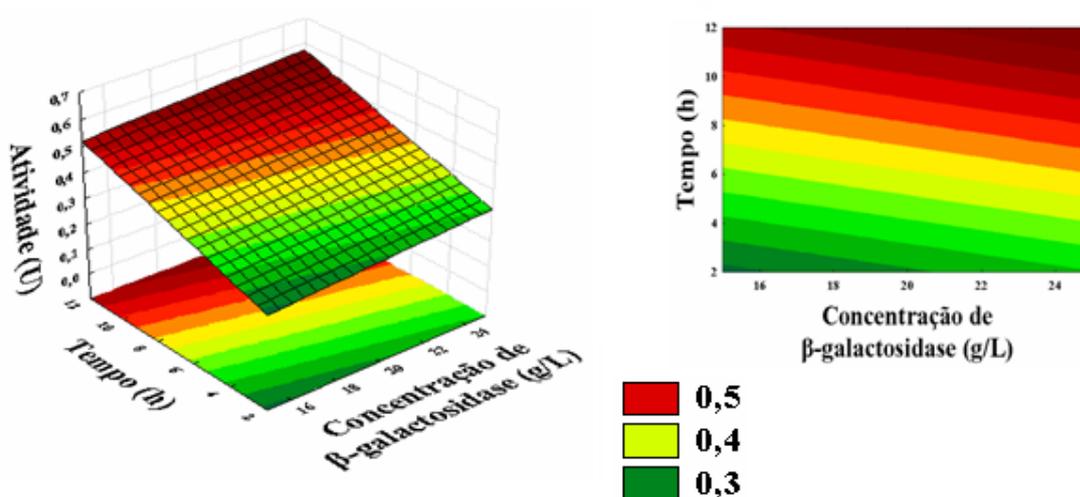


Figura 10 – Superfície de resposta da influência do tempo e concentração de enzima na atividade enzimática

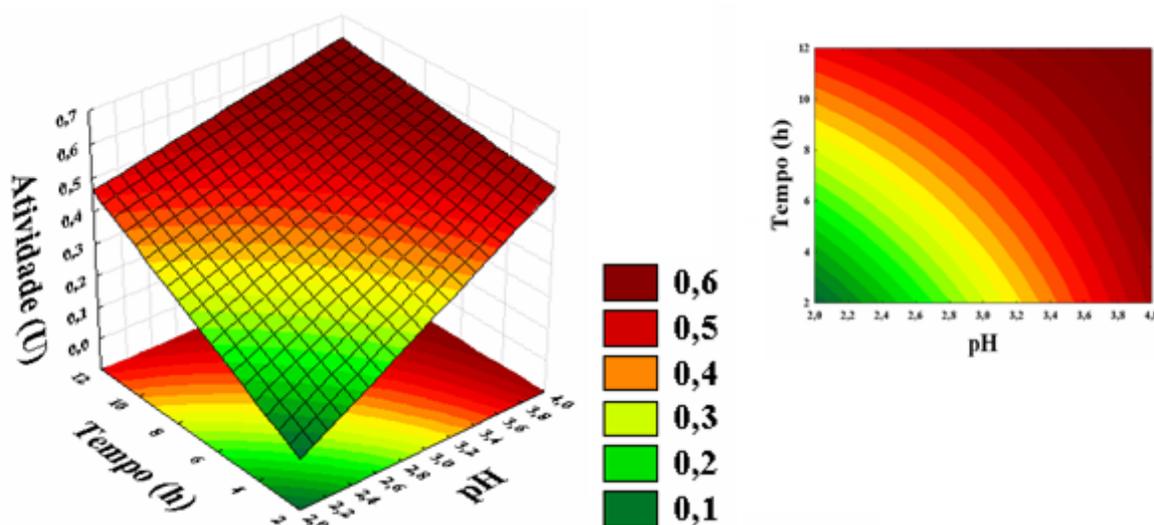


Figura 11 – Superfície de resposta da influência do tempo e pH na atividade enzimática

Considerando os resultados dos dois Planejamentos Fatoriais Completos (1) e (2) pode-se determinar as faixas de pH e concentração de enzima para serem otimizadas por um Planejamento Composto Central (PCC). As faixas definidas para este planejamento foram pH de 3,35 ($-\alpha$) a 5,65 (α) e concentração de enzima de 6,82 ($-\alpha$) a 25,18 g/L (α). Com as superfícies de resposta foi possível determinar um tempo fixo de 12 horas de imobilização para todo o trabalho subsequente. Este tempo foi definido por já estar na faixa ótima e por ter obtido boas atividades.

3.3. Otimização do processo de imobilização

Visando otimizar o processo de imobilização de β -galactosidase em resina Duolite A-568, foram estudadas as influências conjuntas do pH (X_1) e concentração de enzima (X_2) por meio de um Planejamento Composto Central (PCC), conforme item 2.7. Os resultados das atividades enzimáticas obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento composto central da imobilização

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	pH	Concentração de β -galactosidase (g/L)	Atividade (U*)
1	3,5 (-1)	8 (-1)	0,445
2	3,5 (-1)	24 (1)	0,524
3	5,5 (1)	8 (-1)	0,440
4	5,5 (1)	24 (1)	0,509
5	3,35 (- α)	16 (0)	0,410
6	5,65 (α)	16 (0)	0,416
7	4,5 (0)	6,82 (- α)	0,480
8	4,5 (0)	25,18 (α)	0,580
9	4,5 (0)	16 (0)	0,640
10	4,5 (0)	16 (0)	0,660
11	4,5 (0)	16 (0)	0,640

U*=(g_{glicose}/L.min.g_{resina})

Na Tabela 8 pode-se observar que a atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,410 a 0,660 U. Verifica-se que os maiores valores encontrados foram na região do ponto central, experimentos 9, 10 e 11, onde estes experimentos correspondem a pH 4,5 e concentração de enzima 16 g/L. Para o experimento (5) de menor atividade enzimática, nota-se que a concentração de enzima foi de 16 g/L (0) e pH 3,35 (- α).

Os resultados experimentais de atividade enzimática foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. Na Tabela 9 estão representados os termos lineares, termos quadráticos, interações das duas variáveis estudadas e suas respectivas análises no teste *t Student*.

Tabela 9 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,6282	0,0257	0,000002
X ₁ (L)	-0,0021	0,0182	0,9118
X ₁ (Q)	-0,1321	0,0251	0,0033
X ₂ (L)	0,0396	0,0182	0,0809
X ₂ (Q)	-0,0436	0,0251	0,1432
X ₁ X ₂	-0,0027	0,0234	0,9142

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 7 completa com todos os parâmetros:

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade} = & 0,6282 - 0,0021X_1 - 0,1321X_1^2 + \\
 & 0,0396X_2 - 0,0436X_2^2 - 0,0027X_1X_2
 \end{aligned}
 \tag{7}$$

Observa-se na Tabela 9 que as variáveis significativas do modelo foram: concentração de enzima em seu termo linear X₂ (L), o pH na sua forma quadrática X₁ (Q). A concentração de enzima X₂ (Q) (tornou-se um parâmetro significativo com a eliminação dos parâmetros não significativos X₁(L) e X₁X₂) conforme Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,6282	0,0218	0
X ₁ (Q)	-0,1321	0,0212	0,0004
X ₂ (L)	0,0396	0,0154	0,0367
X ₂ (Q)	-0,0436	0,0213	0,0797

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 8.

$$Atividade = 0,6282 - 0,1321X_1^2 + 0,0396X_2 - 0,0436X_2^2 \quad (8)$$

Foram considerados significativos os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$). O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,88, o que indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da atividade da enzima imobilizada, mostrando que 88% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta. A Figura 12 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 13 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

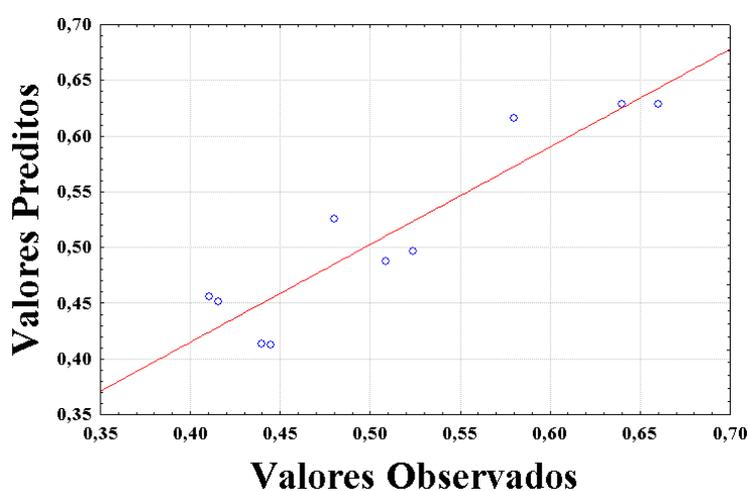


Figura 12 – Valores preditos em função dos valores observados

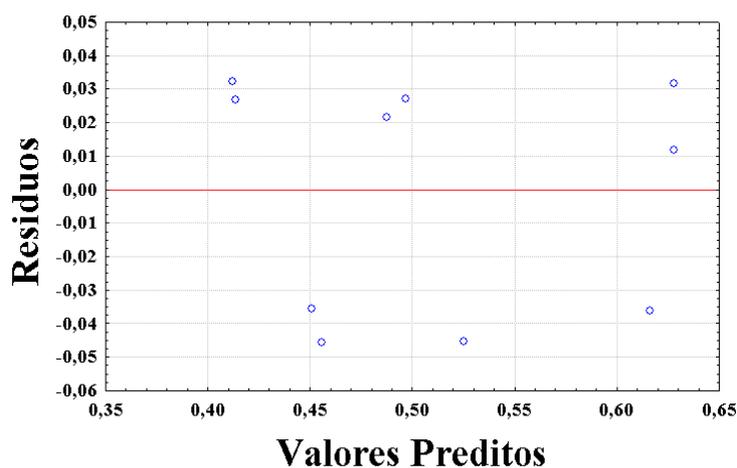


Figura 13 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática

Observando a Figura 12, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação

empírica e na Figura 13, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto a distribuição. Como o modelo mostrou-se significativo foi possível construir a superfície de resposta e otimizar os parâmetros estudados. A superfície de resposta está representada na Figura 14.

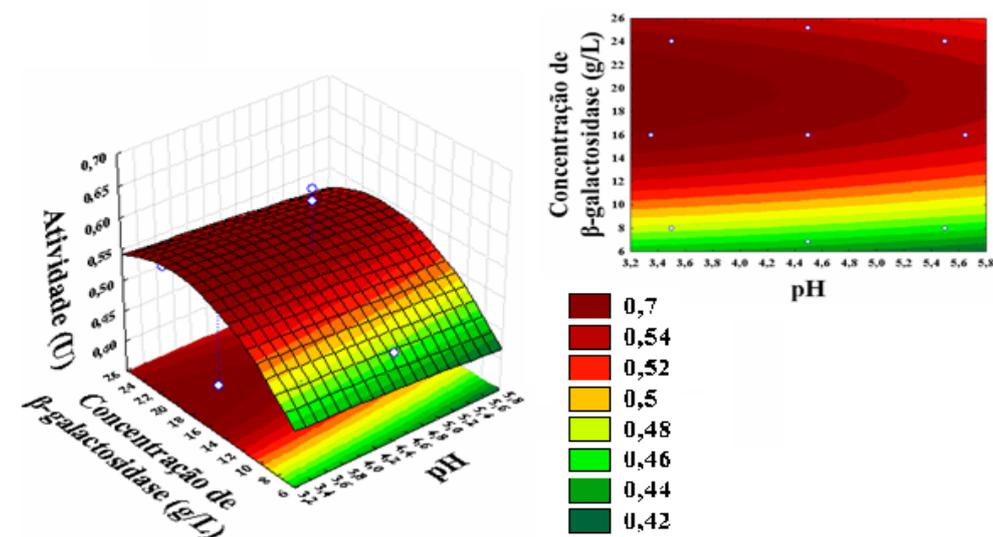


Figura 14 – Superfície de resposta da influência da concentração de β -galactosidase e pH na atividade enzimática na imobilização

Com a equação completa (7), foi realizada uma implementação no programa *Maple* 9.5 para calcular o ponto ótimo para imobilização da enzima, visando maximizar a atividade enzimática. Utilizando as equações de codificação 1 e 2, obtiveram-se os valores reais das variáveis estudadas com concentração de β -galactosidase igual a 19,7g/L e pH 4,5 o qual implicou na máxima atividade da enzima imobilizada de 0,637 U.

Para validar o modelo foram realizados dois experimentos, um na condição ótima dada pelo PCC e o outro dentro da região ótima, porém utilizando uma concentração de β -galactosidase igual a 16 g/L em pH 4,5, obtendo atividades respectivamente de 0,652 U e 0,643 U. Isso indica uma boa concordância entre estes valores experimentais e o calculado pelo modelo. O uso da concentração de 16 g/L que se encontra na região ótima, produziu um biocatalisador com a mesma atividade do ponto ótimo, utilizando menor concentração de enzima na imobilização, o que é uma vantagem econômica.

Para todo trabalho subsequente a ser realizado será utilizado a concentração de β -galactosidase de 16 g/L, pH 4,5 e tempo de imobilização de 12 horas.

3.4. Estabilidade da enzima imobilizada em relação ao número de usos

A amostra de β -galactosidase imobilizada em Duolite A-568, conforme item 3.2.4.5, foi analisada quanto a estabilidade em relação ao número de usos. A atividade da enzima imobilizada após 30 usos foi de 51% em relação à inicial.

4. CONCLUSÃO

A resina que apresentou melhor resultado na imobilização de β -galactosidase por adsorção iônica foi a Duolite A-568.

Utilizando a técnica de superfície de resposta foi possível determinar as condições que maximizaram a atividade da enzima imobilizada, levando em consideração o custo da enzima livre, sem comprometer a resposta a ser alcançada. Utilizando uma concentração de enzima no meio de imobilização igual a 16 g/L e pH 4,5, atingiu-se uma atividade imobilizada de 0,64U.

A atividade da enzima imobilizada após 30 usos foi de 51% em relação à inicial. Estudos mostram que a atividade da enzima em relação à atividade inicial pode ser incrementada submetendo a enzima imobilizada a um processo de reticulação, como exemplo, o processo de ligação cruzada com Glutaraldeído, que segundo a literatura, é eficaz na manutenção da estabilidade da enzima imobilizada em função do número de usos.

5. AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAYRAK, N. e YANG, S. T. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnol. Bioeng.*, 77(1): 8-19, 2002a.
- ALBAYRAK, N. e YANG, S. T. Immobilization of beta-galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Biotechnol. Prog.*, 18(2): 240-251, 2002b.
- ALMEIDA, M.M.; PASTORE, G.M.. Galactooligosacarídeos – Produção e efeitos benéficos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, SBCTA 35 (1/2): 12-19 2001.

- BAO, J., FURUMOTO, K., FUKUNAGA, K., NAKAO, K. A., KOUMATSU, K., YOSHIMOTO, M. Deactivation Kinetics of Immobilized Glucose Oxidase for Production of Calcium Gluconate in an External Loop Airlift Bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 22, pp. 33-41, 2004.
- BÓDALO, A.; GÓMEZ, E.; GÓMEZ, J.L.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M.F.; DIAZ, F.A. A comparison of different methods of β -galactosidase immobilization. *Process Biochemistry*, v. 26, p. 349-353, 1991.
- FREITAS, F. F. Otimização do Processo de Imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de Sódio com Gelatina e Glutaraldeído. Uberlândia, UFU, 2007, p.220.
- GEKAS, V. & LEIVA, L. Hidrolysis of Lactose: a literatura review. *Process Biochemistry*, Ricknansworks 20, 2-12, 1985.
- GAUR, R., PANT, H., JAIN, R. e KHARE, S. K. Galacto-olisaccharides synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*, 97:426-430, 2006.
- HAIDER, T. e HUSAIN Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *International Journal of Biological Macromolecules*. v.41. p. 72–80, 2007.
- <http://www.valio.com>. Acesso em 12/03/2006.
- LADERO, M.; SANTOS, A; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 583-592, 2000.
- JURADO, E.,CAMACHO, F. LUZÓN, G., VICARIA, J. M. A new model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveomyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31 , p. 300-309, 2002.
- MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, v. 63, n.2, p. 147-154, 1998.
- MANNING, T. S. e GIBSON, G. R. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 18(2), 287-298, 2004.
- MARQUES, P. R. B. O., YAMANAKA. H. Biossensores Baseados no Processo de Inibição Enzimática. *Química Nova*, v. 31, n 7, 2008.
- MARQUEZ, L.D.S. Produção De Açúcar Invertido Pelo Uso De Invertase Imobilizada Em Resinas. Dissertação de Mestrado, UFU, 2007.
- O'CONNELL, S. in *Directory of therapeutic enzymes*, Walsh G. and McGrath, M. eds, Tailor and Francis, London, UK pp. 261-290, 2006.

- O'CONNELL, S. and WALSH, G. Physicochemical characteristics of commercial lactases relevant to their application in the alleviation of lactose intolerance. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Article in Press, 2006.
- REUTER, S.; NYGAARD, A.R.; ZIMMERMANN, W. galactooligosaccharides synthesis with β galactosidases from *Sulfolobus sulfataricus*, *Aspergillus oryzae* and *Escherichia coli*. *Enzyme Microbial Technology*, vol. 25, pp. 509-516, 1999.
- SANGEETHA, P. T., RAMESH, M. N. e PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 442-457, 2005.
- SERIO, M. ; MATURO, C. ; ALTERIIS E.; PARASCANDOLA, P; TESSER,R. e SANTACESARIA, E. Lactose Hydrolyses by immobilized galactosidase: the effect of the supports and the kinetics. *Catalyses Today*, pp 333-339, 2003.
- SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic*. v. 10, n. 6, p. 631-637, 2000.
- TANRISEVEN, A.S.; DOGAN, E. A Novel Method for the Immobilization of β -galactosidase. *Process Biochemistry* v.38, p 27-30, 2002.