



INCORPORAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE (E.E. 3.2.1.23) EM MATRIZ POLIMÉRICA DE ÁGAR

INCORPORATION OF β -GALACTHOSIDASE (E.E. 3.2.1.23) ENZYME IN POLYMERIC STRUT OF AGAR

Incorporação da Enzima β -galactosidase (E.E. 3.2.1.23) em Matriz Polimérica de Ágar

Autores: Beatriz Cristina de Oliveira VIEIRA¹, Jefferson Marcolino SCHMOELLER¹, André Luis Fachini de SOUZA^{1,2}.

Identificação autores: ¹Instituto Federal Catarinense - *Campus Araquari*; ²Orientador.

RESUMO

Este trabalho buscou encontrar uma alternativa à produção de produtos sem lactose pela imobilização da enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) comercial (Lactaid®) em suporte sólido de ágar para reaproveitamento da enzima em outros substratos até sua inativação. As enzimas dos comprimidos imobilizadas em ágar foram avaliadas quanto à sua atividade catalítica, assim como o tempo de estabilidade, em uma perspectiva de utilização contínua da enzima imobilizada perante 5 mL de solução de lactose 0,006 mol.L⁻¹. Ao final do trabalho foi observado que a enzima alcança sua atividade máxima em cerca de 7 minutos e mantém sua estabilidade por 6 dias se guardada e refrigerada a 6 °C.

Palavras-chave: β -galactosidase; imobilização; enzima.

ABSTRACT

This occupation sought for a alternative production of lactose free products through the immobilization of the commercial β -galacthosidase (E.C. 3.2.1.23) enzyme in an agar solid suport for reuse of the enzyme in others substrates until your inactivation. The subproduct was tested as for its catalyct activity and stability time, offering the perspective of continuous use of the immobilized enzymes before 5,0 mL of a lactose solution 0,006 mol.L⁻¹. By the end of the research it was observed that the



subjects reached its higher activity in about 7 minutes and kepted its stability for 6 days if stored and refrigerated in 6 °C.

Keywords: β -galactosidase; immobilization; enzyme.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O leite é a principal fonte de nutrientes e proteínas dos mamíferos em seus primeiros dias de vida, incluindo os humanos que mantém este hábito alimentar através do consumo do leite de vaca e de outros animais, acrescentando-os em diversos produtos. Para possibilitar a absorção do açúcar presente no leite, o dissacarídeo lactose, a enzima β -D-galactosidase é produzida pelos organismos dos mamíferos, hidrolisando o composto para a absorção do mesmo durante a digestão (SANTIAGO et al., 2004).

Quando os níveis de β -galactosidase são muito baixos ou nulos em um indivíduo, este não consegue consumir leite ou derivados, já que a lactose não é devidamente digerida no intestino delgado e chega ao cólon, parte do intestino que possui um grande número de bactérias capazes de fermentar a lactose, e causa diversos sintomas gastrointestinais no organismo humano, devido ao fato de produzirem compostos como o hidrogênio e o ácido láctico (TIBBETS, 2008; LIMA, 2012; FALCÃO, 2013). O custo relativamente alto da β -galactosidase é um dos fatores limitantes da sua utilização, fazendo com que sua aplicação direta seja economicamente inviável. Esse problema pode ser equacionado por meio da utilização da enzima imobilizada, uma vez que permite sua reutilização.

Também, devido ao grande número de casos de intolerância à lactose proveniente desta deficiência enzimática, este trabalho visa incorporar a enzima β -galactosidase na matriz polimérica de ágar para avaliar sua atividade enzimática quanto a seu tempo de estabilidade, com uma expectativa de maior aproveitamento da enzima e maior viabilidade de custos.



METODOLOGIA

Para a incorporação da enzima e a realização dos testes foi utilizada uma enzima β -galactosidase comercial LACTAID® em comprimidos e como suporte sólido foi utilizada uma matriz polimérica de ágar bacteriológico.

Inicialmente foi preparada uma solução de ágar 1,0 % (m/v) em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0. A solução foi aquecida para a completa dissolução do ágar e na sequência, após a solução atingir a temperatura de 37 °C, a um volume de 50,0 mL foi adicionado dois comprimidos (60 mg) de enzima comercial macerados. Após a homogeneização completa da enzima na solução tampão, esta foi distribuída em três placas de Petri com volumes similares até a completa solidificação do ágar.

Um volume de 5,0 mL de uma solução de lactose 0,006 mol/L foi adicionado sobre o meio solidificado nas placas, mantidas em temperatura ambiente, e alíquotas desta solução foram coletadas em intervalos de tempo de 10, 30, 45 e 60 minutos após a adição da solução de lactose e em 24 e 192 horas (8 dias) após a adição para análise da estabilidade da enzima incorporada na matriz. Após os experimentos, as placas foram lavadas superficialmente com água destilada e armazenadas a 6 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A avaliação da atividade da enzima foi efetuada por meio da dosagem da concentração de produto formado a partir da hidrólise da enzima. Para a dosagem do produto de reação foi utilizado um kit comercial de dosagem de glicose (GLICOSE Liquiform Labtest®). Este kit consiste em um sistema enzimático para a determinação de glicose baseado na oxidação desta pela glicose oxidase. Um dos produtos dessa reação, peróxido de hidrogênio, reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação da peroxidase formando um composto de coloração vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose na amostra. O produto formado foi determinado por espectrofotometria em comprimento de onda de 505 nm, utilizando uma solução de glicose 100 mg/dL como padrão.



RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade e estabilidade da enzima incorporada em suporte sólido de ágar foram determinadas a partir da dosagem da concentração de produto formado ao longo do tempo. Os resultados mostraram que a atividade máxima da enzima foi atingida dentro dos primeiros 10 minutos de experimentação, mantendo-se estável por pelo menos 24 horas após a imobilização, se mantido refrigerado à 6 °C quando não empregado.

Quando a atividade enzimática foi avaliada após oito dias foi observada uma diminuição significativa na atividade da β -galactosidase, porém retendo ainda aproximadamente 50% da atividade original, apresentando menor desempenho que os testes de WAHBA & HASSAN, cujas enzimas imobilizadas em ágar reteve 92,99% de sua atividade inicial após 15 utilizações consecutivas (2015). Esses resultados sugerem que a enzima após imobilizada manteve sua atividade, hidrolisando consideravelmente o substrato em um curto período de tempo e mantendo esta mesma taxa de atividade por tempos superiores.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho incorporou a enzima comercial β -galactosidase em matriz polimérica de ágar e avaliou preliminarmente sua atividade e estabilidade, revelando uma grande taxa de hidrólise em um curto período de tempo (10 minutos), retendo consideravelmente a atividade por períodos superiores quando armazenadas a 6 °C.

REFERÊNCIAS

FALCÃO, M.C. TEMAS DE PEDIATRIA: Nutrição e desenvolvimento cerebral da criança. N°86. **Nestle Nutrition Institute**. São Paulo, 2013.



LIMA, T.G. **Intolerância à lactose: aspectos clínicos, idagnósticos e terapêuticos.** Trabalho de conclusão de curso (Farmácia) - Universidade Católica de Brasília-DF. 47 folhas, 2012.

SANTIAGO, P.A.; MARQUES, L.B.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. **Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*** - Faculdade de Engenharia Química - Universidade Federal de Uberlândia - MG, 2004.

TIBBETS, T. **Metabolismo dos Carboidratos.** Modelo Ethereal. Maio de 2008. Disponível em: <http://debby2008metabolismo.blogspot.com.br/2008/05/carboidratos.html> (Acessado em: 29 de junho de 2016).

WAHBA, M.I.; HASSAN, M.E. Novel grafted agar disks for the covalent immobilization of β -galactosidase. **Biopolymers**, 103(12):675-84, 2015.