



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA**

**Imobilização da enzima
 β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em
agarose e quitosana utilizando diferentes
protocolos de ativação**

Danielle Cristina Vieira

**São Carlos – SP-Brasil
Fevereiro de 2009**

Danielle Cristina Vieira

**Imobilização da enzima
 β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em
agarose e quitosana utilizando diferentes
protocolos de ativação**

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de Tecnologia Enzimática.

São Carlos – SP
2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

V658ie

Vieira, Danielle Cristina.

Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação / Danielle Cristina Vieira. - São Carlos : UFSCar, 2009.
96 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Imobilização. 2. Quitosana. 3. Agarose. 4. Enzimas. 5. Lactose. I. Título.

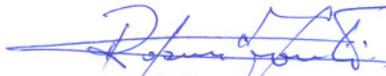
CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **DANIELLE CRISTINA VIEIRA** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 27 DE FEVEREIRO DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, PPG-EQ/UFSCar



Prof. Dr. Rubens Monti
Depto. de Alimentos e Nutrição/FCF-UNESP-Ar



Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
PPG-EQ/UFSCar

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Alécio e Heliane, a minha irmã Lucia e meu irmão Júnior, ao meu companheiro Alexandre e meu filho Luiz Roberto.

“O tempo é algo que não volta atrás, portanto, plante seu jardim e decore sua alma ao invés de esperar que alguém lhe mande flores”.

Sheakespeare

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todos os dias pela vida, pela saúde, pelo amor, pela família, por mais uma batalha que me ajudou a ganhar e por permitir que a minha mãe continuasse comigo.

Aos meus pais Alécio e Heliane que sempre me ouviram e me incentivaram a lutar pelos meus ideais. A minha irmã Lucia e meu irmão Júnior pelo simples fato de serem meus irmãos.

Ao meu companheiro Alexandre que sempre me compreendeu nos momentos difíceis, enxugou minhas lágrimas, compartilhou de meus sorrisos e me estendeu a mão para educar meu filho Luiz Roberto; o qual teve muita paciência comigo nas minhas ausências por conta do mestrado.

À Renata por ter cuidado da minha casa e principalmente por ter cuidado do meu filho com amor e carinho durante estes dois anos.

À Professora Raquel de Lima Camargo Giordano pela orientação, dedicação e paciência, fundamental para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Professor Roberto de Campos Giordano também pela orientação e confiança no meu trabalho.

Ao Professor Paulo Waldir Tardioli pela contribuição e ajuda no fechamento deste trabalho.

À minha amiga Ana Bafuni por ficar com meu filho nos momentos de “hora extra” do mestrado e por me ouvir quando precisei de alguém para desabafar.

Às minhas amigas Lyna, Fabiana, Renata Brito e Bruna por fazerem parte desta história.

Aos meus colegas de pós-graduação do laboratório que junto comigo dividiram incertezas, lágrimas, noites de trabalho e principalmente muitas risadas: Aline, Adriano, Anny, André, Dasciana, Wellington e Andréia.

Agradeço em especial ao Adriano pela dedicação, auxílio, companheirismo e principalmente pela amizade e alto astral que fez meus dias escuros se tornarem iluminados.

Agradeço em especial ao Wellington pelos esclarecimentos e empurrões, e principalmente por ter estado comigo durante um grande período me auxiliando com paciência.

Aos alunos de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar, aos técnicos e prestadores de serviço do departamento, o meu muito obrigado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro; a Novozymes pela doação da enzima e a SPF do Brasil pela doação da lactose, todos de fundamental importância para realização deste trabalho.

ÍNDICE

1-INTRODUÇÃO.....	1
2-REVISÃO IBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Lactose	3
2.2. Enzimas	4
2.3. β -galactosidase	6
2.4. Imobilização de enzimas	8
2.5. Suportes para imobilização	12
2.5.1. Quitosana	15
2.5.1.1. Suportes Híbridos.....	20
2.5.1.2. Modificações químicas na estrutura da quitosana	21
2.5.2. Agarose	23
2.6. Métodos de imobilização de enzimas	25
2.6.1. Imobilização por envolvimento no interior de um suporte.....	26
2.6.2. Imobilização por ligação da enzima a um suporte.....	27
2.6.3. Modificações na enzima pós-imobilização.....	30
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1. Materiais	32
3.1.1. Suportes	32
3.1.2. Enzimas	32
3.1.3. Agentes ativantes	32
3.1.4. Substratos	32
3.2. Métodos	33
3.2.1. Preparação das partículas de híbridos de quitosana e ativação do suporte utilizando glutaraldeído.....	33
3.2.1.1 – Preparação das partículas híbridas de quitosana	33
3.2.2 - Preparação de epóxi-quitosana-alginato.....	34
3.2.3 – Preparação de quitosana-alginato.....	34
3.2.4 – Preparação de quitosana-k-carragenina.....	34
3.2.4.1 – Ativação do suporte quitosana-alginato e quitosana-k-carragenina utilizando glutaraldeído.....	35
3.2.5 – Preparação de gel glioxil-agarose.....	35
3.2.6 – Preparação do gel MANAE	37

3.2.6.1 – Preparação do gel MANAE-glutaraldeído.....	37
3.2.7 – Determinação de proteínas.....	37
3.2.8 – Ensaio de atividade enzimática.....	38
3.2.8.1 – Determinação da atividade hidrolítica da β -galactosidase em Lactose.....	38
3.2.8.1.1 – Determinação da atividade hidrolítica da β -galactosidase em lactose na presença do inibidor.....	38
3.2.8.2 – Determinação da atividade hidrolítica em Lactose da β -galactosidase imobilizada	39
3.2.8.3 – Determinação da atividade hidrolítica da β -galactosidase em <i>o</i> -Nitro-fenilgalactopiranosídeo (<i>o</i> -NPG)	39
3.2.8.4 – Determinação da atividade hidrolítica em <i>o</i> -Nitrofenilgalactopiranosídeo(<i>o</i> -NPG) da β -galactosidase imobilizada.....	40
3.2.9 – Estabilidades, efeito de inibição e velocidade de hidrólise.....	41
3.2.9.1 – Estabilidade Térmica.....	41
3.2.9.2 – Estabilidade Operacional.....	41
3.2.9.3 – Efeito de inibição.....	41
3.2.9.4 – Velocidade de hidrólise.....	42
3.2.10 – Caracterização da temperatura ótima da β -galactosidase	42
3.2.11 – Caracterização do pH ótimo da β -galactosidase	42
3.2.12 - Procedimento de Imobilização em Glioxil-agarose 6 %.....	42
3.2.13 - Procedimento de Imobilização MANAE-glutaraldeído.....	43
3.2.14 - Procedimento de Imobilização em MANAE seguida da reticulação com glutaraldeído ou com o polialdeído.....	43
3.2.14.1 - Procedimento de Imobilização em MANAE seguida da reticulação com glutaraldeído contendo galactose (inibidor) no meio reacional.....	44
3.2.15 – Procedimento de Imobilização da β -galactosidase em Quitosana-glutaraldeído.....	44
3.2.15.1 - Procedimento de Imobilização da β -galactosidase em Quitosana seguida da reticulação com glutaraldeído.....	45
3.2.16 – Procedimento de Imobilização por Encapsulação e conseqüente reticulação com agentes bifuncionais.....	45
3.2.17 - Preparação dos polialdeídos pela oxidação da dextrana.....	46

3.2.18 - Cálculo dos parâmetros de Imobilização.....	47
3.2.18.1 – Cálculo da Atividade Recuperada	47
3.2.18.2 – Cálculo da Proteína Imobilizada	48
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 – Caracterização da β -galactosidase solúvel.....	49
4.1.1-Influência do Tampão sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase.....	49
4.1.2-Influência da Temperatura sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase.....	51
4.1.3-Influência do pH sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase.....	52
4.1.4-Influência do produto galactose na atividade hidrolítica de β -galactosidase.....	53
4.1.5-Estabilidade alcalina de β -galactosidase na presença e ausência do produto inibidor galactose.....	54
4.2- Imobilização de β -galactosidase em géis de Agarose	54
4.2.1- Imobilização da β -galactosidase em gel glioxil-agarose 6% variando as condições de reação	54
4.2.2- Imobilização da β -galactosidase em gel MANAE-glutaraldeído	55
4.2.3- Imobilização da β -galactosidase em gel MANAE por adsorção iônica, seguida da reticulação com glutaraldeído	55
4.2.3.1- Estabilidade térmica de β -galactosidase diluída em tampão de imobilização e do derivado preparado em MANAE reticulado com glutaraldeído.....	58
4.2.4- Imobilização da β -galactosidase em gel glioxil-amino por adsorção iônica, seguida da reticulação com polialdeído dextrana	59
4.2.5- Imobilização por adsorção iônica da β -galactosidase em gel MANAE com agarose 2 e 4 %, seguida da reticulação por polialdeído dextrana ou glutaraldeído.....	60
4.2.6- Encapsulação de β -galactosidase em agarose seguida de reticulação com agentes bifuncionais	62
4.3- Imobilização de β -galactosidase em géis de Quitosana	63
4.3.1- Imobilização da β -galactosidase em gel de epóxi-quitosana-alginato.....	63
4.3.2- Imobilização da β -galactosidase em gel de quitosana-alginato e quitosana-k-carragenina ativados por glutaraldeído.....	64

4.3.3- Encapsulação de β -galactosidase em quitosana seguida de reticulação com glutaraldeído	65
4.3.4-Imobilização da β -galactosidase em gel de quitosana: Efeito do tipo e concentração do agente coagulante e do tempo e temperatura de imobilização sobre as propriedades catalíticas dos biocatalisadores.....	66
4.3.5-Imobilização da β -galactosidase em gel de quitosana seguido da reticulação com glutaraldeído.....	69
4.3.6-Capacidade máxima de imobilização da enzima em gel de quitosana.....	70
4.3.7-Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica da β -galactosidase imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído.....	73
4.3.8-Influência do pH sobre a atividade hidrolítica da β -galactosidase imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído.....	73
4.3.9-Influência da concentração do inibidor na atividade hidrolítica da enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído.....	74
4.3.10-Estabilidade termica dos derivados de quitosana ativada com glutaraldeído a 10°C.....	75
4.3.11-Estabilidade termica dos derivados de quitosana ativada com glutaraldeído a 20 e 40°C.....	77
4.3.12-Estabilidade operacional do derivado de quitosana ativada com glutaraldeído.....	79
4.3.13- Conversão da lactose em glicose utilizando enzima solúvel e imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído.....	80
5- CONCLUSÕES.....	83
6- SUGESTÕES.....	86
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Propriedades de algumas β -galactosidases microbianas	6
Tabela 2.2. Exemplos de suportes quanto à composição química	13

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1. Influência do tipo de tampão e de íons sobre a atividade enzimática de β -galactosidase na hidrólise da lactose.....	49
Tabela 4.2. Influência do tipo de tampão e de íons sobre a atividade enzimática de β -galactosidase na hidrólise do substrato sintético <i>o</i> -NPG.....	50
Tabela 4.3. Influência do pH e da concentração de glutaraldeído na imobilização em gel MANAE reticulado com glutaraldeído.....	56
Tabela 4.4. Influência da concentração de glutaraldeído na imobilização em gel MANAE reticulado com glutaraldeído.....	57
Tabela 4.5. Imobilização em gel MANAE reticulado com dextrana.....	59
Tabela 4.6. Influência da concentração do polialdeído dextrana na imobilização em gel MANAE reticulado com dextrana pouco ativada.....	60
Tabela 4.7. Influência da concentração de agarose, glutaraldeído e dextrana na imobilização em MANAE-agarose seguida da reticulação por estes agentes reticulantes.....	61
Tabela 4.8. Imobilização da β -galactosidase em gel de quitosana-alginato-epoxilada.....	63
Tabela 4.9. Influência do tipo de suporte, tampão, íons, concentração de proteína e do tempo de imobilização na imobilização da β -galactosidase em gel de quitosana-alginato e quitosana-k-carragenina ativados com glutaraldeído.....	64
Tabela 4.10. Influência da concentração de proteína e glutaraldeído, e do tampão de coagulação com íons na encapsulação de β -galactosidase em gel de quitosana reticulado com glutaraldeído.....	65
Tabela 4.11. Influência do tipo de agente coagulante e temperatura de coagulação e o tempo e a temperatura de imobilização sobre a atividade recuperada de β -galactosidase imobilizada em gel de quitosana ativada com glutaraldeído.....	67
Tabela 4.12. Efeito da redução com NaBH_4 sobre a atividade recuperada de derivados imobilizados em quitosana ativada com glutaraldeído.....	69

Tabela 4.13. Influência do tipo de agente coagulante sobre a atividade recuperada de β -galactosidase immobilizada em gel de quitosana seguido da reticulação com glutaraldeído..... 70

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Hidrólise enzimática de lactose catalisada por β -galactosidase.....	5
Figura 2.2. Estabilização das enzimas multiméricas através da imobilização.....	10
Figura 2.3. Imobilização covalente e reticulação de enzimas multiméricas com polialdeídos.....	11
Figura 2.4. Interação entre suporte e enzima.....	14
Figura 2.5. Estrutura dos biopolímeros quitina, quitosana e celulose.....	15
Figura 2.6. Influência do pH sobre a estrutura do hidrogel.....	19
Figura 2.7. Estrutura química de quitosana reticulada com glutaraldeído (A) e epícloridrina (B).....	22
Figura 2.8. Estrutura química da agarose.....	23
Figura 2.9. Métodos para Imobilização de Enzimas.....	26
Figura 2.10. Sistema imobilização-estabilização: ligação covalente amino (enzima)-aldeído (suporte).....	29

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Preparação dos polialdeídos pela oxidação de dextranas.....	47
--	----

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase solúvel na hidrólise de lactose.....	52
Figura 4.2. Influência do pH sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase solúvel na hidrólise do <i>o</i> -NPG.....	53
Figura 4.3. Influência da concentração de galactose na atividade hidrolítica da enzima.....	53
Figura 4.4. Estabilidade térmica de β -galactosidase imobilizada em MANAE reticulado com glutaraldeído.....	58
Figura 4.5. Gráfico da concentração de proteína oferecida pela capacidade máxima de proteína teoricamente imobilizada no suporte.....	71
Figura 4.6. Relação entre a efetividade e o carregamento de proteína.....	72
Figura 4.7. Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase imobilizada na hidrólise da lactose.....	73

Figura 4.8. Influência do pH sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase imobilizada na hidrólise da lactose.....74

Figura 4.9. Influência da concentração de galactose na atividade hidrolítica da enzima imobilizada na hidrólise da lactose.....75

Figura 4.10. Estabilidade termica dos derivados de quitosana ativada com glutaraldeído a 10°C..... 76

Figura 4.11. Estabilidade termica dos derivados de quitosana ativada com glutaraldeído a 20°C..... 78

Figura 4.12. Estabilidade termica dos derivados de quitosana ativada com glutaraldeído a 40°C..... 78

Figura 4.13. Estabilidade operacional dos derivados de quitosana ativada com glutaraldeído a 40°C..... 79

Figura 4.14. Conversão da lactose em glicose com enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído..... 81

Figura 4.15. Conversão da lactose em glicose com enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído..... 81

NOMENCLATURA

<i>o</i> -NPG	<i>o</i> - Nitrofenil galactopiranosídeo
EDA	Etilenodiamina
<i>o</i> -NP	<i>o</i> - Nitrofenol
η	Efetividade
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra Acético sal dissódico

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi imobilizar e estabilizar β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* utilizando diferentes estratégias de imobilização em suportes orgânicos quitosana e agarose, com diferentes protocolos de ativação. Inicialmente, foi avaliado o tipo de tampão, força iônica e a suplementação com íons bivalentes Mn^{2+} e Mg^{2+} sobre a atividade hidrolítica da enzima empregando lactose e *o*-NPG (*o*-nitrofenil galactopiranosídeo) como substratos. A enzima foi imobilizada covalentemente em glioxil-agarose, epóxi-quitosana-alginato e quitosana ativada com glutaraldeído, por encapsulação em agarose e quitosana e por adsorção iônica em MANAE-agarose. Após a imobilização, diferentes estratégias foram adotadas para a estabilização do derivado como o entrecruzamento com glutaraldeído e polialdeído dextrana para a enzima imobilizada por adsorção iônica e a redução com borohidreto de sódio ($NaBH_4$) para a enzima imobilizada covalentemente. Para o melhor derivado de β -galactosidase foram estimados pH e temperatura de máxima atividade catalítica; estudados estabilidade térmica e operacional; efeito de inibição pela galactose e conversão de lactose. Na hidrólise da lactose, as melhores condições avaliadas foram a 45°C em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 e adição de 2 mM $MgCl_2$ e 0,1 mM $MnCl_2$ (6786,5 U/mL de extrato) e na hidrólise do substrato sintético, *o*-NPG, a máxima atividade foi obtida em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 com 2 mM $MgCl_2$ a 25°C (4466,1 U/mL de extrato). A imobilização da enzima em gel glioxil-agarose não forneceu um derivado ativo, pois no pH de imobilização (10,05) a enzima sofreu inativação. Comportamento similar foi verificado para a enzima imobilizada em epóxi-quitosana-alginato. A adsorção iônica da enzima em MANAE-agarose forneceu derivados com elevada atividade catalítica e rendimento de imobilização da ordem de 100%. Porém, o entrecruzamento com polialdeído dextrana e glutaraldeído pós-imobilização reduziu drasticamente a atividade hidrolítica dos derivados provavelmente por distorção da estrutura ativa da enzima. Mesmo com o entrecruzamento, a estabilidade térmica destes derivados a 10°C apresentou um comportamento similar à enzima livre. Com o propósito de obter um derivado mais estável termicamente e com elevada atividade catalítica, foram avaliadas diferentes estratégias de imobilização covalente em quitosana coagulada por diferentes soluções e temperatura. O derivado que forneceu maior atividade catalítica foi obtido imobilizando a enzima em quitosana coagulada em solução 0,5 M de KOH a 50°C e ativado com glutaraldeído 0,8% (v/v), com atividade recuperada e rendimento de imobilização de 100%. A máxima concentração de enzima imobilizada neste suporte foi de 247,0 mg de proteína/g de gel. Após o carregamento de 25 mg/g de gel, limitação difusional foi verificada. A imobilização não alterou o pH e temperatura de máxima atividade hidrolítica da β -galactosidase. A enzima imobilizada em quitosana-glutaraldeído perdeu apenas 20% da atividade inicial após 90 dias incubada no tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 com íons bivalentes Mn^{2+} e Mg^{2+} a 10°C, foi 3-5 vezes mais estável que a enzima solúvel nas temperaturas de 20 e 40°C, pH7,0. A estabilidade operacional (40°C e pH7,0) realizada em 4 ciclos mostrou uma perda de 17% da atividade hidrolítica inicial ao final do quarto ciclo. Outro fato relevante foi o menor efeito de inibição da enzima imobilizada pela galactose em comparação à enzima solúvel, mesmo em altas concentrações (5 g/L). Na hidrólise de lactose a 40°C e pH 7,0 foi verificada uma conversão de 70% da lactose para ambas as enzimas, solúvel e imobilizada. De acordo com os resultados obtidos, pôde-se verificar que a imobilização de β -galactosidase em quitosana ativada com glutaraldeído foi vantajosa, pois permite o desenvolvimento de processos contínuos de produção, simplifica a etapa de purificação do produto final e especificamente para fins alimentícios, reduz ou evita a contaminação do produto pelo biocatalisador.

Palavras-chave: Imobilização, β -galactosidase, agarose e quitosana.

ABSTRACT: The objective of this work was stabilize and immobilize β -galactosidase from activated agarose and chitosan supports. Initially, it was evaluated the buffer type, ionic strength and bivalent ions Mn^{2+} and Mg^{2+} on the hydrolytic activity of the enzyme using as substrates lactose and *o*-NPG (*o*-nitrophenyl galactopyranoside). Then the enzyme was covalently immobilized on glyoxyl-agarose, epoxy-chitosan-alginate and chitosan activated with glutaraldehyde, encapsulation in agarose and chitosan and ionic adsorption on MANAE-agarose. After immobilization, different strategies were used to stabilize the derivative such as crosslinking with glutaraldehyde and polyaldehyde dextran for the enzyme immobilized by ionic adsorption and reduction with sodium borohydride ($NaBH_4$) for the enzyme covalently immobilized. For the derivative with maximum catalytic activity obtained, we estimated the kinetic and biochemical parameters as well as thermal stability at different temperatures and storage, operational stability, effect of inhibition by galactose and lactose yield. In the lactose hydrolysis, the best conditions were evaluated at 45°C in 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and addition of 2 mM $MgCl_2$ and 0.1 mM $MnCl_2$ (6786.5 U/mL of crude extract) and in the hydrolysis of synthetic substrate, *o*-NPG, the conditions for maximum catalytic activity was buffer sodium phosphate pH 7.0 50 mM with 2 mM $MgCl_2$ at 25°C (4466.1 U/mL of crude extract). The enzyme immobilization on glyoxyl-agarose at pH 10.05 inactivated the enzyme. At pH 7.0, the enzyme was not immobilized. Similar behavior was observed for the enzyme immobilized on epoxy-chitosan-alginate. The ionic adsorption of the enzyme on MANAE-agarose allowed obtaining derivatives with high catalytic activity and immobilization yield around 100%. Nevertheless the crosslinking of the immobilized enzyme using polyaldehyde dextran and glutaraldehyde reduced drastically the hydrolytic activity of the derivatives by distortion of the enzyme structure. Besides the thermal stability of these derivatives at 10°C showed a similar behavior to the free enzyme. In order to obtain a derivative with high thermal stability on catalytic activity, the covalent immobilization on coagulated chitosan by different solutions and temperature. The derivative that provided higher catalytic activity was coagulated in a solution of 0.5 M KOH at 50°C and activated with glutaraldehyde 0.8% (v/v), with immobilization yield and recovered activity of 100%. An assay of loading of the support showed that 247,0 mg protein/ g gel was the maximum load. However diffusional limitation was verified even at 25 mg/g of gel. The immobilization process did not change the biochemical properties of the enzyme (optimum temperature and pH). In the storage stability at 10 ° C, the derivative covalently immobilized lost only 20% of initial activity after 90 days. The enzyme immobilized on chitosan was 3-5 fold more stable than the soluble enzyme at 20 and 40°C. The operational stability in 4 cycles showed a loss of 17% of hydrolytic activity after 4 cycles. Another important fact was the smallest effect of inhibition by galactose compared to soluble enzyme, even at high concentrations (5 g/L). In the hydrolysis of lactose the conversion was 70 % using insoluble and immobilized enzymes. We can conclude that the β -galactosidase immobilized on chitosan activated with glutaraldehyde showed good properties, because it allows the development of continuous processes, facility of downstream process (product purification), avoiding contamination of the product by the biocatalyst. This advantage is very important specially for food industry.

Key-words: Immobilization, β -galactosidase, agarose and chitosan

1 – INTRODUÇÃO

A utilização da lactose em produtos alimentícios é limitada por causa de sua baixa solubilidade, baixo poder adoçante e restrição ao consumo deste alimento por pessoas que apresentam intolerância a esse sacarídeo, devido à deficiência da enzima β -galactosidase no intestino delgado, responsável pela hidrólise da lactose, que gera os monossacarídeos glicose e galactose (Pessela *et al*, 2003).

Uma situação importante a ser considerada nas indústrias de laticínios é a gestão ambiental, e um dos principais problemas encontrados nesta área é o destino a ser dado aos subprodutos, como por exemplo, o soro, que possui em sua composição, aproximadamente 5 % m/v de lactose (Giacomini *et al*, 1998). A lactose quando hidrolisada possui maior poder adoçante e maior solubilidade, além de apresentar diversas vantagens adicionais que permitem obter novos produtos economicamente atrativos. Assim, a hidrólise da lactose agrega valor ao soro, evitando o seu descarte sem tratamento e/ou reduzir os custos com tratamento de efluentes nos laticínios.

A reação de hidrólise pode ser catalisada por ácidos ou enzimas. Na hidrólise ácida há a ocorrência de reações paralelas complexas (Hatzinikolaou *et al*, 2005), a hidrólise enzimática é altamente seletiva e os produtos obtidos preservam as suas propriedades (Ladero *et al.*, 2000). Esta hidrólise é catalisada pela enzima β -galactosidase, também chamada de lactase; porém, nem todas as lactases são aceitas e reconhecidas como seguras para utilização na indústria de alimentos.

As β -galactosidases comumente utilizadas para a hidrólise da lactose são extraídas de leveduras como *Kluyveromyces (lactis* ou *fragilis*) ou ainda podem ser obtidas de fungos como *Aspergillus niger* (Gekas e López-Leiva, 1985). A β -galactosidase proveniente do microrganismo *Kluyveromyces fragilis* é uma enzima dimérica, de massa molecular de aproximadamente 200 kDa (Mahoney e Whitaker, 1977).

Apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, devido a sua especificidade e alto poder catalítico, sua aplicação industrial não é tão imediata. Esses biocatalizadores geralmente são caros e como são solúveis e estão presente em baixa concentração no meio, sua recuperação após o uso dificilmente será economicamente viável. A imobilização das enzimas em suportes insolúveis permite reuso da enzima. Outra característica indesejada das enzimas é sua baixa

estabilidade, pois mantém sua conformação e atividade apenas em uma faixa limitada de condições experimentais.

A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma importante ferramenta para viabilizar a utilização das enzimas, pois permite a sua reutilização e pode reduzir significativamente a inativação por influência da temperatura e solventes orgânicos, o que pode ser atrativo para o setor industrial, pois para que a aplicação de enzimas no setor industrial seja viável é necessário obter biocatalisadores ativos e estáveis termicamente (López-Gallego *et al.*, 2005).

A estabilização das enzimas multiméricas é uma importante etapa para a sua aplicação industrial. Em alguns casos, a dissociação das subunidades é um dos primeiros passos para a inativação da enzima, que pode ocorrer rapidamente em condições diluídas. As subunidades da proteína que não estão ligadas ao suporte podem ser desorvidas, contaminando o meio e o produto final, requerendo etapas de purificação que pode encarecer o produto final (Bolívar *et al.*, 2009).

A imobilização das subunidades da enzima pode ser interessante porque permite a estabilização da estrutura multimérica da proteína e a sua rigidificação por meio de ligações covalentes. Suportes altamente carregados são os mais apropriados para a estabilização das enzimas multiméricas porque possibilitam máxima interação enzima-suporte (Pedroche *et al.*, 2007). Entretanto, uma intensa interação enzima-suporte, promove a distorção da enzima, desnaturando à mesma (Bolívar *et al.*, 2009).

Sendo assim, torna-se importante a seleção de um suporte contendo uma concentração suficiente de grupos reativos para promover a adsorção de uma pequena porcentagem da enzima e apresentando uma alta densidade de grupos capazes de reagir covalentemente com a enzima já adsorvida. Atingir esse objetivo requer um método de ativação adequado que permita obter essa concentração ideal de grupos reativos na superfície do suporte para interagir com os grupos reativos da enzima, preservando a estrutura multimérica da mesma; é uma etapa importante para a obtenção destes biocatalisadores (Bolívar *et al.*, 2009).

O objetivo do presente trabalho foi estudar diferentes estratégias de imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* nos suportes quitosana e agarose, visando insolubilização e aumento da estabilidade da enzima.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – LACTOSE

A lactose é o principal açúcar do leite e de vários produtos lácteos, um dissacarídeo redutor pouco solúvel e com baixa doçura quando comparado com os produtos de sua hidrólise: glicose e galactose (Ladero *et al.*, 2000).

A lactose tem tendência a adsorver odores e sabores e é higroscópica, o que causa o endurecimento dos derivados lácteos em pó. Ela cristaliza em baixas temperaturas, dando textura arenosa aos laticínios. Além disso, não é adequada a pessoas que sofrem de intolerância à lactose (deficiência da enzima lactase no intestino) e galactosemia (incapacidade de metabolizar a galactose). Finalmente, a lactose do soro de queijo é um sério problema dos efluentes na indústria de laticínios, devido à elevada DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (Hatzinikolaou *et al.*, 2005; Novalin *et al.*, 2005; Şener *et al.*, 2006). A hidrólise da lactose agrega valor no soro de queijo, que passará de efluente a subproduto e resolverá, assim, todos os problemas causados pela lactose.

Os dois métodos utilizados para a hidrólise da lactose são: o método ácido e o método enzimático. Quando ácidos são utilizados como catalisadores, a reação é muito rápida, a temperatura da reação é muito alta (em torno de 150°C) e os produtos adquirem cor e odor que impedem sua utilização direta em alimentos. A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite ou soro sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as suas propriedades (Hatzinikolaou *et al.*, 2005; Ladero *et al.*, 2000).

O uso de enzimas permite condições mais moderadas de temperatura e pH e não causa problemas nos produtos obtidos, como a desnaturação das proteínas (que podem estar presentes na solução de lactose), o aparecimento de coloração marrom, o que implica na necessidade de se utilizar um descolorante, e o rendimento de subprodutos indesejáveis, normais nos métodos ácidos. Portanto, para aplicações na indústria de alimentos, o método mais recomendável é o enzimático (Hatzinikolaou *et al.*, 2005).

2.2 – ENZIMAS

Enzimas são biocatalisadores de natureza protéica ou glicoprotéica, que atuam de forma a acelerar uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação, sem alterar o equilíbrio da reação. Com enzimas, a catálise é realizada em condições brandas e na maioria das vezes em soluções aquosas, sob pressão e temperaturas amenas. Essas são algumas características que fazem as enzimas diferenciarem dos catalisadores químicos, sendo a principal delas o seu alto grau de especificidade em relação ao substrato.

As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial podem ser associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista, ou produtos contaminados, que requerem uma etapa posterior de purificação (Krajewska, 2004).

As enzimas utilizadas nos setores industriais são quase em sua totalidade produzidas por microrganismos. A tecnologia enzimática apareceu como área de investigação durante a década de 60, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (Krajewska, 2004).

O uso de enzimas se torna interessante quando permite que pequenas quantidades sejam suficientes para catalisar reações específicas devido a sua grande eficiência em condições suaves. Sua alta seletividade faz com que as enzimas sejam extremamente úteis em processos envolvendo oxidações, condensações ou hidrólises, principalmente se o produto final for destinado a fins alimentícios.

Biocatálise ou biotransformação são processos nos quais um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato por um número limitado de etapas enzimáticas. Para que este processo de biotransformação seja eficaz, é necessária a análise detalhada dos fatores que condicionam o desenvolvimento e otimização integrada de um processo biotecnológico (Aires-Barros, 2002). A estratégia de desenvolvimento e otimização de um bioprocessos depende do biocatalisador, da bioconversão, da recuperação e purificação do produto.

O poder catalítico e seletividade das enzimas dependem da manutenção da sua estrutura terciária e, se multimérica, também da quaternária. Qualquer agente que altere essas estruturas tais como pH, temperatura e solventes hidrofóbicos podem causar a inativação da enzima.

Enzimas são frágeis operacionalmente, pois o projeto original delas prevê utilização no ambiente intracelular. Quando alterações no meio provocam sua inativação, ela é enviada para hidrólise total para reutilização dos aminoácidos. Se ainda for necessário, uma nova molécula é sintetizada pela célula. Assim, as enzimas são geralmente comercializadas na presença de aditivos que protegem a proteína da inativação durante a estocagem (Zanin e Moraes, 2004).

2.3 – β -GALACTOSIDASE

A enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23), também chamada lactase, é produzida por uma grande variedade de seres vivos. Enzimas de fontes distintas possuem características físicas e químicas diferentes quanto às condições de hidrólise da lactose. Esta enzima hidrolisa a ligação $\beta(1-4)$ da molécula de lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose (Figura 2.1), de grande interesse para a indústria de laticínios (Gekas e Lopez-Leiva, 1985).

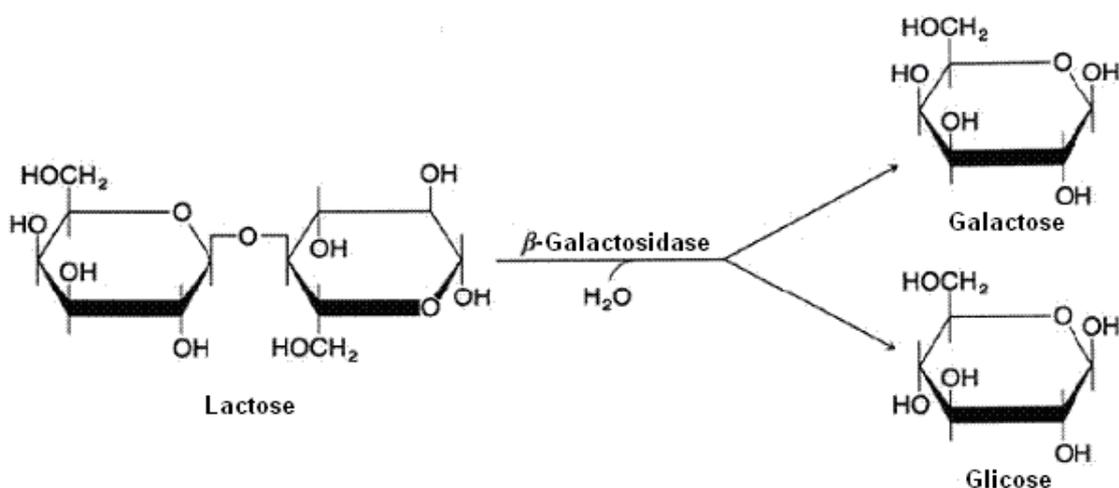


Figura 2.1. Hidrólise enzimática de lactose catalisada por β -galactosidase.

As lactases são encontradas em fontes animais, vegetais e microbianas (Gekas e Lopez-Leiva, 1985). Entretanto, lactases de fungos, leveduras e bactérias são as mais

empregadas e as suas propriedades catalíticas são mostradas na Tabela 2.1. A lactose é o substrato natural mais utilizado para essas enzimas.

As β -galactosidases são enzimas cada vez mais empregadas em aplicações industriais na indústria de laticínios. A sua capacidade como biocatalisadores para hidrólise da lactose do leite e soro permite a produção de produtos lácteos de baixo teor de lactose para pessoas intolerantes a este açúcar, cerca de 75% da população mundial, e serve para reciclar o soro e utilizá-lo como um aditivo para a alimentação humana ou de animais (Ladero *et al.*, 2006).

Tabela 2.1. Propriedades de algumas β -galactosidases microbianas.

Fonte	pH estabilidade	Temperatura Ótima (°C)	Cofatores necessários	Massa molecular (kDa)	Referência bibliográfica
<i>Aspergillus niger</i>	2,5-8,0	55-60	nenhum	124	Widmer e Leuba 1979
<i>Escherichia coli</i>	6,0-8,0	40	Na ⁺ , K ⁺	540	Wallenfels e Malhotra, 1960
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,5-7,5	37	K ⁺ , Mn ⁺ , Mg ⁺	200	Mahoney e Witaker, 1977
<i>Kluyveromyces lactis</i>	7,0-7,5	35	Na ⁺ , Mg ⁺ , Mn ⁺	135	Cavaille e Combes, 1995
<i>Penicillium canescens</i>	4,0-5,0	30	nenhum	120	Budriene <i>et al.</i> , 2005
<i>Thermus</i> s.p. strain T2	6,0-10,0	70	nenhum	550	Ladero <i>et al.</i> , 2002

As enzimas com pH ótimo ácido e temperatura ótima relativamente alta são convenientes para a hidrólise de lactose em soro ácido. Comparada com a lactase de bactérias e leveduras, as fúngicas são proteínas relativamente pequenas, que não requerem íons metálicos para a estabilidade ou atividade, como mostrado na Tabela 2.1,

uma grande vantagem em processos alimentícios. As enzimas de leveduras têm pH ótimo neutro, conveniente para a hidrólise da lactose do leite ou soro doce. Elas são menos estáveis que as fúngicas e podem ser usadas somente em temperaturas moderadas.

β -galactosidase de *Escherichia coli* é a galactosidase bacteriana mais conhecida em níveis estruturais e catalíticos, disponível comercialmente na forma pura e bruta e pode ser utilizada para hidrólise da lactose ou para produção de oligossacarídeos. Esta enzima é um tetrâmero e tem um mecanismo especial durante a produção de oligossacarídeos, o que leva diretamente para a formação do dissacarídeo galactobiose como produto principal da reação (Pessela *et al*, 2007). Estes galacto-oligossacarídeos tem efeitos benéficos para o nosso organismo, são fatores que promovem o crescimento das bactérias intestinais desejáveis. Além disso, podem ser usados em aplicações potenciais na produção de ingredientes alimentares, farmacêuticos e de outros compostos biologicamente ativos (Santiago *et al*, 2000).

As enzimas de origem fúngicas, como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* são relativamente pequenas e independentes de metais, são ativas em pH ácido e, portanto, utilizadas na maioria das vezes para hidrólise em soro ácido. A lactase de *A. oryzae* é comparativamente mais barata, porém, é menos estável e com elevada atividade na síntese de oligossacarídeos (Yang e Okos, 1988).

A enzima de *Thermus sp.*, organismo termofílico, é um octômero, com massa molecular média de 550 kDa (Ladero *et al*, 2002). De acordo com os relatos de Ladero *et al.* (2002), esta enzima produz o trissacarídeo gal-gal-gli, é inibida não só pela galactose, mas também por metais e é muito mais estável a pH básico e temperaturas elevadas. Isto a torna interessante, pois a enzima de *Thermus sp.* pode ser imobilizada covalentemente em pH alcalino sem perda considerável de atividade. A estabilidade das enzimas termofílicas na presença de solventes depende do tamanho molecular e da polaridade de cada solvente, porém, estas enzimas são menos estáveis a agentes oxidantes. A maior complexidade da estrutura desta enzima e a menor exposição das interações hidrofóbicas podem estar relacionadas com a sua alta estabilidade. Uma forma mais compacta e com alta carga superficial pode contribuir também para esta estabilidade. No entanto, a ação dos agentes oxidantes, mais de aminoácidos aromáticos, se estes forem importantes para a atividade da enzima, poderão ocasionar uma baixa estabilidade da mesma (Ladero *et al*, 2002).

As enzimas de leveduras do gênero *Kluyveromyces* são ativas a pH neutro e, portanto, empregadas na hidrólise do leite e do soro doce. É relatado que enzimas deste gênero são inibidas na presença de produtos da reação (Mateo *et al*, 2004). As enzimas de levedura produzem também os dissacarídeos gal-gal e os trissacarídeos gal-gal-gli (Ladero *et al*, 2002).

A lactase de *Kluyveromyces fragilis*, um organismo mesófilo, tem massa molecular em torno de 200 kDa e corresponde a um dímero, de acordo com os relatos de Mahoney and Whitaker, em 1977. Essa enzima é completamente dependente de metais como Mn^{+} , Mg^{+} e K^{+} . Os metais e as enzimas estão envolvidos em uma reação reversível que promove a formação de um complexo enzimático. Esse complexo enzima-íon metálico é 50% mais ativo do que a enzima sozinha (Ladero *et al*, 2002). Assim como nos organismos termofílicos, a estabilidade das enzimas mesófilas aos efeitos de solventes solúveis depende do tamanho molecular e da polaridade de cada solvente. Etanol, por exemplo, é muito agressivo às enzimas mesofílicas, embora essas enzimas sejam mais resistentes a agentes oxidantes do que as termófilas. As enzimas mesofílicas também são estáveis quando um agente surfactante não iônico está presente no meio. Segundo Ladero *et al*. (2002), a uréia, por exemplo, exerce uma alta inativação na enzima de levedura, mas a estabilidade das termófilas é surpreendentemente alta na presença de uréia. A enzima de *Kluyveromyces fragilis* é inibida competitivamente pela galactose durante a hidrólise da lactose, e incompetivamente pelo *o*-nitrofenol durante a hidrólise do *o*-NPG, *o*-nitro-fenilgalactopiranosídeo, um substrato sintético (Ladero *et al*, 2002).

2.4 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Inúmeras enzimas imobilizadas em suportes sólidos por diferentes protocolos têm sido amplamente empregadas na produção de alimentos, produtos farmacêuticos e outros produtos biologicamente importantes.

A principal desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel como catalisador industrial é a sua baixa estabilidade. Para resolver este problema, várias abordagens têm sido propostas: a imobilização de enzimas, o uso de glicóis e outros aditivos estabilizantes, reticulação com agentes bifuncionais, seleção de enzimas de organismos termófilos ou ainda modificações química na enzima (Ladero *et al*, 2002; Giacomini, *et al*, 2001).

A imobilização de enzimas normalmente é necessária, pois esta permite inúmeras vantagens, tais como:

- A reutilização do biocatalizador;
- A redução do volume de reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em um menor volume de reator;
- A facilidade do controle operacional; operar de forma contínua possibilita um controle mais fácil das variáveis do processo;
- É a fácil purificação do produto sem contaminação pelo catalisador, visto que a enzima imobilizada não é solúvel no meio de reação.

No entanto, a enzima com sua mobilidade restringida pelo fato de estar ligada a um suporte dificulta a acessibilidade do substrato a mesma, o que leva à aparente redução da atividade, neste caso provocado por restrições difusionais, ou seja, limitações do acesso do substrato ao sítio ativo devido à presença da matriz sólida. Ocorre também acúmulo de produto na proximidade do sítio ativo, o que pode afetar a cinética de reação, pela redução da velocidade de reação ou alteração do pH no microambiente da enzima (Pessela *et al*, 2007).

Em geral, a imobilização de proteínas promove distorções da estrutura da enzima, que leva a uma diminuição da atividade da enzima.

Quando um biocatalisador ou uma preparação enzimática é selecionado para determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos também devem ser avaliados e otimizados.

As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte, pois a água contribui para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, além de limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (Dalla-Vecchia *et al*, 2004).

As enzimas multiméricas são enzimas muito complexas cujo sítio ativo pode ser determinado pela exata montagem das diferentes subunidades. Isto significa que, se pudermos imobilizar estas enzimas utilizando diferentes protocolos, envolvendo diferentes regiões da proteína, a imobilização pode produzir pequenas distorções sobre a

montagem das subunidades, alterando a forma do sítio ativo e produzindo enzimas imobilizadas com propriedades diferentes (Pessela *et al*, 2007).

As inativações de enzimas multiméricas podem ser fortemente influenciadas pela dissociação das subunidades (Pessela *et al*, 2008). Ligações não-covalentes existentes entre os monômeros podem estabilizar a estrutura individual de cada monômero montando corretamente a estrutura multimérica. Caso contrário, mudanças conformacionais promovidas, por exemplo, pelo calor, pH e agentes oxidantes sobre os monômeros podem ser rápidas e intensas (Fernández-Lafuente *et al*, 1999).

Uma reticulação química intensa entre as subunidades deveria ser uma das melhores abordagens para se estabilizar a estrutura multimérica da enzima. Contudo, essa é uma estratégia muito difícil, pois a reação de enzimas com agentes reticulantes pode promover não só uma rápida e intensa reticulação intersubunidades, mas também um elevado número de reações colaterais indesejáveis, o que poderá promover a distorção e conseqüentemente inativação da enzima (Fernández-Lafuente *et al*, 1999).

No entanto, se bem controlado o processo, a inativação das enzimas multiméricas pela dissociação de suas subunidades pode ser resolvida através da imobilização, como mostrado na Figura 2.2 por Fernández-Lafuente (Fernández-Lafuente *et al*, 1999; Kaddour *et al*, 2008; Pessela *et al*, 2008).

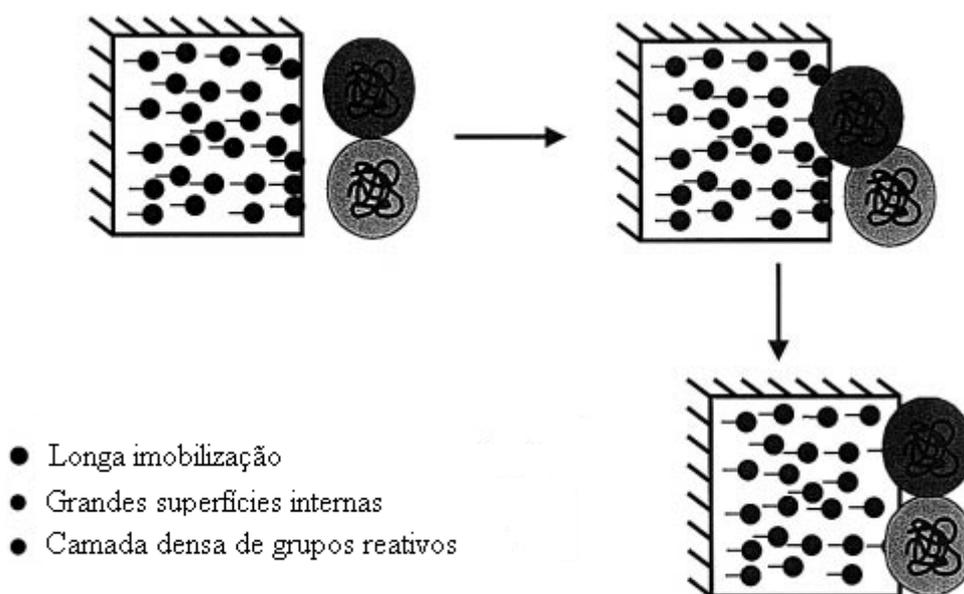


Figura 2.2. Estabilização das enzimas multiméricas através da imobilização.

Fernández-Lafuente *et al* (1999), propuseram que depois de uma intensa imobilização covalente, os derivados fossem reticulados com macromoléculas polifuncionais, como mostrado na Figura 2.3.

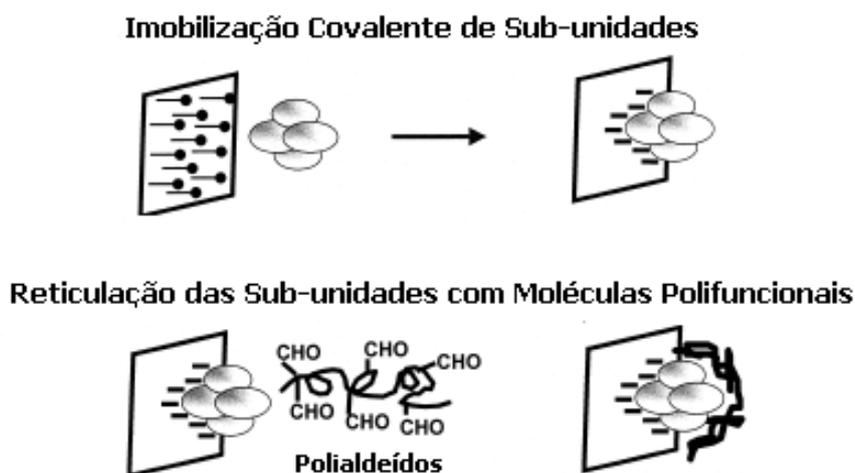


Figura 2.3. Imobilização covalente e reticulação de enzimas multiméricas com polialdeídos.

A reticulação com macromoléculas deverá ser mais fácil de controlar do que com moléculas bi-funcionais, porque pode ocorrer entre grupos localizados com distâncias muito diferentes. Além disso, reticulações multipontuais com melhora na estabilidade estrutural da enzima podem ser alcançadas facilmente. As macromoléculas polifuncionais podem ser obtidas a partir de dextrana comercial. A dextrana pode ser oxidada pelo periodato de sódio rendendo um polialdeído de estrutura adequada para reagir com os grupos amino da proteína. A reação entre os grupos polialdeídos e a proteína ocorre através da formação de bases de Schiff. A reação é finalizada com a adição de borohidreto para a redução das bases de Schiff a grupos amino secundários e a conversão dos polialdeídos em poliálcoois (Fernández-Lafuente *et al*, 1999).

Em muitos casos, existem cátions presentes na montagem da estrutura multimérica das enzimas, os quais podem nem ser essenciais para a atividade enzimática, mas muito importantes para a estabilidade da enzima. Portanto, dependendo da dissociação do complexo enzima-íon, a diluição das enzimas pode ocasionar uma redução na estabilidade delas, mesmo que todas as subunidades estejam ligadas covalentemente ao suporte, pois ocorre a diluição do cátion. Isso pode ser resolvido aumentando a força da ligação deste cátion para a posição correta (Kaddour *et al*, 2008).

Porém, em alguns casos, se a dissociação das subunidades é o primeiro passo para a inativação, pode ser muito difícil descobrir a implicação de um íon envolvido na estabilidade da proteína. O uso de moléculas de enzimas com a estrutura multimérica estabilizada pode permitir detectar o efeito dos íons na enzima, evitando a dissociação das subunidades. Então, a estabilização da estrutura quaternária das enzimas multiméricas pode ser interessante não só para a aplicação da mesma, mas também para se estudar outras propriedades da enzima (Kaddour *et al*, 2008).

Entretanto, todos os problemas citados acima podem ser evitados ou diminuídos pela escolha criteriosa do suporte.

2.5 – SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

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, podem sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima sob expansão ou contração, quando submetido a variações de temperatura (Kennedy, 1987).

O suporte deve ser quimicamente resistente nas condições de ativação, durante o processo de imobilização e nas condições em que se processa a reação, devem 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 (Kennedy, 1987).

A morfologia do suporte é muito importante, pois o mesmo deve ter alta porosidade, o que permite ter uma grande área superficial interna para a imobilização da

enzima, e poros com diâmetro suficiente para permitir o fácil acesso da enzima e do substrato.

A resistência ao ataque microbiológico é mais um dos critérios na seleção do suporte, pois o mesmo deve resistir à degradação por microrganismos, evitando a liberação da enzima para a solução.

A insolubilidade é uma característica essencial, não somente para prevenir a liberação da enzima do suporte, mas principalmente para evitar a contaminação do produto pelo suporte dissolvido e pela enzima.

A possibilidade de regeneração, bem como a reutilização da matriz, deve ser considerada na avaliação econômica do sistema com enzima imobilizada. Os suportes são classificados quanto à composição química em: orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados), como mostrado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Exemplos de suportes quanto à composição química (Kennedy, 1987).

Suportes orgânicos	naturais	Polissacarídeos: celulose, agar, quitina, quitosana, amido, entre outros. Proteínas: colágeno, albumina, gelatina, glúten, seda, entre outros.
	sintéticos	Poliestireno, poliacrilato, polivinílico, náilon, entre outros.
Suportes inorgânicos	minerais	Areia, bentonita, herneblenda, pedra-pomes.
	fabricados	Vidro, cerâmica, sílica, aluminossilicatos, óxido de ferro, óxido de níquel, aços inoxidáveis, entre outros.

Os suportes inorgânicos são mais apropriados para uso industrial por apresentarem elevada resistência mecânica, boa estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque por microrganismos. Eles são de fácil regeneração por pirólise e apresentam boa rigidez da matriz, sendo estáveis em uma ampla faixa de pressões, temperaturas e pH. Entretanto, a maioria das enzimas imobilizadas comercializadas é obtida com matrizes orgânicas devido, provavelmente, à variedade de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos nesses suportes (Rodrigues *et al*, 2008).

Os suportes mais estudados e utilizados são os derivados de polissacarídeos, especialmente os extraídos de algas, como agarose, alginato e K-carragenina. Também merece destaque suportes orgânicos como celulose, quitina e quitosana (Krajewska, 2004).

As propriedades das enzimas imobilizadas são influenciadas pelas propriedades da enzima e do material do suporte, como mostra a Figura 2.4.

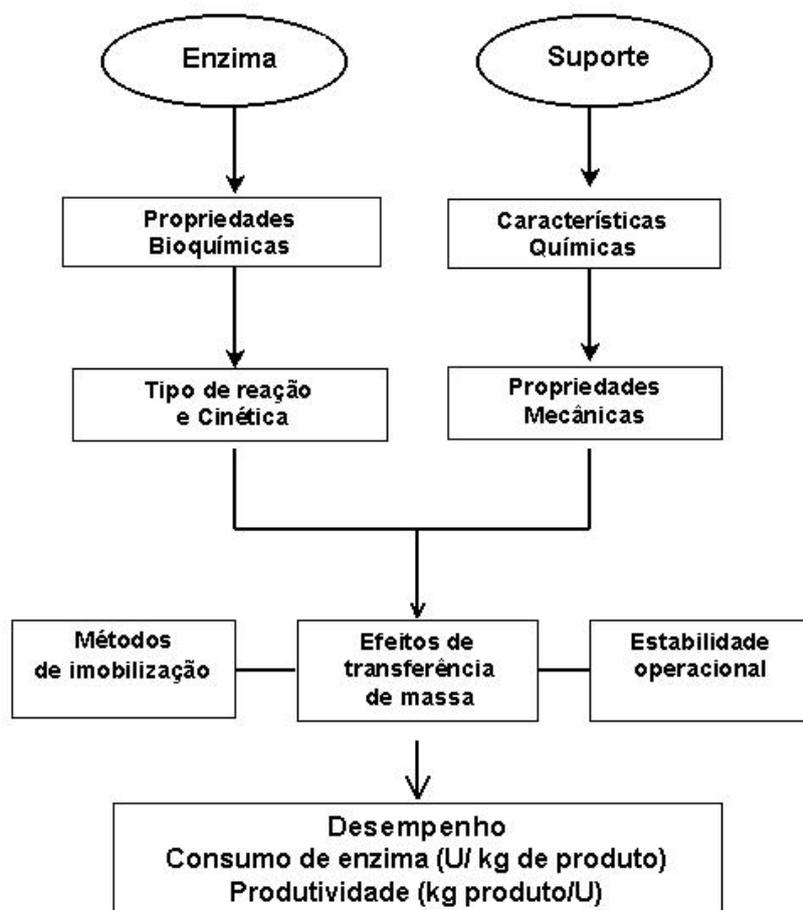


Figura 2.4. Interação entre suporte e enzima (Kennedy, 1987).

2.5.1 – QUITOSANA

Quitosana é um polissacarídeo essencialmente constituído por uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (Krajewska, 2004), como mostrado na figura 2.5. Grupos hidroxil (OH) estão dispostos na estrutura geral do carboidrato para a celulose e grupos amino (NH_2) para a quitosana. É solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação (adição de prótons) do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais. A quitosana é obtida por uma drástica desacetilação com tratamento alcalino de quitina, que é o principal componente no exoesqueleto de crustáceos e insetos, e também nas paredes celulares de alguns fungos. A quitina é separada de outros componentes do exoesqueleto por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização e desproteinização das carapaças com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO_4 e ácido oxálico, por exemplo. A quitina obtida, o biopolímero contendo grupos acetil (NHCCH_3), é desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo a quitosana (Berger *et al.*, 2004).

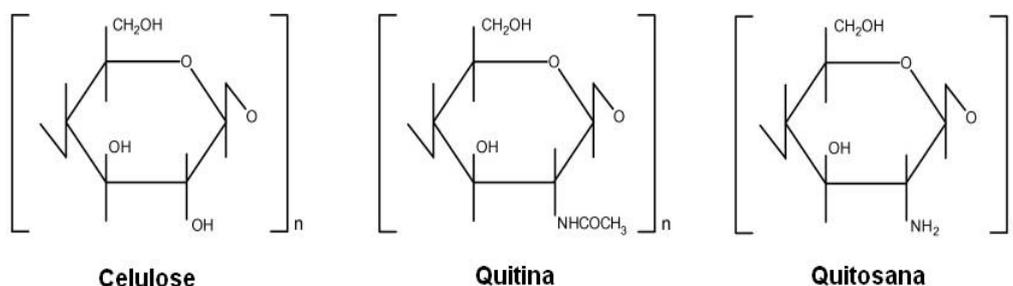


Figura 2.5. Estrutura dos biopolímeros quitina, quitosana e celulose (Berger *et al.*, 2004).

A quitosana é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram como poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado.

Quitina e quitosana têm inúmeras aplicações. Na área ambiental, a quitosana é conhecida como um bioadsorvente para remoção de íons metálicos tóxicos, corantes e compostos orgânicos e utilizados nos processos de tratamento e purificação de água e bebidas (Carrara e Rubiolo, 1994). Devido às suas propriedades antimicrobianas são usadas para redução do crescimento microbiano e como coberturas de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e legumes processados. Atuam também como floculante e coagulante nos processos de tratamento de efluentes industriais e ainda podem remover o petróleo de derramamentos no mar, contribuindo na solução de um dos grandes problemas ambientais (Carrara e Rubiolo, 1994).

Na área da saúde, a quitosana é conhecida como um redutor de níveis de colesterol no sangue. Apresenta uma capacidade de diminuir o colesterol LDL (forma prejudicial – “mau colesterol”) mantendo o colesterol HDL (“bom colesterol”). É conhecida também como um antiácido, para o controle de pressão alta, para prisão de ventre e para redução de ácido úrico no sangue. A quitosana tem sido amplamente empregada como controlador de liberação de drogas e coadjuvante no controle de doenças como a artrose (Kumar *et al*, 2000; Berger *et al.*, 2004). Como cosmético, devido à sua natureza fungicida, é utilizada na formulação de cremes para o rosto, mãos e corpo, loções de banho e fabricação de xampus (Krajewska, 2004).

A quitosana também tem sido usada como um suporte na imobilização de enzimas (Adriano *et al*, 2008). O seu custo reduzido e a disponibilidade de seus grupos funcionais tornam este material um suporte promissor para a imobilização de enzimas.

A quitosana e a quitina, como suportes para imobilização, são utilizadas nas formas em pó, floculada e gel de diferentes configurações geométricas, o que permite a aplicação do suporte para diferentes procedimentos de imobilização.

A preparação da quitosana na forma de hidrogel é possível pelo fato da quitosana ser facilmente dissolvida em soluções diluídas da maioria dos ácidos orgânicos, incluindo fórmico, acético e tartárico, para formar soluções viscosas que precipitam mediante um aumento de pH (Krajewska, 2004). Desta maneira, diversas formas de quitosana podem ser fabricadas: géis em forma de esfera, membranas, cápsulas, fibras, fibras ocas e esponjas.

Os diferentes tratamentos e modificações nos hidrogéis de quitosana são empregados para melhorar a estabilidade e durabilidade do suporte. Os métodos mais

comuns na preparação do gel são: evaporação do solvente, neutralização, reticulação e gelificação.

O método de evaporação do solvente é utilizado principalmente para a preparação de membranas e filmes. Uma solução de quitosana em ácido orgânico é colocada em uma placa e deixada para secar, se possível sob temperatura elevada. Após a secagem, a membrana é neutralizada e reticulada para evitar a desintegração em soluções de pH maior que 6,5. As enzimas podem ser imobilizadas na superfície de tais membranas, por adsorção, frequentemente seguida por uma reticulação (crosslinking) ou por ligação covalente (Krajewska, 2004).

O método da neutralização é explorado para a produção de precipitados de quitosana, membranas, fibras e esferas, todos com tamanho e porosidade diferentes. Este método é realizado basicamente pela mistura de produtos alcalinos com uma solução ácida de quitosana, visto que o aumento no valor de pH ocasiona a precipitação da quitosana. A imobilização de enzimas em quitosana preparada por este método pode ser feita por adsorção à superfície do gel, por reticulação ou ainda por inclusão, dissolvendo-se a enzima na solução inicial de quitosana (Krajewska, 2004).

No método de reticulação, uma solução ácida de quitosana é submetida a uma simples reticulação através da mistura com um agente reticulante, onde o gel obtido é triturado em partículas. A imobilização de enzimas preparadas sobre esses géis não exigem química de ativação, pois na preparação do gel, o agente reticulante é bifuncional, reticula e ativa o gel. A enzima também pode ser introduzida no gel quando misturada com a solução de quitosana antes de ser reticulada. O glutaraldeído, devido a sua facilidade de uso e reatividade, mas mais importante, devido à disponibilidade de grupos de aldeídos para reagir não apenas com grupos aminos das enzimas, mas também com os da quitosana, é o agente reticulante e de ativação mais utilizado. Outros agentes bifuncionais comuns são: glioxal, hidroximetil, etilenodiamina e epícloridrina (Krajewska, 2004).

O método de gelificação é utilizado principalmente para a preparação de esferas de gel, o que é conseguido através da adição de gotas de um polieletrólito aniônico em uma solução ácida de quitosana. Por força da atração de moléculas carregadas, a quitosana, que por natureza é um polieletrólito catiônico, espontaneamente forma complexos insolúveis em água com polieletrólitos aniônicos. Os polieletrólitos aniônicos usados incluem alginato, carragenina, xantana e diversos polifosfatos orgânicos e sulfatos. A imobilização de enzimas por este método é feita preparando-se

uma solução enzimática contendo polieletrólito aniônico, antes da gelificação. A enzima é imobilizada, portanto, por inclusão no interior das esferas ou cápsulas (Krajewska, 2004).

O interesse em quitosana como um suporte promissor na imobilização de enzimas e devido a uma multiplicidade de aplicações, vem crescendo nos últimos anos, pois este biopolímero renovável é de grande potencial para o mercado de biomateriais. O baixo custo e a abundância deste material o tornam interessante para o setor industrial. Na medicina e em aplicações farmacêuticas a quitosana é utilizada como um componente em hidrogéis, conhecidos como redes de macromoléculas inchadas em água ou em fluidos biológicos (Berger *et al.*, 2004). A estrutura dos hidrogéis é formada por interações covalentes ou iônicas, sendo esta última muito influenciada pelo pH do meio reacional, o que reflete na capacidade de retenção de água do hidrogel, como pode ser observado na Figura 2.6. Em meio ácido, a concentração de água no hidrogel é favorecida, pois o meio aumenta o inchamento do hidrogel. Já no meio próximo da neutralidade, ocorre um equilíbrio entre as cargas do hidrogel, o que promove uma interação máxima entre os grupos ionizáveis, aumentando a estabilidade do gel (Berger *et al.*, 2004). Devido à sua instabilidade pelo pH se torna necessário a reticulação do gel.

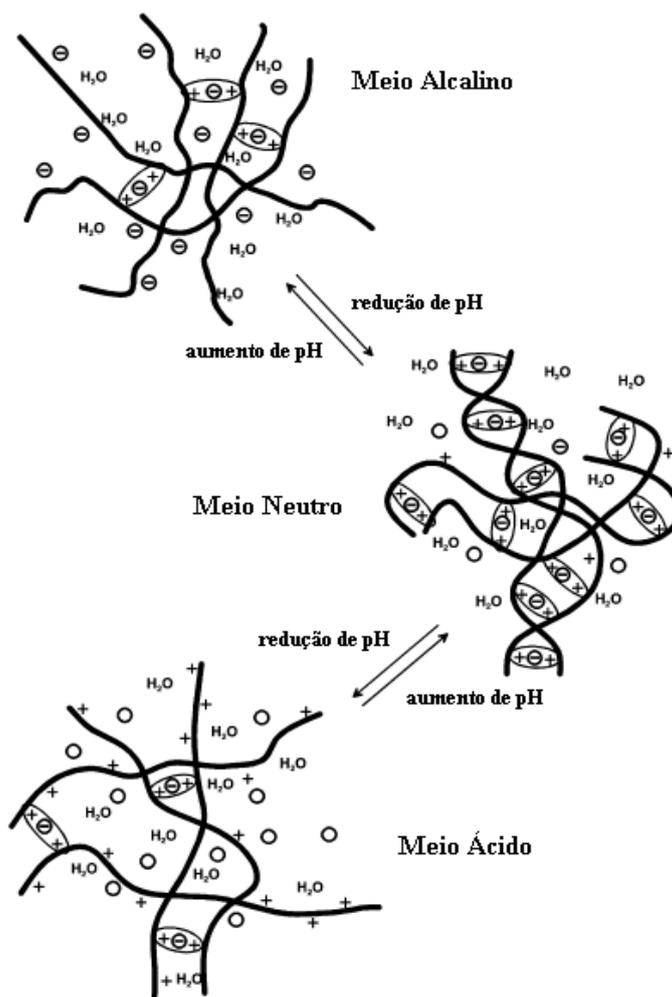


Figura 2.6. Influência do pH sobre a estrutura do hidrogel (Berger *et al.*, 2004).

2.5.1.1 – SUPORTES HÍBRIDOS

De acordo com a literatura, a quitosana é um dos principais compostos empregados na síntese de hidrogéis, como também alginato, carragenina, gelatina e outros (George e Abraham, 2006). Os polieletrólitos de quitosana são formados com o objetivo de obter hidrogéis mais versáteis, com diferentes estruturas química e física, o que pode melhorar sua atuação em uma determinada aplicação. Uma outra importante aplicação dos hidrogéis é na imobilização de enzimas para diversas aplicações, principalmente no desenvolvimento de biossensores (de Oliveira *et al*, 2006).

Diferentes polieletrólitos são utilizados, juntamente com a quitosana, para a formação de hidrogéis como gelatina, alginato, carragenina e outros. Alginato é um polissacarídeo extraído de algas marrons. A estrutura química do alginato é constituída por polímero linear do ácido L-gulurônico e do ácido D-manurônico (George e

Abraham, 2006). Este polissacarídeo tem sido utilizado como veículo para a liberação de fármacos e proteínas, juntamente com a quitosana, complexo quitosana-alginato (Tapia *et al*, 2004). O complexo quitosana-alginato é formado por interações iônicas entre os grupos carboxílicos do alginato e os grupos amino da quitosana (Tapia *et al*, 2004). O hidrogel formado sofre redução de porosidade, reduzindo o tempo de liberação do fármaco encapsulado (Huguet *et al*, 1996). A elevada solubilidade da quitosana é minimizada na presença de alginato, pois este biopolímero é insolúvel em pH ácido e em pH alcalino é facilmente solubilizado, o que não é observado para a quitosana. Deste modo, o complexo quitosana-alginato é um suporte híbrido que pode ser utilizado em uma ampla faixa de pH (George e Abraham, 2006).

Carragenina é um polissacarídeo obtido de algas vermelhas e possui em sua estrutura grupos sulfônicos. Dentre as três formas de carragenina existente, a κ -carragenina é a mais utilizada. Ela possui um grupo sulfônico para cada dois grupos galactose (Tapia *et al*, 2004). Este grupo sulfônico é responsável pela elevada capacidade de retenção de água. É bastante utilizada na indústria de alimentos como emulsificante e na proteção de alimentos contra o processo de desidratação. Este biopolímero também tem sido utilizado como carreador de fármacos em partículas híbridas com quitosana (Tapia *et al*, 2004). Estudos mostram que a liberação prolongada de fármacos empregando o complexo quitosana-alginato foi superior ao complexo quitosana-carragenina (Tapia *et al*, 2004). Carragenina possui um elevado grau de inchamento, que resultou em uma liberação mais rápida devido ao aumento dos poros do carreador. Foi verificado também que o complexo quitosana-carragenina possui baixa estabilidade, pois o complexo apresentou maior velocidade de desestruturação da rede polimérica.

A gelatina é um produto obtido da hidrólise parcial do colágeno, extraído geralmente da pele e dos ossos de certos animais (Kim *et al*, 2006). A gelatina é formada de três moléculas polipeptídicas, arrançadas em forma de hélice. A gelatina possui uma grande habilidade de ligação com água e suas cadeias de configuração helicoidal são importantes para a formação do gel. Por ser um hidrocólóide de origem proteica possui caráter anfótero, associado à presença de grupos amina e carboxílicos nos aminoácidos (Kim *et al*, 2006). Este biopolímero é bastante utilizado na síntese de microcápsulas para uso farmacêutico (Kumar, 2000; Kim *et al*, 2006). Membranas de gelatina-quitosana têm sido utilizadas na regeneração de vários tecidos como pele e cartilagem (Yao *et al*, 1995 *apud* Kumar, 2000).

No intuito de aumentar a estabilidade química e física dos hidrogéis de quitosana e quitosana-copolímeros, diversas alternativas têm sido utilizadas. Dentre elas, a modificação química do hidrogel empregando agentes bifuncionais é a mais utilizada (Monteiro e Airoidi, 1999; Li e Bai, 2005; de Oliveira *et al*, 2006; Mendes *et al*, 2006; Altun e Cetinus, 2007). Esta modificação apresenta diversas vantagens, vantagens estas estudadas no presente trabalho, objetivando aumentar o grau de hidrofobicidade de hidrogéis de quitosana-copolímeros para imobilização de β -galactosidase.

2.5.1.2 – MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA ESTRUTURA DA QUITOSANA

Para modificar quimicamente a estrutura da quitosana com o objetivo de melhorar sua resistência mecânica por redução do efeito de dissolução em extremas condições de pH, ou seja, melhorar sua resistência em meio ácido, reduzir sua capacidade de retenção de água, alterar a hidrofobicidade e melhorar a estabilidade química devido às ligações covalentes ser irreversíveis, existem diferentes métodos empregados (Berger *et al.*, 2004; Rodrigues *et al*, 2008; Adriano *et al*, 2008).

As principais modificações são realizadas empregando agentes bifuncionais, tais como: epícloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído e outros, como mostram a Figura 2.7 (Rodrigues *et al*, 2008).

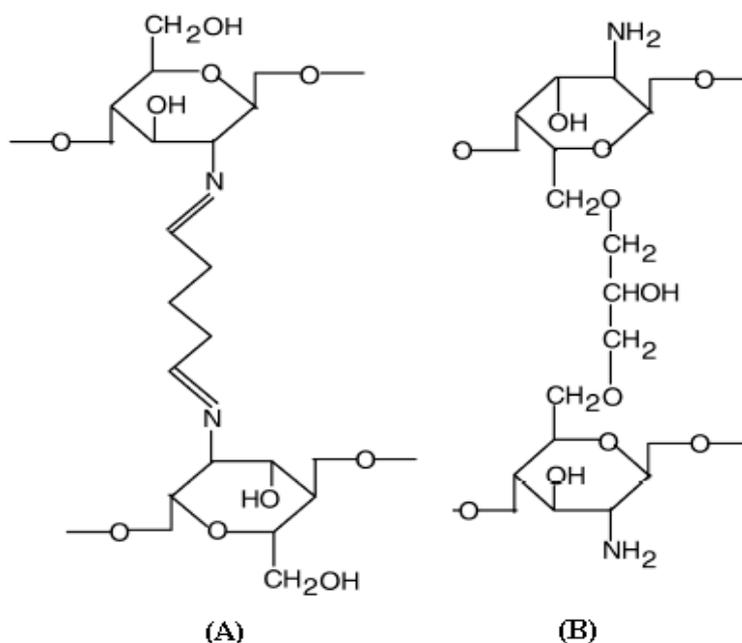


Figura 2.7. Estrutura química de quitosana reticulada com glutaraldeído (A) e epicloridrina (B).

A ativação de suportes com glutaraldeído é uma das mais populares técnicas para imobilizar enzimas. A metodologia é bastante simples e eficiente e, em alguns casos, ela permite ainda melhorar a estabilidade enzimática devido às ligações multipontuais ou ligações entre as subunidades da enzima na imobilização. Além disso, o glutaraldeído também tem sido muito utilizado para reticulações intermoleculares nas proteínas ou para modificar a adsorção de proteínas em suportes aminados. Entretanto, o glutaraldeído deve ser manuseado com cuidado, pois é um composto neurotóxico (Betancor *et al*, 2006).

A eficiência das reticulações do suporte depende da concentração do agente de reticulação, do pH do meio reacional, da temperatura, tempo de reação e do grau de desacetilação da quitosana (Berger *et al.*, 2004). Um período longo de tempo e uma alta concentração do agente reticulante geram muitas reticulações.

Os hidrogéis formados por reticulação devem ser lavados e purificados a fim de eliminar os agentes não reagidos, pois muitos deles são prejudiciais à saúde devido à sua alta toxicidade (Berger *et al.*, 2004).

Apesar de ter algumas desvantagens, a utilização de hidrogéis reticulados com glutaraldeído e epicloridrina como suporte para imobilização, e como consequência para a insolubilidade de enzimas, vem sendo muito estudada, pois o custo reduzido e a

grande quantidade de grupos funcionais fazem da quitosana um suporte de grande potencial a ser desvendado.

2.5.2 – AGAROSE

A agarose é obtida a partir do agar isolado de certas algas marinhas, é um polímero de galactose, cujas unidades são cadeias de agarobiose (Kennedy, 1987).

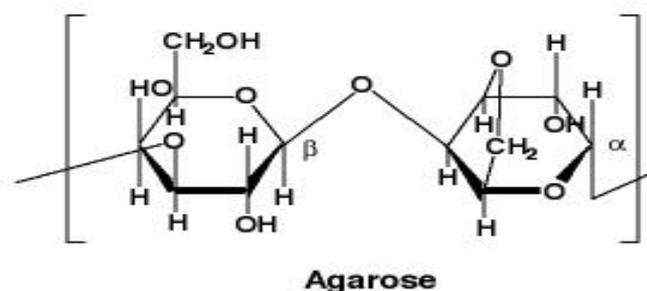


Figura 2.8. Estrutura química da agarose (Kennedy, 1987).

Esferas de agarose são formadas por uma associação não-covalente entre polímeros de agarose formando troncos de diâmetro relacionado com a concentração de agarose (Pedroche *et al*, 2007). Quanto maior a concentração de agarose durante a gelificação, mais espesso os troncos de agarose formados, e, à primeira vista, maiores as possibilidades de atingir uma intensa ligação covalente multipontual. Assim, agarose 4% tem poros maiores, mas troncos mais finos do que esferas de agarose 10%, o que implica uma menor congruência geométrica entre o suporte e a enzima (Pedroche *et al*, 2007).

O gel de agarose, por sua vez, é facilmente manipulado e ativado devido à presença de grupos hidroxil. Têm uma grande área superficial e um diâmetro de poro adequado para imobilização de proteínas. Possui boas propriedades mecânicas e tem sido utilizado com sucesso para imobilização e estabilização de diversas enzimas (Mendes *et al*, 2006; Rodrigues *et al*, 2008).

Os únicos grupos reativos em agarose são os hidroxil. Portanto, eles podem reagir com reagentes epóxidos para gerar grupos glioxil. Estes grupos aldeídos são menos reativos do que os do glutaraldeído, porém, usando glutaraldeído, a ligação pode

ser realizada utilizando o grupo terminal amino da proteína, enquanto que com grupos glioxil, os grupos amino das lisinas residuais têm de estar disponíveis para tornar viável a imobilização (Rodrigues *et al*, 2008).

Quanto maior as concentrações de grupos amino na enzima e de grupos glioxil no suporte, mais ligações ocorrerão. As exigências de altas concentrações de grupos amino e de grupos glioxil dão uma vantagem adicional em relação ao glutaraldeído. A imobilização utilizando grupos glioxil envolve a área das proteínas que possuem mais resíduos reativos, permitindo assim, uma intensa interação multipontual enzima-suporte (Rodrigues *et al*, 2008).

Além disso, o gel glioxil agarose apresenta muitas outras propriedades que são adequadas para a realização de ligações covalentes multipontuais intensas. Segundo Mateo *et al*, (2006-a), podem-se resumir estas propriedades da seguinte forma:

Reatividade muito alta dos grupos glioxil com os grupos amino não-ionizados;

- Poucos impedimentos estéricos na reação entre os grupos amino da proteína e os grupos glioxil do suporte;
- Boa congruência geométrica entre a proteína e a superfície do suporte;
- Fácil controle do grau de ativação;
- Braço espaçador curto que permite fixar a proteína na imobilização aumentando a rigidez da enzima;
- As ligações entre a enzima e o suporte são muito fracas, bases de Schiff. Isto significa que a energia necessária para a formação de cada ligação individual não pode compensar a energia necessária para produzir uma distorção da estrutura das proteínas, mantendo a funcionalidade da mesma;
- A redução final com o borohidreto de sódio transforma as fracas bases de Schiff em ligações amino secundário muito estável e todos os grupos aldeídos restantes do suporte sólido em grupos inertes. Esta é uma característica vantajosa deste suporte, pois os grupos não inertes da superfície do suporte podem promover interações não desejáveis enzima-suporte, promovendo uma diminuição da estabilidade ou até mesmo uma direta inativação da enzima.

Se ligações covalentes multipontuais são desejadas, é necessário um controle rigoroso das condições de imobilização para alcançar um máximo grau de interação

enzima-suporte. Estas condições devem favorecer a reatividade da proteína, permitindo maximizar as multi-interações enzima-suporte (Mateo *et al*, 2006-a).

2.6 – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade térmica e em solventes orgânicos.

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. Porém, não deverão ocorrer alterações estruturais na enzima, como modificações no sítio ativo.

Inúmeros métodos têm sido descritos na literatura para contornar os possíveis problemas de instabilidade, como mostrado na Figura 2.9. A imobilização pode ocorrer por 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 (Haider e Husain, 2009).

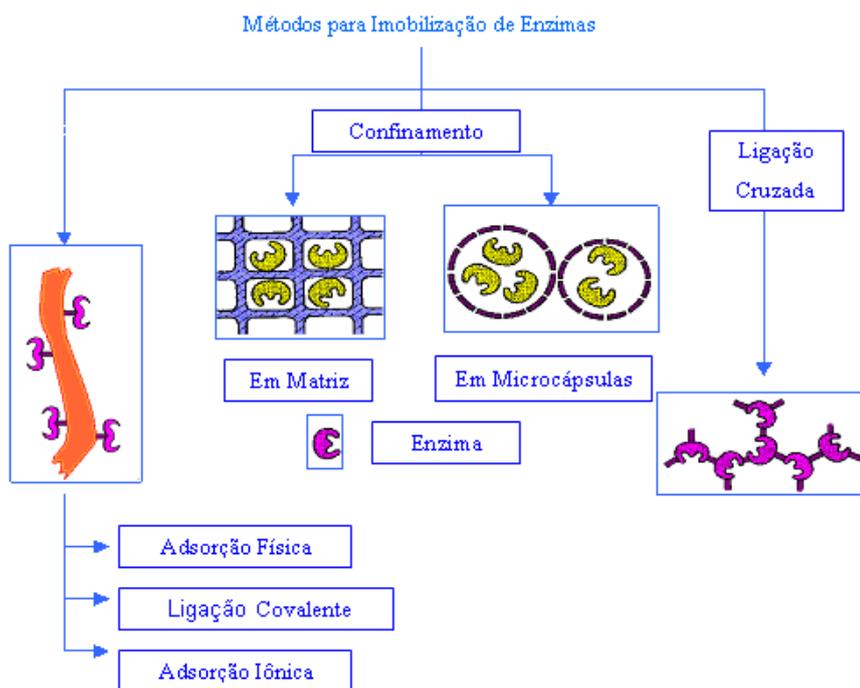


Figura 2.9. Métodos para Imobilização de Enzimas (Dalla-Vecchia *et al*, 2004).

2.6.1 – IMOBILIZAÇÃO POR ENVOLVIMENTO NO INTERIOR DE UM SUPORTE

Este método consiste na formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional, ou a retenção do biocatalisador por uma membrana porosa. Em ambos os casos, a enzima tem sua mobilidade mantida, pois não são envolvidas ligações físicas ou químicas entre a enzima e o suporte. Conseqüentemente, somente substratos de baixa massa molecular podem ser empregados com este tipo de enzima imobilizada. Esse método inclui a encapsulação em gel e em fibras e a microencapsulação (Rosevear *et al*, 1987).

Na microencapsulação a enzima é aprisionada em membranas poliméricas semipermeáveis, com grande superfície de contato. É um sistema limitado para substrato com baixa massa molecular, pois este precisa atravessar a membrana para ter acesso à enzima. Há uma grande vantagem na utilização desta técnica; a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, há a possibilidade de haver incorporação da enzima na parede da membrana (Dalla-Vecchia *et al*, 2004; Mariotti, 2000).

O método de encapsulação em gel envolve a retenção da enzima no interior de uma matriz polimérica insolúvel no meio da reação. Estes métodos são baseados na mistura da enzima com um fluido precursor do gel e subsequente gelificação por polimerização ou precipitação, ficando a enzima distribuída no interior da matriz, a qual é utilizada preferencialmente as do tipo hidrogel, que podem ser obtidas nas mais variadas formas.

A preparação de enzimas imobilizadas no interior de fibras ocorre quando a enzima é envolvida nas microcavidades de fibras sintéticas. Seu uso também é limitado para substrato de baixa massa molecular (Mariotti, 2000).

Uma grande vantagem da encapsulação de enzimas é a grande área superficial de contato entre o substrato e a enzima no interior do suporte, porém, existem algumas desvantagens que devem ser levadas em conta, como a possível inativação da enzima durante o processo de imobilização, os possíveis efeitos de inibição por produtos ou substrato no interior da matriz porosa, a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e ainda a restrição de que o substrato tem que ser de baixa massa molecular (Dalla-Vecchia *et al*, 2004; Mariotti, 2000).

2.6.2 – IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO DA ENZIMA A UM SUPORTE

A fixação da enzima na superfície de um suporte pode ocorrer por interações como a ligação iônica, a ligação covalente, a ligação metálica e a adsorção física.

Os métodos de adsorção, ligação iônica e ligação metálica são de fácil aplicação, no entanto, não são muito usados em escala industrial, na maioria das vezes devido às forças de ligação fracas, o que permite a perda da enzima durante o processo reacional.

A adsorção física é o método mais antigo utilizado para a imobilização de enzimas. É o procedimento mais fácil para se preparar um sistema imobilizado, baseado na adsorção das moléculas de enzima sobre a superfície de matrizes sólidas. A técnica consiste em colocar em contato uma solução aquosa de enzima e um suporte, em determinadas condições de pH, temperatura, força iônica e agitação. O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte dependem muito do tamanho da proteína e da área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros, pois a enzima é adsorvida no interior dos mesmos (Dalla-Vecchia *et al*, 2004). A atração da enzima pelo suporte ocorre por meio das forças de Van der Waals,

ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, que por serem interações fracas permitem a desorção da enzima durante sua utilização. Isso depende muito de fatores como pH do meio reacional, da natureza do solvente, do meio utilizado para a imobilização, da quantidade de enzima que pode ser adsorvida, depende do tempo de imobilização e da temperatura. Outra desvantagem deste método é que a adsorção na superfície do suporte não é específica, podendo incluir outras proteínas e substâncias presentes na solução que irão competir com a enzima por um espaço na superfície do suporte, o que provavelmente decrescerá o rendimento de imobilização.

Por outro lado, uma grande vantagem da utilização deste método pode ser apontada como a simplicidade e a manutenção da conformação da enzima e do seu sítio ativo, que por não haver envolvimento de ligação química entre o suporte e a enzima, evita distorções do sítio ativo da proteína, obtendo-se um sistema imobilizado com atividade específica semelhante à da enzima livre (Dalla-Vecchia *et al*, 2004).

O princípio envolvido no método de imobilização por ligação iônica baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido que contém resíduos para troca iônica. A principal diferença entre a adsorção física e a ligação iônica é a energia envolvida entre a enzima e o suporte, pois as ligações iônicas são mais fortes do que as forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio, porém mais fracas do que a ligação covalente (Fernandes e Cabral, 2006).

Este método é feito da mesma forma que no processo de adsorção física. Também neste caso pode haver a liberação da enzima pelo suporte por variações de pH e força iônica do meio, visto que para este método há total dependência destes. Dado ao caráter iônico da ligação e as condições amenas de imobilização, ocorre pouca mudança conformacional na enzima, o que conduz à obtenção de derivados imobilizados com altas atividades enzimáticas.

No método de imobilização por ligação metálica usa-se um metal de transição como ativador da superfície do suporte, permitindo o acoplamento direto da enzima. Também é um método de simples preparação e força de ligação intermediária. Mantém a atividade da enzima, porém a estabilidade operacional obtida, quando se trabalha com substratos de alta massa molecular, é baixa, devido aos metais envolvidos (Zanin e Moraes, 2004).

O método da ligação covalente baseia-se na formação de uma ligação forte entre a enzima e o suporte, como mostra a Figura 2.10. É o método mais difundido e investigado de imobilização. A seleção das condições de reação não são tão brandas. A

ligação enzima-suporte é mais forte, de tal forma que não há perda para a solução, mesmo na presença de substratos ou soluções de alta força iônica (Fernandes e Cabral, 2006). A ligação da enzima com o suporte deve envolver qualquer grupo químico que não seja essencial para a atividade catalítica, o que significa que o sítio ativo não deve ser afetado pela imobilização.

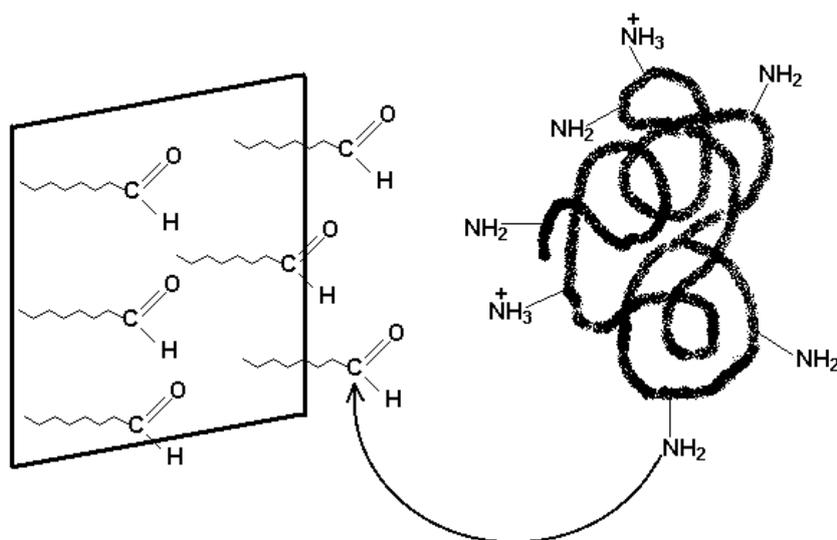


Figura 2.10. Sistema imobilização-estabilização: ligação covalente amino (enzima)-aldeído (suporte) (Fernández-Lafuente *et al*, 1999).

A ativação do grupo ligante é realizada no suporte a fim de reduzir o risco de diminuição da atividade catalítica da enzima.

Dentre os principais fatores consideráveis para este método de imobilização estão as reações de acoplamento enzima-suporte com ativação do suporte por meios de diazotização, formação de ligação amida, alquilação e arilação, formação de Base de Schiff, reação de amidinação, entre outros (Mariotti, 2000).

Como visto anteriormente, os suportes podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos. Os suportes orgânicos dispõem de grupos funcionais capazes de promover a ligação enzima-suporte, entretanto, as enzimas imobilizadas são mais ativas e estáveis quando se introduz um braço espaçador entre a enzima e o suporte.

Os materiais inorgânicos como cerâmica, vidro, sílica e metais são os mais utilizados. Às vezes, alguns grupos funcionais devem ser modificados para produzir intermediários reativos e para obter preparações mais ativas e estáveis usa-se mais comumente o glutaraldeído (Rodrigues *et al*, 2008).

A ligação covalente da enzima na presença de um inibidor competitivo ou do substrato evita que os resíduos de aminoácidos do centro ativo da enzima se movem durante a imobilização, com conseqüente inativação da enzima. Outros métodos como a ligação reversível de um complexo enzima-inibidor ou a ligação multipontual da enzima ao suporte também são empregados para evitar este problema.

A combinação de métodos de imobilização de enzimas como, por exemplo, a adsorção seguida de ligação cruzada entre as moléculas da enzima com glutaraldeído, é realizada para melhorar a estabilidade da proteína imobilizada e para obter enzimas imobilizadas com maior atividade (Mateo *et al*, 2006-b).

2.6.3 – MODIFICAÇÕES NA ENZIMA PÓS-IMOBILIZAÇÃO

Por muitos anos a modificação química de enzimas foi utilizada como uma técnica fundamental para elucidar os resíduos envolvidos na atividade catalítica. Mais recentemente a modificação química tem sido usada também como uma ferramenta em bioquímica aplicada, por exemplo, na estabilização de enzimas pela modificação dos resíduos chave, pelo intercruzamento molecular, etc (Cardias, 2000). Do ponto de vista da bioquímica aplicada, a modificação química continua sendo uma excelente forma de abordagem para o melhoramento da engenharia de imobilização e estabilização de enzimas e modulação das suas propriedades catalíticas, sendo, ainda, uma técnica complementar adicional para a melhoria das propriedades de enzimas geneticamente modificadas (Cardias, 2000).

Reagentes macromoleculares polifuncionais de cadeia longa e hidrofílico, como glutaraldeído e polialdeído dextrana, podem ser usados para modificar quimicamente a superfície de enzimas para obter as seguintes vantagens, segundo Cardias (2000):

- Produção de ligações cruzadas através de um grande número de grupos reativos a diferentes distâncias na superfície da enzima;
- Estabilização da enzima pela restrição da mobilidade de sua superfície aumentando assim sua resistência ao desnovelamento e dissociação das subunidades;
- Estabilização da enzima pela cobertura de grupos hidrofóbicos da superfície da enzima e

- Estabilização da enzima pela criação de uma barreira resistente ao ataque de reagentes químicos, solventes ou outros reagentes apolares.

A ligação cruzada de subunidades e a geração de ambientes artificiais ao redor da superfície da enzima são duas fortes características desta abordagem. A modificação das propriedades da superfície da enzima tais como mudanças nas cargas, na hidrofobicidade e interações com meios diferentes podem causar dramáticos efeitos nas propriedades da enzima (Cardias, 2000).

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 – Suportes

Quitosana em pó com grau de desacetilação de 85,2 % foi adquirida junto a Polymar Ind Ltda, Fortaleza, Ceará; Sepharose 6B-CL (agarose 6 %) adquirida da Amersham Pharmacia Biotech AB (Suécia), Alginato de sódio foi adquirido comercialmente da Vetec (São Paulo, Brasil) e k-carragenina da Sigma Chemical Company (St Louis, MO).

3.1.2 - Enzima

Preparação comercial líquida da enzima β -galactosidase do microrganismo *Kluyveromyces fragilis* (Lactozym 3000 L) doada pela Novo Nordisk, Brasil; com concentração de proteína de 191,4 mg/mL de extrato e atividade hidrolítica específica de 19,9 U_{o-NPG}/mg de proteína e 13,7 U_{lactose}/mg de proteína.

3.1.3 – Agentes ativantes

Glutaraldeído 25% (v/v) comercializado pela Vetec – São Paulo; glicidol (2,3-epóxi-1-propanol) e epiclorigrina (1-cloro-2,3-epóxido) adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico.

3.1.4 – Substratos

Para este trabalho utilizou-se soluções de lactose doada pela empresa de alimentos SPF do Brasil de Descalvado-SP, obtida pela indústria Milkaut S.A.(Argentina). Foi utilizado também o substrato sintético, *o*-Nitrofenilgalactopiranosídeo (*o*-NPG) obtido da Sigma Chemical Company (St Louis, MO) e kit enzimático da Solab-SP.

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – Preparação das partículas híbridas de quitosana e ativação do suporte utilizando glutaraldeído, metodologia de Budriene *et al*, (2005).

Este suporte foi obtido a partir de 2% (m/m) quitosana em pó solubilizada em ácido acético 2% v/v e homogeneizada por 30 min. Então, 20 mL desta solução solubilizada foi colocado em um reator à temperatura de 50°C e deixado estabilizar por alguns minutos sob agitação mecânica e adicionou-se 30 mL de uma solução KOH 0,5 M mantendo a agitação do sistema por 30 min.

A ativação deste suporte foi então realizada adicionando glutaraldeído 0,8 % v/v sob a solução de quitosana coagulada com KOH. Depois de 30 min de ativação à temperatura de 50°C, as partículas foram imediatamente lavadas com excesso de água destilada à temperatura ambiente para remover o excesso de glutaraldeído e estocado sob refrigeração.

A mesma metodologia foi aplicada para a obtenção do suporte utilizando diferentes concentrações de agentes coagulantes: 0,1 M de solução de KOH, 0,5 M e 0,1 M de solução de NaOH. O procedimento foi realizado à temperatura ambiente e também à temperatura de 50°C.

3.2.1.1 – Preparação das partículas híbridas de quitosana

O suporte foi obtido a partir de 2% (m/m) quitosana em pó solubilizada em ácido acético 2% v/v e homogeneizada por 30 min. Então, 20 mL desta solução solubilizada foi colocado em um reator à temperatura de 50°C e deixado estabilizar por alguns minutos sob agitação mecânica adicionando-se 30 mL de uma solução KOH 0,5 M mantendo a agitação do sistema por 30 min. Depois deste tempo as partículas foram lavadas com excesso de água destilada à temperatura ambiente e estocado sob refrigeração.

A mesma metodologia foi aplicada para a obtenção do suporte utilizando como agente coagulante 0,5 M de solução de NaOH.

3.2.2 - Preparação de Epóxi-Quitossana-Alginato

10 g de quitossana foram dissolvidas em 400 mL de solução de ácido acético 5,0% (v/v) sob agitação mecânica por 2 h. Em seguida, foram adicionados 40 mL de metanol e 4 mL de anidrido acético. Após 1 h, foram adicionados 10 g de alginato conforme o gel desejado e o sistema foi mantido sob agitação por 12 h à temperatura ambiente. Esta solução foi adicionada em 3,6 L de solução de NaOH 100 mM para a formação do hidrogel e mantidos sob baixa agitação mecânica (50 rpm) por 12 h. O hidrogel foi lavado exaustivamente com água destilada, filtrado a vácuo e estocado sob refrigeração.

Para cada 10 g do hidrogel obtido, foram adicionados 100 mL de N-dimetilformamida e a mistura foi mantida por 30 min a 60°C. Em seguida, foram adicionados 0,8 g de KOH dissolvidos em 3 mL de isopropanol e, ao final, 10 mL de epiclorigrina, conforme metodologia adaptada de Fangkangwanwong *et al.* (2006). O sistema foi mantido sob agitação a 60°C por 12 h. Após a epoxilação, o gel foi lavado e filtrado a vácuo e estocado sob refrigeração.

3.2.3 – Preparação de Quitossana-Alginato

10 g de quitossana foram dissolvidas em 400 mL de solução de ácido acético 5,0% (v/v) sob agitação mecânica por 2 h. Após 1 h, foram adicionados 10 g de alginato conforme o gel desejado e o sistema foi mantido sob agitação por 12 h à temperatura ambiente. Esta solução foi adicionada em 3,6 L de solução de NaOH 100 mM para a formação do hidrogel e mantidos sob baixa agitação mecânica (50 rpm) por 12 h. O hidrogel foi lavado exaustivamente com água destilada, filtrado a vácuo e estocado sob refrigeração.

3.2.4 – Preparação de Quitossana-k-Carragenina

5 g de quitossana foram dissolvidas em 400 mL de solução de ácido acético 2,5% (v/v) sob agitação mecânica por 2 h. Após 1 h, foram adicionados 5 g de k-carragenina conforme o gel desejado e o sistema foi mantido sob agitação por 12 h à temperatura ambiente. Esta solução foi adicionada em 3,6 L de solução de NaOH 100 mM para a formação do hidrogel e mantidos sob baixa agitação mecânica (50 rpm) por

12 h. O hidrogel foi lavado exaustivamente com água destilada, filtrado a vácuo e estocado sob refrigeração.

3.2.4.1 – Ativação do suporte Quitosana-Alginato e Quitosana-k-Carragenina utilizando Glutaraldeído

A ativação do hidrogel foi realizada com glutaraldeído 5 % v/v em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 por 1h a 25 °C (razão V_{gel}/V_{total} de 1/10). Após a ativação, as partículas foram lavadas com excesso de água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído e estocado sob refrigeração.

3.2.5 – Preparação de gel glioxil-agarose

O suporte glioxil-agarose foi preparado por eterificação da agarose com glicidol e posterior oxidação com periodato de sódio, de acordo com a metodologia de Guisán (1988). A agarose comercial foi lavada com bastante água destilada e seca a vácuo, para a remoção de etanol. Em seguida adicionou-se 6ml de água destilada em 20 g de agarose e manteve-se a suspensão sob suave agitação mecânica em banho de gelo. Em seguida, 9,52 mL de uma solução NaOH 1,7 N previamente a frio contendo 0,2714 g de borohidreto de sódio, em banho de gelo para evitar perda do agente redutor por liberação de hidrogênio, foi adicionado à suspensão de agarose sob agitação no banho de gelo. Gotejou-se lentamente 6,86 mL de glicidol e manteve-se a suspensão sob suave agitação em recipiente aberto por 12 a 15 h. O suporte eterificado (gliceril-agarose) foi lavado com água destilada até pH neutro, seco a vácuo, e suspenso novamente em água destilada na razão $V_{suporte}/V_{suspensão}$ igual a 1/10. Para 20 g de suporte foram adicionados 0,7704 g de periodato de sódio. Após 2 h de suave agitação à temperatura ambiente, o suporte glioxil-agarose foi finalmente lavado com água destilada, seco a vácuo e estocado a 4°C.

A quantificação de grupos aldeídos presentes na superfície do gel de agarose ativado foi determinada pela concentração de periodato de sódio não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril, segundo adaptação da metodologia de Pereira (1996), descrita a seguir.

O periodato (IO_4^-) não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril (álcoois) reage com o iodeto (I^-) em excesso, gerando iodo na forma do íon (I_3^-), o qual

é quantificado por colorimetria. É necessário iodeto em excesso para gerar o íon tri-iodeto, pois o iodo na forma I_2 é muito volátil.

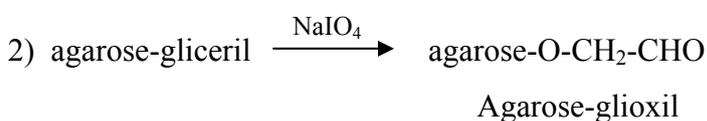
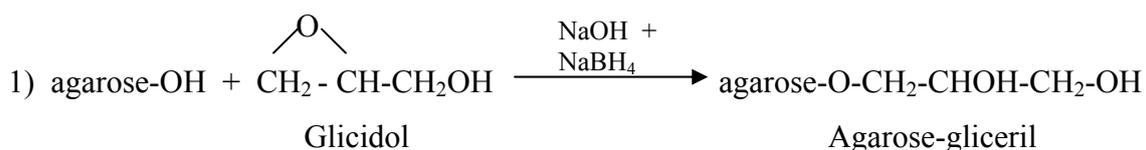


Em solução ácida há perda de iodo, por volatilização, devido à oxidação de iodeto por oxigênio atmosférico. Assim, a quantificação de periodato de sódio não consumido foi realizada em meio contendo bicarbonato de sódio, pois a oxidação atmosférica de iodeto é desprezível em solução neutra (Vogel, 1981).

Em uma cubeta de vidro contendo 3mL de uma solução 1:1 (v/v) de iodeto de potássio saturada e bicarbonato de sódio saturado foram adicionados 100 μ L de uma solução aquosa de periodato, preparada nas mesmas condições da suspensão do gel de gliceril-agarose. Em um espectrofotômetro fez-se uma varredura de comprimentos de onda, escolhendo-se aquela que fornecesse uma absorbância mais ou menos entre 0,7 e 0,8. Uma amostra de 100 μ L do sobrenadante final da oxidação foi posteriormente adicionada a 3mL da solução 1:1 descrita acima, correspondendo o decréscimo na absorbância à porcentagem de grupos aldeídos formados.

A absorbância inicial medida da solução aquosa de periodato, preparada nas mesmas condições de suspensão de oxidação do gel gliceril-agarose, correspondia a 100% do periodato não consumido. Após 2 h de reação, a absorbância do sobrenadante final da oxidação, nas condições descritas acima, media entre 0,1 e 0,2 (em média 75 % de periodato consumido). Portanto, como a reação de oxidação de grupos gliceril (álcoois) a aldeídos é equimolar, o total de periodato consumido é igual ao total de grupos aldeídos formados no suporte.

As etapas reacionais deste gel estão descritas abaixo:

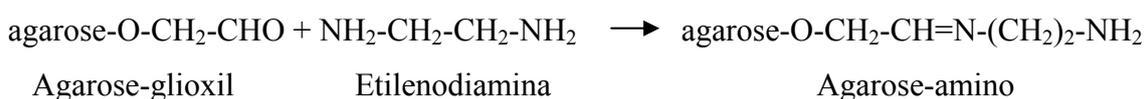


3.2.6 – Preparação do gel MANAE

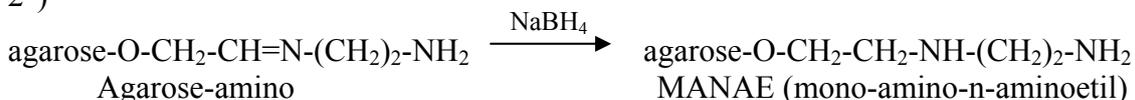
O suporte glioxil-agarose é aminado com etilenodiamina, de acordo com a metodologia de Fernández-Lafuente *et al*, (1993). Para cada grama de suporte adicionou-se 4mL de uma solução de etilenodiamina 2 M, pH 10 (preparado previamente a frio) e após agitação suave por 2 h à temperatura ambiente, adicionou-se 0,0571 g de borohidreto de sódio e agitou-se por mais 2 h. O suporte amino-agarose foi então lavado com solução tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4, para a remoção do borohidreto residual, e tampão borato de sódio 100 mM, pH 9, para desprotonar os grupos aminos, e água destilada em abundância.

As etapas reacionais deste gel estão descritas abaixo:

1°)



2°)



3.2.6.1 – Preparação do gel MANAE-glutaraldeído

O suporte MANAE é ativado com glutaraldeído, de acordo com a metodologia de Pessela *et al*, (2007). Foi adicionado ao gel MANAE obtido, uma solução de 5% de glutaraldeído, mantido sob agitação à temperatura ambiente por 18 h. Ao final deste tempo, o gel foi lavado com água em abundância para a remoção do glutaraldeído residual e estocado sob refrigeração.

3.2.7 – Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para construir a curva de calibração na faixa de 0 a 0,6 mg/mL.

3.2.8 – Ensaios de atividade enzimática

As atividades enzimáticas foram determinadas espectrofotometricamente, medindo-se o aumento de absorbância devido à formação do produto de hidrólise dos substratos. Os ensaios foram realizados em cubeta de vidro (região visível) ou de quartzo (região UV) de 1 cm de caminho óptico em espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) adaptado com agitação magnética e circulação de água para possível termostatização do sistema.

3.2.8.1 – Determinação da atividade hidrolítica da β -galactosidase em Lactose

A atividade da β -galactosidase foi determinada pela hidrólise da lactose. Na hidrólise da lactose a reação foi conduzida em um reator de 50 mL contendo 5 mL de solução de lactose 5% (m/v) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 contendo 0,1 mM de $MnCl_2$ e 2mM de $MgCl_2$ e 10 μ L de amostra previamente diluída, enzima livre a 37°C (Torres *et al*, 2006). A reação foi mantida a 37°C por 40 min sob agitação. Amostras foram retiradas a cada 5 min e a reação foi interrompida pela adição de uma solução de 0,1 M de NaOH. Glicose produzida foi quantificada pelo método GOD-PAP (Trinder, 1969). Uma unidade de lactase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por min nas condições descritas acima. A atividade foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$At (U/mL) = \frac{tg \times V_{reator}}{V_{enzima}}$$

Equação 3.1 – At = Atividade hidrolítica da Lactose; tg = tangente de curva de hidrólise; V_{reator} = volume total do reator em mL; V_{enzima} = volume de enzima em mL

3.2.8.1.1 – Determinação da atividade hidrolítica da β -galactosidase em Lactose na presença do inibidor

A atividade da β -galactosidase foi determinada pela hidrólise da lactose na presença de galactose. Na hidrólise da lactose a reação foi conduzida em um reator de 50 mL contendo 5 mL de solução de lactose 5% (m/v) em tampão fosfato de potássio

100 mM pH 7,0 contendo 0,1 mM de $MnCl_2$ e 2mM de $MgCl_2$, concentrações de 1,0; 1,5 e 5,0g/L de galactose, e 10 μ L de amostra previamente diluída, enzima livre a 37°C (Torres *et al*, 2006), ou 0,1 g do derivado imobilizado. A reação foi mantida a 37°C por 40 min sob agitação, amostras foram retiradas a cada 5 min. e a reação foi interrompida pela adição de uma solução de 0,1 M de NaOH. Glicose produzida foi quantificada pelo método GOD-PAP. A atividade foi calculada de acordo com a equação 3.1 para a enzima solúvel e equação 3.2 para a enzima imobilizada.

3.2.8.2 – Determinação da atividade hidrolítica em Lactose da β -galactosidase imobilizada

A atividade da β -galactosidase imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise conforme metodologia adaptada de Torres *et al*, (2006). Uma massa de 0,1 g do derivado imobilizado foi colocado em um reator a 37°C, contendo 5 mL de solução de lactose 5% (m/v) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 suplementado com 0,1 mM de $MnCl_2$ e 2mM de $MgCl_2$ mantido sob agitação. Durante tempos pré-determinados, uma alíquota de 10 μ L dessa solução foi retirada com um filtro e a quantidade do produto formado (glicose) foi determinada pelo método GOD-PAP com leitura a 505 nm em cubeta de vidro utilizando a curva de calibração determinada pelo kit enzimático. A atividade pode ser calculada de acordo com a equação abaixo:

$$At (U/mL) = \frac{tg \times V_{\text{reator}}}{M_{\text{enzima}}}$$

Equação 3.2 – At = Atividade hidrolítica da Lactose com enzima imobilizada;
tg = tangente de curva de hidrólise; V_{reator} = volume total do reator em L; M_{enzima} = massa de gel em gramas

3.2.8.3 – Determinação da atividade hidrolítica da β -galactosidase em *o*-Nitro-fenilgalactopiranosídeo (*o*-NPG)

Uma amostra da solução enzimática foi adicionada a uma cubeta com 2 mL de solução de *o*-NPG 13 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 7,0 e temperatura ambiente, contendo 2 mM de $MgCl_2$. A atividade foi determinada espectrofotometricamente a 405 nm e acompanhado de modo a se determinar a tangente

da região linear. O coeficiente molar de extinção do produto *o*-nitrofenol (*o*-NP) utilizado foi de $3100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Pessela *et al*, 2007). Uma unidade de β -galactosidase com este substrato foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol}$ de *o*-NP por minuto sob as condições descritas. A atividade pode ser calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{At (U/mL)} = \frac{\text{tg} \times \text{V}_{\text{reator}}}{3,1 \times \text{V}_{\text{enzima}}}$$

Equação 3.3 – At = Atividade hidrolítica do *o*-NPG; tg = tangente de curva de hidrólise; V_{reator} = volume total do reator em mL; V_{enzima} = volume de enzima em mL

3.2.8.4 – Determinação da atividade hidrolítica em *o*-Nitro-fenilgalactopiranosídeo (*o*-NPG) da β -galactosidase imobilizada

Para a hidrólise do *o*-NPG com β -galactosidase imobilizada utilizou-se metodologia descrita por Pessela *et al*, (2007). Uma amostra de $10\mu\text{L}$ de suspensão enzimática contendo $0,1 \text{ g}$ de gel com $0,4 \text{ mL}$ de tampão de imobilização ou uma amostra variando de $0,1$ a $0,005 \text{ g}$ do derivado foi adicionada a uma cubeta de vidro com 2 mL de solução 13 mM do substrato em tampão fosfato de sódio 50 mM a pH $7,0$ contendo 2 mM de MgCl_2 a temperatura ambiente e agitação magnética. A atividade foi determinada espectrofotometricamente a 405 nm e acompanhado de modo a se determinar a tangente da região linear. O coeficiente molar de extinção do produto *o*-nitrofenol (*o*-NP) utilizado foi de $3100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Pessela *et al*, 2007). A atividade pode ser calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{At (U/mL)} = \frac{\text{tg} \times \text{V}_{\text{reator}}}{3,1 \times \text{M}_{\text{enzima}}}$$

Equação 3.4 – At = Atividade hidrolítica do *o*-NPG com enzima imobilizada; tg = tangente de curva de hidrólise; V_{reator} = volume total do reator em mL; M_{enzima} = massa de gel em gramas

3.2.9 – Estabilidades, Efeito de inibição e Velocidade de hidrólise

3.2.9.1 – Estabilidade Térmica

O efeito da temperatura sobre a estabilidade da lactase solúvel e imobilizada foi determinado por meio da incubação de 0,2 mg de proteína da enzima livre e 0,05 g do derivado em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 contendo 0,1mM de MnCl_2 e 2 mM de MgCl_2 nas temperaturas de 10, 20, 40 e 55°C. Em intervalos definidos, as amostras foram retiradas e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação e as atividades residuais foram determinadas através da hidrólise do *o*-NPG como descrito no item 3.2.8.3 e 3.2.8.4.

3.2.9.2 - Estabilidade Operacional

A viabilidade da reutilização de β -galactosidase imobilizada foi analisada durante uma seqüência de três bateladas. Utilizou-se 5 U de enzima/g de lactose, ou seja, 1,83 g do derivado de quitosana ativado por glutaraldeído com um carregamento de 1 mg de proteína/g de gel. As hidrólises foram realizadas em 100 mL de uma solução 5 % (m/v) de lactose em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 contendo 0,1 mM MnCl_2 e 2 mM MgCl_2 sob agitação constante à temperatura de 40°C por um período de 20 min. Durante tempos pré-determinados, uma alíquota de 10 μL dessa solução foi retirada com um filtro e a quantidade do produto formado foi determinada pelo método GOD-PAP. A atividade foi calculada de acordo com a equação 3.2. A solução então foi filtrada, o gel foi lavado, seco e pesado para ser reutilizado novamente.

3.2.9.3 – Efeito de inibição

Verificou-se a influência da galactose, produto da reação e inibidor da enzima, sobre a atividade da β -galactosidase solúvel e imobilizada empregando a reação de hidrólise da lactose, conforme metodologia descrita no item 3.2.8.1 e 3.2.8.2. Foram utilizadas concentrações de 1,0; 1,5 e 5,0 g/L de galactose.

3.2.9.4 – Conversão de lactose

Verificou-se a influência da imobilização da enzima sobre a conversão da lactose em galactose e glicose utilizando β -galactosidase solúvel e imobilizada na reação de hidrólise, conforme metodologia descrita no item 3.2.8.1 e 3.2.8.2. Foi utilizado 2 e 50 U de enzima/g de lactose para a enzima solúvel e imobilizada. As reações ocorreram paralelamente a 40°C por um longo tempo, amostras foram retiradas em espaço de tempo determinado e a glicose produzida foi determinada pelo método GOD-PAP.

3.2.10 – Caracterização da temperatura ótima da β -galactosidase

Verificou-se a influência da temperatura sobre a atividade da β -galactosidase solúvel e imobilizada empregando a reação de hidrólise da lactose, conforme metodologia descrita no item 3.2.8.1 e 3.2.8.2, na faixa de temperatura entre 25 e 55 °C.

3.2.11 – Caracterização do pH ótimo da β -galactosidase

A influência do pH foi avaliada empregando a reação de hidrólise da lactose a 37 °C, na faixa de pH entre 5,5 e 9,0 para a enzima solúvel e imobilizada. Foi utilizado tampão fosfato de potássio 100 mM suplementado com 0,1 mM $MnCl_2$ e 2 mM $MgCl_2$ nas faixas estudadas.

3.2.12 - Procedimento de Imobilização em Glioxil-agarose 6%

A imobilização da β -galactosidase em glioxil-agarose foi realizada no tampão fosfato de potássio 50 mM e 100 mM; pH 7,0 e 10,05; durante 24h a 25°C; a concentração de proteína foi de 5 mg de proteína/ g de gel. Uma alíquota de 0,2 mL do meio reacional contendo tampão de imobilização e enzima foi retirada e juntamente com 0,1 g do gel sem ativação foi utilizada para a medida do branco sobre a hidrólise do *o*-NPG. A suspensão contendo solução enzimática e suporte foi mantida sob suave agitação com o auxílio de um shaker na temperatura estudada pelo período de tempo estudado. Após a imobilização, foi quantificada no sobrenadante a atividade hidrolítica residual. O gel foi lavado exaustivamente com água bidestilada e estocados a 4°C.

3.2.13 - Procedimento de Imobilização em MANAE-glutaraldeído

A imobilização da β -galactosidase foi realizada em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 contendo 0,1 mM de $MnCl_2$ e 2 mM de $MgCl_2$ empregando somente o carregamento de 5 mg de proteína/g de suporte. Uma alíquota de 0,2 mL do meio reacional contendo tampão de imobilização e enzima foi retirada e juntamente com 0,1 g do gel sem ativação foi utilizada para a medida do branco sobre a hidrólise do *o*-NPG. A suspensão contendo solução enzimática e suporte foi mantida sob suave agitação com o auxílio de um shaker a 25°C por um período de 24 h. Após a imobilização, foi quantificada no sobrenadante a atividade hidrolítica residual. O gel foi lavado exaustivamente com água bidestilada e estocados a 4°C.

3.2.14 - Procedimento de Imobilização em MANAE seguida da reticulação com glutaraldeído ou com o polialdeído dextrana

Esta imobilização segue a mesma metodologia descrita no item 3.2.13, porém o gel foi filtrado para a remoção de enzima residual e foi quantificada a atividade hidrolítica aparente do derivado conforme metodologia descrita no item 3.2.8.4. Em seguida, o gel foi suspenso novamente no tampão de imobilização na razão de 10:1 e foi adicionado o glutaraldeído variando as concentrações de 0,03 a 0,5%, ou o polialdeído dextrana variando as concentrações de 0,05 a 0,1%. A suspensão foi deixada reagindo por 1h sob suave agitação e temperatura ambiente, em seguida o derivado foi lavado com tampão de imobilização para remoção do glutaraldeído residual e a atividade hidrolítica do gel foi quantificada novamente. Ao final da imobilização, testes com e sem borohidreto de sódio foram realizados; nos testes com borohidreto foram adicionados à suspensão 1 mg.mL^{-1} de borohidreto de sódio para a redução das bases de Schiff para a formação de aminas secundárias estáveis. O derivado foi mantido por 30 min e lavado exaustivamente com água bidestilada e estocados a 4°C.

3.2.14.1 - Procedimento de Imobilização em MANAE seguida da reticulação com glutaraldeído contendo galactose (inibidor) no meio reacional

A imobilização da β -galactosidase foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.13, porém o gel foi filtrado para a remoção de enzima residual e foi quantificada a atividade hidrolítica aparente do derivado conforme metodologia descrita no item 3.2.8.4. Em seguida, o gel foi suspenso novamente no tampão de imobilização na razão de 10:1 e foi adicionado 0,03 M de galactose, de acordo com a metodologia de Torres *et al*, (2006). A suspensão foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 30 min seguida pela adição de 0,15% de glutaraldeído. A reticulação foi acompanhada pela medida de atividade do derivado a cada 10 min a fim de determinar o tempo máximo de reação onde não ocorre perda da atividade enzimática, que pode ser ocasionada pela distorção da enzima através do aumento do tempo reacional, pois a alta reatividade do glutaraldeído o torna nocivo à enzima após algum tempo de reação. Para proteger o centro ativo da enzima e evitar a distorção da mesma durante a reticulação, adicionou-se a galactose, o inibidor da enzima, para que esta ocupe o centro ativo da proteína impedindo sua distorção pela ação do glutaraldeído. A suspensão foi deixada reagindo sob suave agitação e temperatura ambiente, após 20 min foi lavada com tampão de imobilização para remoção do glutaraldeído residual e a atividade hidrolítica do gel foi quantificada novamente.

3.2.15 - Procedimento de Imobilização da β -galactosidase em Quitosana-glutaraldeído

A imobilização da β -galactosidase no suporte foi realizada na presença de tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 contendo 0,1 mM de $MnCl_2$ e 2 mM de $MgCl_2$ empregando diferentes carregamentos de proteína (1,5, 10, 25, 40, 50, 100, 200, 250 e 340 $mg \cdot g^{-1}$ de gel). Uma alíquota de 0,2 mL do meio reacional contendo tampão de imobilização e enzima foi retirada para a quantificação de proteína e atividade hidrolítica usando *o*-NPG como substrato. A suspensão contendo solução enzimática e suporte foi mantido sob suave agitação com o auxílio de um shaker a 25°C. Após a imobilização, foi quantificada no sobrenadante a concentração de proteína e a atividade hidrolítica residual. O gel foi lavado com água bidestilada em abundância para a remoção de enzima residual e em seguida foi quantificada a atividade hidrolítica

aparente do derivado conforme metodologia descrita no item 3.2.8.4. Ao final da imobilização, também foram realizados testes com e sem borohidreto de sódio. Nos testes com borohidreto, o mesmo procedimento relatado no item 3.2.14 foi realizado.

Para os outros géis de quitosana: epóxi-quitosana-alginato, quitosana-alginato-glutaraldeído e quitosana-k-carragenina-glutaraldeído seguiu-se o procedimento acima, no entanto, não foi realizado ensaios de carga máxima.

3.2.15.1 - Procedimento de Imobilização da β -galactosidase em Quitosana seguida da reticulação com glutaraldeído

A imobilização da β -galactosidase no suporte foi realizada na presença de tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 contendo 0,1 mM de $MnCl_2$ e 2 mM de $MgCl_2$ empregando um carregamentos de proteína de 5 mg.g⁻¹ de gel. Uma alíquota de 0,2 mL do meio reacional contendo tampão de imobilização e enzima foi retirada para a quantificação de proteína e atividade hidrolítica usando *o*-NPG como substrato. A suspensão contendo solução enzimática e suporte foi mantido sob suave agitação com o auxílio de um shaker a 25°C por um período de 24 h. Após a imobilização, foi quantificada no sobrenadante a concentração de proteína e a atividade hidrolítica residual. O gel foi filtrado para remoção de enzima residual e suspenso novamente no tampão de imobilização na razão de 10:1, foi adicionado 0,15 % de glutaraldeído. A suspensão foi deixada reagindo por 1h sob suave agitação e temperatura ambiente, em seguida foi lavada com tampão de imobilização para remoção do glutaraldeído residual e a atividade hidrolítica do gel foi quantificada novamente conforme metodologia descrita no item 3.2.8.4.

3.2.16 - Procedimento de Imobilização por Encapsulação e conseqüente reticulação com agentes bifuncionais

Preparou-se uma solução de 1 % m/v de quitosana em ácido acético 1 % v/v. A esta solução foi adicionada a enzima, de modo a se obter uma concentração de 1 mg de proteína por mililitro de solução de quitosana. O pH da solução foi corrigido para 6,5 para que não houvesse desnaturação enzimática. A solução foi homogeneizada e adicionada lentamente em 200 mL de tampão tris/HCl 0,1 M, pH 8,0, acompanhando o pH em banho de gelo por 30 minutos e depois adicionado glutaraldeído lentamente, de

modo a atingir uma concentração de 0,1 % v/v. Depois disto, a suspensão foi mantida sob agitação suave por 2 horas a temperatura ambiente.

O gel já contendo a enzima imobilizada foi filtrado e lavado com água destilada e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0.

Seguindo o procedimento acima utilizou-se também agarose, agar-agar e gelatina, solubilizados em água destilada.

3.2.17 - Preparação dos polialdeídos pela oxidação da dextrana

1,25 g de dextrana (PM 40000) foi dissolvido em 37,5 mL de água Milli-Q (3,33 mM de dextrana contém 184,8 mM de glicose) e adicionado 3 g de periodato de sódio (Cardias, 2000). Esta quantidade corresponde a dois moles de periodato por molécula de glicose. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 3 h. Posteriormente, a solução foi dializada em 5 mL de água Milli-Q à temperatura ambiente mudando-se a água 5 vezes durante o processo a cada 3 h em câmara fria a 4°C. A solução de polialdeído foi usada no mesmo dia ou então guardada em congelador. O esquema representativo de obtenção do polialdeído a partir de dextrana é mostrado na Figura 3.1.

Para se obter um polialdeído dextrana menos reativo, utilizou-se 0,1 g de periodato de sódio.

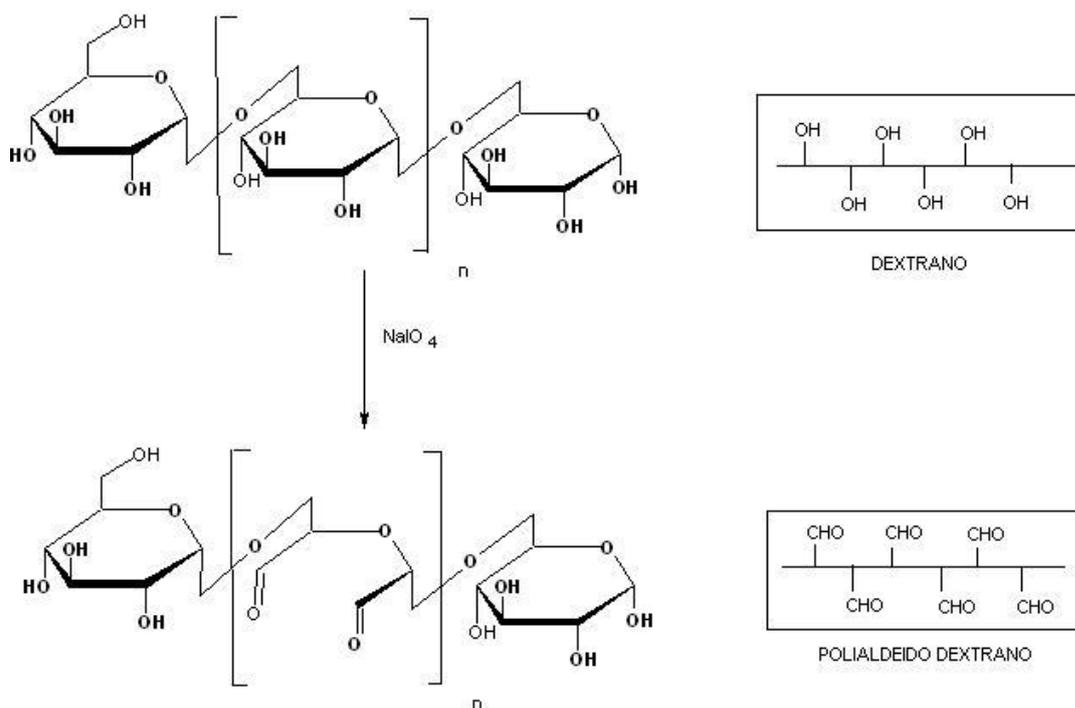


Figura 3.2. Preparação dos polialdeídos pela oxidação de dextrans (Cardias, 2000).

3.2.18 - Cálculo dos Parâmetros de Imobilização

3.2.18.1 – Cálculo da Atividade Recuperada

O cálculo da atividade recuperada foi determinado pela relação entre a atividade hidrolítica aparente do derivado e o produto da atividade inicial oferecida com a concentração de enzima imobilizada, conforme mostrada na equação 3.6.

$$AR (\%) = \frac{U_{gel}}{U_0} \cdot 100$$

Equação 3.6 - AR = atividade recuperada (%); U_{gel} é a atividade hidrolítica aparente do derivado (U.g^{-1} de suporte); U_0 é a atividade oferecida no início da imobilização (U.mg^{-1} de proteína).

3.2.18.2 - Concentração de Proteína Imobilizada

A concentração de proteína imobilizada foi estimada com base na concentração de proteína oferecida e a concentração de proteína presente no meio reacional após o processo de imobilização, como mostrada na equação 3.7.

$$PI(\%) = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \cdot 100$$

Equação 3.7 – PI = Porcentagem de proteína imobilizada (%); P_0 = concentrações de proteínas no tempo inicial e P_f = concentrações de proteínas no tempo final no sobrenadante ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização de β -galactosidase solúvel

4.1.1 Influência do Tampão sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase.

Foi verificada a influência do tipo de tampão empregado sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase. É sabido que o tipo de tampão é um importante parâmetro para a quantificação da atividade hidrolítica de enzimas, pois eles podem atuar como co-fatores ou inibidores das enzimas. Nas Tabelas 4.1 e 4.2 estão apresentados os resultados obtidos com a utilização de tampão fosfato de sódio, de potássio e tampão Novo, bem como a influência de íons sobre a atividade hidrolítica da enzima empregando como substratos lactose (substrato natural) e *o*-NPG (substrato sintético), respectivamente.

Tabela 4.1. Influência do tipo de tampão e de íons sobre a atividade enzimática de β -galactosidase na hidrólise da lactose a pH 7,0 e 37°C.

Ensaio	Tampão	Concentração do Tampão	Íons	Atividade (U/mL)	Atividade Relativa (%)
1	Fosfato de Sódio	100 mM	-	565	8,3
2	Fosfato de Potássio	100 mM	-	3720	54,8
3	Fosfato de Sódio	100 mM	2 mM MgCl ₂ + 0,1 mM MnCl ₂	1220	18,0
4	Fosfato de Potássio	100 mM	2 mM MgCl ₂ + 0,1 mM MnCl ₂	6790	100
5	Fosfato de Potássio	100 mM	0,1 mM MnCl ₂	4400	64,8
6	Novo	*	-	4690	69,0

* 2,7 mM citrato de sódio; 7,91 mM ácido cítrico; 2,99 mM fosfato de potássio dibásico; 10,84 mM fosfato de potássio; 19,43 mM hidróxido de potássio; 4,08 mM cloreto de magnésio; 5,1 mM cloreto de cálcio e 3,33 mM carbonato de sódio.

De acordo com os resultados apresentados, o efeito do potássio é extremamente importante para a atividade hidrolítica da enzima, assim como os íons manganês e magnésio (Mahoney *et al*, 1977).

A atividade hidrolítica da enzima no tampão fosfato de sódio (ensaio 1) foi de 565 U/mL e em tampão fosfato de potássio (ensaio 2) este valor foi 6 vezes superior (3720 U/mL). Nota-se uma influência negativa dos íons sódio sobre a atividade hidrolítica da enzima. A adição de íons bivalentes resultou em um incremento bastante significativo sobre a atividade enzimática. Mantendo-se o tampão fosfato de potássio 100 mM com a adição de Mn^{2+} e Mg^{2+} a pH 7,0 obteve-se o maior valor de atividade hidrolítica da enzima, 6790 U/mL (ensaio 4), comprovando os resultados referentes à influência do tampão e da suplementação de íons também relatados na literatura por Torres *et al*, 2006 e Santos *et al*, 1998.

O tampão Novo resultou em um valor de atividade hidrolítica relativamente alto, 4690 U/mL (ensaio 6), porém, não o bastante quando comparado com o resultado obtido no ensaio 4, como comprovado também por Santos *et al*, 1998. Este tampão Novo é um tampão fosfato-citrato contendo cálcio e magnésio; que mostra uma composição de sais similar à composição do leite (Santos *et al*, 1998 e Ladero *et al*, 2002).

Na hidrólise do *o*-NPG, o efeito do sódio sobre a atividade hidrolítica da enzima foi favorável se comparado com o potássio, como mostra a Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Influência do tipo de tampão e de íons sobre a atividade enzimática de β -galactosidase na hidrólise do substrato sintético *o*-NPG, a pH 7,0 e 25°C.

Ensaio	Tampão	Concentração do Tampão	Íons	Atividade (U/mL)	Atividade Relativa (%)
1	Fosfato de Sódio	50 mM	2 mM $MgCl_2$	4460	100
2	Fosfato de Sódio	50 mM	0,1 mM $MnCl_2$	3630	81,3
3	Fosfato de Sódio	100 mM	2 mM $MgCl_2$	3800	85,1
4	Fosfato de Sódio	100 mM	0,1 mM $MnCl_2$	3470	77,6
5	Fosfato de Potássio	50 mM	2 mM $MgCl_2$	4380	98,1
6	Fosfato de Potássio	50 mM	0,1 mM $MnCl_2$	2270	50,9
7	Novo	*	-	2890	64,8

* 2,7 mM citrato de sódio; 7,91 mM ácido cítrico; 2,99 mM fosfato de potássio dibásico; 10,84 mM fosfato de potássio; 19,43 mM hidróxido de potássio; 4,08 mM cloreto de magnésio; 5,1 mM cloreto de cálcio e 3,33 mM carbonato de sódio.

A influência do tipo de tampão e de íons bivalentes sobre a atividade enzimática não foi tão significativa se comparada com a lactose. Estes resultados mostram que as condições verificadas foram menos drásticas na hidrólise do substrato sintético, mostrando que a hidrólise do substrato natural é fortemente afetada pelo tipo de tampão e adição de íons.

No tampão fosfato de sódio variando a concentração de 50 para 100 mM na presença de íons manganês (ensaios 2 e 4) não foi observado variação significativa sobre a atividade enzimática, com atividade hidrolítica da ordem de 3630 e 3470 U/mL, respectivamente. Na presença de íons magnésio observa-se um aumento quando comparado com o manganês na mesma força iônica (ensaios 1 e 2; 3 e 4). Porém, nota-se que uma força iônica menor tem certa influência sobre a atividade hidrolítica da enzima, para 100 mM (ensaio 3) a atividade relativa é de 85,1%, enquanto que para 50 mM (ensaio 1) foi encontrado o maior valor de atividade relativa, 100%; conforme descrito por Pessela *et al.* (2007). Por isso este tampão foi adotado para a medida de atividade de todos os ensaios realizados neste trabalho empregando *o*-NPG como substrato.

No tampão fosfato de potássio, a presença do íon magnésio também promove um aumento significativo quando comparado com o manganês, ensaio 5 e 6, respectivamente; o mesmo notado para o sódio.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que qualquer variação de tampão fosfato de potássio e sódio contendo Mg^{2+} não foi significativa.

O tampão Novo (ensaio 7) resultou em um valor de atividade hidrolítica baixo, ocasionando impacto sobre os resultados obtidos, pois a atividade relativa foi praticamente a metade da melhor atividade encontrada.

4.1.2. Influência da Temperatura sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase solúvel.

O efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica da β -galactosidase solúvel pode ser observado na Figura 4.1. Sabe-se que com o aumento da temperatura, a velocidade de reação também aumenta. Contudo, devido à frágil estrutura das enzimas, ela pode sofrer alteração com o aumento da temperatura, perdendo a sua atividade catalítica. Para verificar a influência da temperatura sobre a atividade catalítica da β -

galactosidase, a hidrólise foi realizada no intervalo de 25 a 55°C. Observa-se que a máxima atividade da enzima solúvel foi obtida a 45°C, confirmando resultados já reportados por Uwajima *et al*, 1972. Após esta temperatura foi verificada uma queda acentuada da atividade enzimática chegando quase à total inativação.

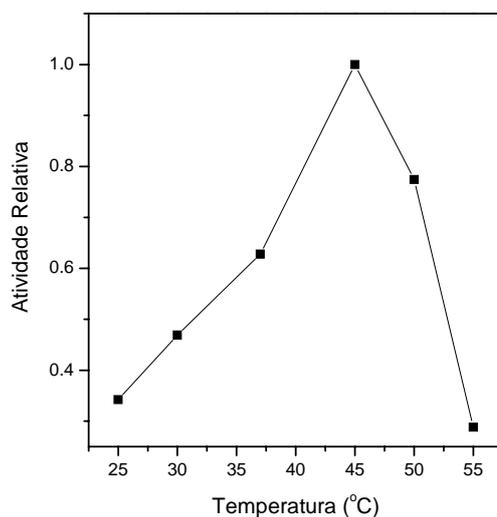


Figura 4.1. Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase solúvel na hidrólise de lactose em tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM suplementado com 2 mM $MgCl_2$ e 0,1 mM $MnCl_2$.

4.1.3. Influência do pH sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase.

O pH é um dos mais importantes parâmetros da atividade enzimática, pois a concentração de hidrogênio no meio pode afetar a estrutura quaternária da enzima e o grau de ionização de substratos, produtos e de resíduos que fazem parte do sítio ativo.

A Figura 4.2 mostra o efeito do pH na atividade hidrolítica da enzima solúvel. A faixa de pH de máxima atividade da enzima solúvel está entre 6,5 e 7,0; com o máximo valor obtido em pH 7,0, o que está de acordo com valores relatados na literatura para esta enzima (Ladero *et al*, 2002).

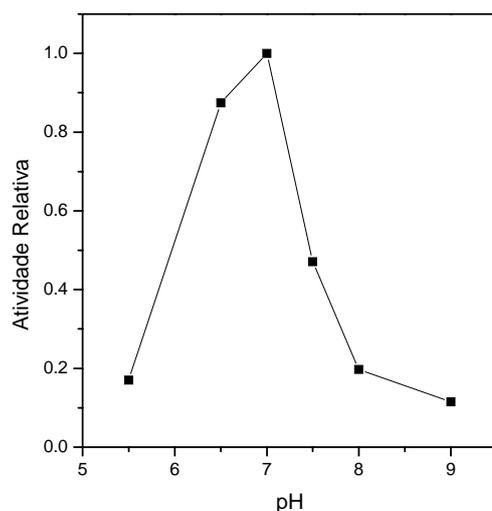


Figura 4.2. Influência do pH sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase na hidrólise da lactose à temperatura de 37°C.

4.1.4. Influência do produto galactose na atividade hidrolítica de β -galactosidase

De acordo com a literatura, a β -galactosidase é uma enzima que sofre inibição pela galactose, produto de hidrólise da lactose (Ladero *et al*, 2002). Ensaios de atividade catalítica da enzima foram realizados em diferentes concentrações de inibidor com o objetivo de verificar o efeito da galactose sobre a atividade da enzima, como mostra a Figura 4.3.

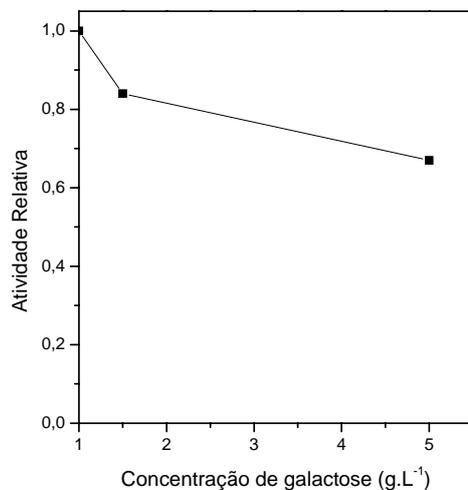


Figura 4.3. Influência da concentração de galactose na atividade hidrolítica da enzima.

A atividade da enzima solúvel foi fortemente influenciada pela concentração do inibidor; visto que, a enzima livre está totalmente susceptível a influência de qualquer substância presente no meio por possuir maior mobilidade no meio reacional.

A partir de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, a redução de atividade hidrolítica da enzima foi de 16% da atividade inicial. Para a concentração de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ esta redução foi ainda mais acentuada, em torno de 35%.

4.1.5. Estabilidade alcalina de β -galactosidase na presença e ausência do produto inibidor galactose

Com o objetivo de retardar e diminuir a inativação da enzima causada pela variação de seu pH ótimo para o pH alcalino, foram feitos ensaios de atividade hidrolítica da enzima solúvel em pH 10,0 na ausência e na presença do inibidor galactose, utilizado para proteger a enzima, na concentração de $1,5 \text{ g/L}$, concentração onde já existe inibição.

A presença de galactose não ocasionou melhora significativa nos resultados, visto que, a inativação total da enzima ocorre em apenas 1 hora de incubação para ambos os ensaios.

4.2. Imobilização de β -galactosidase em géis de agarose

4.2.1. Imobilização da β -galactosidase em gel glioxil-agarose 6% variando as condições de reação

A imobilização de β -galactosidase foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Guisán (1988) que consiste na imobilização de enzimas em suportes previamente ativadas, com grupos glioxil, em pH 10,05 e temperatura ambiente de 25°C . O gel glioxil empregado contém $75 \mu\text{moles}$ de grupos aldeídos/mL de gel.

Utilizando tampão fosfato de potássio com suplementos que estabilizam a enzima, e mesmo na presença do inibidor, não foi possível obter rendimento de imobilização e como consequência o derivado de imobilização não teve atividade, pois o pH ótimo de imobilização em gel glioxil 10,05 não é o mesmo da enzima, a estabilidade da enzima em meio alcalino é muito baixa.

Pode-se concluir que esta técnica não é viável para imobilizar a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*.

4.2.2. Imobilização da β -galactosidase em gel MANAE-glutaraldeído (agarose 6%)

O rendimento de imobilização obtido foi de 100%, porém, mesmo acrescentando os cofatores necessários à enzima, nenhuma atividade recuperada foi encontrada. Isso ocorre devido à alta reatividade do glutaraldeído, que promove inúmeras ligações entre a enzima e o suporte fazendo com que esta sofra distorções destrutivas para a atividade enzimática (Betancor *et al*, 2006).

O glutaraldeído tem sido muito usado para introduzir ligações intramoleculares em proteínas ou para modificar proteínas adsorvidas em suportes aminados (Betancor *et al*, 2006).

4.2.3. Imobilização da β -galactosidase em MANAE por adsorção iônica, seguida pela reticulação com glutaraldeído com diferentes protocolos (agarose 6%)

O primeiro procedimento utilizado seguiu protocolo descrito por Pessela *et al*, (2007), a primeira etapa da imobilização ocorre com reação de adsorção da enzima durante 24 h sob suave agitação e temperatura ambiente. O gel então é filtrado e segue para a segunda etapa de imobilização, onde o derivado é suspenso no tampão de imobilização e reticulado com glutaraldeído, por 1 h de reação. A seguir, o derivado é lavado com tampão e novamente suspenso em tampão de imobilização onde permanecerá por mais 20 h sob agitação e temperatura ambiente. Somente depois deste tempo o gel foi filtrado e as atividades medidas.

Em relação às imobilizações conduzidas covalentemente em MANAE-glutaraldeído, foi possível verificar valores de atividade recuperada da ordem de 78 – 84% com a adsorção da enzima em MANAE, como mostra a Tabela 4.3. No entanto, após a reticulação do sistema enzima-suporte com glutaraldeído foi verificada uma drástica redução da atividade hidrolítica.

Tabela 4.3. Influência do pH e da concentração de glutaraldeído na imobilização em MANAE reticulado com glutaraldeído, 1 hora de reação, seguido de lavagem e incubação em tampão por 20 horas. Carga oferecida 5 mg proteína/g gel; imobilização em tampão fosfato de potássio (TFP)*. $\frac{1}{2}$ vida da enzima solúvel diluída em tampão de imobilização a $55^{\circ}\text{C} = 2$ minutos.

pH	Concentração de glutaraldeído (%)	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade recuperada 1° etapa (adsorção) (%)	Atividade Recuperada após reticulação (%)	$\frac{1}{2}$ vida da enzima imobilizada a 55°C (min)
pH 7,0	0,03	92,4	84,4	13,5	2
pH 6,0	0,03	91,3	78,0	13,4	2
pH 7,0	0,15	92,4	84,4	3,0	2
pH 6,0	0,15	91,3	78,0	3,3	2
pH 6,0	0,50	91,3	78,0	0	-

*TFP: Tampão Fosfato de Potássio 20 mM contendo 0,1 mM MnCl_2 e 2 mM MgCl_2 .

Uma concentração mais alta de glutaraldeído provavelmente ocasionou distorção da enzima resultando em uma atividade recuperada quase nula, devido à alta reatividade do glutaraldeído, o qual pode ser polimerizado sobre a superfície do suporte prejudicando a difusão do substrato, bem como distorcendo o centro ativo da enzima durante a imobilização (Alonso *et al*, 2005). A baixa recuperação da atividade também é agravada pelo tempo adicional em que o gel permanece no tampão após a reticulação. Segundo Pessela *et al*, (2007) este tratamento permite modificar completamente os grupos amino primário da enzima e do suporte com uma molécula de glutaraldeído e pode ser usado também para reticular a enzima e o suporte. Por outro lado, o excesso de ligações entre enzima e suporte pode distorcer a estrutura tridimensional da enzima causando a perda da atividade catalítica (Rodrigues *et al*, 2008). A redução da atividade recuperada obtida pelo aumento do tempo de imobilização se deve ao maior número de interações covalentes entre a enzima e o suporte que permite aumentar a estabilidade térmica dos derivados, mas diminui a sua atividade hidrolítica (Rodrigues *et al*, 2008).

Um dos mais importantes parâmetros da atividade enzimática é o pH. Entretanto, o pH não tem uma influência significativa na atividade recuperada deste derivado quando analisado na primeira etapa da imobilização, em que o valor da atividade recuperada para o pH 6,0 foi de 78,0 % e para o pH 7,0 foi de 84,4 %.

Diante destes resultados, modificou-se o protocolo descrito por Pessela *et al*, (2007), ao eliminar-se o tempo adicional de 20 h de reação do gel com o tampão após a

reticulação com o glutaraldeído. Os resultados indicam que ocorreu aumento na atividade recuperada do derivado, como mostrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Influência da concentração de glutaraldeído na imobilização em MANAE reticulado com glutaraldeído, sem incubação por 20 horas em tampão pH de imobilização = 7,0; carga oferecida = 5 mg proteína/g gel. Imobilização em tampão fosfato de potássio (TFP)*. $\frac{1}{2}$ vida da enzima solúvel diluída em tampão de imobilização a 55⁰C = 2 minutos.

Concentração de glutaraldeído (%)	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)	$\frac{1}{2}$ vida da enzima imobilizada a 55 °C (min)
0,05	100	32,6	2
0,10	100	36,7	2
0,15	93,2	45,8	2

*TFP: Tampão Fosfato de Potássio 20 mM contendo 0,1 mM MnCl₂ e 2 mM MgCl₂

Nota-se que, além de terem-se obtidos novamente altos rendimentos de imobilização, houve expressiva melhora na atividade recuperada com uso do novo protocolo. Contudo, a estabilidade térmica da enzima imobilizada não aumentou.

Visando-se diminuir o efeito de distorção do sítio ativo causado pela intensa reticulação com glutaraldeído, foi reduzido o tempo de reticulação, buscando-se um limite máximo onde a atividade ainda se mantinha. O melhor tempo encontrado foi de 20 min; sendo assim, a reticulação foi feita por um período de apenas 20 min na presença do inibidor galactose para proteger a enzima, na concentração de 0,03 M, conforme procedimento reportado por Torres *et al*, 2006. Contudo, tal como já ocorrido no trabalho da literatura, a presença de galactose na concentração utilizada não ocasionou melhora significativa nos resultados, possivelmente devido à baixa concentração de galactose utilizada. Valores de Km e Ki para a hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* a 30 °C pH 6,5 foram de 17 g/L e 51 g/L, respectivamente. Uma concentração de inibidor bem maior que o valor de Ki seria, portanto, necessária para saturar todas as moléculas de enzima.

Ensaio de dessorção com concentrações de KCl variando de 0,1 M, 0,5 M e 1 M por um período de 24 h acompanhados por Bradford foram realizados para as imobilizações em MANAE seguido da reticulação com glutaraldeído, e comprovaram as imobilizações por ligação covalente, visto que, nenhuma proteína foi encontrada no sobrenadante.

4.2.3.1. Estabilidade térmica de β -galactosidase diluída em tampão de imobilização e do derivado preparado em MANAE reticulado com glutaraldeído, a 10°C.

O melhor derivado de imobilização obtido em gel MANAE reticulado com glutaraldeído foi estocado a 10°C no tampão de imobilização. A atividade recuperada foi medida no período de 90 dias sendo comparada com a enzima solúvel também incubada nas mesmas condições, ou seja, a enzima livre era diluída no mesmo tampão em que era mantida a enzima imobilizada. Os resultados podem ser observados na Figura 4.4.

De acordo com a Figura, pode-se ressaltar que a utilização deste suporte não foi viável para a imobilização desta enzima, pois além de não ser um suporte economicamente interessante, possui um procedimento de obtenção do gel e de imobilização da β -galactosidase que também aumentam o custo do processo. Mas, todas essas subjeções seriam compensadas se o derivado possuísse uma estabilidade térmica inúmeras vezes superiores à enzima livre, entretanto, a enzima imobilizada por adsorção iônica em MANAE-agarose se comporta tal como a enzima solúvel. O que pode estar colaborando para isto é a perda de subunidades da enzima, e com isto, perda da atividade hidrolítica nas condições de incubação.

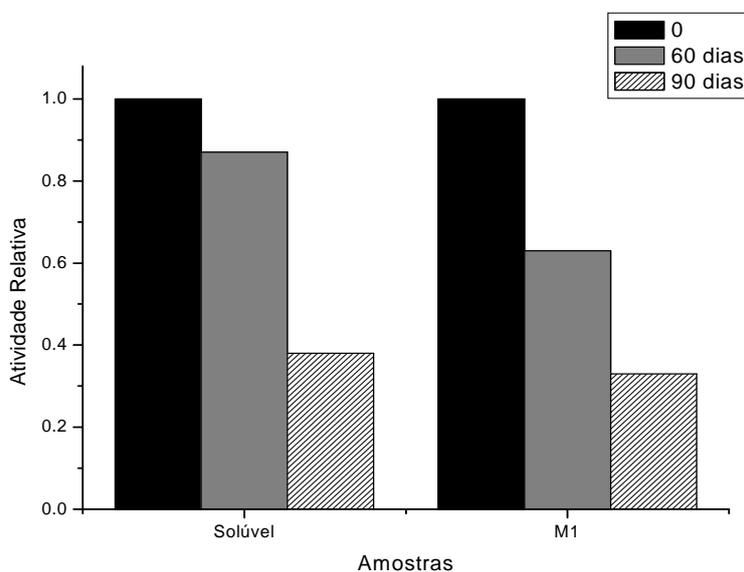


Figura 4.4. Estabilidade de térmica a 10°C da β -galactosidase imobilizada em MANAE-agarose reticulado com glutaraldeído. M1: derivado estocado no tampão de imobilização.

4.2.4. Imobilização da β -galactosidase em MANAE por adsorção iônica, seguida da reticulação com polialdeído dextrana (agarose 6%)

Com o intuito de aumentar a estabilidade deste derivado, foi empregada a técnica de entrecruzamento da enzima com polialdeído dextrana após a imobilização por adsorção iônica. A dissociação de subunidades de enzimas multiméricas é um dos principais fatores da inativação da estrutura multimérica das enzimas (Cardias, 2000; Mateo et al, 2006-b). Esta estratégia tem sido amplamente empregada na estabilização térmica de enzimas multiméricas. Enzimas multiméricas entrecruzadas por polialdeído dextrana após a imobilização de β -galactosidase de *Thermus* spp. e α -aminoácido éster hidrolase de *Acetobacter turbidans* foram mais estáveis termicamente se comparadas com os derivados não entrecruzados (Mateo et al, 2006-b). No entanto, foi verificada redução da atividade recuperada destes derivados decorrente das limitações difusionais ocorridas após o entrecruzamento (Mateo et al, 2006-b). Como o polialdeído dextrana também é um agente reticulante, alguns ensaios foram realizados substituindo o glutaraldeído pelo polialdeído dextrana.

Seguindo o procedimento descrito por Cardias (2000), o polialdeído dextrana foi preparado e os resultados encontrados estão descritos na Tabela 4.5 abaixo. O procedimento de imobilização utilizado foi o mesmo descrito para o glutaraldeído no item 4.2.3.

Tabela 4.5. Imobilização em MANAE reticulado com polialdeído dextrana. Concentração de proteína de 5 mg proteína/g gel.

Condições Reacionais	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Recuperada 1ª etapa (%)	Atividade Recuperada (%)	½ vida da enzima imobilizada a 55 °C (min)
TFP* pH 7,0	100	72,6	1,34	2

*TFP: Tampão Fosfato de Potássio 20 mM contendo 0,1 mM MnCl₂ e 2 mM MgCl₂

De acordo com o resultado obtido, após o entrecruzamento, foi verificada inativação do derivado. Possivelmente, o entrecruzamento com polialdeído dextrana promoveu a distorção da estrutura quaternária da enzima, o que também foi verificado por Becaro (2008) quando imobilizou a enzima D-hidantoinase de *Vigna angularis* em glioxil-agarose e posteriormente entrecruzou o derivado com polialdeído dextrana, com

redução drástica da atividade catalítica da enzima, resultados bastante similares aos obtidos no presente trabalho.

Na tentativa de obter uma melhora no resultado de entrecruzamento com polialdeído dextrana, adaptou-se a metodologia de Cardias (2000) para a obtenção de um polialdeído menos reativo. O resultado está descrito na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Influência da concentração do polialdeído dextrana na imobilização em MANAE reticulado com polialdeído dextrana pouco ativada. Concentração de proteína de 5 mg proteína/ g gel.

Condições Reacionais	Concentração de Polialdeído Dextrana (%)	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)	$\frac{1}{2}$ vida da enzima imobilizada a 55 °C (min)
TFP* pH 7,0	0,05	100	33,0	2
TFP* pH 7,0	0,1	100	25,9	2

*TFP: Tampão Fosfato de Potássio 20 mM contendo 0,1 mM MnCl₂ e 2 mM MgCl₂

A concentração de polialdeído dextrana empregada foi em relação ao volume total de suspensão derivado/tampão. Mesmo assim, nota-se que o entrecruzamento de derivados de β -galactosidase com polialdeído dextrana não foi uma boa alternativa para a imobilização da enzima, visto que, a atividade recuperada encontrada ainda foi baixa.

4.2.5. Imobilização por adsorção iônica da β -galactosidase em MANAE com agarose 2 e 4% , seguida da reticulação por polialdeído dextrana ou glutaraldeído

Ainda na tentativa de imobilizar a β -galactosidase em agarose, decidiu-se utilizar agarose 2 e 4% produzida no Laboratório de Tecnologia Enzimática da Universidade Federal de São Carlos. Menores as porcentagens de agarose, maiores os poros do suporte obtido. Suportes obtidos com menores concentrações possuem, portanto, uma maior área superficial que os obtidos com concentrações menores de agarose e permitem imobilização de proteínas com alta massa molecular (Giacomini et al, 1998).

Após a preparação do suporte MANAE com agarose 2 e 4% ensaios foram realizados variando as concentrações dos agentes reticulantes glutaraldeído e polialdeído dextrana. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.7.

A concentração de proteína utilizada para todas as imobilizações foi de 5 mg/g de gel, o tampão de imobilização também foi o mesmo utilizado para todas as imobilizações, tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 contendo os cofatores necessários à enzima, 0,1 mM $MnCl_2$ e 2 mM $MgCl_2$ e o protocolo de imobilização seguido foi o descrito no item 4.2.4.

Tabela 4.7. Influência da concentração de agarose, glutaraldeído e polialdeído dextrana na imobilização em MANAE-agarose seguida da reticulação por estes agentes reticulantes.

Concentração de Agarose (%)	Concentração de Glutaraldeído (%)	Concentração de Dextrana (%)	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)
4	0,05	-	100	43,2
4	0,15	-	100	25,0
4	-	0,05	100	53,6
4	-	0,10	100	59,0
2	0,05	-	100	43,0
2	0,15	-	100	26,0
2	-	0,05	100	54,5
2	-	0,10	100	71,1

O processo de imobilização covalente de todas as subunidades da enzima pode ser alcançado por um processo longo de imobilização e em suportes porosos compostos por uma larga superfície interna coberta por uma densa camada de grupos reativos (Mateo et al, 2006-b). A adição de macromoléculas polifuncionais promove a reticulação completa das subunidades prevenindo a dissociação da enzima (Mateo et al, 2006-b). Portanto, suportes macroporosos e agentes polifuncionais foram utilizados.

Nota-se que a atividade recuperada para os derivados imobilizados em géis 2 e 4% foi ligeiramente superior aos derivados em agarose 6%. O derivado com maior atividade recuperada foi verificado em MANAE-agarose 2% reticulado com 0,10 % de polialdeído dextrana, valor empregado em relação ao volume total de suspensão derivado/tampão, com atividade recuperada de 71,1 %. Os valores encontrados quando utilizado 0,10 % de polialdeído dextrana foram maiores do que quando utilizado 0,05 %, mostrando que 0,05 % foi uma concentração muito baixa de polialdeído dextrana e algumas subunidades ainda se dissociaram diminuindo a atividade recuperada. Conforme mostra a Tabela 4.7, a imobilização da enzima em MANAE-agarose 2 e 4%, os valores de atividade recuperada para os derivados reticulados com 0,05% de

glutaraldeído foram similares, da ordem de 43%, mas com o aumento da concentração do agente de reticulação para 0,15%, a atividade recuperada decresceu para 25%. De acordo com estes resultados, é possível verificar que a concentração de agarose no gel não resultou no aumento da atividade catalítica dos derivados, mas o tipo e a concentração de agente de reticulação foram os parâmetros mais significativos para a obtenção de derivados ativos.

Glutaraldeído tem sido muito usado para introduzir ligações intramoleculares em proteínas ou para modificar proteínas adsorvidas em suportes aminados, o mesmo pode ser verificado com polialdeído dextrana (Fernandez-Lafuente et al., 1999; Betancor et al, 2006). Porém, a imobilização em agarose seguida da reticulação com glutaraldeído resultou em um derivado com baixa atividade devido à alta reatividade do glutaraldeído que pode ser responsável pela distorção da estrutura ativa durante a imobilização (Alonso, 2005).

Os ensaios de influência da temperatura na atividade hidrolítica da enzima solúvel já haviam mostrado que a enzima inativa-se rapidamente a 55°C, detectando-se cerca de 10% de atividade residual mesmo no curto tempo utilizado para medir a atividade. O derivado apresentou perfil de inativação térmica semelhante a enzima solúvel, e portanto, não se obteve significativo aumento na estabilidade térmica com a imobilização.

4.2.6. Encapsulação de β -galactosidase em agarose seguida de reticulação com agentes bifuncionais

Outra estratégia empregada para a imobilização de β -galactosidase em géis de agarose, agar-agar e gelatina foi a encapsulação da enzima seguida de reticulação com glutaraldeído ou polialdeído dextrana. Esta estratégia foi baseada na metodologia de Martino et al (1995), que imobilizaram β -glicosidase em quitosana por encapsulação seguida de reticulação com glutaraldeído. O procedimento de imobilização por encapsulação é um método simples e barato, se comparado com o procedimento de imobilização por ligação covalente. Contudo, essa estratégia, nas condições utilizadas neste trabalho, não se mostrou adequada, não se detectando atividade hidrolítica nos derivados obtidos.

4.3. Imobilização de β -galactosidase em géis de Quitosana

4.3.1. Imobilização da β -galactosidase em gel de epóxi-quitosana-alginato

Quitosana tem sido muito empregada na imobilização de enzimas e a sua utilização proporciona resultados satisfatórios na estabilização de enzimas de diferentes fontes como lipases, tripsina, quimotripsina e celulase. Estes estudos vêm sendo realizados no Laboratório de Tecnologia Enzimática da UFSCar, com resultados promissores, mostrando que a quitosana é um suporte atraente na imobilização/estabilização de enzimas devido ao seu baixo custo em relação às matrizes disponíveis comercialmente.

No presente trabalho, foram empregados vários tipos de géis de quitosana sintetizados em laboratório como alternativa ao gel de agarose. Na Tabela 4.8 estão apresentados os parâmetros de imobilização de β -galactosidase em quitosana-alginato-epoxilada.

Em geral, a imobilização de enzimas em suportes epóxido ocorre com a adsorção física de proteínas por interações hidrofóbicas e após a adsorção, os grupos nucleofílicos da enzima reagem com os grupos epóxidos por ligação covalente.

Tabela 4.8. Imobilização de β -galactosidase em gel de quitosana-alginato-epoxilada. Concentração de proteína de 5 mg proteína/g gel.

Força iônica e pH	Tempo de Imobilização (h)	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)
TFP** pH 7,0 elevado a 8,5	24	24,8	7,3
TFP** pH 7,0 elevado a 10,0	24	25,5	1,0

**TFP: Tampão Fosfato de Potássio 20 mM contendo 0,1 mM $MnCl_2$ e 2 mM $MgCl_2$.

Observa-se que as imobilizações em quitosana-alginato-epoxilada praticamente não apresentaram atividade. O protocolo de imobilização de enzimas em suportes epóxi requer alta força iônica (1 M) para forçar a adsorção hidrofóbica da enzima e, em seguida, imobilizar covalentemente com ataque nucleofílico dos grupos hidroxil, tiol e amino aos grupos epóxi presentes na superfície do suporte com o aumento do pH de imobilização, conforme metodologia descrita por Mateo et al (2002). No entanto, a

enzima empregada neste trabalho apresenta baixa estabilidade em alta força iônica e pH alcalino principalmente. A imobilização foi conduzida então em baixa força iônica (20 e 50 mM) e o mecanismo de adsorção que deve ter atuado foi interação iônica da enzima com os grupos aminos carregados positivamente da quitosana, a pH 7,0. O aumento de pH era necessário para alcançar um maior número de lisinas nas formas desprotonadas para reagir com grupos epóxido. Contudo, a baixa estabilidade alcalina da enzima implicava inativação antes da reação da maioria das moléculas de enzima.

β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em epóxi-Sepabeads, uma resina acrílica comercial da Mitsubish Chemical Corporation, em alta força iônica, e o rendimento de imobilização foi de 100%, porém a atividade catalítica da enzima imobilizada foi nula (Mateo et al, 2002).

4.3.2. Imobilização da β -galactosidase em gel de quitosana-alginato e quitosana-k-carragenina ativados por glutaraldeído

Os géis híbridos de quitosana-alginato e quitosana-k-carragenina ativados por glutaraldeído também foram empregados na imobilização da enzima β -galactosidase. Estes suportes híbridos têm sido empregados na imobilização/estabilização de enzimas hidrolíticas como quimotripsina, celulase e lipases com resultados bastante satisfatórios (Mendes et al., 2006; Adriano, 2008). Os resultados obtidos para a enzima β -galactosidase imobilizada nestes suportes estão sumarizados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Influência do tipo de suporte, tampão, íons, concentração de proteína e do tempo de imobilização na imobilização da β -galactosidase em gel de quitosana-alginato e quitosana-k-carragenina ativados com glutaraldeído.

Suporte	Condições Reacionais	Concentração de Proteína (mg /g gel)	Tempo de Imobilização (h)	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)
Q-A	TFP*pH 7,0	5,0	3	100	0
Q-C	TFP*pH 7,0	5,0	3	100	0

Q-A: Quitosana-Alginato; Q-C: Quitosana-k-Carragenina; *TFP: Tampão Fosfato de Potássio 100 mM contendo 0,1 mM $MnCl_2$ e 2 mM $MgCl_2$

O tempo de imobilização empregado foi de 3 h, visto que a imobilização de enzimas em suportes ativadas com glutaraldeído é extremamente rápida, devido à alta reatividade desse agente ativante (Alonso, 2005). No entanto, os derivados obtidos não apresentaram atividade hidrolítica. A obtenção de derivados sem atividade catalítica pode ser explicada pela presença de alginato e k-carragenina no suporte. Estes biopolímeros são aniônicos, pela presença de grupos carboxilatos (alginato) e sulfonatos (carragenina), e podem formar complexos com íons bivalentes. Durante o processo de imobilização, como pode ser verificado na Tabela acima, foi adicionado $MnCl_2$ e $MgCl_2$ para manter a atividade catalítica da enzima. Neste caso, estes biopolímeros atuaram como agentes quelantes dos íons bivalentes, inativando totalmente a enzima imobilizada.

Outra possível explicação é a alta reatividade do glutaraldeído, agente ativante do suporte, que pode ser responsável pela distorção da estrutura ativa da enzima durante a imobilização ao entrecruzar as subunidades (Alonso, 2005).

4.3.3. Encapsulação de β -galactosidase em quitosana seguida de reticulação com glutaraldeído

Com o intuito de aumentar a atividade catalítica e estabilização de β -galactosidase, foi empregada a técnica de encapsulação da enzima em gel de quitosana com reticulação com glutaraldeído 0,1-1,0%. Variaram-se as condições de coagulação do gel, como mostrado na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Influência da concentração de proteína e glutaraldeído, e do tampão de coagulação com íons na encapsulação de β -galactosidase em gel de quitosana reticulado com glutaraldeído.

Concentração de Proteína (mg/g gel)	Concentração de Glutaraldeído (% v/v)	Tampão de Coagulação	Atividade Recuperada (%)
20,0	1,0	TFP* pH 8,0	0
20,0	0,10	TFP* pH 8,0	3,6
20,0	0,10	TFP** pH 8,0	5,6

*TFP: Tampão Fosfato de Potássio 100 mM.

**TFP: Tampão Fosfato de Potássio 100 mM contendo 0,1 mM $MnCl_2$ e 2 mM $MgCl_2$

Os resultados de atividade recuperada para a enzima encapsulada em gel de quitosana seguido de reticulação com glutaraldeído também foram baixos. Esses resultados podem se dever tanto a um possível efeito quelante da quitosana ao seqüestrar os íons co-fatores, como também a distorção da enzima pelo glutaraldeído. Em suma, a imobilização da enzima β -galactosidase por encapsulação também não foi uma boa alternativa para a obtenção de derivados com alta atividade catalítica.

4.3.4. Imobilização da β -galactosidase em gel de quitosana: Efeito do tipo e concentração do agente coagulante e do tempo e temperatura de imobilização sobre as propriedades catalíticas dos biocatalisadores.

As condições de reticulação são muito importantes, pois a eficiência desta reticulação depende da concentração e tipo de agente de reticulação, tempo de contato, temperatura, pH, massa molar da quitosana e o seu grau de desacetilação (Berger et al, 2004). O tempo de contato e a concentração de agente de reticulação são importantes para a determinação da natureza da estrutura produzida porque o aumento do tempo de reação e o uso de altas concentrações geram extensas reticulações. O grau de desacetilação e a massa molar da quitosana são importantes parâmetros porque o aumento da massa molar e do grau de desacetilação também resulta em um maior rendimento de reticulação (Berger *et al*, 2004).

Como pode-se notar, vários parâmetros influenciam o grau de reticulação de hidrogéis de quitosana. Nos protocolos de coagulação de quitosana descritos na literatura empregam-se soluções diluídas de NaOH (Mendes et al., 2006; Adriano, 2008; Rodrigues et al., 2008). No presente trabalho foi empregada, além de solução de NaOH, solução de KOH a quente (50°C). As condições de obtenção de hidrogéis de quitosana e reticulação para posterior aplicação como suporte para a imobilização de β -galactosidase adotadas no presente trabalho foi baseada na metodologia descrita por Budriene et al. (2005).

Com o objetivo de obter derivados com elevada atividade catalítica foram avaliadas as influências do tipo de agente coagulante e temperatura de coagulação, bem como o tempo de imobilização, como mostrados na Tabela 4.11. É importante ressaltar que a concentração de glutaraldeído empregada para a reticulação e ativação do hidrogel foi de 0,8 % (v/v) e o carregamento de proteína empregado foi de 5 mg/g de gel. A

quantificação da atividade catalítica dos derivados de quitosana foi determinada pela hidrólise do substrato sintético *o*-NPG.

O máximo valor de atividade recuperada (100,0 %) foi obtido para a quitosana coagulada com solução 0,5 M de KOH a 50°C (ensaio 1). No entanto, na redução da temperatura de coagulação de 50 para 25°C, foi observada uma atividade recuperada aproximadamente 30 % inferior, da ordem de 72,3 % (ensaio 3). Possivelmente os melhores resultados a 50°C devem-se à obtenção de um suporte com maior porosidade e alteração do microambiente interno que favoreceu a atividade catalítica da enzima.

Um possível efeito da alta temperatura durante a coagulação e reticulação da quitosana é diminuir o diâmetro das fibras de quitosana, com conseqüente aumento do diâmetro dos poros, favorecendo a imobilização da enzima. Após a reticulação com glutaraldeído o gel é resfriado imediatamente, lavado com água destilada, o que pode estar impedindo que um lento resfriamento das fibras permita o retorno ao diâmetro natural. É importante ressaltar que nos diferentes ensaios realizados, toda enzima oferecida foi imobilizada, no entanto, a atividade recuperada foi fortemente influenciada por estes parâmetros.

Tabela 4.11. Influência do tipo de agente coagulante, temperatura de coagulação e do tempo de imobilização sobre a atividade recuperada de β -galactosidase imobilizada em gel de quitosana ativada com glutaraldeído*. Imobilização a 25°C.

Ensaio	Agente Coagulante	Temperatura de Coagulação (°C)	Tempo de Imobilização (h)	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Recuperada <i>o</i> -NPG (%)
1	0,5 M KOH	50,0	3	100,0	100,0
2	0,5 M KOH	50,0	24	100,0	81,2
3	0,5 M KOH	25,0	3	100,0	72,3
4	0,1 M NaOH	50,0	3	100,0	61,3
5	0,5 M NaOH	50,0	3	100,0	74,3
6	0,5 M NaOH	25,0	3	100,0	59,8

* Imobilização conduzida em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 contendo 0,1 mM MnCl₂ e 2 mM MgCl₂.

O tempo de imobilização também foi uma variável relevante, visto que o aumento do tempo de imobilização influencia as propriedades catalíticas do

biocatalisador (Mateo et al., 2006-b; Rodrigues et al., 2008). Nota-se que com o aumento do tempo de imobilização do melhor derivado de 3 para 24 h, houve um declínio na atividade recuperada, de 100,0 % para 81,2 % (ensaio 2), provavelmente decorrente de um número excessivo de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, o que ocasionou a distorção da estrutura protéica da enzima, mas que também pode ter conduzido ao aumento da estabilidade térmica do derivado.

Nota-se pelos resultados obtidos que o tipo de agente coagulante também é uma variável importante, íons sódio influenciam negativamente na atividade hidrolítica da enzima β -galactosidase, o que é confirmado pelos ensaios 1 e 5.

Para a concentração do agente coagulante NaOH foi testado uma concentração menor (0,1 M), utilizada nos protocolos de coagulação de quitosana descritos na literatura (Mendes et al., 2006; Adriano, 2008; Rodrigues et al., 2008). No entanto, observa-se nos ensaios 4 e 5 que uma concentração maior do agente coagulante resulta um aumento de atividade recuperada de aproximadamente 13 %.

No ensaio 1, como mostrado na Tabela 4.11, toda atividade desaparecida no sobrenadante durante a imobilização foi detectada no gel, empregando *o*-NPG como substrato. Entretanto, na hidrólise da lactose a atividade recuperada foi em torno de 70% inferior ao substrato sintético. Isto se deve possivelmente a efeitos difusivos, visto que o substrato natural apresenta uma massa molecular superior ao do substrato sintético. Durante a imobilização, efeitos de distorção da estrutura ativa da enzima também podem ocorrer, no entanto, para este derivado não foi verificada má orientação durante o processo de imobilização porque na hidrólise do *o*-NPG, a atividade recuperada foi de 100%. Para reafirmar que a imobilização da enzima neste suporte não causa distorção da estrutura do biocatalisador e que ocorre limitação difusional na hidrólise da lactose, foi oferecido um carregamento de 1 mg de proteína/g de gel. A atividade recuperada para este derivado foi 100%, confirmando que não ocorre distorção da enzima e efeitos difusivos ocorrem na hidrólise da lactose.

Para todos os ensaios realizados, os derivados foram reduzidos com NaBH₄, na proporção de 1,0 mg/mL de suspensão conforme metodologia descrita por Guisán (1988). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. Efeito da redução com NaBH_4 sobre a atividade recuperada de derivados imobilizados em quitosana ativada com glutaraldeído.

Ensaio	Atividade Recuperada (%)	
	Sem redução com NaBH_4	Após redução com NaBH_4
1	100,0	82,4
2	81,2	54,2
3	72,3	49,4
4	61,3	41,0
5	74,3	57,6
6	59,8	46,2

Todos os derivados obtidos apresentaram perda de atividade catalítica após a redução com NaBH_4 . O derivado com máxima atividade recuperada (ensaio 1) apresentou uma redução de aproximadamente 20% em relação à sua inicial. O efeito de redução da atividade catalítica de enzimas imobilizadas covalentemente por NaBH_4 é relatado na literatura (Rodrigues et al., 2008). O agente redutor pode também reduzir importantes regiões da enzima com conseqüente perda de atividade, como comprovado por Adriano et al, (2005), os quais notaram um efeito negativo na etapa de redução durante a imobilização de penicilina G acilase em quitosana. A redução pode causar efeitos drásticos na estrutura da proteína, ocasionados pela clivagem de pontes dissulfeto e/ou ligações peptídicas (Blanco et al, 1989). Este efeito pode ser ainda mais forte em metalo-enzimas como a β -galactosidase porque pode reduzir os íons para a sua forma metálica (Tardioli *et al*, 2003-b).

Para confirmar a presença de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, foi realizado ensaios de dessorção da proteína com soluções de 0,1; 0,3; 0,5 e 1 M de KCl para a enzima imobilizada com carregamentos de 5, 25 e 200 mg de proteína/g gel. A atividade do sobrenadante e do gel foram medidas a cada 4 h por um período de 24 h. Não foi constatada atividade no sobrenadante em nenhuma das medidas. Este ensaio comprovou que a enzima está ligada ao suporte covalentemente.

4.3.5. Imobilização da β -galactosidase em gel de quitosana seguido da reticulação com glutaraldeído

Seguindo a metodologia descrita para o melhor derivado obtido de quitosana, foi verificada a influência do tipo de agente de coagulação na imobilização da β -galactosidase em gel de quitosana imobilizada por adsorção iônica e seguida da

reticulação com 0,15 % (m/v) de glutaraldeído. A imobilização foi conduzida em tampão fosfato de potássio com força iônica de 20 mM pH 7,0 contendo 0,1 mM MnCl_2 e 2 mM MgCl_2 , conforme metodologia descrita por Pessela *et al*, (2006) e o substrato foi o *o*-NPG. Os resultados são apresentados na Tabela 4.13.

O rendimento de imobilização mostra que o método de imobilização adotado é uma etapa muito importante, visto que, para todas as imobilizações realizadas por ligação covalente toda a enzima oferecida foi imobilizada. No entanto, por adsorção iônica o rendimento de imobilização foi de 62,5 a 74,5%, para o gel coagulado com NaOH e KOH, respectivamente. Os valores de atividade recuperada também foram inferiores aos derivados imobilizados por ligação covalente. Possivelmente, a reticulação com glutaraldeído pós-imobilização pode ter alterado a estrutura ativa da enzima com distorção do sítio ativo. Os resultados também mostram a influência do tipo de agente de coagulação sobre as propriedades catalíticas dos derivados com potássio, como já verificado anteriormente. Outra hipótese é a dessorção da enzima após a reticulação, pois o glutaraldeído pode ter reagido covalentemente com os grupos amino do suporte (sítios de adsorção), auxiliando no processo de dessorção.

Tabela 4.13. Influência do tipo de agente coagulante sobre a atividade recuperada de β -galactosidase imobilizada em gel de quitosana seguido da reticulação com glutaraldeído*.

Agente Coagulante	Tempo de Imobilização (h)	Temperatura de Imobilização (°C)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)
0,5 M KOH	24	25,0	74,5	54,4
0,5 M NaOH	24	25,0	62,5	36,0

* Imobilização conduzida em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 contendo 0,1 mM MnCl_2 e 2 mM MgCl_2 .

4.3.6. Capacidade máxima de imobilização da enzima em gel de quitosana ativada com glutaraldeído

Uma das propriedades mais importantes de um suporte é sua capacidade máxima de imobilização. Ensaios foram conduzidos visando à saturação do suporte e a obtenção de derivados com elevada atividade catalítica. Foram oferecidas diferentes concentrações de proteína entre 5,0 a 340 mg de proteína.g⁻¹ de suporte e verificada a

concentração máxima de proteína imobilizada e a influência do carregamento sobre a atividade hidrolítica dos derivados, como mostrado na Figura 4.5.

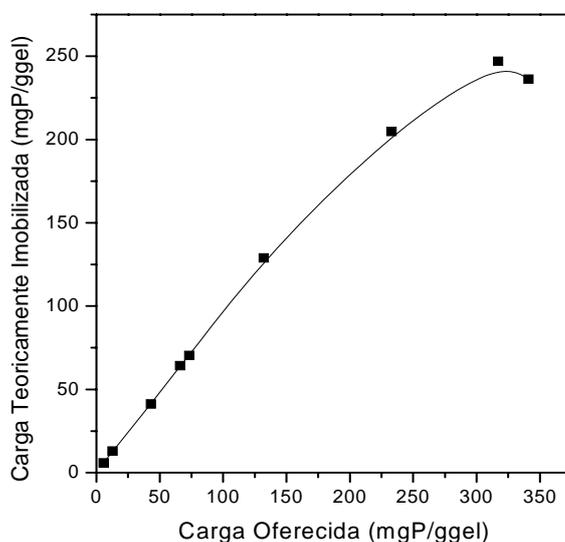


Figura 4.5. Gráfico da concentração de proteína oferecida pela capacidade máxima de proteína imobilizada em quitosana. Imobilizações realizadas em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 contendo 0,1 mM $MnCl_2$ e 2 mM $MgCl_2$.

Até o carregamento de 50 mg/g de suporte, toda a enzima oferecida foi covalentemente imobilizada em quitosana. A máxima concentração de proteína imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído foi de 247,0 mg de proteína/ g gel, como mostra a Figura 4.5. Isto mostra que o suporte obtido nestas condições consegue imobilizar uma elevada massa de enzima. É importante ressaltar que a enzima empregada no presente trabalho apresenta uma elevada massa molecular (200 kDa), mas mesmo assim foi possível obter um derivado com elevada atividade e com alta concentração de proteína imobilizada, confirmando a hipótese de que a metodologia empregada para a obtenção do suporte permitiu obter uma matriz com elevada porosidade, matriz esta promissora para a imobilização de outras enzimas de interesse industrial.

A Figura 4.6 mostra a relação entre o carregamento de proteína e a efetividade (η), relação entre a atividade aparente (observada) e a atividade na ausência de limitações difusionais (teórica) dos derivados de β -galactosidase imobilizados em quitosana. A velocidade intrínseca da reação catalisada pela enzima aumenta com o aumento da carga enzimática, e velocidade de difusão do substrato nos interstícios do gel pode diminuir devido à redução do tamanho dos poros pela imobilização de

moléculas de enzima (Salis et al, 2003; Rodrigues et al, 2008). O módulo de Thiele descreve uma relação entre a velocidade de reação e a de difusão. Uma vez que a efetividade diminui com o aumento do módulo de Thiele espera-se diminuição da efetividade com o aumento da carga enzimática imobilizada.

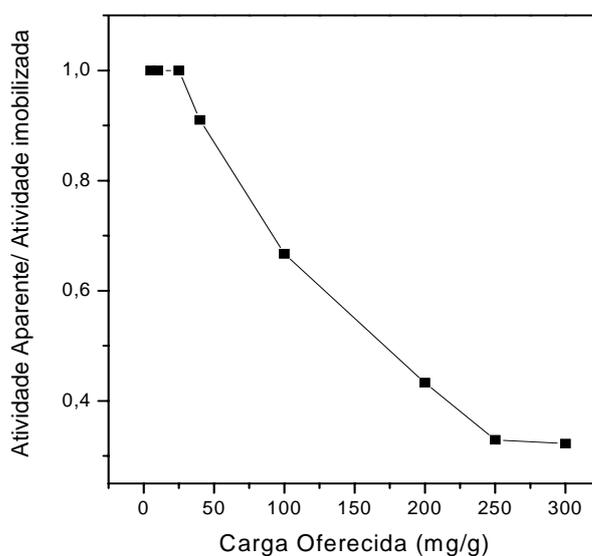


Figura 4.6. Relação entre a atividade aparente do derivado/ atividade teoricamente imobilizada (efetividade) e o carregamento de proteína, hidrólise do *o*-NPG.

Os resultados obtidos são muito bons, visto que Carrara e Rubiolo (1994) imobilizaram a β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em gel de quitosana ativado com glutaraldeído utilizando uma concentração de 20 mg de proteína e o rendimento de imobilização encontrado foi de 55,7 %. Neste trabalho, no mesmo carregamento, obteve-se rendimento de imobilização e atividade recuperada de 100%.

Budriene et al (2005), descreveram a imobilização da β -galactosidase de *Penicillium canescens*, de massa molecular 120 kDa, em quitosana, seguindo o mesmo protocolo utilizado neste trabalho e conseguiram um rendimento de imobilização de 89,9 %. Levando em consideração que a enzima utilizada no trabalho possui massa molecular de 200 kDa, os resultados apresentados mostram-se muito promissores.

O suporte em questão deve possuir uma estrutura contendo diâmetros de poros maiores que quitosana coagulada a frio, por isso a limitação difusional do substrato aos poros é menor, e só começa a ser relevante com uma concentração de 50 mg de proteína, verificado pela efetividade dos derivados.

4.3.7. Influência da Temperatura sobre a atividade hidrolítica da enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído

Para verificar a influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica da enzima imobilizada, a hidrólise foi realizada no mesmo intervalo de tempo utilizado para a enzima solúvel, de 25 a 55°C.

O efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica da β -galactosidase imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído (melhor derivado obtido neste trabalho) pode ser observado na Figura 4.7.

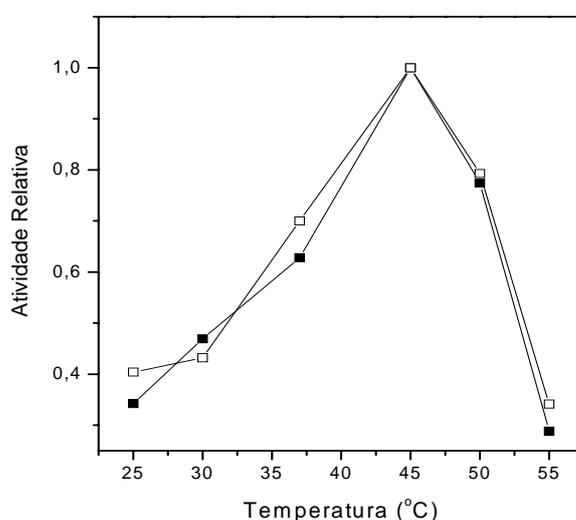


Figura 4.7. Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase imobilizada na hidrólise de lactose em tampão fosfato de potássio pH 7,5 100 mM suplementado com 2 mM $MgCl_2$ e 0,1 mM $MnCl_2$; ■ enzima solúvel; □ enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído.

Nota-se que a imobilização não alterou o valor de temperatura de máxima atividade hidrolítica da enzima.

4.3.8 Influência do pH sobre a atividade hidrolítica da enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído

Como já visto anteriormente, a faixa de pH de máxima atividade da enzima solúvel está entre 6,5 e 7,0; com o máximo valor obtido em pH 7,0. Então, ensaios de atividade hidrolítica da enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído

foram realizados com os mesmos valores de pH utilizado para a enzima solúvel. Os resultados são mostrados na Figura 4.8.

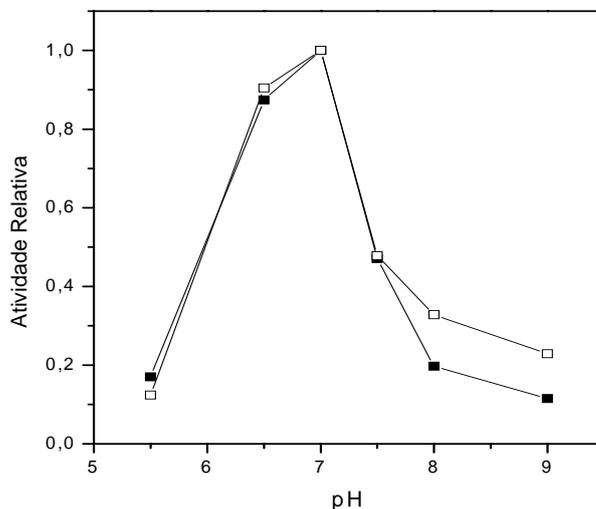


Figura 4.8. Influência do pH sobre a atividade hidrolítica de β -galactosidase na hidrólise da lactose à temperatura de 37°C; ■ enzima solúvel; □ enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído.

A enzima imobilizada não teve suas propriedades catalíticas alteradas na faixa de pH entre 5,5 e 7,5; evidenciando que o microambiente do suporte não tem influência sobre a enzima. Entretanto, valores de pH acima de 8,0 mostraram um aumento na estabilidade da enzima em meio alcalino.

4.3.9. Influência da concentração do inibidor na atividade hidrolítica da enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído

Como comentado anteriormente, a β -galactosidase é uma enzima que sofre inibição pela galactose, produto de hidrólise da lactose (Ladero *et al*, 2002). Ensaio de atividade catalítica da enzima foram realizados em diferentes concentrações de inibidor com o objetivo de verificar o efeito do processo de imobilização sobre a atividade da enzima, conforme observado na Figura 4.9.

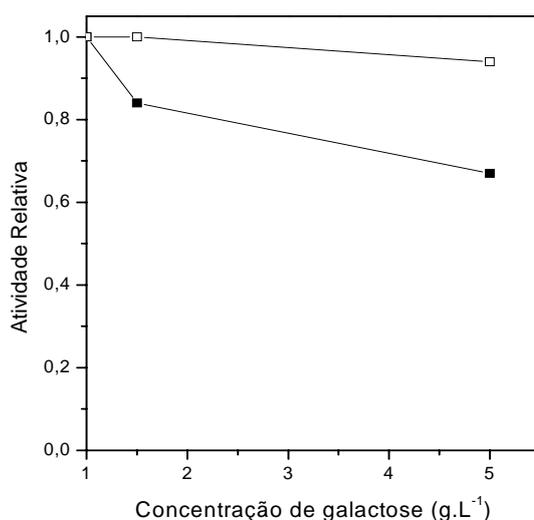


Figura 4.9. Influência da concentração de galactose na atividade hidrolítica da enzima. ■ enzima solúvel; □ enzima imobilizada.

A atividade da enzima solúvel foi fortemente influenciada pela concentração do inibidor, visto que, a enzima livre está totalmente susceptível a influência de qualquer substância presente no meio por possuir maior mobilidade no meio reacional. Entretanto, após a imobilização a enzima se encontra insolubilizada nos interstícios do suporte, o que pode reduzir o efeito de inibição pelo produto da reação.

Nota-se que para o ensaio com concentração de galactose de 1 g.L⁻¹, a atividade da enzima solúvel e imobilizada foi a mesma, oferecendo o mesmo número de unidades de atividade hidrolítica. A partir de 1,5 g.L⁻¹, a redução de atividade hidrolítica da enzima solúvel foi mais acentuada, com uma redução de 16% da atividade inicial, enquanto que para a enzima imobilizada não foi verificado perda de atividade. Para a concentração de 5,0 g.L⁻¹ a atividade hidrolítica da enzima imobilizada teve uma pequena queda de 6%, no entanto, a enzima solúvel apresentou uma queda de 35%. A imobilização pode ter mudado a conformação da molécula da enzima, alterando o efeito de inibição.

4.3.10. Estabilidade térmica dos derivados de quitosana ativada com glutaraldeído a 10°C

Com relação à influência do tempo de estocagem a 10°C sobre a atividade hidrolítica da β -galactosidase imobilizada, os resultados mostram que a β -galactosidase

imobilizada em quitosana por ligação covalente teve sua atividade reduzida em apenas 10 % num período de 60 dias quando estocada em tampão, e 20 % após 90 dias de armazenamento, como mostra a Figura 4.10. Segundo Zanin e Moraes (2004), a estabilidade de estocagem das enzimas imobilizadas em solução ou secas, geralmente é superior àquela da enzima livre, porém, isto depende do método de imobilização, do suporte e da solução em que está estocada.

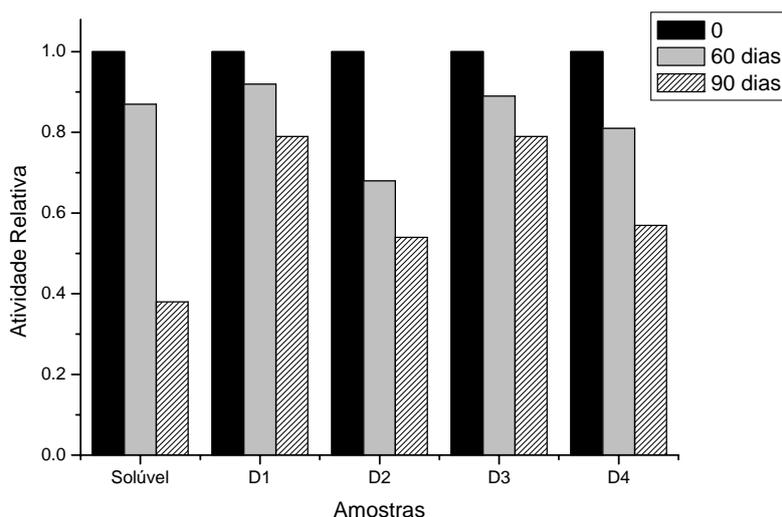


Figura 4.10. Estabilidade de estocagem de derivados de quitosana a 10°C; D1: derivado sem redução estocado em tampão de imobilização; D2: derivado sem redução estocado a seco; D3: derivado reduzido estocado em tampão de imobilização; D4: derivado reduzido estocado a seco.

Nota-se que os derivados estocados a seco perderam quase 50 % da atividade inicial em 90 dias de armazenamento, enquanto que os derivados estocados em tampão a perda de atividade foi de aproximadamente 20 %. Esta perda de atividade se deve possivelmente a dessorção de subunidades, o que não acontece na presença de tampão por influência dos íons bivalente presentes na solução. Independente se o derivado foi reduzido com NaBH_4 ou não, os valores encontrados nos derivados estocados em tampão foram muito próximos, mostrando que a redução não interfere na estabilidade de estocagem.

Normalmente as enzimas imobilizadas mantêm sua atividade em condições de estocagem, quando não são expostas a condições adversas de pH e temperatura. Neste trabalho, ambos derivados de imobilização, MANAE-agarose e quitosana, foram estocados nas mesmas condições e, no entanto, a redução da atividade enzimática no

derivado proveniente do MANAE pode estar relacionada com o tipo de suporte empregado e o método de imobilização.

4.3.11. Estabilidade térmica do derivado de quitosana ativado com glutaraldeído a 20 e 40°C

O melhor derivado obtido, conforme descrito no item 4.3.4, foi incubado em tampão fosfato de potássio pH 7,0 na presença de íons bivalentes Mn^{2+} e Mg^{2+} nas temperaturas de 20 e 40°C para a estimativa do fator de estabilidade, relação entre os tempos de meia-vida do derivado e da enzima solúvel. Os perfis de inativação térmica do derivado e da enzima solúvel nestas temperaturas são mostrados nas Figuras 4.11 e 4.12, respectivamente.

O processo de imobilização conferiu à enzima um aumento da estabilidade térmica em relação à enzima na forma solúvel. Em 16 h de incubação a 20°C, metade da atividade inicial da enzima solúvel havia sido inativada, enquanto que na enzima imobilizada a atividade residual era de aproximadamente 75%. Em 42 h de incubação, apenas 12% da atividade inicial foi medida e no derivado somente 40% da atividade inicial foi inativada. De acordo com a Figura 4.11, o tempo de meia-vida foi de aproximadamente 80 h, com um fator de estabilização de 5 vezes. É possível verificar que a molécula da enzima adquire considerável resistência térmica após o processo de imobilização e ressalta as possíveis aplicações que podem ser conferidas à β -galactosidase imobilizada em processos industriais com temperaturas mais elevadas, apesar das indústrias de laticínios trabalharem sob temperaturas amenas.

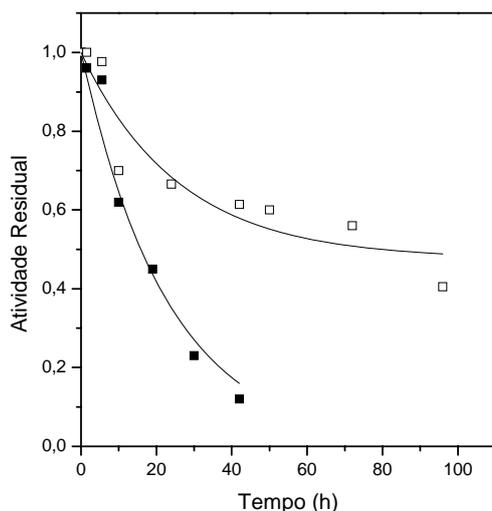


Figura 4.11. Estabilidade Térmica à temperatura de 20°C e a pH 7,0. ■ enzima solúvel; □ enzima imobilizada.

Na Figura 4.12, é mostrado perfil de inativação da enzima solúvel e imobilizada incubadas a 40°C. Nesta temperatura, o tempo de meia-vida da enzima foi de 2,2 h e a enzima imobilizada possuía ainda 80% da atividade inicial. Para a enzima imobilizada, o tempo de meia-vida estimado foi de 6,5 h e o fator de estabilização estimado foi de 3 vezes.

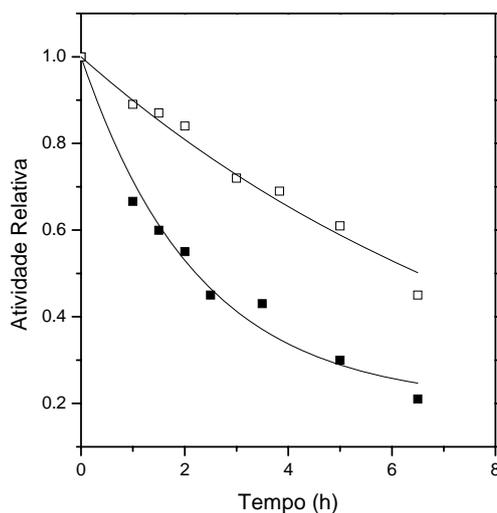


Figura 4.12. Estabilidade Térmica à temperatura de 40°C e a pH 7,0. ■ enzima solúvel; □ enzima imobilizada.

A inativação de enzimas é realizada por dois mecanismos distintos: o primeiro é dependente do tempo, com irreversível perda de atividade enzimática sobre a exposição

a temperaturas elevadas e o segundo é induzido somente pelo calor, incubada por um pequeno período, e é normalmente reversível (Klibanov, 2001).

Com o intuito de verificar se a inativação da enzima foi reversível ou irreversível, os derivados após a inativação foram lavados com solução de EDTA 1 mM e ressuspensos no tampão de imobilização durante 24 h. A inativação térmica da enzima foi irreversível, o que comprova a completa inativação da proteína.

4.3.12. Estabilidade operacional do derivado de quitosana

No desenvolvimento de processos com enzimas imobilizadas, um parâmetro fundamental é a estabilidade operacional. Os processos com enzimas imobilizadas podem ser mais econômicos que os processos com a enzima livre, se for possível que a enzima imobilizada seja capaz de reter considerável atividade enzimática após vários ciclos de uso. Dessa forma, haveria uma redução no custo operacional do processo advindo do menor consumo de enzima, além de compensar as despesas adicionais com os processos de imobilização (Zanin e Moraes, 2004).

A viabilidade da reutilização de β -galactosidase imobilizada foi analisada durante uma seqüência de quatro bateladas. Utilizou-se o derivado de quitosana ativado por glutaraldeído com um carregamento de 1 mg de proteína/g de gel. Os resultados são mostrados na Figura 4.13.

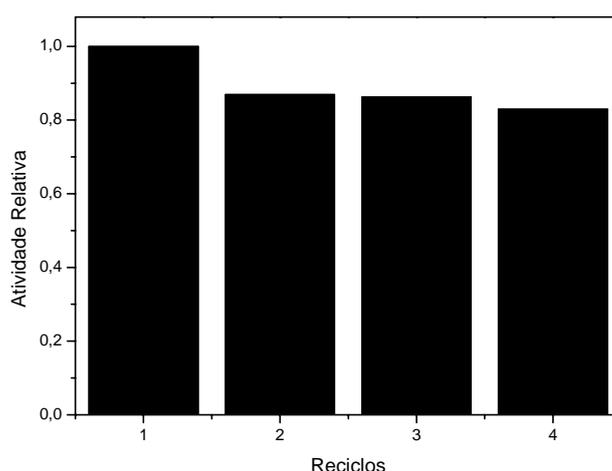


Figura 4.13. Estabilidade operacional na hidrólise da lactose a 40°C, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 com a suplementação dos íons bivalentes Mg^{2+} e Mn^{2+} , 20 min de hidrólise para cada ciclo.

Observou-se uma perda de 17% da atividade hidrolítica inicial ao final do quarto ciclo. Esse resultado evidencia que o processo de imobilização acarretou boa estabilidade operacional à enzima. A título de comparação com os dados da literatura, é possível verificar que os outros autores observaram resultados muito distintos quando utilizaram como suporte a quitosana. Zhang *et al* (2006) imobilizou β -galactosidase em microesferas de quitosana ativada com glutaraldeído, e verificou a estabilidade operacional durante 9 ciclos de reuso. Esse autor observou uma queda de 20% da atividade inicial no quarto ciclo hidrolítico.

Budriene *et al* (2005) imobilizou β -galactosidase de *Penicillium canescens*, uma enzima termofílica, em quitosana ativada com glutaraldeído e obteve um resultado ainda melhor, apenas 10% de perda da atividade hidrolítica inicial no quinto ciclo.

A β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* utilizada neste trabalho é uma enzima mesofílica e muito difícil de estabilizar termicamente, como mostrado anteriormente nos ensaios de estabilidade térmica. Por ser uma enzima multimérica, perde subunidades e acarreta uma baixa estabilidade, comprovando dados relatados na literatura por Pessela *et al* (2007) e Ladero *et al* (2002). Portanto, os resultados de estabilidade operacional eram esperados para esta enzima.

4.3.13. Conversão da lactose em glicose utilizando enzima solúvel e imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído

A hidrólise da lactose utilizando a enzima β -galactosidase solúvel e imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído foi realizada em função do tempo de reação. Os resultados obtidos na Figura 4.14 mostram que para uma solução contendo 5% (p/v) de lactose e utilizando 2U de enzima solúvel e imobilizada/g de lactose, o tempo de hidrólise de 7 h na temperatura de 40°C resultou uma conversão de aproximadamente 30% para a enzima solúvel e 25% para imobilizada.

Segundo Miezeliene *et al* (2000), uma conversão de 20-30% da lactose é suficiente para as pessoas que sofrem intolerância a este açúcar, sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados positivos. Este autor conseguiu uma conversão de 70% da lactose na hidrólise do leite a 40°C com uma alta carga de enzima imobilizada em DEAE-Sephadex, em torno de 70U de enzima imobilizada/g de lactose.

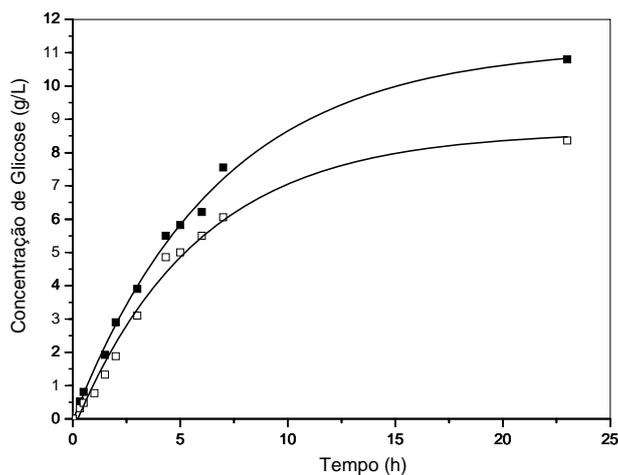


Figura 4.14. Conversão da lactose em glicose na reação de hidrólise a 40°C, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 com a suplementação dos íons bivalentes Mg^{2+} e Mn^{2+} . ■ enzima solúvel; □ enzima imobilizada.

Nota-se que a enzima imobilizada possui um pequeno atraso na velocidade de hidrólise, possivelmente pelo fato de estar ocorrendo limitação difusional ocasionada pelo suporte, fato também observado por Budriene *et al* (2005).

Com o objetivo de obter uma conversão maior, foram realizados ensaios de hidrólise da lactose utilizando 50U de enzima solúvel e imobilizada/g de lactose, os resultados são mostrados na Figura 4.15.

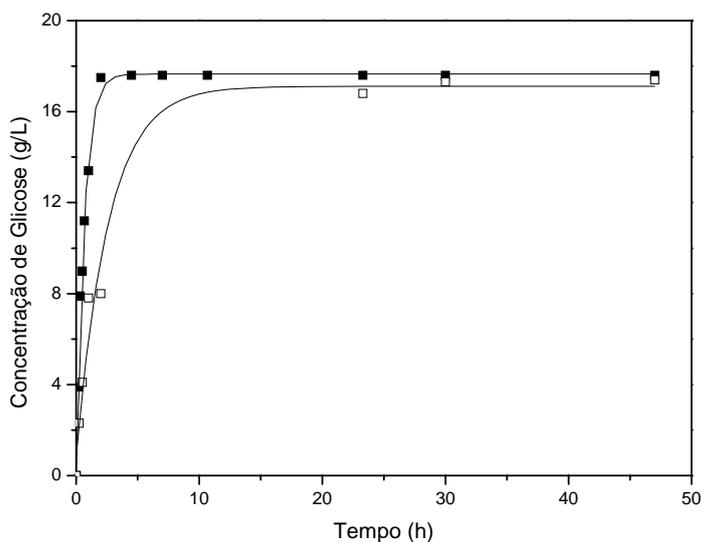


Figura 4.15. Conversão da lactose em glicose na reação de hidrólise a 40°C, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 com a suplementação dos íons bivalentes Mg^{2+} e Mn^{2+} ; ■ enzima solúvel; □ enzima imobilizada.

Pode-se observar que aumentando a relação enzima/substrato, à máxima conversão obtida foi de 70% para ambas as enzimas, solúvel e imobilizada. Este ensaio foi realizado no pH ótimo da enzima (7,0) e resultou em uma conversão 2,5 vezes superior ao ensaio realizado a pH 7,5, ressaltando a influência do pH na atividade hidrolítica da enzima.

Pessela et al (2003) imobilizaram β -galactosidase de *Thermus sp.* em gel epóxi-sepabeads e conseguiram uma conversão de 100% de lactose em um período de 50 min a 70°C utilizando um suporte com 60 mg de proteína/g de gel.

A conversão obtida neste trabalho pode não ter alcançado 100% para a enzima imobilizada devido à limitação difusional causada pelo suporte, que impede o acesso do substrato a enzima; à perda de subunidades da enzima no meio reacional, o que acarreta na diminuição da atividade hidrolítica da enzima; e ainda à presença do produto da reação no meio, o que diminui a velocidade de reação pelo efeito de inibição. Para a enzima solúvel, não ocorreu a conversão total da lactose possivelmente pela inativação da enzima pela temperatura (40°C) e pelo tempo reacional.

5- CONCLUSÕES

Neste trabalho algumas estratégias para a imobilização da β -galactosidase utilizando suportes orgânicos, agarose e quitosana, com diferentes protocolos de ativação foram estudadas. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, destacando-se:

- ✓ A suplementação de íons bivalentes Mg^{2+} e Mn^{2+} durante todas as etapas de hidrólise e estocagem, foi importante para manter a enzima ativa, sendo, pois importantes co-fatores da β -galactosidase.
- ✓ Na hidrólise da lactose, as melhores condições avaliadas foi a 45°C em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 e adição de 2 mM $MgCl_2$ e 0,1 mM $MnCl_2$ (6786,5 U/mL de extrato) e na hidrólise do substrato sintético, *o*-NPG, as condições de máxima atividade catalítica foram em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 com 2 mM $MgCl_2$ a 25°C (4466,1 U/mL de extrato).
- ✓ Em pH 7,0 não foi possível imobilizar em glioxil-agarose e em epóxi-quitosana-alginato. Em pH 10,0, a enzima foi totalmente inativada em 3 h, não sendo possível quantificar sua atividade hidrolítica. Em epóxi-quitosana-alginato é necessária alta força iônica para imobilizar a enzima, porém β -galactosidase também é totalmente inativada em alta força iônica.
- ✓ A encapsulação da enzima em géis de quitosana, alginato e agarose não permitiram obter derivados ativos, seja por efeitos difusivos, seja por quelação pelos suportes dos co-fatores da enzima.
- ✓ A adsorção iônica da enzima em gel MANAE-agarose apresentou derivados com atividade recuperada de 80% e após a reticulação com glutaraldeído, estratégia para fixar covalentemente a enzima, a atividade recuperada caiu para 45,8%, mostrando que a etapa de reticulação distorce a estrutura ativa da enzima.

- ✓ Com o intuito de obter derivados estáveis termicamente, foi empregada a técnica de entrecruzamento da enzima com polialdeído dextrana, alternativo ao glutaraldeído, após a imobilização. De acordo com os resultados obtidos, após o entrecruzamento, foi verificada total inativação do derivado reduzido e não-reduzido com NaBH_4 . O entrecruzamento de derivados de β -galactosidase com polialdeído dextrana e glutaraldeído não foi uma boa alternativa para a estabilização dos derivados.
- ✓ Diferentes protocolos de obtenção de hidrogéis de quitosana foram avaliados e o suporte que conduziu aos melhores resultados na imobilização foi aquele coagulado a 50°C em solução $0,5\text{ M}$ de KOH e ativado com baixa concentração de glutaraldeído, com rendimento de imobilização de 100% e atividade recuperada de 100% na hidrólise do *o*-NPG.
- ✓ O máximo carregamento neste suporte foi de 247 mg de proteína/g de gel e a partir de 25 mg de proteína/g de gel foi verificado limitação difusional.
- ✓ O aumento do tempo de imobilização não influenciou na estabilização térmica dos derivados em ambos os suportes testados; proporcionou apenas uma acentuada queda nas atividades recuperadas dos melhores derivados, devido ao aumento do número de reações, o que ocasiona a distorção da estrutura multimérica da enzima.
- ✓ Para a estabilidade térmica a 10°C , o melhor resultado encontrado foi a β -galactosidase imobilizada em quitosana-glutaraldeído, com redução de 20% da atividade inicial após 90 dias de armazenamento. A estabilidade térmica do derivado preparado em MANAE reticulado com glutaraldeído mostrou um comportamento similar à enzima solúvel, com redução de quase 70% da atividade inicial após 90 dias de armazenamento.
- ✓ A imobilização da enzima em quitosana ativada com glutaraldeído não alterou o valor de temperatura e pH de máxima atividade hidrolítica da enzima.

- ✓ A enzima solúvel foi mais fortemente inibida pelo produto de hidrólise, galactose, do que o derivado de quitosana ativado com glutaraldeído.
- ✓ Foi verificado um incremento sobre a estabilização térmica da enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. A 20°C, o fator de estabilidade foi de 5 vezes e para o derivado incubado a 40°C, este fator foi de 3.
- ✓ A estabilidade operacional (40°C, pH 7,0) do derivado de quitosana ativada com glutaraldeído realizada em 4 ciclos mostrou que uma perda de 17% da atividade hidrolítica inicial ao final do quarto ciclo. Esse resultado evidencia que o processo de imobilização acarretou boa estabilidade operacional à enzima.
- ✓ Na hidrólise da lactose a 40°C e pH 7,0, foi verificada uma conversão de 70% da lactose utilizando a enzima solúvel e imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Nota-se que a enzima imobilizada possui um pequeno atraso em relação à enzima solúvel, possivelmente pelo fato de estar ocorrendo limitação difusional.
- ✓ De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pôde-se verificar que a imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em quitosana ativada por glutaraldeído estabilizou termicamente a enzima por fator de 3-5 vezes em relação à enzima solúvel. O derivado obtido pode ser empregado para fins alimentícios na hidrólise da lactose presente no leite ou soro. A imobilização torna-se uma importante estratégia para estabilizar a enzima e outra vantagem pertinente é a fácil purificação do produto formado, pois a enzima está insolubilizada permitindo fácil separação e reutilização.

6- SUGESTÕES

- Testar altas relações enzima/substrato na hidrólise da lactose do leite para obtenção de altas conversões em curto período de tempo. Fazer assepsia dos instrumentos utilizados.
- Após a hidrólise da lactose do soro com a enzima imobilizada, fermentar a glicose produzida e aromatizar o produto para ser comercializado como uma bebida levemente alcoólica e protéica.
- Testar β -galactosidase de outras origens buscando melhores resultados de estabilidade térmica.
- Testar a aminação da β -galactosidase para tentar imobilização multipontual em pH 8,0.
- Determinar as concentrações ótimas dos cofatores.
- Refazer estabilidade operacional no leite ou com tampão Novo a pH 7,0.
- Fazer a caracterização do suporte para ver o tamanho de poro obtido com a quitosana coagulada a quente.
- Tentar imobilizar a enzima em amino-glioxil-agarose.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adriano, S.W. Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, p.84. **2008**.

Adriano, W.S.; Filho, H.E.C.; Silva, J.A.; Gonçalves, L.R.B. Optimization of penicillin G acylase multipoint immobilization onto glutaraldehyde-chitosan beads. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v.41, p.201-207. **2005**.

Aires-Barros, M.R. Biocatálise em solventes orgânicos. Centro de Engenharia Biológica e Química Instituto Superior Técnico, *Biocatálise*. Lisboa. **2002**.

Alonso, N. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 35, p. 57-61, **2005**.

Altun, G. D.; Etinus, S. A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry*, v. 100, p. 964–971. **2007**.

Becaro, A.A. Imobilização/Estabilização de D-hidantoinase para a produção de N-Carbamoil-D-Fenilglicina. Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. **2008**.

Berger, J.; Reist, M.; Mayer, M.J.; Felt, O.; Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.35-52. **2004**.

Betancor, L.; López-Gallego, F.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Dellamora-Ortiz, G.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, M.J. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.877-882. **2006**.

Blanco, R.M.; Calvete, J.J.; Guisán, J.M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine) –agarose (aldehyde) multipoint attachment. *Enzyme and Microbial Technology*. v.11, p.353-359. **1989**.

Bolivar, M.J.; Mateo, C.; Rocha-Martin, J.; Cava, F.; Berenguer, J.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, M.J. The adsorption of multimeric enzymes on very lowly activated supports involves more enzyme subunits. Stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* by immobilization on heterofunctional. *Enzyme and Microbial Technology*, v.44, p.139-144. **2009**.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v.72, p.248-254. **1976**.

Budriene, S.; Gorochoveva, N.; Romaskevici, T.; Yugova, V.L.; Miezeliene, A.; Dienys, G.; Zubriene, A. β -galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. *Central European Journal of Chemistry*, v.3, n.1, p.95-105. **2005**.

Cardias, H.T.C. Estudo da Síntese de Antibióticos β -Lactâmicos Semi-Sintéticos Catalisada por Diferentes Derivados de Penicilina G Acilase. 2 de março de 2000. 208p. Tese Doutorado em Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 29 de set, **2000**.

Carrara, R.C.; Rubiolo, C.A. Immobilization of β -galactosidase on chitosan. *Biotechnology Prog.*, v.10, p.220-224. **1994**.

Cavaille, D.; Combes, D. Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Appl. Biochemistry*, v.22, p.55-64. **1995**.

Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, G.M.; Soldi, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, n.4, p.623-630. **2004**.

Delanoy, G.; Li, Q.; Yu, J. Activity and stability of lactase in conjugation with chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.35, p.89-95. **2005**.

Fernandes, P.; Cabral, S.M.J. Biotransformation. *In: Basic Biotechnology*. 3° ed. Cambridge University Press, Edited by Colin Ratledge, Borj Kristiansen. p. 577-626. **2006**.

Fernández-Lafuente, R.; Rosell, C.M.; Rodrigues, V.; Santana, C.; Soler, G.; Bastida, A.; Guisán, J.M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 546–550. **1993**.

Fernández-Lafuente, R.; Rodríguez, V.; Mateo, C.; Penzol, G.; Hernández-Justiz, O.; Irazoqui, G.; Villarino, A.; Ovsejevi, K.; Batista, F.; Guisán, M.J. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.7, p.181–189. **1999**.

Fangkangwanwong, J.; Yoksan, R.; Chirachanchai, S. Chitosan gel formation via the chitosan–epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. *Polymer*, v. 47, p. 6438-6445. **2006**.

Gekas, V.; Lopez-Leiva, M.L. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem*, v.20, n.2, p.2-12. **1985**.

George, M.; Abraham, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14. **2006**.

Giacomini, C.; Villarino, A.; Franco-Fraguas, L.; Batista-Viera, F. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on sílica and agarose: comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.4, p.313-327. **1998**.

Giacomini, C.; Irazoqui, G.; Batista-Viera, F.; Brena, M.B. Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.11, p.597-606. **2001**.

Guisán, J.M. Aldehyde gels as activated support for immobilization–stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, p. 375–382, **1988**.

Haiden, T.; Husain, Q. Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate–starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk *International Dairy Journal* v.19, p.172–177. **2009**.

Hatzinikolaou, G.D.; Katsifas, E.; Mamma, D.; Karagouni, D.A.; Christakopoulos, P.; Kekos, D. Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v.24, p.161-172. **2005**.

Huguet, M. L.; Dellacherie, E. Calcium-alginate beads coated with chitosan: effect of the structure of encapsulated materials on their release. *Process Biochemistry*, v. 31, p. 745-751. **1996**.

Kaddour, S.; López-Gallego, F.; Sadoun, T.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, M.J. Preparation of an immobilized–stabilized catalase derivative from *Aspergillus niger* having its multimeric structure stabilized: The effect of Zn^{2+} on enzyme stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* . v.55, p.142–145. **2008**.

Kennedy, J.F. Enzyme Technology. In: Rehm, H.J.; Reed, G. (Eds). *Biotechnology*. v.7a. Weinheim: VCH, **1987**.

Klibanov, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, v.409, p. 241-246. **2001**.

Kim, J.-C.; Lee, H. Y.; Kim, M. H.; Lee, H.-J.; Kang, H.-Y.; Kim, S. M. Preparation and characterization of chitosan/gelatin microcapsules containing triclosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 52, p. 52–56. **2006**.

Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v.35, p.126-139. **2004**.

Kumar, G.; Bristow, J.F.; Smith, P.J. Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. *Polymer*, v.41, n.6, p.2157-2168. **2000**.

Ladero, M.; Ruiz, G.; Pessela, C.C.B.; Vian, A.; Santos, A.; 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, p.14-24. **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, n.8, p.583-592. **2000**.

Ladero, M.; Santos, A.; Garcia, L.J.; Carrascosa, V.A.; Pessela, C.C.B.; Garcia-Ochoa, F. Studies on the activity and the atability of β -galactosidases from *Thermus* sp. strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis* . *Enzyme and Microbial Technology*, v.30, p.392-405. **2002**.

Li, N.; Bai, R. A novel amine-shielded surface cross-linking of chitosan hydrogel beads for enhanced metal adsorption performance. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 44, p. 6692-6700. **2005**.

López-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisán, J.M.; Fernández-Lafuente, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*, v. 116, n. 1, p. 1-10. **2005**.

Mahoney, R.R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chem*, v.63, p.147-154. **1998**.

Mahoney, R.R.; Whitaker, R.J. Stability and Enzymatic Properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Food Biochemistry*, v.1, p.327-350. **1977**.

Mahoney, R.R.; Whitaker, R.J. Purification and Properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Food Sci*, v.43, p.584-591. **1978**.

Mariotti, P.M. Hidrólise de lactose de soro de leite por meio de β -galactosidase imobilizada. Mestrado. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, **2000**.

Martino, A.; Pifferi, P.G.; Spagna, G. Immobilization of β -glucosidase from a commercial preparation. Part 2. Optimization of the immobilization process on chitosan. *Process Biochemistry*, v.31, n.3, p.287-293. **1995**.

Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J.M. Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology*. V.18, p.629-634. **2002**.

Mateo, C.; Monti, R.; Pessela, C.C.B.; Fuentes, M.; Torres, R.; Guisan, M.J.; Fernandez-Lafuente, R. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk. *Biotechnology Prog.*, v.20, p.1259-1262. **2004**.

Mateo, C.; Palomo, M.J.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazu, V.; López-Gallego, L.; Pessela, C.C.B.; Hidalgo, A.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, M.J. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. v.39, p.274-280. **2006-a**.

Mateo, C.; Pessela, C.C.B.; Fuentes, M.; Torres, R.; Betancor, L.; Hidalgo, A.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, M.J. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and further cross-linking with aldehyde-dextran. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second edition. p.129-136. **2006-b**.

Mendes, A.A. Rodrigues, D.S.; Adriano, W.S.; Mammarella, E.J.; Castro, H.F.; Giordano, R.L.C. Covalent Attachment of *Aspergillus oryzae* Lipase on Chemically Bound Hybrid Matrices. **In:** 10th International Conference on Chitin and Chitosan - 10th I.C.C.C., Montpellier-FR, Livro de Abstracts, 1: 95-96, **2006**.

Miezeliene, A.; Zubriene, A.; Budriene, S.; Dienys, G.; Sereikaite, J. Use of native and immobilized β -galactosidase in the food industry. *Food Biotechnology*. p.171-175. **2000**.

Monteiro Jr., O. A. C.; Airoidi, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p. 119-128. **1999**.

Novalin, S.; Neuhaus, W.; Kulbe, D.K. A new innovate process to produce lactose-reduced skim milk *Journal of Biotechnology*, v.119, p.212-218. **2005**.

de Oliveira, I. R. W. Z.; Fernandes, S. C.; Vieira, I. C. Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 366-372. **2006**.

Pedroche, J.; Yust, M.M.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Vioque, J.; Guisán, M.J.; Millán, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology* .v.40, p.1160-1166. **2007**.

Pereira, G.H.A. Estudo da imobilização multipontual da penicilina g acilase em sílica ativada com grupos glioxil. Mestrado em Engenharia Química, UFSCar, São Carlos. **1996.**

Pessela, C.C.B.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Vian, A.; García, L.J.; Carrascosa, V.A.; Guisán, M.J.; Fernández-Lafuente, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decrease product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme and Microbial Technology*, v.33, p.199-205. **2003.**

Pessela, C.C.B.; Dellamora-Ortiz, G.; Betancor, L.; Fuentes, M.; Guisan, M.J.; 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, p.310-315. **2007.**

Pessela, C.C.B.; Mateo, C.; Filho, M.; Carrascosa, V.A.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, M.J.; Stabilization of the quaternary structure of a hexameric alpha-galactosidase from *Thermus* sp. T2 by immobilization and post-immobilization techniques. *Process Biochemistry* v. 43, p.193-198. **2008.**

Rodrigues, S.D.; Mendes, A.A.; Adriano, S.W.; Gonçalves, B.R.L.; Giordano, C.L.R. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.51, p.100-109. **2008.**

Rosevear, A.; Kennedy, J.F.; Cabral, J.M.S. Immobilized enzymes and cells. Bristol, Adam Hilger, **1987.**

Salis, A.; Svensson, I.; Monduzzi, M.; Solinas, V.; Adlercreutz, P. The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginose*. *Biochimica et Biophysica Acta*. V.1646, p. 145-151. **2003.**

Santiago, R.; Fernández-Mayoralas, A.; García-Junceda, E. Enzymatic synthesis of disaccharides by β -galactosidase-catalyzed glycosylation of a glycocluster. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.11, p.71-79. **2000**.

Şener, N.; Apar, K.D.; Özbek, B. A modeling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. *Process Biochemistry*. v.41, p.1493-1500. **2006**.

Tapia, C.; Escobar, Z.; Costa, E.; Sapag-Hagar, J.; Valenzuela, F.; Basualto, C.; Gai, M. N.; Yazdani-Pedram, M. Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan–alginate and chitosan–carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 65-75. **2004**.

Tardioli, P.W. Hidrólise controlada de proteína de soro de queijo usando *carboxipeptidase A* e *Alcalase* imobilizadas multipontualmente em agarose. Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. **2003**.

Tardioli, P.W.; Ferández-Lafuente, R.; Guisán, M.J.; Giordano, C.L.R. Design of new immobilized-stabilized *Carboxipeptidase A* derivate for production of aromatic free Hydrolysates of proteins. *Biotechnology Program*. v.19, p.565-574. **2003-b**.

Torres, A.A.; Regenhardt, A.S.; Mammarella, J.E.; Rubiolo, C.A. Estudio del proceso conjunto de recuperación de proteínas e hidrólisis de lactosa presentes em el suero dulce de quesería em una unidad de ultrafiltración com enzimas inmovilizadas. Universidad Nacional del Litoral – CONICET . IACCHE – Interamerican Confederation of Chemical Engeneering (CIIQ). **2006**.

Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, v.6, p. 24-27. **1969**.

Uwajima, T.; Yagi, H.; Terada, O. Purification, crystallization and some properties of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *Agr. Biol. Chemistry*. V.36, p.570-577. **1972**.

Villela, M.S. Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papelerias. Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis **2006**.

Vogel. A.I. Análise inorgânica quantitativa. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, **1981**.

Wallenfels, K.; Malhotra, P. The Enzymes, v.2, p.409-413. **1960**.

Widmer, F.; Leuba, J.L. Eur. J. Biochem., v.100, p.559-563. **1979**.

Zanin, G. M.; Moraes, F.F. Enzimas como Agentes Biotecnológicos; Saiad, S.; Pietro, R. C. L. R., eds; Legis Summa: Ribeirão Preto, cap.4, p.35-85. **2004**.