

Caracterização Parcial da Enzima Comercial β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000L)

TRINDADE, R.A.; RÊGO, T.V.; BURKERT, C.A.V.

Introdução

A importância industrial da β -galactosidase (EC 3.2.1.23) está na sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite em seus monossacarídeos glicose e galactose (SANTIAGO et al., 2004).

Esse tratamento torna os produtos lácteos adequados para alimentação de indivíduos intolerantes à lactose, bem como aumenta a solubilidade e reduz os riscos de cristalização em sorvetes, doce de leite e leite condensado (JURADO et al., 2002).

Além disso, a β -galactosidase também catalisa reações de transgalactosilação para a produção de galactoligossacarídeos, considerados agentes prebióticos por estimularem a microflora intestinal humana.

O estudo dos fatores que afetam a atividade das enzimas, bem como sua estabilidade operacional, constituem aspectos importantes a serem considerados em processos biotecnológicos. Com estes estudos é possível obter informações sobre as propriedades da enzima, permitindo aperfeiçoar a viabilidade econômica dos processos industriais.

Neste estudo foi proposta a caracterização parcial da enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000L), sendo avaliados os efeitos do pH (4,6 a 8,0) e temperatura (25 a 60°C) sobre a atividade da enzima na reação de hidrólise da lactose.

Metodologia

Os ensaios foram conduzidos em banho termostaticado com agitação recíproca. Como substrato foi utilizada uma solução de lactose a 5% m/v (30 mL) em tampão apropriado. A enzima (37,5 μ L) foi adicionada e, em intervalos de tempo pré-estabelecidos, alíquotas foram retiradas, inativadas a 100°C por 5 min, determinando-se a concentração de glicose. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Foi testado o efeito da presença dos íons Mg^{+2} e Mn^{+2} no meio reacional, adicionando $MgCl_2$ e $MnCl_2$ no tampão fosfato de potássio pH 6,6, de forma a atingir 1 mM.

Quando avaliado o efeito do pH, a solução de lactose foi preparada em tampão acetato de sódio (pH 4,6; 5,0; 5,6), citrato de sódio (pH 4,6; 5,6; 6,0) e fosfato de potássio (pH 6,0; 6,6; 7,0; 7,3; 8,0), a 37°C.

A influência da temperatura foi determinada conduzindo-se a reação a 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 e 60°C em tampão fosfato de potássio pH 6,6.

A glicose liberada foi quantificada utilizando um kit enzimático-colorimétrico Glicose PAP Likuiform® (Labtest, Brasil), com leitura de absorbância a 505 nm e conversão à concentração de glicose por curva de calibração previamente determinada.

A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de glicose por min nas condições do ensaio.

Resultados e Discussão

Quando avaliado o efeito da adição de íons, a melhor atividade enzimática alcançada em tampão fosfato de potássio pH 6,6 foi com o íon Mg^{+2} . Quando analisado a adição do íon Mn^{+2} , a atividade relativa foi de 94,8%, e sem adição de íons a atividade alcançada foi de 75,2%.

Quanto ao pH a enzima apresentou melhor atividade no pH 6,6, tampão fosfato de potássio, de acordo com a Figura 1, havendo redução expressiva acima e abaixo deste valor. Para os tampões citrato de sódio e acetato de sódio não foi detectada atividade enzimática.

Com o melhor tampão, fosfato de potássio pH 6,6 com Mg^{+2} , foi realizado o estudo do efeito da temperatura, conforme ilustrado na Figura 2, onde observou-se a maior atividade na temperatura de 45°C, resultados semelhantes foram encontrados por Matioli et al 2001, que observou uma melhor atividade com a enzima - galactosidase de *Klyuveromices fragilis* a esta mesma temperatura com pH 6,5.

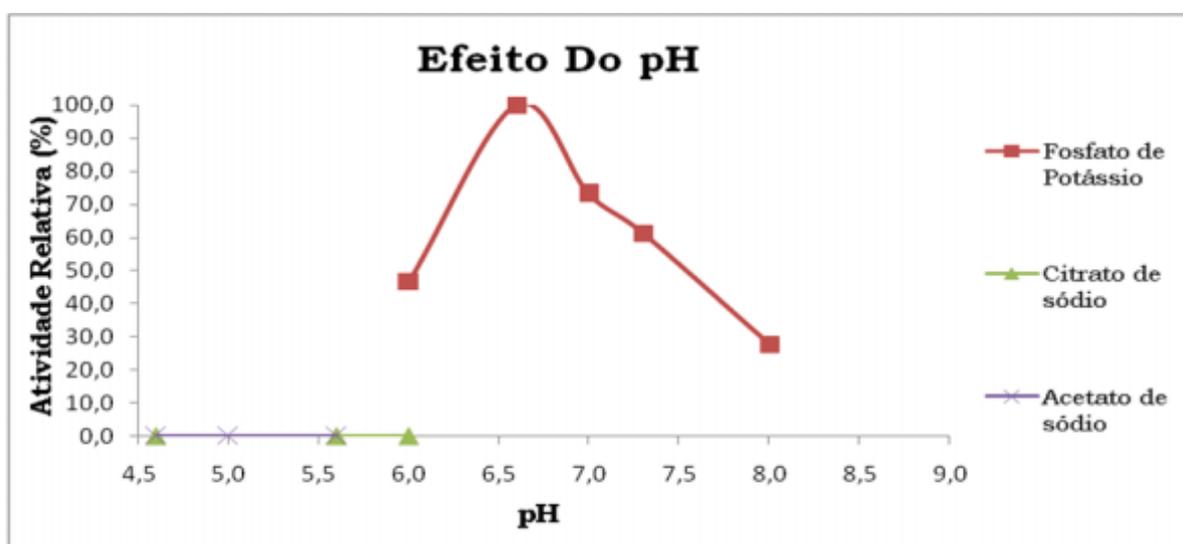


Figura 1. Perfil de pH para Lactozym® 3000L a 37°C.

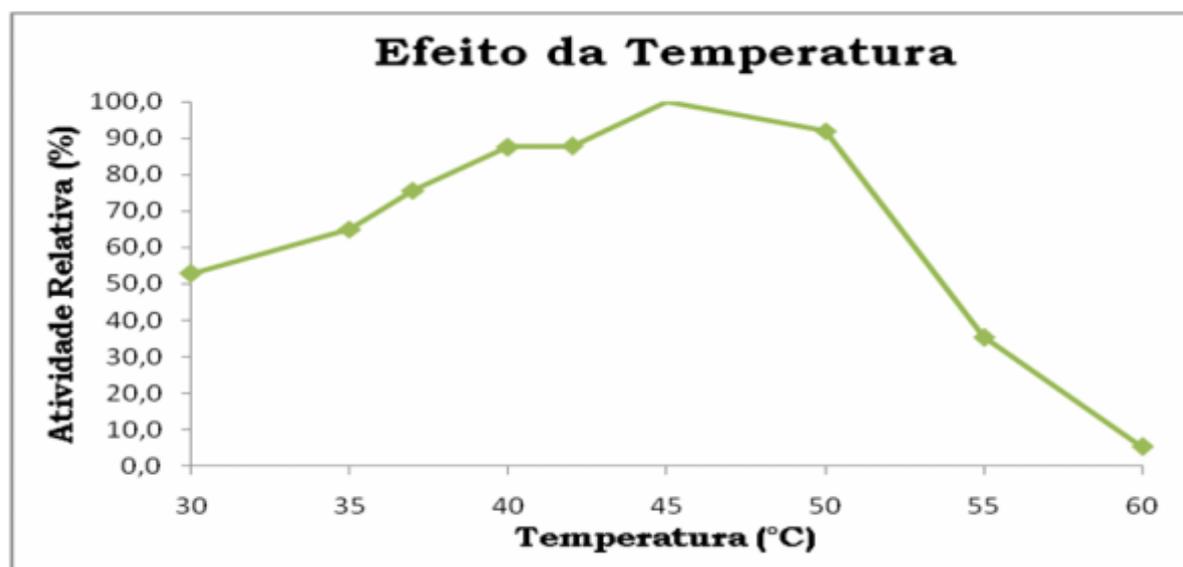


Figura 2. Perfil de temperatura para Lactozym® 3000L

(tampão fosfato de potássio)

Conclusões

A enzima α -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000L) apresentou o melhor desempenho na hidrólise de lactose com tampão fosfato de potássio, pH 6,6, com adição do íon Mg^{+2} (1mM), na temperatura de 45°C. Estudos adicionais são necessários para verificar a estabilidade operacional (térmica) desta enzima em diferentes temperaturas.

Referências

- JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J.M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by α -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 300-309, 2002.
- SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L.D.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p. 567, 2004.
- MATIOLI, G.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Hydrolysis of lactose by α -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 3, p. 655-659, 2001.