

Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio

*Kinetics and thermodynamic characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fractionated with ammonium sulphate*

Autores | Authors

Renata Bemvenuti HEIDTMANN
Susan Hartwig DUARTE
Lidiane Pereira de PEREIRA
Anna Rafaela Cavalcante BRAGA

Universidade Federal do Rio Grande
(FURG)

Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia e Ciência de Alimentos
Rio Grande/RS - Brasil

e-mail: reheidtmann@yahoo.com.br
susanduarte@hotmail.com
lidianepereirap@hotmail.com
annarafaela@gmail.com

✉ **Susana Juliano KALIL**

Universidade Federal do Rio Grande
(FURG)

Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia e Ciência de Alimentos
Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475
CEP: 96201-900

Rio Grande/RS - Brasil
e-mail: dqmsjk@furg.br

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Recebido | Received: 23/07/2010

Aprovado | Approved: 08/09/2011

Publicado | Published: mar./2012

Resumo

A β -galactosidase é uma enzima importante que atua na hidrólise da lactose, podendo ser empregada na obtenção de alimentos destinados a consumidores intolerantes a esse dissacarídeo. A levedura *Kluyveromyces marxianus* apresenta bom rendimento de crescimento, além de ser um micro-organismo seguro em aplicações industriais, e tem sido utilizada para produção da enzima por cultivo submerso. A β -galactosidase obtida foi fracionada com sulfato de amônio e caracterizada quanto a temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica, valores D e z, e parâmetros cinéticos e termodinâmicos. A temperatura e pH ótimos foram de 45-50 °C e 7,0, respectivamente. A energia de ativação da reação enzimática foi de 9,8 kcal.mol⁻¹ e da reação de desativação, 64,2 kcal.mol⁻¹. Os valores de K_m e V_{max} obtidos foram de 3,7 mM e 99,0 U.mL⁻¹, respectivamente. A energia livre de Gibbs reduziu com o aumento de temperatura, sendo a enzima mais estável a 30 °C ($\Delta G^* = 106,8$ kJ.mol⁻¹). A entalpia foi de 313,04 kJ.mol⁻¹ e a entropia 0,68 kJ.mol⁻¹.k⁻¹. O valor D confirmou que a enzima foi mais estável em temperaturas próximas de 30 °C (D = 11.513,0 min) e o valor z foi de 5,8 °C.

Palavras-chave: Enzima; Temperatura ótima; pH ótimo; Entalpia; Entropia; Energia livre de Gibbs.

Summary

β -galactosidase is an important enzyme that acts on lactose hydrolysis and can be used to obtain food for consumers intolerant to this disaccharide. The yeast *Kluyveromyces marxianus* presents a good growth yield, is a safe microorganism for industrial applications and has been used for enzyme production using the submerged process. The β -galactosidase obtained was fractionated with ammonium sulphate and characterized with respect to its optimum temperature and pH, thermal stability and its D and z values, as well as its kinetic and thermodynamic parameters. The optimum temperature and pH were 45-50 °C and 7.0, respectively. The activation energy and the deactivation reaction of the enzymatic reaction were, respectively, 9.8 kcal.mol⁻¹ and 64.2 kcal.mol⁻¹. The K_m and V_{max} values obtained were 3.7 mM and 99.0 U.mL⁻¹, respectively. The Gibbs free energy decreased with increasing temperature and the enzyme was more stable at 30 °C ($\Delta G^* = 106.8$ kJ.mol⁻¹). The enthalpy was 313.04 kJ.mol⁻¹ and entropy 0.68 kJ.mol⁻¹.k⁻¹. The D value confirmed that the enzyme was more stable at temperatures around 30 °C (D = 11,513.0 min) and the z value was 5.8 °C.

Key words: Enzyme; Optimum temperature; Optimum pH; Enthalpy; Entropy; Gibbs free energy.

Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio

HEIDTMANN, R. B., et al.

1 Introdução

Enzimas microbianas possuem vasta aplicação no setor alimentício e farmacêutico por serem substâncias naturais, apresentarem elevada especificidade catalítica, atuarem em condições brandas de temperatura e pH, e serem eficientes a baixas concentrações (SILVA e FRANCO, 1999).

A β -galactosidase (EC 3.2.1.23), ou lactase, é uma importante enzima utilizada industrialmente na hidrólise da lactose presente no leite em seus monossacarídeos glicose e galactose (GEKAS e LOPES-LEIVA, 1985). Sua importância é ressaltada pela atuação na produção de derivados lácteos destinados a pessoas intolerantes à lactose, além de evitar a cristalização desse dissacarídeo nesses produtos (JURADO et al., 2002).

Essa enzima é largamente encontrada na natureza, distribuída entre animais, vegetais e micro-organismos, sendo que suas características variam de acordo com a origem. Suas melhores condições operacionais de temperatura e pH diferem de acordo com a fonte (LADERO et al., 2000).

A hidrólise enzimática da lactose é mais adequada do que a química, pois permite condições moderadas de temperatura e pH durante o processo, sem gerar subprodutos responsáveis por sabor, odor ou cor desagradáveis, que são normais nos métodos ácidos. Além disso, as propriedades nutricionais dos produtos lácteos não são modificadas (SANTOS et al., 1998; LADERO et al., 2002).

As lactases mais importantes em termos de interesse tecnológico, produzidas por leveduras do gênero *Kluyveromyces*, são intracelulares. Suas sínteses são induzidas por lactose e galactose, e reprimidas pela glicose, sendo, na sua maioria, obtidas por cultivo submerso (SZCZODRAK, 2000). A utilização de leveduras *Kluyveromyces* é interessante comercialmente, pois são consideradas GRAS (*Generally Recognized as Safe*), sendo aceitas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA para a produção de compostos alimentícios e farmacêuticos (HENSING et al., 1994).

O sítio ativo da β -galactosidase possui habilidade tanto para hidrolisar a lactose quanto para transgalactosilar a galactose (JURADO et al., 2002). Por causa dessa propriedade, essa enzima vem sendo utilizada para a produção de galacto-oligossacarídeos (GOS). Estes são oligossacarídeos não digeríveis e são utilizados como ingrediente em alimentos, por apresentarem efeito prebiótico. A reação enzimática de produção de GOS é denominada transgalactosilação e é realizada a partir de substratos ricos em lactose (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996; SAKO et al., 1999; CHEN et al., 2002).

Muitas características fisiológicas atribuídas aos GOS são relacionadas aos seus efeitos sobre a microflora intestinal e às suas atividades bioquímicas (MARTINS e BURKERT, 2009).

Para maior eficiência da enzima em reações biotecnológicas, é interessante eliminar os interferentes desse processo. A precipitação de proteínas é uma técnica de purificação parcial considerada rápida e eficiente, sendo empregada para eliminar impurezas e aumentar a atividade específica da enzima (LIMA et al., 2001).

O potencial de aplicação para determinada enzima em processos industriais depende de sua atuação catalítica, ou seja, sua atividade e sua estabilidade sob diferentes condições físicas, como pH e temperatura (LEHNINGER, 1997). Dessa forma, a caracterização das enzimas ganha destaque, sendo de fundamental importância para o estudo dos parâmetros que são relevantes no dimensionamento de um processo enzimático. Na literatura, poucos dados são encontrados sobre os parâmetros termodinâmicos da β -galactosidase, especialmente quando oriunda de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.

O objetivo do trabalho foi caracterizar a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio, quanto aos seguintes aspectos: pH e temperatura ótimos; estabilidade térmica, que foi estudada em termos de meia vida ($t_{1/2}$); constante cinética de desnaturação térmica (K_d) e energia da reação de desativação (E_d); valores D e z, e parâmetros cinéticos e termodinâmicos.

2 Material e Métodos

2.1 Micro-organismo

A levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, depositada na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, foi cedida pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, SP.

A cultura foi mantida a 4 °C, em tubos de ensaio com Ágar Extrato de Malte e Levedura.

2.2 Preparo do inóculo

O inóculo continha 150 mL do meio de cultivo, composto por 10 g.L⁻¹ de lactose, 5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1,2 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,4 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e 1,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, preparado em tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,0, sendo a lactose esterilizada por filtração. As condições de cultivo foram 30 °C, 180 rpm por 24 h (INCHAURRONDO et al., 1994; PINHEIRO et al., 2003; LUKONDEH et al., 2005; ALVES et al., 2008).

Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio

HEIDTMANN, R. B., et al.

2.3 Cultivo submerso

A enzima foi produzida por cultivo submerso, utilizando-se o meio de cultivo otimizado por Manera et al. (2008) com 10% de inóculo, preparado em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,0. As condições de cultivo foram 30 °C, 180 rpm por 96 h.

2.4 Extração da enzima

A enzima foi extraída utilizando-se pérolas de vidro e agitador tipo vórtex. Para cada mililitro em suspensão contendo 40 mg de células, foi adicionado 1,1 g de pérolas de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm. A suspensão celular foi centrifugada, sob refrigeração (5200 g, 10 min), para separação do extrato enzimático (MEDEIROS et al., 2008).

2.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pela reação de 2 mL de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) 1,25 mM em tampão KH_2PO_4 50 mM pH 6,6 com 50 μL do extrato enzimático, por 5 min a 37 °C. A reação foi interrompida com 0,5 mL de carbonato de sódio 1 M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de o-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio (INCHAURRONDO et al., 1994).

2.6 Fracionamento com sulfato de amônio

O fracionamento da enzima foi realizado por meio de precipitação com a adição do sulfato de amônio ao caldo contendo a enzima, até 70% de saturação. A seguir, a suspensão foi agitada, mantida em repouso a 4 °C por 12 h e centrifugada. O precipitado foi essuspensado em tampão fosfato de potássio 50 mM com $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM pH 6,6, depois de realizado o processo de diálise para remoção do sal utilizando-se o mesmo tampão de ressuspensão (VEIGA et al., 2007).

O fator de purificação (FP) foi usado como a medida da purificação proporcionada pelo fracionamento, sendo definido conforme a Equação 1.

$$\text{FP} = \frac{\text{atividade específica do extrato fracionado}}{\text{atividade específica do extrato bruto}} \quad (1)$$

em que atividade específica é a atividade enzimática por mg de proteína.

A recuperação (R) foi definida como a atividade enzimática no extrato fracionado pela obtida no extrato bruto, conforme Equação 2.

$$\text{R}(\%) = \frac{\text{atividade da enzima fracionada} \times V}{\text{atividade da enzima bruta} \times V} \times 100 \quad (2)$$

em que V (mL) é o volume do respectivo extrato (SILVA e FRANCO, 1999).

2.7 Caracterização da enzima fracionada com sulfato de amônio

2.7.1 Temperatura e pH ótimos e energia de ativação

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada por meio da atividade de β -galactosidase fracionada com sulfato de amônio, utilizando-se o mesmo procedimento descrito no item 2.5, porém incubando a enzima nas temperaturas de 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 e 60 °C.

A influência do pH na atividade foi estudada a 37 °C, testando a variação de pH em diferentes tampões: acetato de sódio (pH 5,0; 5,6), citrato de sódio (pH 5,6; 6,0), tris-HCl (pH 7,3; 7,6) e fosfato de sódio (pH 6,6; 7,0; 7,3) (ALVES et al., 2008).

Por meio da forma linearizada da equação de Arrhenius, plotou-se o gráfico $\ln V$ em função do inverso da temperatura em que V ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) é a atividade da enzima e T (K), a temperatura absoluta. Com o coeficiente angular da equação da reta, determinou-se a energia de ativação (Equação 3).

$$K = A e^{(-E_a/R_g \cdot T)} \quad (3)$$

em que: K = constante de velocidade; A = constante exponencial; E_a = energia de ativação; R_g = constante dos gases; T = temperatura.

2.7.2 Estudo da estabilidade térmica da enzima

A estabilidade térmica da enzima fracionada com sulfato de amônio foi estudada nas temperaturas de 30, 37, 40 e 45 °C em termos de meia vida ($t_{1/2}$), constante cinética de desnaturação térmica (K_d) e energia da reação de desativação (E_d). Para este estudo, a enzima foi incubada em cada temperatura até que perdesse 50% de sua atividade inicial. A medida da atividade enzimática foi feita conforme o item 2.5, em intervalos de tempos pré-determinados.

A meia vida da enzima foi calculada conforme Lavorenti et al. (2003), a partir da Equação 4:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (4)$$

Considerando-se que, na faixa das temperaturas estudadas (30-45 °C), a cinética de desnaturação enzimática é de 1ª ordem e que o valor de K_d é função apenas da temperatura absoluta, os valores experimentais de K_d foram determinados por meio do coeficiente angular do gráfico $-\ln(V/V_0)$ versus tempo de incubação da amostra, em que V é a atividade enzimática em cada tempo de amostragem e V_0 é a atividade enzimática no tempo inicial ($t = 0$).

A energia da reação de desativação (E_d) foi determinada a partir dos dados do estudo da estabilidade

Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio

HEIDTMANN, R. B., et al.

térmica. A partir do coeficiente angular da reta $-\ln(K_d)$ versus $1/T$ e utilizando-se a Equação 5, foi determinado o valor de E_d , em que R é a constante dos gases ideais ($8,314 \cdot 10^{-3} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$).

$$\ln K_d = \ln K - \left(\frac{E_d}{RT} \right) \quad (5)$$

2.7.3 Determinação dos valores D e z

Para verificação da influência da temperatura na estabilidade da enzima, foram estudados os valores D e z .

O valor de redução decimal D é o tempo necessário para reduzir a velocidade de reação a 10% e foi determinado pela Equação 6.

$$D = \frac{2,3026}{K_d} \quad (6)$$

A variação de temperatura (valor z) requerida em um sistema para que ocorra uma redução decimal na velocidade de reação foi obtida pelo inverso do coeficiente angular da reta construída a partir de $\log(D)$ versus temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

2.7.4 Determinação das constantes cinéticas

A cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas segue o modelo Michaelis-Menten (Equação 7). As constantes cinéticas (K_m e V_{max}) foram determinadas usando-se o método gráfico de Lineweaver Burk (SHULER e KARGI, 2002), graficando $1/S$ versus $1/V$, em que foi utilizada uma faixa de concentração de 1-10 mM de ONPG e a atividade enzimática determinada conforme o item 2.5.

$$V = \frac{V_{\text{máx}} S}{K_m + S} \quad (7)$$

2.7.5 Parâmetros termodinâmicos de desnaturação da enzima

Os dados termodinâmicos foram estudados para as temperaturas de 30, 37, 40 e 45 $^{\circ}\text{C}$. Os valores de ΔH^* e ΔS^* foram obtidos pela inclinação e pela interceptação do gráfico $\ln(k_d/T)$ versus $1/T$, respectivamente, e calculados de acordo com a Equação 8. O ΔG^* foi estimado pela Equação 9.

$$\ln \left(\frac{K_d}{T} \right) = \ln \left(\frac{K_B}{h} \right) + \left(\frac{\Delta S^*}{R} \right) - \left(\frac{\Delta H^*}{R} \right) \left(\frac{1}{T} \right) \quad (8)$$

em que: k_B = constante de Boltzmann; h = constante de Planck; ΔS^* = entropia de inativação; ΔH^* = entalpia de inativação; R = constante universal dos gases.

$$\Delta G^* = \Delta H^* - \Delta S^* \cdot T \quad (9)$$

2.8 Métodos analíticos

2.8.1 Determinação da biomassa

Após o cultivo submerso, tomou-se uma alíquota para determinação da biomassa. A amostra foi centrifugada e as células lavadas com água. Posteriormente, as células foram ressuspensas e a concentração celular foi estimada a partir da leitura da absorbância a 620 nm e convertida para massa de células seca, utilizando-se curva padrão (RECH et al., 1999).

2.8.2 Determinação de proteína

A dosagem de proteína foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Lowry et al. (1951). Foi construída uma curva padrão utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão, com concentrações variando de 0,02 a 0,4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Esta foi expressa em concentração de BSA ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) versus absorbância a 750 nm e foi utilizada para determinar a concentração de proteína.

2.8.3 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada por meio da leitura da amostra em um potenciômetro de pH, segundo Cunniff (1995).

3 Resultados e Discussão

3.1 Fracionamento com sulfato de amônio

A adição de sulfato de amônio foi o processo de separação de proteínas utilizado para livrar a pretendida enzima de acompanhantes, proteínas ou não, possibilitando obter a máxima concentração da proteína de interesse e o aumento de atividade enzimática específica. O fator de purificação da β -galactosidase fracionada com sulfato de amônio foi de 1,3 e a recuperação, de 83,2%.

O fracionamento enzimático com sulfato de amônio baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas proteicas se agregam e precipitam (LIMA et al., 2001), sendo esse um método simples, rápido e de baixo custo (HILBRIG e FREITAG, 2003). Apesar dessas vantagens, pelos resultados apresentados, percebeu-se que esse método não consegue alta purificação da enzima por se tratar de uma etapa inicial do processo, mas apresenta uma boa recuperação. Silva e Franco (1999) purificaram β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* por sistema aquoso bifásico (SAB), pelo qual ativaram quimicamente PEG 4000, com cloreto de tresila, e acoplaram o ligante bioespecífico p-aminofenil- β -D-tiogalactopiranosídeo (AGPG). Utilizando-se os sistemas 6% PEG 4000 8% Dextrana, 6% PEG 4000-AGPG 8% Dextrana e 13% PEG

Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio

HEIDTMANN, R. B., et al.

4000-AGPG 9% fosfato, obtiveram resultados de fator de purificação e recuperação de 2,8 e 57%; 9,7 e 55%; 19 e 39%, respectivamente. Gul-Guven et al. (2007) purificaram β -galactosidase de *Alicyclobacillus acidocaldarius* pelos procedimentos de precipitação com sulfato de amônio com 50% de saturação, permeação em gel, troca iônica e cromatografia de afinidade, e, finalmente, por eletroforese preparativa, tendo obtido fator de purificação e recuperação de: 1,90 e 54,6%; 2,53 e 36,9%; 3,95 e 33,6%; 11,99 e 14,4%; 162,9 e 8,20%, respectivamente. Song et al. (2010) também purificaram a β -galactosidase, porém de *Guehomyces pullulans* 17-1 por cromatografia de filtração em gel e cromatografia de troca de cátions, tendo obtido baixo fator de purificação: 2,2 e 2,4, e baixo rendimento: 19,3 e 16,1%, respectivamente.

3.2 Efeito da temperatura e do pH na atividade de β -galactosidase

A β -galactosidase fracionada com sulfato de amônio apresentou maior atividade entre 45 e 50 °C. Observa-se, porém, na Figura 1, que existe uma manutenção da atividade entre 30 e 37 °C. Como a enzima não é altamente purificada, pode haver mais de uma proteína com atividade e com temperatura ótima diferentes, explicando o perfil de temperatura da Figura 1.

Segundo Alves et al., (2008), a temperatura ótima para a β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 bruta é de 37 °C. Assim, o fracionamento com sulfato de amônio da enzima proporcionou uma temperatura ótima mais elevada (45 °C) quando comparada à mesma enzima, porém bruta, estudada por esses autores. O processo de fracionamento pode ter removido do meio proteases ou contaminantes que conduzissem a uma maior desnaturação ou uma inibição em temperaturas acima de 37 °C, obtendo-se, assim, o ótimo, na enzima fracionada, em temperaturas mais elevadas.

Brady et al. (1995) estudaram o efeito da temperatura e do pH na atividade de β -galactosidase

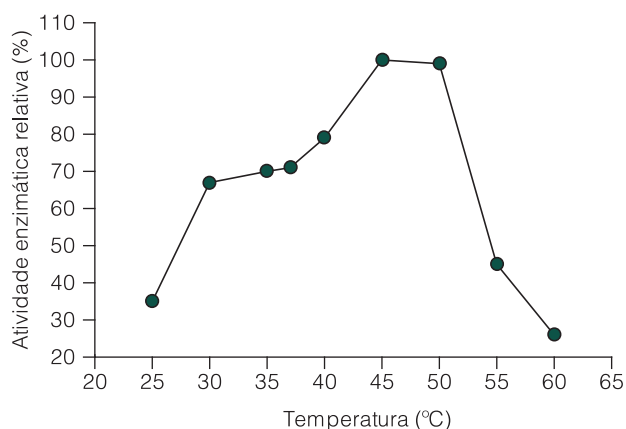


Figura 1. Efeito da temperatura na atividade enzimática da β -galactosidase fracionada com sulfato de amônio.

de *Kluyveromyces marxianus* IMB3 durante o crescimento em meio contendo lactose e também verificaram maior atividade entre 45 e 50 °C, dentre as temperaturas estudadas (20-60 °C) e notaram um decréscimo de atividade fora dessa faixa de temperatura. O pH ótimo foi em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5. Tomaska et al. (1995) estudaram a temperatura ótima para a mesma enzima, porém proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCY e SY2, e obtiveram resultados entre 50 e 52 °C, respectivamente.

Rhimi et al. (2010) estudaram a temperatura (4-50 °C) e o pH (4-8,5) ótimos para β -galactosidase de *Streptococcus thermophilus* LMD9, e encontraram, respectivamente, faixas de 25-40 °C e 6,5-7,5. Song et al. (2010), estudando as condições ótimas para β -galactosidase de *Guehomyces pullulans* 17-1 purificada, obtiveram temperatura ótima de 50 °C e pH ótimo em tampão citrato 100 mM pH 4,0.

No estudo da influência do pH na reação enzimática, foi possível observar, por meio dos resultados ilustrados na Tabela 1, que o tampão fosfato de sódio proporcionou maior atividade enzimática, tanto para a enzima fracionada com sulfato de amônio (pH 7,0), estudada neste trabalho, como no estudo para a mesma enzima, bruta, de Alves et al., (2008) (pH 6,6). O fracionamento com sulfato de amônio conduziu a uma enzima menos reativa nos diferentes tampões. O contrário ocorreu com a enzima bruta estudada por Alves et al., (2008) que, em uma pequena faixa fora do pH ótimo, manteve-se praticamente estável sua atividade enzimática.

Os valores ótimos de pH obtidos para a β -galactosidase fracionada com sulfato de amônio nos tampões estudados estão de acordo com a literatura em que são reportados valores de pH ótimos na faixa de 6,0-7,3 para enzimas obtidas de leveduras do gênero *Kluyveromyces* (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; JURADO et al., 2002).

A energia de ativação obtida foi de 9,8 kcal.mol⁻¹. De acordo com Whitaker (1994), a energia de ativação para transformação de reagentes em produtos em reações enzimáticas está compreendida entre 6,0 e 15,0 kcal.mol⁻¹.

Segundo Alves et al. (2008), a β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 bruta possui energia de ativação de 9,4 kcal.mol⁻¹, ou seja, praticamente não houve alterações da energia de ativação com o fracionamento da enzima.

3.3 Estabilidade térmica da enzima, valores D e z

O valor de redução decimal D representa a resistência a uma determinada temperatura, enquanto o valor z é expresso em °C e equivale à dependência da mudança de temperatura para a desnaturação do fator

Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio

HEIDTMANN, R. B., et al.

Tabela 1. Atividade enzimática relativa em função do pH.

Tampão	pH	Atividade enzimática relativa (%)	
		Enzima fracionada com sulfato de amônio	Enzima bruta (ALVES et al., 2008)
Acetato 50 mM	5,0	1,5	0,6
	5,6	8,7	76,5
Citrato 50 mM	5,6	2,7	30,5
	6,0	5,7	80,7
Fosfato 50 mM	6,6	80,9	100,0
	7,0	100,0	98,7
	7,3	85,2	98,3
Tris-HCl 50 mM	7,3	27,2	94,3
	7,6	19,3	93,2

termodegradável. Esse parâmetro indica o intervalo em que a temperatura, sendo aumentada ou diminuída, gera a mudança de um ciclo logarítmico no valor D.

Os resultados apresentados na Tabela 2 permitem perceber que as constantes cinéticas de desnaturação térmica (K_d) são inversamente proporcionais às respectivas meias vidas.

Pela observação dos valores D na Tabela 2, é possível afirmar que a enzima é mais estável em temperaturas próximas de 30 °C ($D = 11.513,0$ min).

Brady et al. (1995) encontraram que a β -galactosidase é estável por 7 h a 30 °C, com meia vida de 0,25 h, sendo que, entre 45 e 50 °C, a meia vida cai para 0,1 h. Tomaska et al. (1995) verificaram que a β -galactosidase perdeu toda atividade em 4 h a 45 °C, enquanto que a mesma enzima, porém imobilizada, apresentava cerca de 60 a 70% de atividade após 5 horas; os autores apontam o fato de a imobilização da enzima ter sido responsável pela estabilização à inativação térmica.

O valor de z obtido foi de 5,8 °C, ou seja, ao variar a temperatura para mais ou para menos no valor de z , muda-se o valor D em um ciclo logarítmico. O valor z indicou que a temperatura deve ter especial atenção em um processo que utilize a enzima β -galactosidase, já que este é baixo, ou seja, uma pequena variação de temperatura irá afetar grandemente a estabilidade da enzima. Na temperatura ótima, a enzima apresentou baixa meia vida, sendo inapropriada para utilização em processos realizados nessa condição.

A energia da reação de desativação (E_a) da enzima fracionada com sulfato de amônio foi de 64,2 kcal.mol⁻¹.

3.4 Determinação das constantes cinéticas

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da enzima β -galactosidase fracionada com sulfato de amônio foram obtidos experimentalmente e os valores de K_m e V_{max} obtidos foram de 3,7 mM e 99,0 U.mL⁻¹, respectivamente.

Tabela 2. Valores experimentais do $t_{1/2}$, K_d e valor de redução decimal (D) para β -galactosidase fracionada com sulfato de amônio, em função da temperatura.

T (°C)	Enzima fracionada com sulfato de amônio		
	$t_{1/2}$ (h)	K_d (min ⁻¹)	Valor D (min)
30	57,8	0,0002	11.513,0
37	7,7	0,0015	1.535,0
40	1,8	0,0063	365,5
45	0,1	0,0775	29,7

Segundo Whitaker (1994), quanto menor o valor de K_m maior a afinidade do catalisador pelo substrato. Alves et al. (2008) realizaram a caracterização da enzima β -galactosidase bruta obtida a partir da mesma cepa e substrato do presente estudo e obtiveram valores de K_m de 15,1 mM e V_{max} de 18,9 U.mL⁻¹. Ao se compararem esses dados aos obtidos no presente estudo, verifica-se que o K_m da enzima bruta foi aproximadamente 4 vezes maior em relação ao obtido quando se utiliza a enzima fracionada com sulfato de amônio; portanto, a enzima fracionada apresentou maior afinidade com o substrato ONPG do que a enzima bruta.

Song et al. (2010) encontraram valor de K_m para β -galactosidase de *Guehomyces pullulans* 17-1 purificada por cromatografia de filtração em gel e cromatografia de troca de cátions de 3,3 mM, sendo esse valor bastante próximo ao encontrado no presente trabalho, que utilizou somente uma etapa de purificação. Ku e Hang (1992) obtiveram K_m para β -galactosidase de *K. marxianus* NRRL Y-1196 de 3,9 mM.

3.5 Parâmetros termodinâmicos: energia livre de Gibbs, entalpia e entropia

A determinação dos parâmetros termodinâmicos ajuda a entender o mecanismo de desnaturação da enzima, o qual é muito importante em processos enzimáticos, bem como o efeito da temperatura na

Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio

HEIDTMANN, R. B., et al.

taxa de desnaturação enzimática. Os parâmetros ΔH^* e ΔS^* fornecem o número de ligações não covalentes quebradas e a mudança na desordem enzima/solvente associada com a formação do estado de transição, respectivamente (ORTEGA et al., 2004).

A Tabela 3 mostra os valores experimentais obtidos para a energia livre de Gibbs, entalpia e entropia.

A energia livre de Gibbs (ΔG^*) de uma enzima é diferente para cada estado: forma nativa e forma desnaturada, e indica quanto da conformação inicial ainda esta preservada ou ativa. A desnaturação ocorre quando ΔG^* assume valor baixo, indicando que o estado assumido apresenta menos energia disponível, em função da desnaturação, quando comparado com o estado inicial (MODELL e REID, 1983).

Conforme se pode observar, os dados de ΔG^* na Tabela 3 indicam que a β -galactosidase desnaturou com o aumento da temperatura, sendo que os valores de ΔG^* mostram que a temperatura de 30 °C proporcionou maior resistência ao desdobramento térmico.

A abertura na estrutura da enzima é acompanhada pelo aumento da entropia ou desordem de inativação (ΔS^*) (VIEILLE e ZEIKUS, 1996). Valores positivos de entropia sugerem que o desdobramento da enzima pode ser uma etapa determinante para a termoinativação irreversível da enzima; porém, valores positivos e baixos sugerem uma desordem insignificante no sistema. Logo, comparando o valor de entropia deste trabalho, de 0,68 kJ.mol⁻¹.K⁻¹ (Tabela 3) com o obtido por Manera et al. (2009), de 0,68 kJ.mol⁻¹.K⁻¹, para a enzima bruta, pode-se dizer que β -galactosidase tanto fracionada com sulfato de amônio como bruta possuem uma insignificante desordem no sistema. Os valores de ΔH^* e ΔS^* são altamente influenciados por vários fatores, incluindo o efeito do solvente e da estrutura (NAIDU e PANDA, 2003). Assumindo-se que a força de uma ligação não covalente seja de 5,4 kJ.mol⁻¹ (ORTEGA et al., 2004), a formação do estado de transição da β -galactosidase é acompanhada pela ruptura de aproximadamente 60 ligações, como mostrado pelo valor de ΔH^* (Tabela 3).

Tabela 3. Valores experimentais do ΔG^* , ΔH^* e ΔS^* para β -galactosidase fracionada com sulfato de amônio, em função da temperatura.

Temperatura (°C)	ΔG^* (kJ.mol ⁻¹)	ΔH^* (kJ.mol ⁻¹)	ΔS^* (kJ.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
30	106,8	313,04	0,68
37	102,4		
40	100,4		
45	96,9		

4 Conclusões

A temperatura ótima da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio encontrou-se entre 45 e 50 °C. O pH ótimo foi em tampão fosfato de sódio pH 7,0.

A energia de ativação e da reação de desativação foram 9,8 e 64,2 kcal.mol⁻¹, respectivamente.

O valor z obtido para a enzima fracionada com sulfato de amônio foi de 5,8 °C. O ΔH^* e ΔS^* foram, respectivamente, 313,04 kJ.mol⁻¹ e 0,68 kJ.mol⁻¹.K⁻¹.

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da enzima β -galactosidase fracionada com sulfato de amônio foram de 3,7 mM e 99,0 U.mL⁻¹ respectivamente.

A enzima foi mais estável em torno de 30 °C ($D = 11.513,0$ min, $K_d = 0,0002$ min⁻¹, $t_{1/2} = 57,8$ h⁻¹, $\Delta G^* = 106,8$ kJ.mol⁻¹). Acima dessa temperatura, a enzima desnaturou rapidamente, sendo que uma pequena variação na temperatura acarretou grande perda de estabilidade.

Agradecimentos

Ao CNPq, à CAPES e à FAPERGS.

Referências

- ALVES, F. G.; DUARTE, S H.; PEREIRA, L. P.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. Caracterização da β -galactosidase imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. In: SIMPÓSIO EM CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DO MERCOSUL, 3., 2008, Cascavel. **Anais...** Cascavel: Universidade do Oeste do Paraná, 2008.
- BRADY, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, L.; MCHALE, A. P. Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 17, n. 8, p. 696-699, 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00115-8](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(94)00115-8)
- CHEN, C. S.; HSU, C. K.; CHIANG, B. H. Optimization of the enzymatic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, n. 5, p. 801-808, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00232-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00232-7)
- CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 7, n. 11, p. 353-361, 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(96\)10038-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(96)10038-8)
- CUNNIFF, P. A. (Ed.). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16. ed. Virginia: AOAC, 1995.

Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio

HEIDTMANN, R. B., et al.

- GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: A literature review. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 2-12, 1985.
- GUL-GUVEN, R.; GUVEN, K.; POLI, A.; NICOLAUS, B. Purification and some properties of a β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from Antarctica. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 40, n. 6, p. 1570-1577, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.11.006>
- HENSING, M. C. M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C.; BAARTMANS, R.; VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, London, v. 42, n. 4, p. 516-521, 1994.
- HILBRIG, F.; FREITAG, R. Protein purification by affinity precipitation. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 790, n. 1-2, p. 79-90, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00081-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00081-3)
- INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 47-54, 1994. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01429.x>
- JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 300-309, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00107-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00107-2)
- KU, M. A.; HANG, Y. D. Production of yeast lactase from sauerkraut brine. **Biotechnology Letters**, London, v. 14, n. 10, p. 925-928, 1992. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01020630>
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00244-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00244-1)
- LADERO, M.; PEREZ, M. T.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Hydrolysis of lactose by free and immobilized β -galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2. **Biotechnology and Bioengineering**, Washington, v. 81, n. 2, p. 241-252, 2002. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10466>
- LAVORENTI, A.; ROCHA, A. A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L.; PINTO, O. B. Comportamento do diclosulam em amostras de um latossolo vermelho distroférrico sob plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 183-190, 2003.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1997. 1232 p.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biociência Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. 593 p.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the foling phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Fairfax, v. 32, n. 7, p. 284-288, 2005.
- MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.
- MANERA, A. P.; BRAGA, A. R. C.; SALA, L.; GOMES, P. A.; ORES, J. C.; MAUGERI FILHO, F.; KALIL, S. J. Propriedades enzimáticas da β -Galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082. In: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 9., 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009. <http://dx.doi.org/10.4260/BJFT2009800900017>
- MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.
- MODELL, M.; REID, R. C. **Thermodynamics and its Applications**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1983. 448 p.
- NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 57-67, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00022-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00022-6)
- ORTEGA, N.; DIEGO, S.; BUSTO, M. D. Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 209-217, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.035>
- PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, Bunkyo-ku, v. 37, n. 6, p. 438-442, 2003. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01429.x>
- RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A.; AYUB M. Utilization of protein-hidrolized cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of industrial Microbiology**

Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio

HEIDTMANN, R. B., et al.

and Biotechnology, Fairfax, v. 23, n. 2, p. 91-96, 1999. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.2900692>

RHIMI, M.; BOISSON, A.; DEJOB, M.; BOUDEBOUZE, S.; MAGUIN, E.; HASER, R.; AGHAJARI, N. Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a β -galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 161, p. 515-525, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2010.04.011>

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 9, n. 1, p. 69-80, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00046-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00046-1)

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from a *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 22, n. 7, p. 558-567, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00236-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00236-6)

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 553 p.

SILVA, M. E.; FRANCO, T. T. Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. **Revista de Microbiologia**, Campinas, v. 30, n. 4, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37141999000400006>

SONG, C.; LIU, G. L.; XU, J. L.; CHI, Z. M. Purification and characterization of extracellular β -galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 45, p. 954-960, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.02.025>

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by in immobilized β -galactosidase *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 10, n. 6, p. 631-637, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00187-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00187-9)

TOMASKA, M.; STREDANSKY, M.; GEMEINER, P.; STURDIK, E. Improvement of the thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 7, p. 649-652, 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00056-5](http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592(94)00056-5)

VEIGA, I. G.; GRUNENVALDT, F. L.; KUHN, K. R.; KALIL, S. J. Purificação da enzima β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces marxianus* pela técnica de precipitação. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. **Trends in Biotechnology**, Salt Lake, v. 14, n. 6, p. 183-190, 1996.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2. ed. Davis: University of California, 1994. 625 p.