

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA HIDRÓLISE DA LACTOSE DO SORO DE QUEIJO POR β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 6500L) LIVRE E IMOBILIZADA

TRINDADE, Renata Aguirre¹; REGO, Tatiane Vieira¹; BURKERT Carlos André Veiga²

¹Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Engenharia de Bioprocessos.
re_maps@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Lactose, o componente de maior concentração no leite e soro, tem aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos, porém esta aplicação é limitada, devido a sua baixa solubilidade e à intolerância à lactose. A intolerância à lactose deve-se a uma redução geneticamente predeterminada de β -galactosidase (lactase) no intestino delgado, que ocorre muitas vezes com a idade, provocando sintomas gastrointestinais. Por esta razão, a lactose é freqüentemente hidrolisada antes do uso (MORIWAKI, 2000). Esse tratamento torna o leite, o soro e produtos lácteos adequados para a alimentação de indivíduos intolerantes à lactose, bem como melhora algumas características tecnológicas, aumentando a solubilidade e reduzindo os riscos de cristalização em sorvetes, doce de leite e leite condensado (JURADO et al., 2002).

No entanto, um dos fatores limitantes para hidrólise da lactose por β -galactosidase em larga escala reside no alto custo dessa enzima. Uma das alternativas tecnológicas é o uso de enzimas imobilizadas, as quais ainda são pouco exploradas, o que tem atraído o interesse de inúmeros pesquisadores. As enzimas imobilizadas podem ser recuperadas após uma batelada, garantindo sua reutilização em bateladas posteriores, reduzindo drasticamente os custos deste insumo, sendo desta forma um fator determinante da viabilização comercial do processo (MARIOTTI et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi comparar o desempenho da enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 6500L) na forma livre e imobilizada em Eupergit® C quanto ao grau de conversão de lactose em diferentes temperaturas.

2 METODOLOGIA

2.1 Material

A enzima utilizada foi a β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* Lactozym® 6500L, gentilmente cedida pela Novozymes (Dinamarca).

Foi utilizado o soro desidratado, disponibilizado pela Cooperativa Sul-Riograndense de Laticínios (COSULATI), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

2.2 Métodos

2.2.1 Imobilização da enzima em Eupergit® C

Foi utilizado o procedimento proposto por Campello et al. (2010), envolvendo a reação de 400 mg de Eupergit® C com 400 µL da enzima em tampão fosfato de potássio 1,5 M, pH 6,6, contendo 1 mM de Mg²⁺. A temperatura foi controlada em 25°C e o tempo de contato foi de 8 h. Após a imobilização, a suspensão foi filtrada e lavada com tampão fosfato de potássio (10 mL, 0,1 M, pH 6,6 e 0,1 mM de Mg²⁺).

2.2.2 Ensaio em reator em batelada

As reações enzimáticas foram conduzidas em reatores de vidro encamisados, conectados a um banho termostático com circulação de água para controle de temperatura e dispostos sobre um agitador magnético para promover a agitação.

Como substrato foi utilizado o soro reconstituído para uma concentração de lactose de 5%, sendo o pH ajustado em 6,6, no qual foi adicionada a enzima na forma livre ou imobilizada (respectivamente 0,012 mL e 0,14 g para um volume reacional de 100 mL).

Amostras foram retiradas em intervalos pré-definidos, sendo inativadas a 100°C por 5 min, determinando-se em seguida a concentração de glicose através de um kit enzimático-colorimétrico Glicose PAP Likuiform® (Labtest, Brasil), com leitura da absorbância a 505 nm e conversão à concentração de glicose por curva de calibração previamente determinada. A reação foi interrompida após três leituras constantes.

O grau de conversão da lactose foi estimado de acordo a Equação 1.

$$\text{Grau de Conversão (\%)} = \frac{\text{Lac}_c}{\text{Lac}_i} \times 100 \quad (1)$$

A lactose consumida foi estimada de acordo com a estequiometria da reação de hidrólise, correspondendo à Equação 2.

$$\text{Lac}_c \text{ (g/L)} = \text{Gli}_F \frac{\text{PM}_{\text{Lac}}}{\text{PM}_{\text{Gli}}} \quad (2)$$

Foram testadas as temperaturas de 37°C, 40°C e 45°C, escolhidas de acordo com o perfil de temperatura da β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* anteriormente determinado (Campello et al., 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os valores obtidos referentes à conversão da lactose por enzima livre e imobilizada, a 37°C, 40°C e 45°C.

Tabela 1: Valores médios ± desvios padrão obtidos para conversão de lactose com β-galactosidase livre e imobilizada em diferentes temperaturas de reação.

T (°C)	Conversão de Lactose com Enzima Livre (%)*	Conversão de Lactose com Enzima Imobilizada (%)*
37	79,72±1,51 ^{a,A}	78,37±3,36 ^{b,A}
40	84,17±2,19 ^{a,B}	90,43±1,44 ^{a,A}
45	39,58±4,51 ^{b,B}	65,36±2,53 ^{c,A}

*Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas a 95% de confiança. Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferenças significativas a 95% de confiança.

Pela análise estatística dos resultados pode-se observar para a enzima livre que não houve diferença significativa a 95% de confiança entre as temperaturas de 37°C e 40°C, atingindo-se em média, respectivamente, grau de conversão de 79,72% e 84,17%, correspondendo a um consumo de lactose de 39,86 g/L e 42,08 g/L.

Já na temperatura de 45°C observou-se que o grau de conversão da lactose foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em relação às temperaturas de 37°C e 40°C, sendo de apenas 39,58%, correspondendo a um consumo de 19,79 g/L, evidenciando a severa perda de estabilidade desta enzima com o aumento da temperatura, conforme já observado por Campello et al. (2011).

Com relação à enzima imobilizada, a 40°C a enzima apresentou a maior conversão de lactose (em média 90,43%), diferindo das demais temperaturas, a 95% de confiança.

Comparando enzima livre e imobilizada, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) a 37°C, mas foram observadas diferenças significativas a 40°C e 45°C, havendo aumento do grau de conversão de lactose com a imobilização para ambas as temperaturas, de 84,17% para 90,43% a 40°C, e de 39,58% para 65,86% a 45°C.

Convém ressaltar que a galactose e a glicose formadas podem atuar como inibidor competitivo e não competitivo, respectivamente, contribuindo para reduzir as taxas de reação ao longo do tempo, à medida que se acumulam no meio reacional, contribuindo para a hidrólise incompleta da lactose normalmente observada nos processos em batelada (Mateo et al., 2004). Além disso, também as proteínas e minerais presentes no soro podem ter efeito inibitório sobre a β -galactosidase (Chen et al., 2002). Também a baixa estabilidade térmica comumente observada em β -galactosidases de *Kluyveromyces* pode contribuir. No entanto, a imobilização tanto melhora a estabilidade térmica (Campello et al., 2011), pela estabilização da estrutura proteica pela formação de ligações covalentes com o suporte, como diminui o efeito inibitório dos produtos de reação (Mateo et al., 2004), o que pode justificar os maiores valores de conversão de lactose obtidos com a imobilização.

4 CONCLUSÃO

Foi possível avaliar o efeito da temperatura sobre o grau de conversão de lactose presente no soro de queijo por ação da β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 6500L) livre e imobilizada, obtendo-se os melhores resultados a 37°C e 40°C com a enzima livre e a 40°C com a enzima imobilizada. A 45°C foram observados os desempenhos menos satisfatórios, tanto para a enzima livre quanto para imobilizada, provavelmente pela menor estabilidade nesta temperatura. O procedimento de imobilização teve impacto positivo sobre o grau de conversão da lactose nas temperaturas de 40°C e 45°C, atingindo em média 90,43% de conversão a 40°C.

5 REFERÊNCIAS

CAMPELLO, G. S.; TRINDADE, R. A.; RÊGO, T. V.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Imobilização de beta-galactosidase (Lactozym® 3000L) em Eupergit® C. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçu, PR, setembro de 2010.

CAMPELLO, G. S.; TRINDADE, R. A.; RÊGO, T. V.; BURKERT, C. A. V. Caracterização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* livre e imobilizada. Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul, RS, julho de 2011.

CHEN, C. S.; HSU, C. K.; CHIANG, B. H. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. Process Biochemistry, v. 38, p. 801-808, 2002.

JURADO, E. F.; CAMACHO, F.; LUZON G.; VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p. 300-309, 2002.

MARIOTTI, M. P.; YAMANAKA, H.; ARAUJO, A. R.; TREVISAN, H. C. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, p. 1233-1240, 2008.

MATEO, C.; MONTI, R.; PESSELA, B. C. C.; FUENTES, M.; TORRES, R.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk. *Biotechnology Progress*, v. 20, p. 1259-1262, 2004.

MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. Influência da β -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose. *Arquivos Ciências Saúde UNIPAR*, v. 4, p. 283-290, 2000.