



HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE LACTOSE UTILIZANDO β -GALACTOSIDASE IMOBILIZADA EM RESINA DE TROCA IÔNICA

B. I. S. DAMIN¹, B. D. COSTA², A. DETTMER¹ e J. FISCHER²

¹ Universidade de Passo Fundo, Curso de Engenharia Química

² Universidade de Passo Fundo, Curso de Química (B)

E-mail para contato: brebrenda.damin@gmail.com

O soro lácteo apresenta elevada concentração de lactose e, consequentemente, diversas possibilidades de reaproveitamento e valorização. Nesse sentido, a hidrólise da lactose é um processo promissor para as indústrias alimentícias pois possibilita o desenvolvimento de produtos com baixo teor de lactose ou sem lactose. Há diferentes métodos para a conversão de lactose nos produtos lácteos, sendo a hidrólise enzimática o mais empregado. Entretanto, devido as aplicações de enzimas livres apresentarem limitações, a utilização de enzimas imobilizadas apresenta vantagens, como a reutilização, aumento da estabilidade do biocatalisador e melhoria no processo. O objetivo desse trabalho foi otimizar o processo de imobilização da β -galactosidase *Kluyveromyces lactis* por adsorção e ligação cruzada, utilizando como suporte resina de troca iônica Duolite A568. A atividade enzimática no teste com a enzima livre foi de 0,782 e com a enzima imobilizada, sem passar pelo processo de reticulação, foi de 0,520. As atividades foram próximas, demonstrando que o processo adotado para a imobilização foi adequado. Para o estudo da influência da concentração de enzima e do volume de glutaraldeído foi utilizado o planejamento fatorial 2². A variável significativa do modelo foi a concentração de enzima, sendo que a maior atividade foi de 0,0880 U com a maior concentração de 5 mL L⁻¹.

1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos produtos alimentícios com maior demanda de produção atualmente e o Brasil é um grande produtor de leite e derivados como queijo e, consequentemente, gera quantidades significativas de soro lácteo. A lactose é o principal componente de ambos os produtos, sendo que o soro de leite apresenta elevada concentração de lactose, o que confere valor nutritivo, mas também poluidor, se tratado como resíduo, devido a elevada carga de matéria orgânica. Dessa forma apresenta potencial promissor de reaproveitamento e valorização.

Muitos estudos são realizados com a lactose devido a sua ampla utilidade em indústrias alimentícias, principalmente relacionados aos alimentos, como fonte de glicose e galactose, açúcares com elevada aplicação pelo seu forte poder adoçante e maior solubilidade, além de permitir a obtenção de produtos economicamente mais atrativos e adequados à alimentação de indivíduos intolerantes à lactose (MAGALHÃES et al., 2011; FISCHER et al., 2013).



Nesse sentido, a hidrólise da lactose é um processo promissor para a indústria de alimentos pois possibilita o desenvolvimento de produtos com teor reduzido de lactose ou sem lactose. Sendo possível comercializá-los para as pessoas que são intolerantes e, também, ampliar o aproveitamento de soro lácteo visto que apresenta alto teor de lactose e valor comercial (MUKHOPADHYAY et al., 2003; JURADO et al., 2002; GANZLE et al., 2008).

Há diferentes métodos para a conversão de lactose dos produtos lácteos, tanto pelo método ácido quanto pelo método enzimático. Entretanto, a hidrólise enzimática é uma técnica promissora (FISCHER et al., 2013). Baseia-se na adição de uma enzima β -galactosidase, livre ou imobilizada, que vai quebrar as moléculas de lactose em galactose e glicose, exercendo a função de um biocatalisador. Essa técnica além de trabalhar com temperaturas baixas, reduz as necessidades energéticas, a corrosão nos equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY; OLLIS, 1986; VAN et al., 2014).

Entretanto, as aplicações de enzimas livres em processos industriais têm certas limitações devido ao alto custo e a difícil recuperação dessas no final do processo. Nesse sentido, a utilização de enzimas imobilizadas apresenta vantagens como a reutilização da enzima, possibilidade de melhorar o processo e aumento da estabilidade do biocatalisador.

A imobilização pode ser realizada a partir de diversos métodos, sendo o método de adsorção física o mais simples. Esse método baseia-se na adsorção física da enzima na superfície de suportes insolúveis, por meio de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas (CHIBATA, 1978; BICKERSTAFF, 1997; PANESAR, 2010). Apesar de não provocar alterações na estrutura inicial da enzima uma desvantagem é que pode ocorrer a desorção da enzima durante a sua utilização. Assim, posterior ligação cruzada pode ser realizada a fim de reticular a enzima e contribuir para a sua estabilização, geralmente são utilizados reagentes bi ou multifuncionais como glutaraldeído e disocianato de tolueno. As resinas de troca iônica são mais empregadas envolvendo, basicamente, interações iônicas e eletrostáticas. (PANESAR et al., 2010).

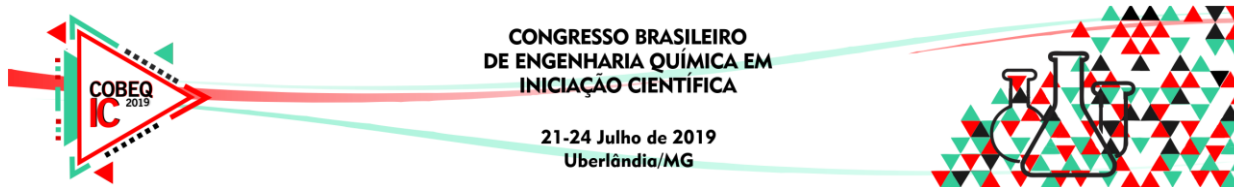
Dentre os suportes, destaca-se a resina Duolite A568, um trocador aniônico fracamente básico, baseado em ligação cruzada de fenol-formaldeído, usado como suporte (orgânico sintético) de enzimas em aplicações de bioprocessos alimentícios. A imobilização em resinas de troca iônica envolve interações entre os íons da proteína e os íons de carga oposta da resina. A estabilidade da enzima adsorvida pode ser melhorada por criação de ligações cruzadas adicionais (MATEO et al., 2001; LETCA et al., 2004).

Diante desse contexto o trabalho objetiva otimizar o processo de imobilização de uma enzima microbiana em resina de troca iônica para ser utilizada na hidrólise de lactose de leite e de soro de leite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Enzima e Suporte



A enzima utilizada foi a enzima comercial β -galactosidase *Kluyveromyces lactis* e para a sua imobilização foi utilizada a resina de troca iônica Duolite A568.

Utilizou-se como substrato solução de lactose 50 g L⁻¹ em solução tampão fosfato de potássio 1M pH 6,8. Sendo que para todas as soluções necessárias para as análises foi utilizado esse mesmo tampão a fim de aproximar as condições do leite e do soro de leite.

A unidade experimental foi montada no laboratório de aulas práticas da Universidade de Passo Fundo (UPF), onde foram realizados os experimentos com a enzima livre e imobilizada. O volume útil do reator foi de 250 ml, qual foi dotado de um banho com controle de temperatura e submetido a agitação magnética. Para os testes com a enzima imobilizada foi utilizada uma cesta de 100 mesh com a inserção do biocatalisador.

2.2 Métodos

2.2.1 Ativação do suporte

A resina Duolite foi ativada de acordo com a metodologia do fabricante (Rohm Hass) sendo utilizada solução de ácido clorídrico (HCl_(aq)) e hidróxido de sódio (NaOH_(aq)), ambos 1M, na razão de dez volumes de solução por volume de resina. Inicialmente foi adicionada na resina a solução de HCl_(aq) e submetido em incubadora rotativa por 30 minutos e agitação de 50 rpm, posteriormente a resina foi lavada com água destilada e adicionada à solução de NaOH_(aq) que foi submetido as mesmas condições. No final do processo, a resina foi lavada novamente e seca a temperatura ambiente.

2.2.2 Imobilização e Reticulação

Para a realização da imobilização adaptou-se o procedimento proposto por GUIDINI et al. (2010), no reator batelada foram adicionados 10 mL da solução de β -galactosidase com concentrações de 1 mL L⁻¹, 3 mL L⁻¹ e 5 mL L⁻¹, e 0,5 gramas de resina Duolite A568, previamente ativada, sendo submetido a incubadora rotativa durante uma hora, com agitação de 50 rpm e temperatura de 25°C.

O processo de reticulação baseado na ligação cruzada também foi realizado utilizando o procedimento proposto por GUIDINI et al. (2010), a enzima imobilizada foi lavada com solução tampão e foram adicionados volumes de 1,25 mL, 2,5 mL e 3,75 mL da solução de glutaraldeído 3,5 g L⁻¹, e acordo com cada ensaio. Sendo disposto, posteriormente, em incubadora rotativa nas mesmas condições do processo de imobilização.

2.2.3 Ensaio com a enzima livre

Os ensaios com a enzima livre foram realizados em reatores nas condições especificadas no item 2.1.3. A enzima foi introduzida diretamente em 100 mL de solução de lactose com concentração de 50 g L⁻¹ e temperatura controlada entre 35 a 37°C.

2.2.4 Planejamento Experimental

A determinação da melhor condição experimental para a reticulação da enzima imobilizada foi definida com a utilização de um planejamento experimental ²², utilizando o software *Statistica 7.0*, com o intuito de avaliar a influência da concentração da solução enzimática e o volume de glutaraldeído a $3,5 \text{ g L}^{-1}$. A resposta estudada foi gramas de glicose formada por litro por minuto por grama de biocatalisador.

2.2.5 Métodos Analíticos

Para determinar a atividade catalítica dos experimentos com a enzima imobilizada usou-se o método das velocidades iniciais da reação. Em cada experimento foram retiradas cinco amostras do meio reacional nos tempos 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. Cada amostra era introduzida em um tubo de ensaio, os quais eram imediatamente colocados em um banho de água em ebulição por 10 minutos para a completa inativação da β -galactosidase.

A concentração da glicose formada foi determinada conforme procedimento descrito por Mandels; Hontz e Nystrom (1974), realizadas por espectrofotometria-VIS para a quantificação da glicose, pelo método de glicose-oxidase. A unidade de atividade (U) foi definida como grama de glicose por litro por minuto por grama de biocatalisador ($\text{g.glicose L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g.biocatalisador}$).

A atividade a partir do método das atividades iniciais, para cada reação da hidrólise de lactose, foi obtida pela inclinação das equações lineares de concentração de glicose em função do tempo de reação. Os experimentos foram realizados em duplicata e a atividade foi calculada a partir da curva padrão desenvolvida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros experimentos realizados foram com a enzima livre no meio reacional e com a enzima imobilizada sem passar pela etapa de reticulação a fim de obter comparações preliminares dos resultados. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 1: Hidrólise enzimática de lactose com a enzima livre e imobilizada

Ensaio	Concentração da enzima (mL L^{-1})	Atividade ($\text{g.glicose L}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
Enzima livre	5	0,782
Enzima imobilizada	5	0,520

Analizando os resultados apresentados na Tabela 1, verifica-se a proximidade da atividade catalítica obtida pela enzima livre e imobilizada. É possível observar que a atividade foi maior quando utilizada a enzima livre, o que já é esperado pois há um contato direto dela com a solução de lactose. No estudo do processo de imobilização de enzima *β -galactosidase *Aspergillus oryzae** de Guidini, 2009 foi obtida uma atividade sem reticulação de 0,649 U. Percebe-se que os resultados estão próximos visto que ainda serão otimizados, indicando que o procedimento adotado para imobilização foi adequado.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados de cada experimento do planejamento experimental.

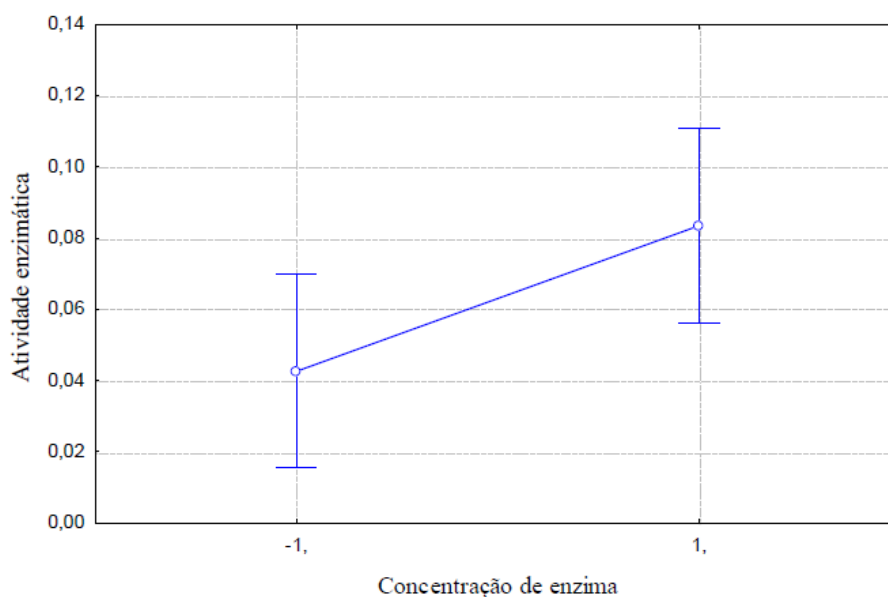
Tabela 2: Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento experimental 2²

Experimentos	Concentração de enzima (mL L ⁻¹)	Volume de glutaraldeído (mL)	Atividade U (g.glicose L ⁻¹ min g.suporte ⁻¹)
1	1 (-1)	3,75 (1)	0,0438
2	3 (0)	2,5 (0)	0,0316
3	5 (1)	1,25 (-1)	0,0880
4	3 (0)	2,5 (0)	0,0356
5	3 (0)	2,5 (0)	0,0420
6	1 (-1)	1,25 (-1)	0,0414
7	5 (1)	3,75 (1)	0,0790
8	3 (0)	2,5 (0)	0,0458

Analisando a Tabela 2 pode-se observar que a atividade variou de 0,0316 a 0,0880 U. Sendo o maior valor de atividade no experimento 3 que é o ponto de maior concentração de enzima. Os resultados obtidos de atividade enzimática foram ajustados pelo planejamento experimental 2², utilizando o software *Statistica 7.0*. Foi considerado, nível de confiança de 90%, valor $p < 0,1$. A variável significativa do modelo foi a concentração de enzima, sendo $p = 0,0207$ para a concentração de enzima e $p = 0,4398$ para o volume de glutaraldeído.

A Figura 1 apresenta o comportamento da variável resposta.

Figura 1: Comportamento da variável resposta



Observando a Figura 1 verifica-se que a tendência de melhores atividades ocorre com maior concentração de enzima, o que é esperado visto que há mais biocatalisador para



hidrolisar o mesmo volume de solução. Esta tendência pode ser confirmada nos experimentos 3 e 7, indicados na Tabela 2. A quantidade de glutaraldeído não foi significativa no processo o que pode estar relacionado com a concentração alta para uma pequena variação dos volumes analisados.

4. CONCLUSÃO

As atividades enzimáticas obtidas nos ensaios com a enzima livre e imobilizada foram próximas sugerindo que o procedimento de adsorção física utilizando a resina Duolite foi eficiente para a imobilização da enzima.

Com os resultados obtidos no planejamento experimental foi possível observar que quanto maior a concentração de enzima maior foi a atividade enzimática, e que o volume de glutaraldeído não apresentou influência significativa no processo. Entretanto, a atividade da enzima imobilizada, sem o tratamento de glutaraldeído, foi maior quando comparado aos ensaios realizados com imobilização e posterior ligação cruzada. Indicando a necessidade em melhorar o processo de reticulação a fim de tornar viável econômica e industrialmente a hidrólise da lactose.

Diante desse contexto, os resultados foram satisfatórios, pois demonstram caminhos promissores para o processo de imobilização de enzima, hidrólise de lactose e aproveitamento de resíduos e subprodutos agroindustriais.

6. REFERÊNCIAS

- BAILEY J. E.; OLLIS D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second edition. New York, 1986.
- CHIBATA I. *Immobilized Enzymes-Research and Development*. Tokyo. Kadansha Ltd, 1978.
- FISCHER, J.; · GUIDINI, C. Z.; · SANTANA, L. N. S.; · RESENDE, M. M.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E. J. Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013.
- GANZLE M.G., HAASE G., GELLEN P. *Lactose: Crystallization, hydrolysis and valueadded derivatives*, 2008.
- GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. *Hidrolisis of lactose: A Literature Review*. *Process Biochemistry*, v. 20, 1985.
- GUIDINI, Z. C. Imobilização de β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Resinas de Troca Iônica. Dissertação Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2009.



- GUIDINI, C.Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L.N.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking, *Biochem. Eng. J.*, v. 52, 2010.
- JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A New Kinetic Model Proposed for Enzymatic Hydrolysis of Lactose by β -galactosidase from *Kluyromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 31, 2002.
- KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S. Enzyme immobilization. *Enzyme Technology*, 1987.
- LETCA, D.; HEMMERLING, C.; WALTER, M.; WULLBRAND, D.; BUCHHOLZ, K. Immobilization of Recombinant Inulase II from a Genetically Modified *Escherichia coli* Strain. *Roumanian Society of Biological Sciences*, 9, 1879-1886, 2004.
- MAGALHÃES, K. T. et al. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chemistry*, 2011.
- MANDELS, M., L. HONTZ e J. NYSTROM. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnology Bioengineering*, 1974.
- MATEO, C.; ABIAN O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 509-515, 2000.
- MUKHOPADHYAY, R.; TALUKDAR, D.; CHATTERJEE, B. P. and GUHA, A. K. Whey processing with chitosan and isolation of lactose. *Process Biochemistry*, 39, 2003.
- PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Research*, v. 2010, 2010.
- Rohm Haas. Disponível em: <<http://www.rohmhaas.com/ionexchange>>. Acesso em 4 de março, 2019.
- VAN de VOORDE, I.; GOIRIS, K.; SYRYN, E.; VANDEN, B. C.; AERTS, G.. *Process Biochemistry*, 2014.