

## Determination of the Activity of the Enzyme $\beta$ -galactosidase by Lactose Whey Cheese

### Determinação da Atividade da Enzima $\beta$ -galactosidase por Lactose do Soro de Queijo

Títulos abreviados:

Determination of the Activity of the Enzyme  $\beta$ -Galactosidase

Determinação da Atividade da Enzima  $\beta$ -Galactosidase

Bruna Payão Rossetto<sup>1\*</sup>; Flávio Faria de Moraes<sup>2</sup>; Gisella Maria Zanin<sup>3</sup>

#### ABSTRACT

The enzyme  $\beta$ -galactosidase is used in the hydrolysis of lactose, which are produced from lactose present in the whey, glucose and galactose, and can be also produced some oligosaccharides such as galacto-oligosaccharides (GOS) which are nondigestible sugars, ensuring foods with a low lactose content, improving the solubility and digestibility of milk and derivatives. The objective of this study was to determine the specific activity of the enzyme as a function of pH and temperature and its thermal stability, for later use in the synthesis of galacto-oligosaccharides (GOS). By the tests carried out, the maximum activity of the enzyme was at pH 6.5 and 45 °C and it reached 2.67 U/mg of protein, although the enzyme was most stable at 40 °C. At this temperature the enzyme reached 2.35 U/mg of protein, only 1.1 times lower than 45 °C, so their use is more feasible at 40 °C.

**Key words:** whey,  $\beta$ -galactosidase specific activity and thermal stability.

#### RESUMO

A enzima  $\beta$ -galactosidase é utilizada na hidrólise da lactose, onde são produzidos a partir da lactose presente no soro, a glicose e galactose, podendo ser produzidos também alguns oligossacarídeos como os galacto-oligossacarídeos (GOS), que são açúcares não digeríveis, garantindo alimentos com baixo teor de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados. O objetivo do trabalho foi determinar a atividade específica da enzima em função do pH e da temperatura e sua estabilidade térmica, para posterior utilização na síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS). A partir dos testes realizados, a atividade máxima da enzima foi encontrada em pH 6,5 e a 45 °C, atingindo 2,67 U/mg de proteína, porém a enzima se apresentou mais estável a 40 °C. Nesta temperatura a enzima atingiu atividade de 2,35 U/mg de proteína, aproximadamente 12% menor que a 45 °C, sendo assim, mais recomendável sua utilização a 40 °C.

**Palavras-chave:** soro de leite,  $\beta$ -galactosidase, atividade específica e estabilidade térmica.

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Engenharia Química. Avenida Colombo, 5.790, Bloco D-90 – 87020-900 – Maringá – Paraná.

\* Autor para correspondência: brunarossetto6@hotmail.com

<sup>2</sup> flavio@deq.uem.br

<sup>3</sup> giselladeq@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Por muito tempo o soro de queijo foi visto somente como um subproduto, obtido da fabricação de queijos, sendo o mesmo rico em proteínas, lactose, minerais e vitaminas (TEIXEIRA, 2008). O soro de leite é em grande parte, descartado em rios provocando graves problemas ambientais devido à alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cerca de aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico (ALENCAR, 2011). Por isso, há uma busca por novas alternativas para o processamento da lactose presente no soro de queijo como um passo crucial para que as indústrias possam respeitar as legislações ambientais.

A lactose é um dissacarídeo, que ao sofrer hidrólise, forma como produtos glicose e galactose. A hidrólise enzimática da lactose, tem se mostrado um dos métodos mais promissores para remover a lactose do leite e de seus subprodutos, como o soro. Dependendo do nível de hidrólise, o leite com lactose pré-digerida terá um gosto ligeiramente mais doce. Durante a hidrólise enzimática da lactose, além dos principais produtos da hidrólise, que são a glicose e galactose, quantidades consideráveis de oligossacarídeos são formados (CARMINATTI, 2001).

A importância industrial da  $\beta$ -galactosidase está em sua aplicação na indústria de laticínios, pois garante alimentos com baixo teor de lactose, melhor solubilidade e digestibilidade do leite e derivados (TOMAL, 2010), por essa razão a lactose é geralmente hidrolisada antes da sua utilização (MATIOLI, 2001). Com isso, os problemas associados com a eliminação do soro, cristalização de lactose em certos alimentos congelados e o consumo de leite por indivíduos com intolerância à lactose podem ser reduzidos (SANTOS, 2006).

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi determinar a atividade enzimática da enzima  $\beta$ -galactosidase, a atividade específica em função do pH e da temperatura e a estabilidade térmica da enzima, para posterior aplicação na síntese de galacto-oligossacarídeos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

O soro de leite em pó utilizado foi doado pela empresa Cargil S/A.

A enzima  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* Lactozym®

2600L foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich.

### Caracterização do soro de leite

O soro de leite utilizado na determinação da atividade enzimática foi caracterizado conforme teor de umidade (AOAC, 1995) em estufa a 105 °C, cinzas (AOAC, 1995) em mufla a 500-550 °C, proteínas pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995), sendo o fator de conversão utilizado igual a 6,38, gordura pelo método de Roese-Gottlieb (AOAC, 1995) e lactose pelo método DNS (MILLER, 1959) modificado pelo Laboratório Berkeley (açúcares redutores) (ZANIN e MORAES, 1987). O teor de proteína da enzima foi determinado pelo método de Bradford.

### Determinação da atividade enzimática

Para a preparação de 100 mL da solução de soro utilizada na determinação da atividade enzimática com 5% (m/v) de lactose foi utilizado 10% (v/v) de solução tampão especial recomendada pelo NOVO INDUSTRI em pH 6,5. Esse tampão contém os mesmos componentes do leite de vaca (MATIOLI, 1991 e NOVO, 1979).

**Tabela 1** - Características da solução tampão.

Reagentes	Quantidade (mmol/L)
Citrato de $\text{Na}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,70
Ácido Cítrico $\cdot \text{H}_2\text{O}$	7,91
$\text{K}_2\text{SO}_4$	1,03
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2,99
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10,80
KOH	19,43
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,08
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,10
NaOH 4N	10,00
$\text{NaHCO}_3$	3,33

Para a determinação da atividade enzimática foi empregado o método das velocidades iniciais. Em um reator batelada adicionou-se 50 ml da solução de lactose 5% (m/v) em pH 6,5, e estabilizou-se a temperatura do banho em 45°C. Adicionou-se 1,0 ml da enzima na concentração adequada (1:50). Após 15 segundos uma amostra de 0,5 ml foi retirada e adicionada em um tubo com 1,0 ml de água, o tubo foi tampado e levado em água fervente por 10 minutos

para a inativação da enzima (MATIOLI, 1991). Esse foi o padrão. As demais amostras foram retiradas de 5 em 5 minutos até completar 30 minutos. As amostras foram armazenadas em 4 °C até a determinação da concentração de glicose pelo método GOD-PAD (TRINDER, 1969). As amostras foram lidas em espectrofotômetro (525 nm).

#### Determinação da atividade específica em função do pH e da temperatura

Para o ensaio de atividade específica em função do pH e da temperatura foi utilizada a mesma metodologia para a determinação da atividade enzimática. Foram testadas faixas de pH de 6,0 a 7,5 e temperatura de 30 a 50 °C. A atividade específica foi calculada pelo coeficiente angular da reta de ajuste da concentração de glicose em função do tempo, dividido pelo teor de proteína da enzima (12,48 mg/ml de solução). Para pH de 6,0 a 7,0 foi utilizada solução tampão hidrogênio fosfato dissódico 0,1 M + ácido cítrico 0,1 M preparada pelo método de McIlvaine (MORITA, 2007) e para pH 7,5 foi ajustado com tampão NOVO (MATIOLI, 1991) e solução de NaOH 4N.

#### Determinação da estabilidade térmica da enzima

Para o teste de estabilidade térmica foi utilizada uma solução de lactose 5% (m/v) pH 6,5, sendo o teor de lactose total do soro de leite em pó de 58,5%. A faixa de temperatura testada foi de 30 a 50 °C com intervalos de 5 °C. Em um tubo de ensaio, adicionou-se a enzima pura (0,2 mL) na solução de lactose para obter a diluição desejada (1:50). Foi retirada uma amostra de 1,0 ml desse tubo e adicionada no reator com 50 ml da solução de lactose, estabilizada na temperatura de 45 °C, o teste se repetiu conforme descrito na determinação da atividade enzimática. Esse foi o tempo zero. As demais amostras foram retiradas após a estabilização da temperatura de teste desejada a cada 40 minutos até completar 240 minutos (MATIOLI, 1991).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Caracterização do soro de leite

O resultado da caracterização do soro de leite (%) utilizado nos experimentos segue na Tabela 1.

**Tabela 2** - Composição do soro de leite em pó.

Análises	Resultados
Umidade	2,08 ± 0,03
Cinzas	6,79 ± 0,01
Proteína	11,97 ± 0,01
Gordura	1,48 ± 0,00
Carboidratos	77,68 ± 0,01

Os carboidratos foram determinados pelo método da diferença, sendo 58,5% deste total o teor de lactose presente no soro do leite, determinado pelo método dos açúcares redutores (DNS).

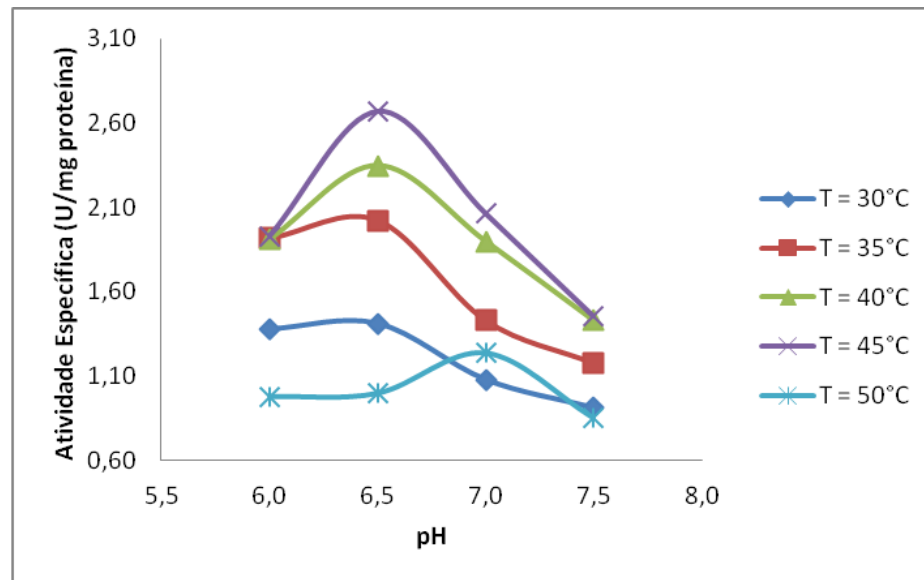
Os resultados encontrados estão em conformidade com o padrão estabelecido no Codex Alimentarius (versão 2006), que prevê valor máximo de 5,0% (m/m) para umidade e 9,5% (m/m) para cinzas, valor mínimo de proteína de 11,0% (m/m) e os valores de referencia de 61,0% (m/m) de lactose e 2,0% (m/m) de gordura.

O teor de proteína da enzima  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* foi de 12,48 mg/mL de solução.

#### Atividade específica da enzima em função do pH e da temperatura

A Figura 1 apresenta os resultados da atividade específica da enzima em função do pH e da temperatura, sendo que os maiores valores da atividade foram encontrados em pH 6,5 com exceção da temperatura de 50 °C, e os menores resultados foram determinados em pH 7,5, sendo na temperatura de 50 °C as menores atividades. Em função da temperatura, os maiores valores de atividade foram em 45°C, sendo a atividade máxima igual a 2,67 U/mg de proteína, obtida em pH 6,5 e 45°C, coerente com os apresentados por Matioli (1991), que encontrou atividade máxima da enzima (3,12 U/mg de proteína) em pH 6,5 na temperatura de 45 °C, sendo os maiores valores da atividade também encontrados em 45 °C, em relação ao pH também houve coerência, visto que as maiores atividades foram determinadas em pH 6,5. O pH ótimo encontrado foi compatível também com o apresentado por Otieno (2010), que determinou pH 6,5 como o ótimo para essa enzima.

**Figura 1** - Atividade específica em função do pH e da temperatura.

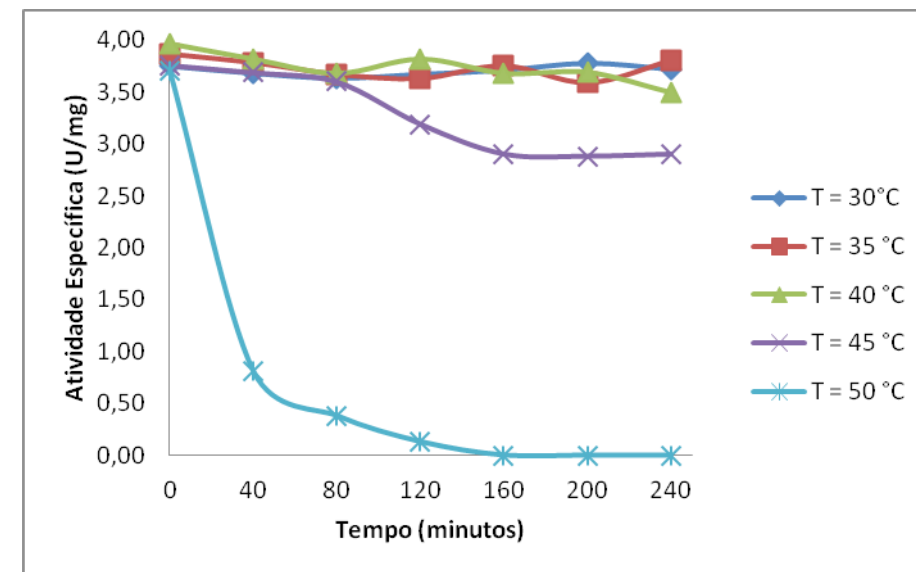


#### Estabilidade térmica da enzima

A Figura 2 mostra os resultados da estabilidade térmica, onde observa-se que nas temperaturas de 30, 35 e 40°C a enzima mostrou-se bem estável durante todo o ensaio. Já na temperatura de 45 °C a enzima perdeu 19,44% de sua atividade após 80 minutos e a 50 °C, após 40 minutos estava praticamente inativa. Embora a maior atividade da enzima tenha sido encontrada a 45 °C, a mesma sofreu inativação térmica em pouco tempo nessa temperatura, portanto sua aplicação em longas reações deve ser realizada em temperaturas inferiores a 45 °C.

Os resultados encontrados por Mاتيoli (1991), também concluiu que apesar da atividade máxima ser encontrada a 45 °C, a temperatura recomendada para processos de longos períodos é 40 °C (2,81 U/mg de proteína), por apresentar-se mais estável e apenas 10% menor que a 45 °C (3,12 U/mg de proteína)

**Figura 2** - Estabilidade térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase.



#### CONCLUSÃO

A enzima  $\beta$ -galactosidase apresentou atividade máxima em pH 6,5 e temperatura de 45 °C (2,67 U/mg de proteína), enquanto a menor atividade foi no ensaio com pH 7,5 e temperatura de 50 °C (0,85 U/mg de proteína). Apesar de a enzima ter uma maior atividade em 45 °C, a mesma apresentou ser mais estável em 40 °C. Nessa temperatura a atividade é de 2,35 U/mg de proteína, aproximadamente 12% (11,99%) menor que a 45 °C, portanto, seu uso torna-se mais recomendável a 40 °C.

#### AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16 th edition. Virginia, USA, 1995.

ALENCAR, A. A. **Produção de bacitracina por *Bacillus licheniformis* (UCP1010) utilizando meio alternativo à base de soro de leite**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais), Universidade Católica de Pernambuco, 2011.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reactor a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS. **Standard for whey powder**. Codex Stan A - 15 - 1995, (2006).

LISBOA, C. R. **Síntese enzimática de galactooligossacarídeos a partir de lactose e soro de leite**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos), Universidade Estadual do Rio Grande, 2008.

MATIOLI, G. **Hidrólise da lactose com a enzima beta-galactosidase – Modelagem cinética**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, 1991. (UEL).

MATIOLI, G., MORAES, F. F. e ZANIN, G. M. Hydrolysis of lactose by betagalactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, p. 655-659, 2001.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORITA, T e ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação com indicadores de segurança e de descarte de produtos químicos**, 2ª. edição. São Paulo: Editora Blucher, 2007.

NOVO **Application of yeast lactase: a review**. Bagsvaerd: Novo Nordisk. 1979, p. 28. Novo's file number A 5489.

OTIENO, D. O. Synthesis of  $\beta$ -Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial  $\beta$ -Galactosidases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 9, p. 474, 2010.

SANTOS, R. **Produção de galactooligossacarídeos por lactase fúngica**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2006.

TEIXEIRA, L. V, e FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p. 243-250, 2008.

TOMAL, A. A. B., CUNHA, M. E. T., BOSSO, A., YOUSSEF, E. Y. e SUGUIMOTO, H. H. Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galactooligossacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas. **Científica, Ciências biológicas e da saúde**, v. 12, n. 4, p. 41-49, 2010.

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.

ZANIN, G. M. e MORAES, F. F. **Tecnologia de Imobilização de Células e Enzimas Aplicada à Produção de Álcool de Biomassas**. Relatório nº 2, junho, p. 315-321, 1987.

Received 23 October 2012

Accepted 11 March 2013