

Utilização da β -galactosidase na Hidrólise da Lactose do Leite em Baixa Temperatura

Use of β -galactosidase on Hydrolysis of Milk Lactose in Low Temperature

Tarllis Carolina Álvares da Silva Campos^a; Wilmar Kruger D'Almeida^b; Lina Casale Aragon Alegro^c;
Salvador Massaguer Roig^d; Hélio Hiroshi Suguimoto^{e*}

Resumo

No segmento dos produtos lácteos, a hidrólise da lactose é amplamente estudada, seja pelo elevado índice de indivíduos com má absorção da lactose, bem como pelo aspecto tecnológico envolvendo este açúcar. Estima-se que mais de 58 milhões de brasileiros são acometidos pela hipolactasia, sendo que desses, mais de 37 milhões apresentam intolerância ao leite em decorrência da deficiência na síntese de β -galactosidase, enzima responsável pela hidrólise da lactose no intestino. Quanto ao aspecto tecnológico, a hidrólise da lactose é um importante processo na indústria de alimentos, pois este dissacarídeo possui baixa solubilidade e baixo poder adoçante. Sabe-se que a temperatura ótima de reação da β -galactosidase produzida pela levedura *Kluyveromyces lactis* é 35 °C; contudo, essa é a temperatura ótima de desenvolvimento de vários microrganismos deteriorantes e patogênicos. Assim, a fim de se evitar a multiplicação bacteriana no leite, a β -galactosidase tem sido utilizada em temperatura abaixo do valor ótimo de reação dessa enzima. Com o exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento dessa enzima em diferentes temperaturas, principalmente a de refrigeração. Amostras de leite com a enzima foram incubadas nas diferentes temperaturas e a concentração de glicose liberada foi quantificada pelo método de glicose-oxidase. A partir da regressão linear da curva de glicose, calculou-se a velocidade de hidrólise para cada tratamento. Nos tratamentos próximos a temperatura ótima de reação da enzima a hidrólise foi acima de 90% do total da lactose presente no leite. Nestas condições a velocidade foi maior quando comparada com a utilização de baixas temperaturas. Porém, esses resultados foram melhorados quando foram adicionadas sobrecargas de β -galactosidase nos leites incubados a 4 °C, tornando a hidrólise da lactose viável industrialmente em temperaturas de refrigeração, garantindo, assim, a qualidade microbiológica do leite.

Palavras-chave: Lactose. β -galactosidase. Hidrólise. Temperatura.

Abstract

*In the dairy segment, the lactose hydrolysis is widely studied due to the high number of people who don't absorb lactose properly, as well as to the technological aspect involving this sugar. It is estimated that more than 58 million Brazilians are afflicted by hypolactasia, and among them, more than 37 million have milk intolerance due to deficiency in the synthesis of β -galactosidase, an enzyme responsible for hydrolysis of lactose in the intestine. As for the technological aspect, the hydrolysis of lactose is an important process in the food industry, because this disaccharide has low solubility and low sweetness. It is known that the ideal temperature for reaction of β -galactosidase produced by yeast *Kluyveromyces lactis* is 35 °C, however, this is also the ideal temperature for the development of several spoilage and pathogenic microorganisms. Thus, in order to avoid bacterial growth in milk, β -galactosidase has been used at temperatures below the ideal value. With that, the goal was to study the behavior of this enzyme at different temperatures, especially refrigeration. Milk samples were incubated with the enzyme at different temperatures and the concentration of glucose released was quantified by the glucose oxidase. From the linear regression curve of glucose, we calculated the rate of hydrolysis for each treatment. In treatments near the ideal temperature for the enzyme hydrolysis reaction was over 90% of the lactose in milk. Under these conditions the speed was higher when compared with the use of low temperatures. However, these results were improved when β -galactosidase was overused in the milk incubated at 4 °C, making the hydrolysis of lactose in industrially viable refrigeration temperatures, thus ensuring the microbiological quality of milk.*

Key words: Lactose. β -galactosidase. Hydrolysis. Temperature.

^a Discente do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite – Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: tarllis@hotmail.com.

^b Discente do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite - Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: w.kruger@uol.com.br.

^c Doutora em Ciência dos Alimentos. Docente da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: lcalegro@yahoo.com.br.

^d Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Docente da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: salvadormassaguer@hotmail.com.

^e Doutor em Ciência de Alimentos. – Universidade Estadual de Londrina (UEL). Docente da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: heliohs@unopar.br.

* Endereço para correspondência: Rua Marselha, 183, 86041-100, Jardim Piza, Londrina, PR.

1 Introdução

A lactose é o principal carboidrato do leite, sendo o constituinte predominante e menos variável em sua matéria

seca^{1,2}. É um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose ligada a uma de galactose, que está presente no leite de todos os mamíferos na concentração de 2% a 10%, sendo encontrada, no leite de vaca, com concentração média de 4,8%¹.

Esse carboidrato apresenta o mesmo peso molecular da sacarose, diferindo desta na configuração molecular, no poder edulcorante, na solubilidade e no poder redutor. A lactose é cerca de dez vezes menos solúvel que a sacarose, o que pode causar cristalização e, conseqüentemente, problemas tecnológicos durante o processamento de alguns produtos na indústria de laticínios³.

Do ponto de vista nutricional, a lactose promove a absorção de cálcio e fósforo, o que é especialmente útil em formulações infantis. Porém, o alto nível de lactose presente no leite, restringe o consumo deste alimento por pessoas

que apresentam intolerância a esse dissacarídeo, devido à deficiência dessa enzima no intestino delgado e, como consequência, à incapacidade de digerir a lactose⁴.

Assim, é de grande importância nutricional e comercial a redução do teor de lactose no leite e em seus derivados, sendo a hidrólise enzimática, com a utilização da β -galactosidase, um dos métodos mais interessantes para esta finalidade⁵. A hidrólise da lactose realizada com essa enzima é um processo usado em escala industrial e que conduz à formação de produtos mais facilmente digeríveis, mais doces e que previnem a cristalização da lactose na produção, por exemplo, de sorvetes e doces de leite⁶. Os queijos manufaturados com leite contendo lactose hidrolisada maturam mais rapidamente que aqueles produzidos com leite com lactose íntegra⁷.

A hidrólise enzimática da lactose do leite pode ser realizada de duas maneiras: 1) o leite cru é esterilizado e, depois do resfriamento, a lactase é adicionada e o leite é embalado assepticamente; 2) o leite cru é pasteurizado e, após o resfriamento, a lactase é adicionada, sendo que a hidrólise ocorre no tanque de armazenamento. Assim que termina a hidrólise da lactose, é realizada a esterilização e o envase asséptico⁸.

O desenvolvimento de processos comerciais para o isolamento de β -galactosidase a partir de diferentes fontes microbianas aumentou as possibilidades de hidrólise da lactose. Várias β -galactosidasas têm sido estudadas para a elaboração de leite e produtos lácteos com lactose reduzida, devido, principalmente, ao problema de intolerância à lactose^{7,9}.

As propriedades das β -galactosidasas, como temperatura e pH ótimos, diferem de acordo com sua fonte e com o método de preparação comercial. O pH ótimo pode variar de 3,0 a 7,5, e a temperatura ótima, de 35 a 80 °C, dependendo de qual microrganismo ela foi isolada¹⁰. Uma β -galactosidase comercial bastante utilizada na hidrólise da lactose do leite é a derivada da levedura *Kluyveromyces lactis*. Segundo Gekas e Lopez-Leiva¹⁰, a faixa de pH ótima para atividade dessa enzima é de 6,9-7,3, e a temperatura ótima, 35 °C.

Apesar dessa temperatura ótima de atividade da lactase, sabe-se que manter o leite sob refrigeração é uma das principais e mais antigas maneiras de se controlar a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Devido à grande quantidade de nutrientes, ao pH próximo ao neutro e à alta atividade de água, esse alimento é bastante susceptível ao ataque de um grande número de microrganismos, provenientes do próprio animal, do homem e dos utensílios usados na ordenha¹¹.

Pelo exposto, o objetivo deste trabalho foi comparar o comportamento da β -galactosidase na hidrólise da lactose do leite incubado em diferentes temperaturas, variando entre 4 e 40 °C.

2 Material e Métodos

Todos os experimentos foram realizados nos laboratórios do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, na Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

2.1 Material

Para a realização deste trabalho foram utilizados leite UHT integral (Frimesa) e enzima β -galactosidase derivada de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact® – L500).

2.2 Métodos

2.2.1 Hidrólise da lactose

A hidrólise da lactose foi realizada adicionando-se 0,24 g da enzima β -galactosidase em alíquotas de 300 mL de leite UHT integral, totalizando cinco amostras. Cada uma delas foi incubada em uma das temperaturas: 4, 10, 20, 30 e 40 °C. O tempo total do experimento variou para cada amostra, de acordo com a temperatura de incubação. Na temperatura de 4 °C, também foi testado o efeito de sobrecarga de enzima após 2, 4 e 6 horas de hidrólise. Para isso, 0,24 g da enzima foi adicionada inicialmente e 0,24 g, a cada duas horas. Todo o experimento foi repetido três vezes.

2.2.2 Amostragem

Foram retiradas alíquotas de 10 mL, em intervalos de tempo variando de acordo com a temperatura de incubação da amostra. As alíquotas foram aquecidas a 95 °C, durante cinco minutos, para que a atividade da enzima fosse interrompida, resfriadas e utilizadas para a determinação de glicose.

2.2.3 Determinação da concentração de glicose

A Determinação de glicose foi realizada pelo método glicose-oxidase, utilizando-se o Kit Glicose P-P (Analisa®), que se baseia na oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, pela glicose oxidase. A absorbância foi medida em 505 nm. Os resultados foram calculados em mg/dL de glicose e expressos em porcentagem.

2.2.4 Análise dos dados

Para se avaliar o comportamento da lactase nas diferentes temperaturas, foram calculadas as médias dos valores de glicose obtidos nos três experimentos e expressas nas curvas de hidrólise. A partir desses dados, por regressão linear, as velocidades de hidrólise foram calculadas.

3 Resultados e Discussão

A lactose é um dissacarídeo que, quando submetido à ação da enzima lactase, é quebrado em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose. Desta forma, uma vez que a concentração de glicose é inversamente proporcional à concentração de lactose presente na amostra, neste trabalho, a porcentagem de hidrólise no leite foi medida pela concentração de glicose.

A concentração de lactose na amostra do leite foi de 4,8%. Portanto, se toda ela for hidrolisada a concentração máxima de glicose será de 2,4%. Este valor foi utilizado para o cálculo da eficiência da hidrólise.

Nota-se, na figura 1, que as curvas de hidrólise foram semelhantes nas amostras incubadas a 30 e 40 °C, atingindo a

concentração máxima de glicose próximo a 5 horas. A eficiência de 90% de hidrólise da lactose foi alcançada nos tempos 3,5 e 4 horas de incubação, respectivamente. Esse resultado era esperado, uma vez que a temperatura ótima de ação da enzima utilizada nesse trabalho, que proporciona uma maior atividade, é 35 °C¹⁰.

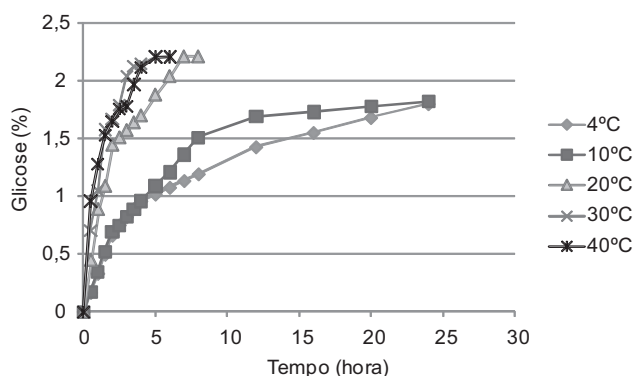


Figura 1. Curva de hidrólise de lactose do leite incubado em diferentes temperaturas.

Na temperatura de 20 °C, como a temperatura está abaixo da ótima de reação da enzima, o tempo para alcançar 90% de hidrólise foi de aproximadamente 7 horas.

Quando incubado em temperaturas bem mais baixas que a ideal para a enzima, a 4 e a 10 °C, verificou-se que, mesmo após 24 horas de reação, apenas 75% da lactose presente no leite foi hidrolisada, 15% a menos que a necessária para alcançar o mínimo exigido comercialmente para ser considerado leite deslactosado ou baixa lactose, que é acima de 90%.

A partir da regressão linear dos dados da figura 1, a velocidade de hidrólise em cada amostra foi calculada. Na figura 2, os valores de velocidade foram divididos em dois períodos: de 0 a 2 horas, e de 2 a 4 horas. Esses períodos foram selecionados por serem os de maior ação da enzima β -galactosidase.

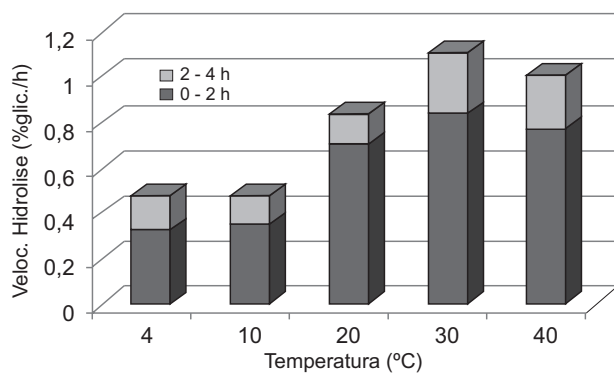


Figura 2. Velocidade da hidrólise da lactose, expressa em %glicose/h, em cada temperatura, durante as quatro primeiras horas.

Em todas as temperaturas a maior velocidade de hidrólise ocorreu nas duas primeiras horas, sendo que nas temperaturas de 30 e 40 °C, os valores foram de 0,84 e 0,77% glicose/hora, respectivamente. Conforme a temperatura diminuiu, o mesmo aconteceu com a velocidade de hidrólise, sendo que nas

temperaturas de 4 e 10 °C os valores foram de 0,33 e 0,35% glicose/hora, respectivamente. Isso representa menos da metade da velocidade das temperaturas consideradas ótimas para ação da enzima.

No período subsequente, entre 2 e 4 horas, a velocidade de hidrólise da lactose nas diferentes temperaturas foi menor que nas primeiras duas horas, variando entre 0,12 e 0,23 % glicose/h (figura 2), indicando uma acentuada diminuição da ação enzimática.

Considerando que a temperatura de 4 °C é a mais importante para fins de conservação do leite sob o aspecto microbiológico, foi testada também a hidrólise com sobrecargas de β -galactosidase. Quando foram adicionadas sobrecargas de enzima, a cada duas horas, pôde-se observar que, após um período de 7 horas de hidrólise, 92% da lactose foi hidrolisada, valor semelhante à obtida nas temperaturas de 30 e 40 °C (figuras 1 e 3). No leite com adição da enzima somente no início do processo, observou-se a hidrólise de 47,1% de lactose, no mesmo período, mostrando a importância dessa sobrecarga de lactase durante o processo (figura 3).

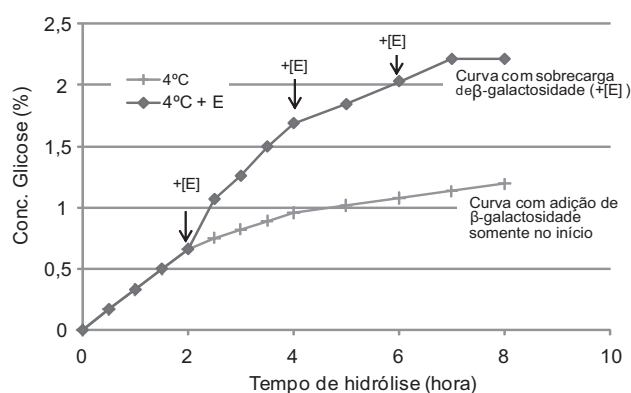


Figura 3. Curva de hidrólise da lactose do leite a 4 °C e com sobrecarga de β -galactosidase (4 °C + E) a cada 2 horas

Na Figura 4, observam-se as velocidades de hidrólise da lactose no leite adicionado de lactase somente no início, e com sobrecarga dessa enzima. Em ambos os casos a velocidade de hidrólise nas duas primeiras horas foram iguais com valor de 0,33% glicose/h.

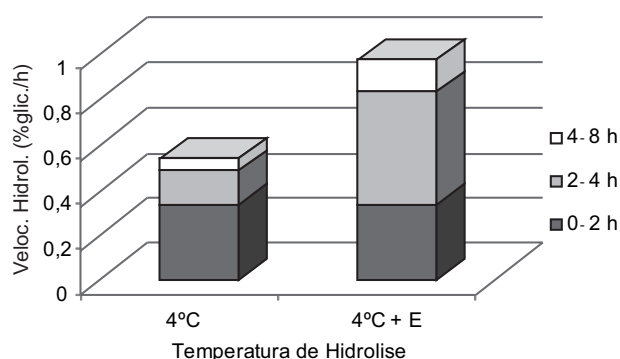


Figura 4. Velocidade de hidrólise da lactose em leite a 4 °C com e sem sobrecarga de β -galactosidase.

No período entre duas a quatro horas, com a primeira sobrecarga de enzima, a velocidade de hidrólise da lactose foi de 3,4 vezes maior do que no leite em que a enzima foi adicionada somente no início, com valor de 0,5% glicose/h.

Os resultados indicam que a sobrecarga de enzima é uma estratégia interessante para que a hidrólise da lactose do leite seja realizada em um curto período de tempo, portanto mais viável para a indústria láctea, podendo ser realizada em uma temperatura que evita a multiplicação da maioria dos microrganismos patogênicos e deteriorantes, inclusive em leite cru, com velocidade relativamente alta para essa temperatura, levando à hidrólise quase total da lactose presente no leite.

4 Conclusão

A hidrólise da lactose do leite em baixas temperaturas é possível, apesar da velocidade do processo se apresentar diminuída, quando comparada com o uso da β -galactosidase em temperaturas próximas da ideal dessa enzima. A sobrecarga de enzima durante o processo de hidrólise a 4 °C possibilita a utilização da enzima com expressiva redução de tempo de reação tornando-a mais viável para a indústria e garantindo a qualidade microbiológica do leite.

Referências

1. Gousaud J. O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas. In: Luquet F M. O leite: do úbere à fábrica de laticínios. Portugal: Publicações Europa-America Lda, 1985;1:31-56.
2. Albuquerque LC. O leite em suas mãos. Juiz de Fora: Concorde Editora Gráfica, 1997. 150p.
3. Valsechi O. Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados. Araras: UFSCar, 2001. 36p. Apostila.
4. Varnam AH, Sutherland JP. Leche e productos lácteos: tecnología, química y microbiología. Zaragoza: Acribia, 1995. 476p.
5. Matioli G., Moraes FF, Zanin GM. Hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. Acta Scientiarum. 2001;23: 655-9.
6. Andrade VT, Brandão SCC, Alvim TC. Sorvete de doce de leite delactosado. In: XXI Congresso Nacional de Laticínios, 2004, Juiz de Fora. Anais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. 2004;59:126-30.
7. Kim SH, Lim KP, Kim HS. Differences in the hydrolysis of lactose and other substrates by β -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Journal of Dairy Science. 1997;80:2264- 9.
8. Vitolo M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: Aquarone E. (Coord.). Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001;4:387-420.
9. Maciunski J, Czys B, Synowiecki J. Isolation and some properties of β - galactosidase from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. Food Chemistry. 1998;63:441-5.
10. Gekas V, López-Leiva MH. Hydrolysis of lactose – a literature review. Process Biochemistry. 1985;20:2-12.
11. Leite CC, Guimarães AG, Assis PN, Silva MD, Andrade CSO. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador – Bahia. Revista Brasileira de Saúde e Produção. 2002;3:21-5.