

Formulação de microcápsula de proteína de soro de queijo com potencial para hidrólise de lactose**Cheese whey protein microcapsule formulation with lactose hydrolysis potential**

DOI:10.34117/bjdv6n3-057

Recebimento dos originais: 29/02/2020

Aceitação para publicação: 05/03/2020

Ariane Bachega

Graduada em Biomedicina

Instituição: Universidade Pitágoras Unopar

Endereço: Rua Marselha, 591. Londrina-PR

E-mail: ariane_bachega@hotmail.com

Alessandra Bosso

Doutor (a) em Ciência dos Alimentos

Instituição: Universidade Estadual de Londrina

Endereço: Rua Marselha, 591. Londrina-PR

E-mail: alessandrabosso@yahoo.com.br

Hélio Hiroshi Suguimoto

Doutor em Ciência dos Alimentos

Instituição: Universidade Estadual de Londrina

Endereço: Rua Marselha, 591. Londrina-PR

E-mail: helio.suguimoto@unopar.br

Luiz Rodrigo Ito Morioka

Doutor em Ciência dos Alimentos

Instituição: Universidade Estadual de Londrina

Endereço: Rua Marselha, 591. Londrina-PR

E-mail: luiz.morioka@kroton.com.br

RESUMO

O soro de queijo, considerado um subproduto dos laticínios, vem sendo utilizado para diversas finalidades por meio de processos biotecnológicos, por exemplo, na produção de whey protein e atualmente tem sido empregado como meio de cultivo a fim de se obter produtos com alto valor agregado, como a enzima β -galactosidase. A β -galactosidase é a enzima responsável pela quebra da lactose, açúcar do leite que causa desconforto a indivíduos intolerantes. O objetivo do trabalho foi a obtenção de uma microcápsula contendo a enzima β -galactosidase e as proteínas do soro de queijo com potencial de hidrólise da lactose. Para o experimento, utilizou-se o delineamento estatístico Box Behnken, com as variáveis independentes enzima

% (v/v), proteína do soro de queijo % (p/v) e número de microcápsulas, totalizando 9 formulações e 12 corridas. Para a produção das microcápsulas foi utilizada a mistura base contendo 2% (p/v) de alginato de sódio dissolvido em água destilada. Os demais componentes, enzima % (v/v) e proteína do soro de queijo % (p/v) tiveram suas quantidades variadas entre as formulações de acordo com o delineamento estatístico. As formulações foram gotejadas em uma solução de 0,4% (p/v) de cloreto de cálcio, diluído em água destilada e agitada em agitador magnético, maturaram nesta solução por 5 minutos. Após a etapa de maturação as microcápsulas foram lavadas, contadas e distribuídas em 12 Erlenmeyers contendo uma solução de 5% (p/v) de lactose P.A, diluída em tampão fosfato de potássio pH 6,8, seguindo o delineamento. Os frascos foram incubados a 37°C, a 120 rpm por 4 horas, após este período as amostras foram inativadas e foi realizada a dosagem de lactose pelo método de dosagem de metilamina. Observou-se que a corrida 7 obteve o melhor resultado atingindo 92,8% de hidrólise da lactose com a formulação de 0,5% de enzima, 5% de proteína e 20 microcápsulas.

Palavras-chave: Beta-galactosidade. Proteína. Microencapsulação. Alginato de Sódio.

ABSTRACT

Cheese whey, considered a by-product of dairy products, has been used for various purposes through biotechnological processes, for example in the production of whey protein, and is currently used as a cultivation medium to produce products with high added value, such as the enzyme β -galactosidase. β -galactosidase is the enzyme responsible for breaking down lactose, which causes discomfort to intolerant individuals. The objective of this work was to obtain a microcapsule containing β -galactosidase enzyme and cheese whey proteins with lactose hydrolysis potential. For the experiment, the Box Behnken statistical design was used, with the independent variables enzyme% (v/v), cheese whey protein % (w/v) and number of microcapsules, totaling 9 formulations and 12 runs. For the production of microcapsules, the base mixture containing 2% (w/v) sodium alginate dissolved in distilled water was used. The other components, enzyme% (v/v) and cheese whey protein % (w/v) had their amounts varied among formulations according to the statistical design. The formulations were dripped into a 0.4% (w/v) solution of calcium chloride, diluted in distilled water and stirred on a magnetic stirrer, matured in this solution for 5 minutes. After the maturation step, the microcapsules were washed, counted and distributed in 12 Erlenmeyers containing a 5% (w/v) lactose P.A solution diluted in pH 6.8 potassium phosphate buffer following the design. The flasks were incubated at 37 °C, at 120 rpm for 4 hours, after which time the samples were inactivated and lactose was measured by the methylamine dosing method. Race 7 had the best result reaching 92.8% lactose hydrolysis with the formulation of 0.5% enzyme, 5% protein and 20 microcapsules.

Keywords: Beta-galactosidase. Protein. Microencapsulation. Sodium Alginate.

1 INTRODUÇÃO

O leite se trata de um composto fluido sintetizado pelas glândulas mamárias, considerado um alimento de grande importância na nutrição humana, por ser um produto

alimentício rico em minerais e matérias orgânicas (GONZALEZ, 2001). No leite encontram-se também aproximadamente 5% (p/v) de lactose. Esse dissacarídeo é composto por uma molécula de glicose e uma molécula de galactose unidas por uma ligação beta 1-4 e é responsável pelo sabor adocicado do leite (WALSTRA et al., 2006). Grande parcela da população mundial sofre com a intolerância a lactose, que está relacionada a dificuldade de hidrolisar este açúcar para sua posterior absorção. Esta dificuldade de hidrólise da lactose é devido à falta ou a pouca produção da enzima β -galactosidase (MATTAR, 2010).

A enzima β -galactosidase é uma hidrolase com potencial industrial utilizada na hidrólise da lactose do leite e do soro de queijo, gerando alimentos com baixos níveis de lactose, cujo resultado é uma melhor solubilidade e digestibilidade de leite e produtos lácteos, tornando-os, ideal para os consumidores intolerantes a este açúcar (HUSAIN, 2010). A β -galactosidase hidrolisa a lactose em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose (JUERS, 2012). Esta enzima é sintetizada por microrganismos que possuem a capacidade de metabolizar a lactose, presente no meio de cultivo, devido a presença do gene Operon LacZ. Industrialmente a β -galactosidase é utilizada como matéria prima na produção de suplementos para a indústria alimentícia, farmacêutica e na área de cosméticos. Para sua síntese, microrganismos que metabolizam a lactose podem utilizar diferentes meios de cultura como por exemplo, o soro de queijo (DOMINGUES et al., 2010).

O soro de queijo é o líquido residual, contendo lactose, extraído a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína e pode ser obtido através de três processos principais: coagulação enzimática, resultando na precipitação de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos; precipitação ácida ao atingir o pH isoeletrico da caseína; e por separação física das micelas de caseína por filtração em fluxo tangencial, obtendo-se independentemente do processo um concentrado de micelas e as proteínas do soro de queijo, na forma de concentrado ou isolado proteico (BRASIL, 2005; SGARBIERI, 2005; HARAGUCHI et al., 2006; KRISANSSEN, 2007).

O soro de queijo, contém cerca de 55% dos nutrientes do leite entre elas as proteínas solúveis do soro de queijo conhecidas como “whey protein”. As principais famílias de proteínas do soro de queijo são as β -lactoglobulinas e as α -lactoalbuminas (ESCOBAR et al., 2014). Trabalhos recentes têm demonstrado que as proteínas do soro de queijo apresentam algumas vantagens sobre às caseínas do leite. Uma das explicações para tais vantagens pode estar relacionada à própria estrutura da caseína, pois, diferentemente das proteínas do soro, as caseínas do leite sofrem alteração conformacional, ou seja, se desnaturam na presença dos

ácidos estomacais e acabam perdendo parte de suas propriedades funcionais e, para ter função fisiológica, os peptídeos têm que ser absorvidos pelo intestino na sua forma ativa (PACHECO et al., 2005; RENHE, 2008). Dessa forma as proteínas do soro de queijo possuem atividade de gastro-resistência ao ambiente estomacal (GEBARA et al., 2013). Representando cerca 85% do volume de leite utilizado na produção do queijo e devido ao grande volume gerado, este subproduto, acaba sendo descartado com frequência pelas indústrias de laticínios por falta de aproveitamento (ALMEIDA, 2001). Atualmente pesquisas em diversas áreas utilizam este subproduto para fins biotecnológicos a fim de obter produtos e/ou processos de interesse industrial. Evitando assim, que o soro de queijo se torne um agente de poluição ambiental além de evitar impactos financeiramente negativos às indústrias (ALMEIDA, 2001; SANTOS, 2017). A demanda por soro de queijo tem aumentado para a obtenção de suas proteínas, β -lactoglobulina e a alfa-lactalbumina devido a seus altos valores funcionais e nutricionais. As proteínas de soro de queijo também têm várias aplicações na indústria farmacêutica (YADAV et al., 2015). A β -lactoglobulina apresenta médio peso molecular (18,4 a 36,8 kDa), o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado. A α -lactoalbumina com peso molecular de 14,2 kDa apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas (SGARBIERI, 2005; HARAGUCHI et al., 2006; KRISSENSEN, 2007; HERNÁNDEZ et al., 2008; RENHE, 2008; HARAGUCHI et al., 2006; SANTOS et al., 2011).

Os usos de enzimas em processos industriais na área de alimentos apresentam custo elevado, assim como forma de reduzir esse valor e possibilitar o emprego da tecnologia enzimática em diferentes segmentos industriais, estudos buscam desenvolver e aprimorar métodos de imobilização enzimática (BON, 2008). A imobilização pode ser feita utilizando diferentes suportes, orgânicos e inorgânicos, e por metodologias diferentes como microencapsulação, adsorção física, ligação covalente entre outras (GONÇALVES, 2007). O alginato é um polímero aniônico de ocorrência natural isolado de algas marrons que tem a capacidade de formar hidrogéis fortes (LEE & MOONEY, 2012). As microcápsulas de alginato carregadas com proteína podem ser fabricadas extrudindo uma solução de alginato de sódio contendo a proteína bioativa em uma solução de reticulação divalente, como por exemplo uma solução de cloreto de cálcio (GOMBOTZ & WEE, 2012).

Entre os processos de microencapsulação, está a produção de microcápsulas de alginato, por gelificação iônica, sendo que o alginato é considerado praticamente atóxico. Na indústria de alimentos, a aplicação principal dessa tecnologia envolve a proteção de compostos

ou células biologicamente ativos, de ambientes biológicos e fisiológicos deletérios para uma entrega eficiente nos locais de destino. (DOHERTY et al., 2011; PAQUES et al., 2014). O objetivo deste trabalho foi desenvolver microcápsulas de alginato contendo a enzima β -galactosidase e proteína do soro de queijo com potencial para a hidrólise da lactose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO

O soro de queijo *in natura* foi cedido pelo Laticínios Volpato[®] Ltda, localizada na cidade de Arapongas, Paraná, Brasil. O soro de queijo *in natura* foi filtrado em uma unidade de filtração (TIA Brasil, Araraquara-SP), em fluxo tangencial em escala piloto. Inicialmente o soro de queijo foi filtrado utilizando uma membrana de microfiltração com porosidade de 1,2 μm , para a retirada das sujidades e de microrganismos residuais. EM seguida o permeado do soro de queijo passou por uma nova filtração, utilizando uma membrana de ultrafiltração com porosidade de 0,020 μm acoplada. Após o processo de ultrafiltração, foi obtido o permeado e o concentrado (proteínas do soro de queijo). O concentrado foi congelado e posteriormente levado ao liofilizador (LIOBRAS[®], L101, São Carlos-SP) para a obtenção das proteínas do soro de queijo.

2.2 ENZIMA

A enzima β -galactosidase da marca MAXILACT LX5000 (Sedin Cedex, França), produzida a partir do microrganismo *Kluyveromyces lactis*, foi utilizada na formulação das microcápsulas sem nenhuma alteração da sua composição original.

2.3 MICROENCAPSULAÇÃO

Para a microencapsulação foram utilizados alginato de sódio P.A. (DINAMICA, Indaiatuba-SP), em um valor fixo de 2% (p/v), enzima β -galactosidase e a proteína do soro, sendo que as duas últimas frações da composição das microcápsulas variaram de acordo com o delineamento estatístico.

Os três componentes da microcápsula (alginato, enzima e proteína do soro) confeccionadas conforme o delineamento estatístico, foram dissolvidas em água destilada, até a formação de um gel homogêneo. Este gel foi gotejado, com o auxílio de uma pipeta pasteur, em uma solução de 0,4% (p/v) de cloreto de cálcio (ANIDROL, Diadema-SP), sob agitação constante (IKA[®], RH basic 2, Alemanha). As microcápsulas permaneceram na solução de

cloreto de cálcio por um período de 5 minutos. Em seguida as microcápsulas foram lavadas com água destilada e secas para a análise da atividade enzimática através da hidrólise da lactose.

2.4 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Para a obtenção das formulações foi utilizado o delineamento experimental fracionado de Box–Behnken (1960), pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). O planejamento e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa disponível “Statistica 10.0”. As três variáveis independentes em três níveis equidistantes estudadas foram: enzima beta-galactosidase (% p/v)–X1, proteína do soro de queijo (% p/v)–X2, e número de microcápsulas–X3, sendo a codificação (-1), (0) e (+1), representam os três níveis de cada variável, Tabela 1. A variável dependente foi a hidrólise da lactose (%).

Tabela 1 - Variáveis independentes do delineamento estatístico.

Variáveis Independentes	Níveis de Variação		
	-1	0	+1
Enzima (% p/v)–X1	4	5	6
Proteína (% p/v)–X2	0,2	0,6	1,0
Número de Microcápsulas–X3	25	30	35

2.5 HIDRÓLISE DA LACTOSE

A hidrólise da lactose foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL de capacidade com 50 mL de solução de lactose P.A. 5% p/v (SYNTH, Diadema–SP), diluída em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8. As vidrarias foram identificadas com números de 1 a 12 e cada frasco recebeu a formulação das microcápsulas correspondente ao número da corrida do delineamento estatístico.

Os frascos foram tampados com plástico filme PVC e levados em agitador orbital (TECNAL®, TE–420, Piracicaba–SP) a uma temperatura de 37°C, 120 rpm por 4 horas. Ao fim das 4 horas de hidrólise os frascos foram levados ao banho de água fervente por 5 minutos, com a finalidade de interromper a reação de hidrólise da lactose. As amostras foram acondicionadas em tubos falcon de 50 mL e resfriadas para posterior dosagem de lactose.

2.6 DOSAGEM DA LACTOSE

A determinação de lactose foi realizada utilizando-se a técnica descrita por Nickerson, Vujicic e Lin (1975), baseado na reação da lactose com a metilamina em solução alcalina.

A concentração de lactose (mg) foi obtida através da equação da reta de uma curva padrão de lactose P.A.. De acordo com a equação da reta a concentração de lactose inicial foi de 5,74%. O cálculo da lactose final (%), ou seja, após o tempo de hidrólise foi determinado com o resultado da concentração de lactose (mg) obtida nas amostras, conforme a equação 1:

$$\text{Lactose final (\%)} = \text{Abs}_{\text{amostra}} + 0,211 / 0,3115 / 1000 \times 100 / 0,222 \times \text{diluição (se houver).}$$

Equação 1.

Onde:

Lactose residual (%), corresponde à lactose ao final da hidrólise.

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$, corresponde de lactose na amostra.

0,211, equivale ao intercepto da equação da reta da curva padrão.

0,3115, equivale ao ângulo da equação da reta da curva padrão.

1000, para passar de mg para g de lactose.

100, para converter em g/100 mL.

0,222, equivale ao fator da lactose da curva padrão.

Para o cálculo da hidrólise da lactose (%) utilizou-se a equação 2:

$$\text{Hidrólise da lactose (\%)} = \text{PLI} - \text{PLF} / \text{PLI} \times 100$$

Equação 2.

Onde:

Hidrólise da lactose (%), corresponde à hidrólise da lactose.

PLI, porcentagem da lactose inicial.

PLF, porcentagem da lactose final.

2.7 ELETROFORESE SDS–PAGE

O efeito da filtração em fluxo tangencial na separação das proteínas do soro de queijo foi determinado por SDS–PAGE em 12,5% de gel de separação e 5% de gel espaçador, conforme descrito por Grewal et al. (2017), com modificações. Para desnaturação das

amostras, 100 μ L da amostra foi tratado com 250 μ L de solução tampão (60 mg de Tris, 800 μ L de glicerol, 100 mg de *dodecil sulfato* de sódio (“Sodium Dodecyl Sulfate”–SDS), 400 μ L de β -mercaptoetanol, 4 mg de azul de bromofenol e q.s.p. de H₂O ultrapura para 8 mL) e aquecidas em banho-maria a 90 °C por 5 min. Após a desnaturação proteica, uma alíquota de 10 μ L de cada uma das amostras diluídas foi colocada no poço de carregamento dos géis SDS–PAGE. A unidade de eletroforese vertical (Bio–Rad Laboratories) foi utilizada em conjunto com a fonte de alimentação. O gel foi corado com a solução 0,23% de Coomassie Blue R–250 durante 90 min e descolorido na solução de metanol/ácido acético (5% de metanol, ácido acético a 7%).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

A metodologia de superfície e resposta foi utilizada para avaliar a relação entre os dados experimentais e preditos assim como avaliar o efeito das variáveis significativas (enzima (% , v/v), proteína do soro de queijo (% , p/v) e número de microcápsulas) na porcentagem de hidrólise da lactose. As condições experimentais testadas no delineamento de Box–Behnken com 9 corridas mais 3 pontos centrais estão apresentados na Tabela 2. A porcentagem de hidrólise da lactose alcançada pelas microcápsulas no delineamento experimental variou de 78,16 a 92,09 %. A maior porcentagem de hidrólise da lactose (experimental) de 92,09 % foi obtida na condição com 4% de enzima, 1% de proteína do soro de queijo e 30 microcápsulas. Das et al. (2015) verificaram que para obter aproximadamente 19% de hidrólise da lactose as melhores condições das microcápsulas foram 3% de alginato de sódio, 5,9% de cloreto de cálcio e 5,2 mg/mL de enzima beta-galactosidase.

Os níveis experimentais de hidrólise da lactose de cada conjunto de condições foram determinados e comparados com valores preditos pelo delineamento (Tabela 2).

Podemos analisar a partir dos resultados contidos na Tabela 2 os valores dos pontos centrais do delineamento, correspondentes as corridas 10, 11 e 12 com percentuais de 91,64; 91,23 e 91,51%, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,86027, isto significa que 86,02 % da variação da resposta é explicada pelo modelo matemático escolhido, o que é aceitável uma vez que apenas 13,98 % dos resultados foram obtidos ao acaso, ou seja, ao erro experimental. O valor do R^2 ajustado (0,69414) indica uma relação

aceitável entre os valores experimentais e preditos sobre a resposta, porcentagem de hidrólise da lactose. A falta de ajuste apresentou-se significativa ($p=0,00020$) sendo principalmente devido ao baixo valor do erro puro. Dessa forma o modelo matemático ainda necessita ser ajustado para que possa ser validado para fins preditivos dentro da região experimental testada. De qualquer forma, a semelhança entre os resultados obtidos e os valores preditos pelo delineamento observados na Tabela 2 indicam que o delineamento experimental foi adequado.

Tabela 2. Matriz do delineamento central composto para atividade da β -galactosidase.

Corridas	Variáveis Codificadas e Decodificadas			Resposta		
	X1 Enzima (%) (v/v)	X2 Proteína (%) (p/v)	X3 Número microcápsulas	de Hidrólise da lactose (%)	Experimental	Predito
1	-1 (4)	-1 (0,2)	-1 (25)		89,57	88,14
2	-1 (4)	0 (0,6)	+1 (35)		78,16	81,16
3	-1 (4)	+1 (1)	0 (30)		92,09	90,52
4	0 (5)	-1 (0,2)	+1 (35)		90,12	88,56
5	0 (5)	0 (0,6)	0 (30)		91,18	91,03
6	0 (5)	+1 (1)	-1 (25)		91,59	94,58
7	+1 (6)	-1 (0,2)	0 (30)		81,43	84,43
8	+1 (6)	0 (0,6)	-1 (25)		82,67	81,01
9	+1 (6)	+1 (1)	+1 (35)		82,44	81,00
10	0 (5)	0 (0,6)	0 (30)		91,64	91,03
11	0 (5)	0 (0,6)	0 (30)		91,23	91,03
12	0 (5)	0 (0,6)	0 (30)		91,51	91,03

Na Tabela 3, verificou-se a análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de regressão para o modelo matemático proposto pelo delineamento de Box-Behnken. Com base nos resultados observou-se que, todos os efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) da enzima, proteína do soro de queijo e número de microcápsulas foram significativos, com valor de $p<0,05$. A porcentagem de enzima e o número de microcápsulas apresentaram um efeito linear negativo, isso significa que ao passar do nível +1 (maior concentração) para o nível -1 (menor concentração) dentro da faixa testada, houve um aumento na hidrólise da lactose. Já a porcentagem de proteína do soro de queijo apresentou um efeito significativo positivo, ou seja, de acordo com o modelo proposto e dentro dos níveis testados quanto mais proteína do soro de queijo (%), maior será a hidrólise da lactose.

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de regressão para o desenho Box–Behnken utilizados para determinar o efeito da enzima, proteína e número de microcápsulas na hidrólise da lactose.

	SS	df	MS	F	p
Enzima (%) (L+Q)	151,8281	2	75,91405	1596,576	0,000029
Proteína (%) (L+Q)	33,7974	2	16,89872	355,403	0,000272
Número de microcápsulas (L+Q)	49,6966	2	24,84829	522,593	0,000153
Falta de ajuste	39,0007	2	19,50035	410,119	0,000220
Erro Puro	0,14260	3	0,04755		
Total SS	281,5510	11			

Seq. SS: soma sequencial dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: quadrado médio ajustado; F: F calculado;

p: valor de p a 0,05%.

A partir dos coeficientes de regressão para as respostas polinomiais ajustadas para a hidrólise da lactose das microcápsulas de alginato com enzima e proteína do soro de queijo determinou-se a condição ideal em que resultou na máxima hidrólise da lactose. Os efeitos da enzima (% , v/v), proteína do soro de queijo (% , p/v) e número de microcápsulas foram avaliados quantitativamente usando curvas de superfície de resposta. Aplicando várias análises de regressão aos dados experimentais, foi definido a equação polinomial de segundo grau que representam a relação entre as variáveis independentes testadas (Equação 3). Os resultados mostram que o intercepto foi significativo positivo, ao nível de 0,01%, demonstrando que o ponto central foi escolhido adequadamente. Todos os parâmetros estimados, relativo às variáveis independentes testadas mostraram-se significativas ao nível de 0,05%, indicando a relevância destas na hidrólise enzimática. Por meio da análise estatística dos resultados, obteve-se a equação do modelo codificado (Equação 3).

$$Y = 89,02180 - 4,42554 X_1 + 8,55045 X_2 - 4,36676 X_3 + 6,99857 X_1^2 - 6,88772 X_2^2 + 2,90473 X_3^2$$

Equação 3.

Onde:

Y = Hidrólise da lactose (%)

X₁ = Enzima beta-galactosidase (% , v/v)

X₂ = Proteína do soro de queijo (% , p/v)

X₃ = Número de microcápsulas

A partir da equação do modelo matemático, foi possível gerar as superfícies de resposta para analisar as melhores condições para elaboração da microcápsula que conduzem a uma maior porcentagem de hidrólise da lactose. Com o objetivo de determinar as faixas das variáveis que influenciam a hidrólise da lactose a partir da formulação das microcápsulas, analisaram-se os gráficos de superfície de resposta (Figura 1).

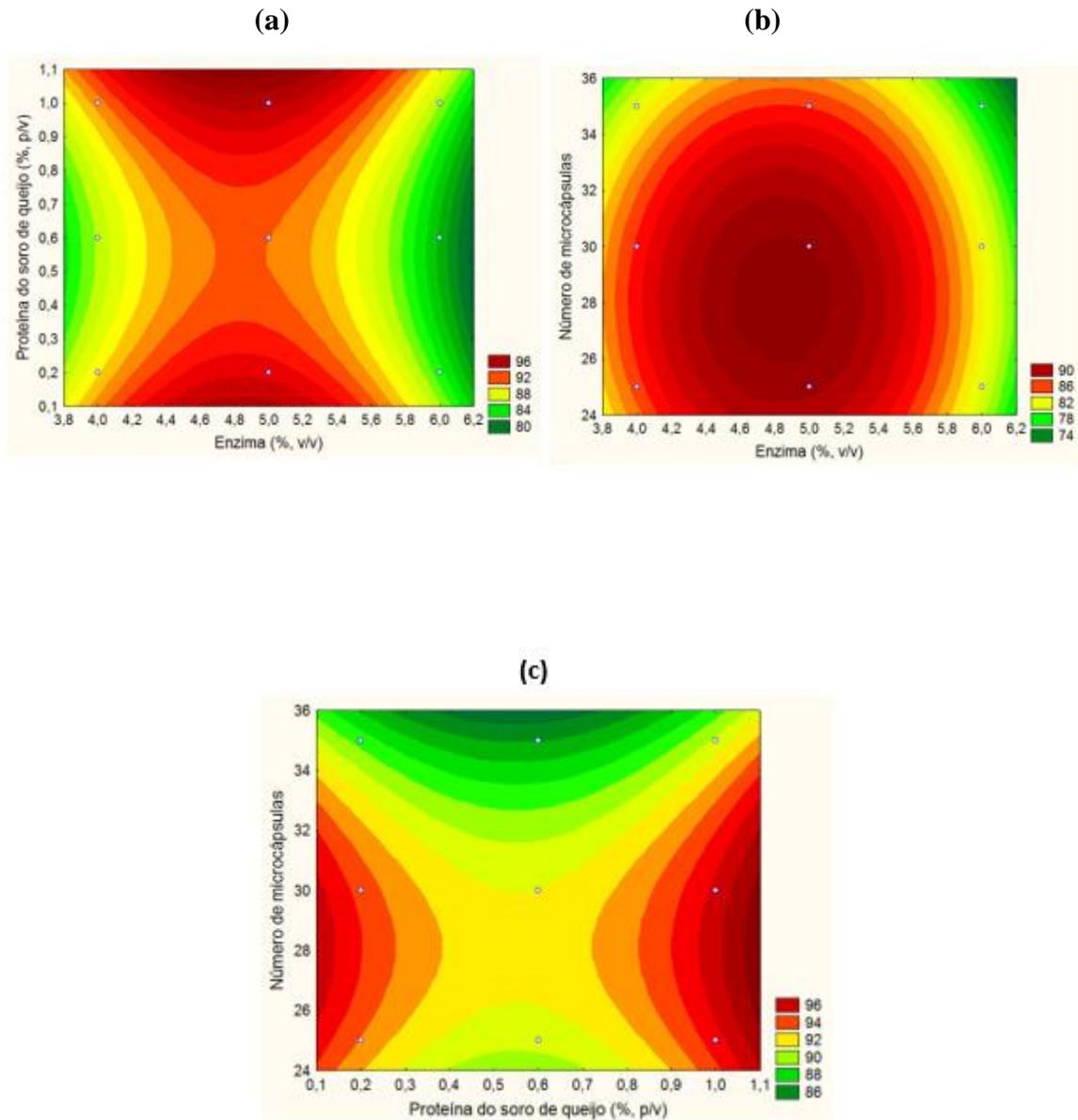


Figura 1. Superfícies de respostas para hidrólise da lactose a partir das microcápsulas em função: (a) Enzima e proteína do soro de queijo, (b) enzima e número de microcápsulas e (c) Proteína do soro de queijo e número de microcápsulas.

A Figura 1(a) mostra os efeitos da enzima beta-galactosidase e proteína do soro de queijo na hidrólise da lactose a partir das microcápsulas de alginato. Observa-se que a enzima entre 4,0 a 5,2 % (v/v) e proteína do soro de queijo entre 0,6 a 1,0 % (p/v) apresentaram maior porcentagem de hidrólise da lactose. Baseado na característica de gastro-resistência da proteína do soro de queijo, optou-se em considerar o maior nível da variável testada, ou seja, entre 0,6 a 1,0 % de proteína do soro. Escobar et al. (2014) verificaram que a enzima β -galactosidase imobilizada atingiu não mais que 40% de teor de conversão final após 6 horas de reação de hidrólise da lactose, a 35°C e pH 7,0. A Figura 1(b) indica que a enzima na faixa de 4 a 5,4 % (v/v) propiciam porcentagem de hidrólise mais elevadas. Já o número de microcápsulas ficou entre 25 a 32 unidades, ou seja, de acordo com o modelo matemático, apresentou um efeito negativo sobre a hidrólise da lactose. Elnashar e Yassin (2009) imobilizaram a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em biopolímero natural de carragena revestido com quitosana. A enzima na forma imobilizada foi avaliada no processo de hidrólise de uma solução de lactose. A enzima imobilizada apresentou grau de conversão da lactose de apenas 70% em sete horas de reação de hidrólise. Pela Figura 1(c) observa-se que níveis maiores de proteína do soro na faixa de 0,8 a 1,0% (p/v) e níveis menores do número de microcápsulas na faixa de 25 a 30 levam a porcentagens de hidrólise da lactose mais elevadas. Assim, a condição estabelecida com maior hidrólise da lactose de aproximadamente 92,09%, foi 4% (v/v) de enzima β -galactosidase, 1% (p/v) de proteína do soro de queijo e 30 microcápsulas de alginato. Haider & Husain (2009) verificaram que a β -galactosidase solúvel microencapsulada em alginato de cálcio hidrolisou a lactose no máximo em 77% em 3 h de reação, enquanto que a β -galactosidase microencapsulada com Concanavalina-A apresentou 88% de conversão da lactose após 4h de reação. A taxa de hidrólise da lactose no soro de queijo e no leite foi dependente da atividade da β -galactosidase, que por sua vez depende das condições de reação como concentração de enzima, pH, temperatura e tempo de reação (SENER et al., 2006).

3.2 ELETROFORESE SDS-PAGE

As amostras de soro de queijo “in natura” (SQI), soro de queijo microfiltrado (SQM) e soro de queijo ultrafiltrado (SQU) foram avaliadas quanto a eficiência da filtração em fluxo tangencial para a separação das respectivas proteínas do soro de queijo. A presença das proteínas nas amostras do soro de queijo foi analisada pela técnica de eletroforese em SDS-PAGE, conforme mostra a Figura 2. De acordo com os resultados pode-se confirmar que

dentro do processo de obtenção das proteínas do soro de queijo (Item 2) tanto no SQI quanto SQM, o (s) permeado (s) apresentaram a (s) banda (s) que correspondem às proteínas do soro de queijo. Já no permeado do SQU não apresentaram as bandas que correspondem às proteínas do soro de queijo uma vez que as mesmas ficaram retiradas no concentrado proteico na qual foi utilizado nos experimentos para confecção das microcápsulas de alginato com enzima β -galactosidase e proteína do soro de queijo (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina).

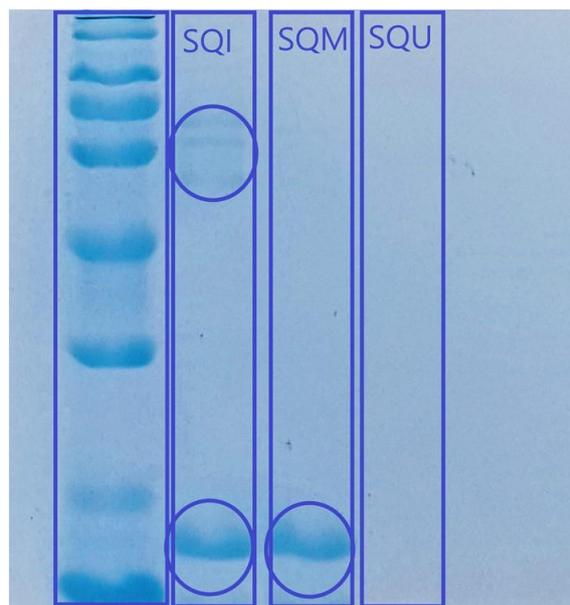


Figura 2. Perfil eletroforético da obtenção das proteínas do soro de queijo durante o processo de filtração em fluxo tangencial.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, a enzima foi microencapsulada nas esferas de hidrogel à base de alginato de sódio, contendo proteínas do soro de queijo pelo método de gelificação por encapsulamento. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o microencapsulamento da enzima β -galactosidase com proteínas do soro de queijo é eficaz na hidrólise da lactose. Neste estudo, as condições reacionais adequadas para uma maior hidrólise da lactose de aproximadamente 92,09%, foi com 4% (v/v) de enzima β -galactosidase, 1% (p/v) de proteína do soro de queijo e 30 microcápsulas de alginato. Este processo tende a ser uma sugestão para futuros trabalhos que se encontram em andamento, sobre o aperfeiçoamento do processo de imobilização enzimática por encapsulamento com alginato de sódio e, da mesma forma, o

estudo da passagem das microcápsulas contendo proteína do soro de queijo ao ambiente do sistema gastrointestinal, a fim de verificar seu efeito na proteção ao ambiente gástrico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES/Brasil pelo apoio financeiro e a Universidade Pitágoras Unopar pelo apoio técnico-científico e infraestrutura.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROCA, R. O. Physical and chemical characteristics of fermented dairy beverages using minas cheese whey. *Food Science and Technology*. v.21(2), p.187–192, 2001.

BON, E P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº16 de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. Brasília, DF, 2005.

DAS, B.; ROY, A.P.; BHATTACHARJEE, S.; CHAKRABORTY, S.; BHATTACHARJEE, C. Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 121, p. 244–252, 2015.

DOHERTY, S.B.; GEE, V.L.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Development and characterization of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids* v. 25, p. 1604–1617, 2011.

DOMINGUES, L.; GUIMARÃES, P.M.R.; OLIVEIRA, C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. *Bioengineered Bugs*. v. 1(3), p. 164–171, 2010.

ELNASHAR, M.M.M.; YASSIN, M.A. Lactose hydrolysis by β -galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 159, p. 426–437, 2009.

ESCOBAR, G.P.; DE SOUZA, C.F.V.; LEHN, D.N. Avaliação de β -galactosidase livre e imobilizada na hidrólise da lactose do permeado de soro de queijo. *Caderno pedagógico*, Lajeado, v 11(1), p. 117–129, 2014.

GEBARA, C.; CHAVES, K.S.; RIBEIRO, M.C.E.; SOUZA, F.N.; GROSSO, C.R.F.; GIGANTE, M.L.. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, v. 51, p. 872–878, 2013.

GONZÁLEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios de hormônios da lactação. In: GONZÁLEZ, F. H. D., DÜRR, J. W., FONTANELI, R. S. *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo das vacas leiteiras*. 1. ed. Porto Alegre: 2001. p. 5–22.

GREWAL, M.K.; CHANDRAPALA, J.; DONKOR, O.; APOSTOLOPOULOS, V.; VASILJEVIC, T. Electrophoretic characterization of protein interactions suggesting limited feasibility of accelerated shelf-life testing of ultra-high temperature milk. *J Dairy Sci.*, v. 100(1), p. 76–88, 2017.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by β -galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. *Chemical Engineering and Processing*, v. 48, p. 576–580, 2009.

HARAGUCHI F.K.; ABREU W.C.; PAULA H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Brasileira de Nutrição**, 19(4), p. 479-488, 2006.

HERNÁNDEZ, L.B.; RECIO, I.; AMIGO, L. β -lactoglobulin as Source of Bioactive Peptides. *Journal Amino Acids*, v. 35(2), p. 257–265, 2008.

JUERS, D. H., MATTHEWS, B. W., HUBER, R. E. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science*, v. 21(12), p. 1792–1807, 2012.

KRISSANSEN, G.W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 26(6), p. 713–723, 2007.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância a lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 56(12), p. 250–256, 2010.

PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G.; BALDINI V.L.S.; TANIKAWA C.; SGARBIERI V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 25(2), p. 333–338, 2005.

RENHE, I.R.T. O papel do leite na nutrição. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, nº 363(63), p. 36–43, 2008.

SANTOS, F. F., QUEIROZ, R. C. S., ALMEIDA NETO, J. A. Avaliação da aplicação das técnicas da Produção Mais Limpa em um laticínio no Sul da Bahia. *Gestão & Produção, São Carlos*, v. 25(1), p. 117–131, 2017.

SANTOS, M.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 879(7–8), p. 475–479, 2011.

SENER, N.; APAR, D.K.; OZBEK, B. A modeling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication, *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1493–1500, 2006.

SGARBIERI, V.C., Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8(1), p. 43–56, 2005.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. *Dairy Science and Technology*, 2a ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

YADAV, J.S.S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, v. 33(6), p. 756–774, 2015.