



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

SÍNTESE SIMULTÂNEA DE LACTULOSE E ETANOL UTILIZANDO O SORO DE LEITE COMO SUBSTRATO

ALBUQUERQUE, T.L.¹; D'ALMEIDA, A.P.¹; SILVA, L.H.A.¹; SILVA, N.C.G.¹; GONÇALVES, L.R.B.¹; ROCHA, M.V.P.¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: natancamara@hotmail.com

*RESUMO – O soro de leite (resíduo da indústria alimentícia) apresenta um alto teor de lactose e este dissacarídeo pode ser utilizado como matéria prima para a produção de produtos com maior valor agregado, sendo um destes a lactulose obtida por síntese enzimática pela enzima β -galactosidase. A hidrólise da lactose na produção de lactulose gera, além da galactose, quantidades significativas de glicose. Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a produção simultânea de lactulose por via enzimática e de etanol por via fermentativa, utilizando uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Para tal, foram avaliados o uso da enzima livre e da enzima imobilizada no processo. Os resultados obtidos mostraram que a produção simultânea de lactulose e etanol é possível, alcançando as concentrações de $17,04 \pm 0,13$ g/L de lactulose e $8,42 \pm 0,13$ g/L de etanol, utilizando-se a enzima livre, e de $17,05 \pm 0,76$ de lactulose e $8,79 \pm 0,65$ de etanol, utilizando-se a enzima imobilizada. Dessa forma, é possível dar um tratamento adequado ao soro de leite, fazendo seu uso para produção de compostos de interesse e de valor agregado.*

1. INTRODUÇÃO

Dentre os principais resíduos gerados pela indústria de alimentos, mais especificamente no setor láctico, está o soro de leite, um subproduto do processo de fabricação de queijos que, tipicamente, contém de 5 a 8% (m/m) de sólidos, dos quais cerca de 60-80% são lactose e de 10-20% são proteínas (Vamvakaki *et al.*, 2010). Na última década, o total de geração de soro de leite foi de aproximadamente 140 milhões de toneladas (Seo; Park; Han, 2015). Esse resíduo, quando descartado sem tratamento prévio, pode causar substanciais problemas ambientais.

Tem sido relatado a utilização da lactose presente no soro de leite para a produção de enzimas, como a β -galactosidase (Lima *et al.*, 2013). Outra alternativa promissora é a produção de derivados da lactose com valor agregado, como lactulose, lactitol, ácido lactobiônico, lactose-ureia, galacto-oligossacarídeos, (GOS) e lactosacarose (Spatelcu, 2012). A produção de lactulose catalisada por β -galactosidasas requer frutose como substrato e exibe uma baixa conversão. Assim, para um processo em batelada, uma proporção menor de lactose/frutose é geralmente favorável para obter uma maior concentração de lactulose, uma vez que as probabilidades de frutose para atuar como aceptor de galactosil são maiores em comparação com a água (Sitanggang; Drews; Kraume, 2015).



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

A lactulose (fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$), um dissacarídeo composto de frutose e galactose. É um dos prebióticos mais importantes e amplamente utilizados, possuindo aplicações significativas nos campos alimentício e farmacêutico. A formação de lactulose por catálise enzimática pode ocorrer por um rearranjo molecular da lactose ou pela formação de uma ponte β -glicosídica entre galactose e frutose (Wang *et al.*, 2013), sendo essa última forma catalisada por β -galactosidases (Schuster-Wolff-Bühning; Fischer; Hinrichs *et al.*, 2013). Esse processo gera quantidades significativas de glicose oriunda da hidrólise enzimática da lactose. Tal glicose pode ser aproveitada para produção de etanol por via fermentativa utilizando alguns microrganismos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, otimizando o processo de produção de lactulose, dada a eliminação de açúcares residuais provenientes da hidrólise enzimática da lactose. A fermentação seletiva é interessante para a purificação de lactulose, uma vez que permite a remoção completa de monossacarídeos sem consumo dos produtos de síntese. No caso da purificação de lactulose, somente *S. cerevisiae* pode ser usada, pois tal cepa não consome a lactulose. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou a produção simultânea de lactulose e etanol, por via enzimática e fermentativa, respectivamente, a fim de se desenvolver um processo em que fossem gerados compostos de valor comercial, com diversas aplicações nos ramos alimentício e farmacêutico, agregando valor a um resíduo da indústria alimentícia: o soro de leite.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O soro de leite em pó foi fornecido pela Indústria Alibra Ingredientes Ltda (Campinas-SP). A enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) de *Kluyveromyces lactis*, Lactozyme[®] 2600, e a frutose P.A. foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Os reagentes utilizados para o preparo do meio de cultura YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glicose) foram obtidos da empresa Kasvi (Paraná, Brasil). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada nos ensaios fermentativos foi obtida a partir de uma levedura comercial (Fleischmann - AB Brasil Industrial e Comércio de Alimentos Ltda) no Laboratório de Bioengenharia situado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará.

2.2. Métodos

Meio de cultura e manutenção das células: Para a manutenção da levedura utilizou-se o meio complexo YEPD. O pH do meio foi ajustado para 4,5 utilizando HCl 6 N e a esterilização se deu em autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) a 110 °C por 10 min.

Imobilização da enzima β -galactosidase de *K. lactis* em quitosana: β -galactosidase foi imobilizada em gel de quitosana (2%) ativado com glutaraldeído 0,8% (Lima *et al.*, 2013). Utilizou-se uma carga enzimática de 10 mg de proteína por grama de suporte. A imobilização foi realizada a pH 7,0 e 25 °C em tampão fosfato de potássio 100 mM, contendo 0,1 mM de $MnCl_2$ e 0,2 mM de $MgCl_2$, sob agitação suave em agitador rotatório.

Produção simultânea de lactulose e etanol a partir do soro do leite: Para tal procedimento, o soro de leite foi previamente diluído em tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7. Após, adicionou-se frutose para atingir a concentração na razão de 1:2 m/m de lactose:frutose (a concentração inicial de lactose foi de aproximadamente 66,7 g/L). O

experimento foi conduzido a 50 °C e carga enzimática de 7 U/mL. Adicionou-se a enzima β -galactosidase de *K. lactis* livre e imobilizada em quitosana, para fins comparativos. Após duas horas de reação inoculou-se a cepa de *S. cerevisiae* para produção do etanol, utilizando um volume de inóculo de 2% v/v. O volume reacional foi de 10 mL. Amostras foram coletadas periodicamente para análise dos carboidratos (lactose, glicose e lactulose) e etanol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Métodos Analíticos: As concentrações de lactose, glicose, lactulose e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters, Milford, MA, USA), com detector de índice de refração Waters (Modelo 2414) e uma coluna Supelco 610-H a 30 °C. O eluente utilizado foi H₃PO₄ a uma concentração de 0,1% (m/v) a um fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção foi 20 μ L.

3. RESULTADOS

A Figura 1A mostra o curso da reação completa para a produção de lactulose e etanol utilizando a enzima livre e a levedura. Pode-se verificar que cerca de 88% da lactose foi convertida em 2 h de reação e em até 24 h alcançou-se conversão de aproximadamente 96%. No momento em que se adicionou o micro-organismo ao meio reacional para a produção de etanol, a concentração de glicose correspondia a cerca de $29,45 \pm 0,17$ g/L e a concentração máxima de etanol produzida foi de $8,42 \pm 0,13$ g/L. A concentração máxima de lactulose nesse ensaio foi de $17,04 \pm 0,22$ g/L, no entanto ao final de 24 h de fermentação, observou-se uma redução do conteúdo de lactulose em 25%, o que corresponde a uma concentração final de $12,77 \pm 0,18$ g/L. Esse fato se deve, provavelmente, a diluição ocorrida ao adicionar-se a levedura para o início da fermentação.

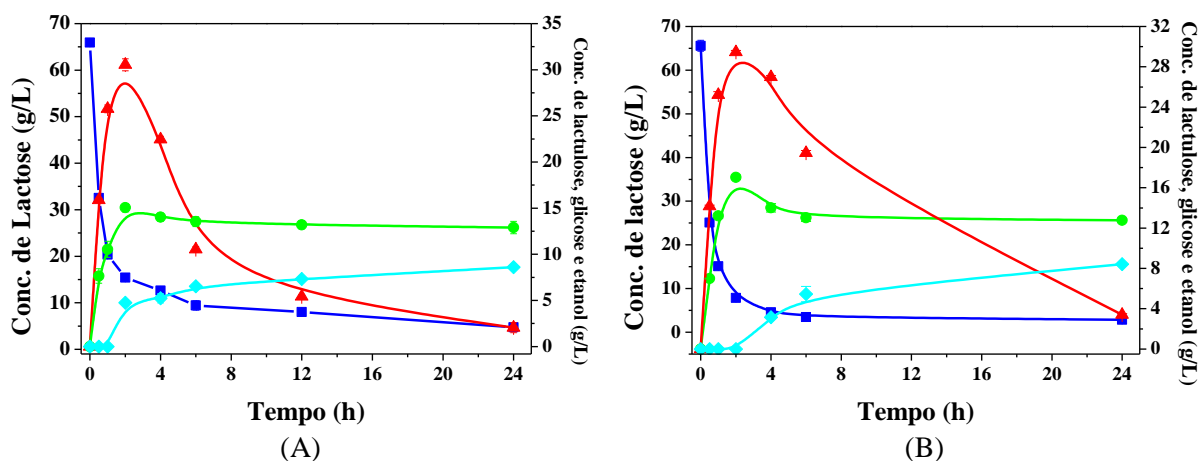


Figura 1 - Produção simultânea de lactulose por β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e etanol por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de soro de leite: enzima livre (A) e enzima imobilizada (B). (■): lactose; (▲) glicose; (●) lactulose e (◆) etanol.

Os perfis de síntese de lactulose e etanol utilizando a enzima na forma imobilizada podem ser visualizados na Figura 1B. Nesse caso, pode-se observar que cerca de 93% da lactose foi consumida em até 24 h de reação. Em 2 h observou-se que $28,94 \pm 0,76$ g/L de



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

glicose foi liberada e a concentração máxima de etanol atingida foi de $8,79 \pm 0,65$ g/L, valor muito próximo ao obtido com a enzima solúvel, e a concentração máxima de lactulose sintetizada foi $17,50 \pm 0,76$ g/L.

As produtividades e os rendimentos de lactulose foram similares ao utilizar o biocatalisador na forma livre ou imobilizada. A produtividade de etanol alcançou seu máximo no experimento com a enzima imobilizada, de 2,16 g/L.h, com rendimento percentual (g de etanol/ g de glicose) de 30,37. A concentração residual de glicose em relação a inicial foi de apenas 11,6% utilizando a enzima livre e de 9,55% usando a imobilizada. Dessa forma, os resultados obtidos para a produção conjunta de lactulose e etanol são promissores, uma vez que se pode aproveitar, via processo biotecnológico, tanto a lactose presente no soro de leite, como também a glicose formada durante o processo enzimático.

4. CONCLUSÃO

Utilizando a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi possível produzir lactulose e etanol em uma mesma batelada, obtendo concentrações máximas de 17,50 g/L e 8,79 g/L, respectivamente. Conclui-se, portanto, que é possível produzir simultaneamente lactulose por via enzimática e etanol por via fermentativa, usando o soro de leite, o que traz benefícios ambientais, visto a redução de resíduos prejudiciais, como a lactose, no meio ambiente, além de tornar o processo de produção deste prebiótico menos oneroso.

6. REFERÊNCIAS

- FREITAS, M. F. M. Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana / Maria de Fátima Matos de Freitas. – 2013. 99 f.: il. color., enc.; 30 cm. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2013.
- LIMA, A. F.; CAVALCANTE, K. F.; FREITAS, M. F. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING, R.; FISCHER, L.; HINRICHS, J. Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *Inter. Dairy Journal*, v. 20, 731-741, 2010.
- SEO, Y.H.; PARK, G.W.; HAN, J. Efficient lactulose production from cheese whey using sodium carbonate. *Food Chemistry*, v. 173, p. 1167-1171, 2015.
- SITANGGANG, A.; DREWS, A.; KRAUME, M. Influences of operating conditions on continuous lactulose synthesis in an enzymatic membrane reactor system: A basis prior to long-term operation. *Journal of Biotechnology*, v. 203, p. 89-96, 2015.
- SPALATELU, C. Biotechnological valorization of whey. *I. R. F. B.*, v. 10, p. 1-8, 2012.
- VAMVAKAKI, A. N.; KANDARAKIS, I.; KAMINARIDES, S.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by *Zygomycetes*. *Engineering in Life Sciences*, v. 10, p. 348-360, 2010.
- WANG, H., YANG, R., HUA, X., ZHAO, W., ZHANG, W. Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: current state and perspectives. *A. Micro. and Bio.*, v. 97, p. 6167– 6180, 2013.