



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 ENZIMÁTICA DE LACTULOSE POR $\beta$ -GALACTOSIDASE UTILIZANDO FRUTOSE DO SUCO DE CAJU COM UM SUBSTRATO ALTERNATIVO

DALMEIDA, A.P.<sup>1</sup>; SILVA, L.H.A.<sup>1</sup>; SILVA, N.C.G.<sup>1</sup>; ALBUQUERQUE, T.L.<sup>1</sup>;  
GONÇALVES, L.R.B.<sup>1</sup> e ROCHA, M.V.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: alanportaldalmeida@hotmail.com; valderez.rocha@ufc.br

*RESUMO – A lactulose (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-frutose) é um dissacarídeo sintético não digerível e sua síntese por ocorrer por catálise enzimática através da formação de uma ponte  $\beta$ -glicosídica entre galactose e frutose catalisada por  $\beta$ -galactosidasas. Para a produção deste carboidrato, este trabalho propõe o uso da frutose do suco de caju, produto de baixo valor agregado, oriundo do processamento das indústrias alimentícia. As condições operacionais como carga enzimática e razão mássica entre os substratos (lactose e frutose) foram estudadas. Os resultados mostraram que a maior concentração de lactulose (3,8 g/L) foi obtida para a razão frutose/lactose de 1:2 e uma carga enzimática de 4,2 U/mL a 50 °C, 150 RPM e 3h. Com base nestes resultados, a frutose proveniente do suco de caju demonstrou ser um substrato alternativo para a produção da lactulose, que pode possibilitar uma diminuição no custo deste processo.*

## 1. INTRODUÇÃO

A lactulose (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-frutose) é um dissacarídeo composto de galactose e frutose, sendo prebióticos amplamente utilizados na indústria alimentícia, inclusive, na indústria farmacêutica (Wang, 2009, Zokae *et al.*, 2002). Além disso, pode ser classificado com um açúcar cristalino de forma alfa e higroscópico (Ramos, 2010).

A lactulose pode ser sintetizada utilizando métodos químicos ou enzimáticos, sendo a produção comercial geralmente realizada por rota química, que se baseia principalmente na isomerização da lactose em meio alcalino, com o uso de catalisadores, como o ácido bórico, alcançando rendimentos entre 70-80% (Aider e Halleux, 2007; Hicks *et al.*, 1984; Zokae *et al.*, 2002). Sua produção também pode ser realizada através da hidrólise enzimática da lactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase e utilizando a frutose como um dos monossacarídeos necessários a reação (Andrews, 1986). Essa rota de produção tem recebido maior atenção, pois é vista como uma alternativa mais eficiente para a síntese deste dissacarídeo, uma vez que, diferentemente da rota química, não necessita de condições bruscas de temperatura e pH, não requer substratos com elevada pureza (Silvério *et al.*, 2016), instigando novos questionamentos para buscar substratos alternativos para a produção de lactulose. E neste trabalho, propõe-se o uso do suco de caju como fonte de frutose.

De acordo com Rocha *et al.* (2007), o suco de caju apresenta quantidades significativas de glicose (46,88%) e frutose (46,72%), sendo que a utilização da frutose natural como



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

substituta da frutose sintética é interessante, uma vez que o aproveitamento de matérias-primas agrícolas de baixo custo, como substratos alternativos, diminui os custos dos processos e, conseqüentemente, do produto final, além de aumentar a importância econômica de um produto anteriormente pouco valorizado.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo estudar e otimizar a síntese da lactulose por via enzimática, utilizando como fonte de frutose o suco de caju, visando reduzir os custos da produção deste prebiótico.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

O suco de caju clarificado foi cedido pela Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA), situada na cidade de Fortaleza - CE. A lactose (P.A.) e a enzima  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) de *Kluyveromyces lactis*, Lactozyme<sup>®</sup> 2600, foi obtida da empresa Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

### 2.2. Métodos

Tratamento inicial do suco de caju: Inicialmente o pH do suco foi ajustado para 7,0 utilizando-se o tampão fosfato de potássio 100 mM. Já a concentração inicial de frutose foi de 6,2 g/L, tanto para realização dos estudos da influência da proporção mássica de frutose/lactose e da carga enzimática na produção de lactulose. Preparo do meio reacional: Para produção de lactulose foi preparado um meio composto de lactose P.A., adicionada na proporção de 1:1 e 1:2 (m/m), em relação à frutose presente no suco de caju. As cargas enzimáticas utilizadas no meio reacional foram de 4,2; 7; 14 e 21 U/mL. Após a adição da enzima, a solução foi mantida em um banho termostático a 50 °C e 150 RPM durante o período de 3 h. Ao final de cada reação foram coletadas amostras, as quais foram centrifugadas, filtradas e analisadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Métodos Analíticos: Para quantificação da lactose consumida e da lactulose formada, foi utilizada a técnica de 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 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a uma concentração de 0,1% (m/v) a um fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção foi 20  $\mu$ L. O tempo de retenção das amostras foram comparados com soluções padrão.

## 3. RESULTADOS

A concentração de lactose e lactulose após a reação é apresentada na Tabela 1. Nas reações conduzidas ocorreu a hidrólise da lactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase, seguido da formação de galactose e glicose. A galactose formada ligou-se à enzima para criar o complexo galactosil-enzima que, posteriormente, reagiu com frutose como um aceptor, formando lactulose (KIM; PARK; OH, 2006).

Tabela 1 – Influência da carga enzimática e da razão mássica frutose:lactose na produção da lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* a 50 °C, 150 rpm por 3 h.

Carga Enzimática (U/mL)/ Razão Frutose/Lactose (m/m)	Concentração Final de Lactose (g/L)		Concentração produzida de Lactulose (g/L)	
	1:1	1:2	1:1	1:2
4,2	0,66 ± 0,04	1,62 ± 0,04	3,49 ± 0,03	3,80 ± 0,10
7,0	0,43 ± 0,00	0,88 ± 0,14	3,28 ± 0,02	3,79 ± 0,41
14,0	0,25 ± 0,01	0,34 ± 0,01	3,21 ± 0,00	3,23 ± 0,14
21,0	0,14 ± 0,00	0,25 ± 0,02	3,35 ± 0,01	3,54 ± 0,08

Analisando a Tabela 1, pode-se observar que a concentração de lactose obtida após 3 h de reação diminuiu com o aumento da carga enzimática, evidenciando que, à medida que a carga enzimática foi aumentada, foi possível hidrolisar mais lactose no meio reacional. No entanto, a carga enzimática não influenciou significativamente na concentração de lactulose, possivelmente, era necessária uma maior concentração inicial de substrato para verificarmos o efeito da carga enzimática.

Tabela 2 – Rendimento da produção de lactulose ao final de cada estudo %(g/g). Os dados marcados com letras diferentes representam diferenças estatísticas a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) analisado pelo Teste de Tukey.

Carga Enzimática (U/mL)/ Razão Frutose/Lactose (m/m)	Rendimento (g de lactulose/g de frutose)		Rendimento (g de lactulose/ g de lactose)	
	1:1	1:2	1:1	1:2
4,2	56,29 <sup>a</sup>	61,29 <sup>b</sup>	56,29 <sup>c</sup>	30,64 <sup>e</sup>
7	52,90 <sup>a</sup>	61,12 <sup>b</sup>	52,90 <sup>d</sup>	30,56 <sup>e</sup>
14	51,17 <sup>f</sup>	52,10 <sup>h</sup>	51,17 <sup>j</sup>	26,04 <sup>l</sup>
21	54,03 <sup>g</sup>	57,09 <sup>i</sup>	54,03 <sup>k</sup>	28,54 <sup>m</sup>

O rendimento de lactulose com relação à quantidade de frutose no suco de caju, no teste em que houve maior produção (na proporção de frutose/lactose de 1:2 e carga enzimática de 4,2 U/mL) foi de 61,29%, e de 30,64% com relação a lactose adicionada ao sistema, mostrando que apesar de ter um grande rendimento relativamente alto com relação a frutose do suco de caju, houve um grande desperdício de lactose que apesar de ter sido hidrolisada, não sintetizou lactulose, com relação a lactose inicial, todos os rendimentos na proporção 1:2 foram inferiores a 50%, sendo assim, os maiores rendimentos ocorreram à proporção 1:1 e carga enzimática 4,2 U/mL, onde o rendimento com relação tanto a frutose quanto à lactose foi de 56,29%. Kim, Park e Oh (2006) avaliaram as cargas enzimáticas de 1, 2, 3, 5 e 7 U/mL na produção de lactulose usando lactose e frutose PA e observaram que a produção máxima foi em 5 U/mL.



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

Estes resultados mostram-se promissores, tendo em vista que em outro estudo de produção de lactulose nas mesmas condições (50 °C, pH 7 e carga enzimática 7 U/mL) usando lactose e frutose PA como substratos, mostrou rendimento menor, 25,5% com relação a lactose adicionada (Albuquerque, 2018). E usando a frutose do suco de caju, foi obtido um rendimento de 52,9% e 30,56%, em relação a proporção frutose:lactulose estudada (1:1 e 1:2), respectivamente.

## 4. CONCLUSÃO

Foi possível observar a síntese enzimática de lactulose a partir da lactose PA e do suco de caju, sendo a maior concentração de lactulose obtida quando se utilizou uma razão frutose/lactose de 1:2 e carga enzimática de 4,2 U/mL a 50 °C, 150 rpm e 3 h. Dessa forma, conclui-se que a produção de lactulose a partir do suco de caju apresenta resultados satisfatórios, contudo ainda com a carência de estudos futuros que devem ser conduzidos para incrementar essa produção.

## 6. REFERÊNCIAS

- AIDER M, HALLEUX D, Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Food Science & Technology*, v. 18, n. 2, London, 2007.
- ALBUQUERQUE T.L. PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LACTULOSE A PARTIR DE SORO DE LEITE UTILIZANDO A ENZIMA  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis*. Tese (Tese de Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p. 105, 2018.
- ANDREWS GR, Formation and occurrence of lactulose in heated milk. *Journal of Dairy Research*. v. 53, n. 4, p. 665-80, Cambridge, 1986.
- HICKS KB, RAUPP DL, SMITH PW, Preparation and purification of lactulose from sweet cheese whey ultrafiltrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 32, n. 2, p. 288-292, Easton, 1984.
- KIM YS, PARK CS, OH DK, Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 903-908, 2006.
- RAMOS TM, Produção de xarope de lactulose a partir do soro de ricota e seu emprego em iogurte e queijo quark. UFLA- Universidade Federal de Lavras, p. 99, Lavras, Minas Gerais, 2010.
- ROCHA MVP, Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- SILVÉRIO, S. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biocatalytic approaches using lactulose: end product compared with substrate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, p. 878-8962, 2016.
- WANG Y, Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, v. 42, p. 8-12, 2009.
- ZOKAEE F, KAGHAZCHI T, ZARE A, SOLEMANI M, Isomerization of lactose to lactulose: study and comparison of their catalytic systems. *Process Biochemistry*, London, v. 37, n. 6, 2002.