

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA HIDRÓLISE
DA LACTOSE EM LEITE

13/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Tese Apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Alimentos

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITE

Parecer

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Janice Campos Godoy
Ilha e aprovada pela Comissão Julgadora
em 26.03.92.*

JANICE CAMPOS GODOY ILHA

ENGENHEIRA DE ALIMENTOS

Salvador Massaguer Roig

PROF. DR. SALVADOR MASSAGUER ROIG

ORIENTADOR

PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE

CO-ORIENTADOR

CAMPINAS - SÃO PAULO

1992

Aos meus pais Godoy e Eunice,

Aos meus irmãos João, Jeanine e Leopoldo,

Ao Luiz Fernando,

pelo incentivo, amor e carinho,

com todo o meu amor, eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig, pela orientação, estímulo e amizade no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, pela co-orientação e sugestões de grande valia.

À Prof. Dra. Terezinha de Jesus Garcia Salva, pelas sugestões apresentadas na redação final deste trabalho.

À Prof. Dra. Marisa Hoelz Jackix, pelas sugestões também apresentadas na redação final deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

À UNICAMP, pela bolsa de Monitoria II concedida.

Ao FAEP, pela bolsa auxílio-ponte concedida.

À Fundação ATLANTIC, pela premiação deste trabalho.

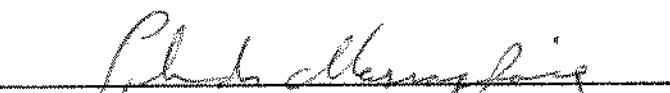
A Ana Lourdes, Beth e Cláudia, pela colaboração no desenvolvimento experimental deste trabalho.

Às minhas tias Cleo e Nize, pelo inestimável incentivo e carinho.

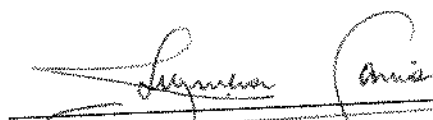
Aos amigos da pós-graduação, pelo incentivo e bons momentos juntos, e a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

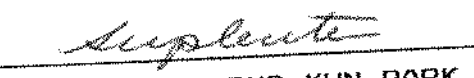
À ABIA, pelas cópias fornecidas deste trabalho.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. SALVADOR MASSAGUER ROIG
(ORIENTADOR)


Prof. Dra. MARISA HOELZ JACKIX
(MEMBRO)


Prof. Dra. TEREZINHA DE JESUS GARCIA SALVA
(MEMBRO)


Prof. Dr. YONG KUN PARK
(MEMBRO)

Campinas, 26 de março de 1992.

ÍNDICE GERAL

Página

ÍNDICE GERAL.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xviii
RESUMO.....	xix
SUMMARY.....	xxi
 I. INTRODUÇÃO.....	 01
 II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	 04
II.1. LACTOSE.....	04
II.2. INTOLERANCIA À LACTOSE.....	06
II.3. LACTASE : β - GALACTOSIDASE.....	12
II.3.1. PROPRIEDADES DA LACTASE DE <i>Kluyveromyces lactis</i> - "MAXILACT".....	16
II.4. REDUÇÃO DO TEOR DE LACTOSE EM LEITE.....	17
II.4.1. MÉTODOS DE REDUÇÃO DO TEOR DE LACTOSE E HIDRÓLISE.....	17
II.4.2. MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE LEITE LACTOSE HIDROLISADO.....	22

II.4.3. EFEITO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	
NA ATIVIDADE DA LACTASE.....	24
II.4.4. EFEITO DA PASTEURIZAÇÃO NA	
HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	27
II.4.5. EFEITO DOS CONSTITUINTES DO LEITE NA	
HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	33
II.5. ULTRAFILTRAÇÃO.....	36
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
III.1. MATÉRIA PRIMA.....	41
III.1.1. LEITE.....	41
III.1.2. ENZIMA : β - GALACTOSIDASE.....	41
III.2. EQUIPAMENTOS E APARELHOS UTILIZADOS.....	41
III.3. OUTROS MATERIAIS.....	43
III.4. PRODUÇÃO DE LEITES DIAFILTRADOS.....	44
III.4.1. CÁLCULO DA MASSA DE ÁGUA PARA DIAFILTRAÇÃO.....	44
III.4.2. RECEPÇÃO DO LEITE.....	46
III.4.3. PASTEURIZAÇÃO.....	47
III.4.4. DIAFILTRAÇÃO DO LEITE.....	47
III.4.5. LIMPEZA DA MEMBRANA.....	48
III.5. PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES	
COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE.....	51
III.5.1. AMOSTRAS PARA HIDRÓLISE COM	
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE.....	51
III.5.2. HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	52
III.5.3. TEMPO DE HIDRÓLISE.....	52
III.5.4. INATIVAÇÃO DA ENZIMA.....	53

III.6.PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES	
COM DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS.....	53
III.6.1.AMOSTRAS PARA HIDRÓLISE COM DIFERENTES	
TEORES DE SAIS MINERAIS.....	53
III.6.2.HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	54
III.6.3.TEMPO DE HIDRÓLISE.....	54
III.6.4.INATIVAÇÃO DA ENZIMA	55
III.7.PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES SUBMETIDOS	
A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO.....	55
III.7.1. AMOSTRAS PARA HIDRÓLISE EM LEITES	
SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS	
DE PASTEURIZAÇÃO.....	55
III.7.2. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA HIDRÓLISE.....	56
III.7.3. HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	56
III.8. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICAS.....	57
III.8.1. ACIDEZ TITULÁVEL.....	57
III.8.2. CINZAS.....	57
III.8.3. EXTRATO SECO.....	57
III.8.4. GORDURA.....	57
III.8.5. LACTOSE.....	58
III.8.6. PROTEÍNA.....	58
III.8.7. DETERMINAÇÃO DO pH.....	58
III.8.8. TESTE ENZIMÁTICO COLORIMÉTRICO PARA	
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LACTOSE	
HIDROLISADA.....	58
III.8.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	

DA LACTASE.....	60
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
IV.1. PARAMETROS DE HIDRÓLISE.....	61
IV.1.1. ATIVIDADE DA ENZIMA LACTASE.....	61
IV.1.2. TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO.....	61
IV.1.3. TEMPERATURA DE INATIVAÇÃO.....	61
IV.2. PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE.....	62
IV.2.1. PROCESSAMENTOS PRELIMINARES.....	62
IV.2.2. PROCESSAMENTOS FINAIS.....	74
IV.3. PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES COM DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS.....	91
IV.4. PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO.....	104
V. CONCLUSÕES.....	116
V.1. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	118
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA II.1. - DIFERENÇAS DA MALABSORÇÃO DE LACTOSE ENTRE VÁRIAS POPULAÇÕES DO MUNDO.....	10
TABELA II.2. - PROPRIEDADES DAS LACTASES MICROBIANAS.....	14
TABELA II.3. - EFEITO DA TEMPERATURA DE PASTEURIZAÇÃO NA HIDRÓLISE DA LACTOSE POR 300 mg DE LACTASE DE <i>S. lactis</i> /Kg de leite desnatado incubados a 32°C.....	28
TABELA II.4. - EFEITO DA TEMPERATURA DE PASTEURIZAÇÃO SOBRE A HIDRÓLISE DA LACTASE.....	31
TABELA II.5. - EFEITO DO TEMPO DE PASTEURIZAÇÃO SOBRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTASE.....	31
TABELA II.6. - TAMANHOS MOLECULARES DOS COMPONENTES DO LEITE.....	38
TABELA IV.1. - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP1.....	63
TABELA IV.2. - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP2.....	64
TABELA IV.3. - LACTOSE HIDROLISADA (%) PARA O PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP1 EM 120 MINUTOS DE HIDRÓLISE.....	65
TABELA IV.4. - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO	

FINAL PF1.....	74
TABELA IV.5. - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO	
FINAL PF2.....	75
TABELA IV.6. - VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO PARA O PROCESSAMENTO PF1. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA: 0,20 ml/l.....	
	87
TABELA IV.7. - VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO. PARA O PROCESSAMENTO PF1 CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA: 0,12 ml/l.....	
	87
TABELA IV.8. - VALORES DE K_m E V_m PARA HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE OBTIDO NO PROCESSAMENTO PF1. CE = 0,20 ml/l.....	
	88
TABELA IV.9 - VALORES DE K_m E V_m PARA HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE OBTIDO NO PROCESSAMENTO PF1. CE = 0,12 ml/l.....	
	88
TABELA IV.10 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS1.....	
	91
TABELA IV.11 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS2.....	
	92
TABELA IV.12 - TEORES DE LACTOSE NOS LEITES DIAFILTRADOS ANTES E APÓS RECOMPOSIÇÃO PARA O PROCESSAMENTO PS1.....	
	93

TABELA IV.13 - TEORES DE LACTOSE NOS LEITES DIAFILTRADOS ANTES E APÓS RECOMPOSIÇÃO PARA O PROCESSAMENTO PS2.....	93
TABELA IV.14. - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS MINERAIS, DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA HIDRÓLISE DE LEITES DIAFILTRADOS OBTIDOS PARA O PROCESSAMENTO PS1. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA: 0,12 ml/l.....	103
TABELA IV.15. - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS MINERAIS, DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA HIDRÓLISE DE LEITES DIAFILTRADOS OBTIDOS PARA O PROCESSAMENTO PS2. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA: 0,12 ml/l.....	103
TABELA IV.16 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS LEITES EMPREGADOS NOS PROCESSAMENTOS PT1 E PT2.....	104
TABELA IV.17 - VELOCIDADE INICIAL DE REAÇÃO (g/min.l.) NO PROCESSAMENTO PT1 EM FUNÇÃO DAS TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO (TP) E TEMPERATURAS DE HIDRÓLISE (TH).....	107
TABELA IV.18 - VELOCIDADE INICIAL DE REAÇÃO (g/min.l.) NO PROCESSAMENTO PT2 EM FUNÇÃO DAS TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO (TP) E TEMPERATURAS DE HIDRÓLISE (TH).....	107
TABELA IV.19. - VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO PARA O PROCESSAMENTO PF2. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA: 0,20 ml/l.....	142

TABELA IV.20. - VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO EM
FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE
SUBSTRATO. PARA O PROCESSAMENTO PF2 CONCENTRAÇÃO DE
ENZIMA: 0,12 ml/l.....142

TABELA IV.21. - VALORES DE K_m E V_m PARA HIDRÓLISE DE
LACTOSE EM LEITE OBTIDO NO PROCESSAMENTO PF2.
CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA = 0,20 ml/l.....143

TABELA IV.22 - VALORES DE K_m E V_m PARA HIDRÓLISE DE
LACTOSE EM LEITE OBTIDO NO PROCESSAMENTO PF2.
CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA = 0,12 ml/l.....143

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA II.1. - DOIS POSSÍVEIS ESQUEMAS DE PROCESSO PARA HIDRÓLISE DA LACTOSE NO LEITE.....	23
FIGURA II.2. - EFEITOS DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NA HIDRÓLISE DA LACTOSE POR 300 mg DE LACTASE DE <i>S.</i> <i>lactis</i>	25
FIGURA II.3. - EFEITOS DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS SOBRE HIDRÓLISE DE LACTOSE DE SORO RECONSTITUÍDONA ATIVIDADE DE 300 mg DE LACTASE DE <i>S. lactis</i> /Kg DE SORO RECONSTITUÍDO A pH 6,6.....	27
FIGURA II.4. EFEITOS DO PRÉ-AQUECIMENTO DO LEITE NA HIDRÓLISE DA LACTOSE EM SORO, EM LEITE DESNATADO, E EM SOLUÇÃO DE LACTOSE.....	30
FIGURA II.5. - TAXA DE HIDRÓLISE DA LACTOSE COMO FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SORO E DA CONCENTRAÇÃO DA LACTOSE.....	35
FIGURA III.1.- FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO PARA OBTENÇÃO DE LEITES COM BAIXOS E DIFERENTES TEORES DE LACTOSE.....	50
FIGURA IV.1. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,50 ml/litro de leite.....	66
FIGURA IV.2. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM	

DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
PRELIMINAR PP1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C,
COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,50 ml/litro de
leite.....67

FIGURA IV.3 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
PRELIMINAR PP1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C,
COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,50 ml/litro de
leite.....68

FIGURA IV.4. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
PRELIMINAR PP1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C,
COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,50 ml/litro de
leite.....69

FIGURA IV.5. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
PRELIMINAR PP2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C,
COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,25 ml/litro de
leite.....70

FIGURA IV.6. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
PRELIMINAR PP2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C,
COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,25 ml/litro de
leite.....71

FIGURA IV.7. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
PRELIMINAR PP2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C,

COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,25 ml/litro de
leite.....72

FIGURA IV.8. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
PRELIMINAR PP2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C,
COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,25 ml/litro de
leite.....73

FIGURA IV.9. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM
CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de
leite.....77

FIGURA IV.10 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM
CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite.....78

FIGURA IV.11 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM
CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de
leite.....79

FIGURA IV.12 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM
CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de
leite.....80

FIGURA IV.13 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM

DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....81

FIGURA IV.14 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....82

FIGURA IV.15 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....83

FIGURA IV.16 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....84

FIGURA IV.17 - GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK, PARA O PROCESSAMENTO FINAL PF1, a 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/l.....90

FIGURA IV.18 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de

leite.....94

FIGURA IV.19 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO
PROCESSAMENTO PS1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE
30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de
leite.....95

FIGURA IV.20 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO
PROCESSAMENTO PS1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE
35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de
leite.....96

FIGURA IV.21- HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO
PROCESSAMENTO PS1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE
40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de
leite.....97

FIGURA IV.22 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO
PROCESSAMENTO PS2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE
25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de
leite.....98

FIGURA IV.23 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO
PROCESSAMENTO PS2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE
30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de
leite.....99

FIGURA IV.24 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM

DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO
PROCESSAMENTO PS2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE
35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de
leite.....100

FIGURA IV.25 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO
PROCESSAMENTO PS2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE
40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de
leite.....101

FIGURA IV.26 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES
SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO
NO PROCESSAMENTO PT1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE
25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de
leite.....108

FIGURA IV.27 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES
SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO
NO PROCESSAMENTO PT1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE
30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de
leite.....109

FIGURA IV.28 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES
SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO
NO PROCESSAMENTO PT1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE
35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de
leite.....110

FIGURA IV.29 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES
SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO
NO PROCESSAMENTO PT1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE

40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....	111
FIGURA IV.30 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....	112
FIGURA IV.31 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....	113
FIGURA IV.32 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....	114
FIGURA IV.33 - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....	115
FIGURA IV.34. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....	134

FIGURA IV.35. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....	135
FIGURA IV.36. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....	136
FIGURA IV.37. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.....	137
FIGURA IV.38. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite.....	138
FIGURA IV.39. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite.....	139
FIGURA IV.40. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO	

FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM
CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de
leite.....140

FIGURA IV.41. - HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM
DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO
FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM
CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de
leite.....141

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I.....	132
ANEXO II.....	133

RESUMO

O processo de hidrólise da lactose com enzima lactase comercial foi estudado em leite integral e em leites com diferentes teores de lactose e de sais minerais.

Para a obtenção destes leites, foi utilizada uma planta piloto de ultrafiltração, operando em diafiltração, tendo sido adicionada água na mesma taxa em que foi retirado o permeado.

A hidrólise foi realizada nos distintos leites, comparando-se com leite integral padrão. Os efeitos das variáveis tempo e temperatura de hidrólise foram estudados. O grau de hidrólise foi avaliado em diferentes tempos de reação sob as temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C e 40°C.

Os resultados obtidos mostram diferenças nos graus de hidrólise entre estes leites. Em geral, quanto maior o teor de lactose nos leites, menor a porcentagem de lactose hidrolisada. Leite com 50 gramas de lactose por litro teve 14 % de lactose hidrolisada em 20 minutos, a 35°C. Já o leite com 26 gramas de lactose por litro, quando sob as mesmas condições, teve 19 % da lactose hidrolisada. Para as outras temperaturas de hidrólise o comportamento foi similar.

Nos leites com diferentes teores de sais minerais a diferença encontrada na hidrólise foi pequena, mas em geral, quanto maior o teor de sais minerais nos leites, maior a porcentagem de lactose hidrolisada. Leite com 0,7 % de sais teve

7,2 % de lactose hidrolisada a 35°C, em 20 minutos de hidrólise, e leite com 0,5 % de sais, nas mesmas condições, teve 6 % de lactose hidrolisada. Para as outras temperaturas de hidrólise o comportamento foi semelhante.

O efeito da pasteurização do leite na hidrólise da lactose também foi estudado. Esta etapa consistiu no processamento de leite integral com quatro pré-tratamentos térmicos: 68°C, 76°C, 84°C e 92°C por 5 minutos.

Dos resultados obtidos comprovou-se que o aumento da atividade da enzima lactase foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura empregada nos pré-tratamentos. Leite pasteurizado a 68°C, por 5 minutos, teve 9,72 % de lactose hidrolisada. Já quando pasteurizado a 92°C, 14,67 % de lactose presente no leite foi hidrolisada. Ambas as hidrólises citadas foram realizadas em 20 minutos, a 40°C. O comportamento foi similar nas outras temperaturas de hidrólise.

SUMMARY

The process of lactose hydrolysis studied employed commercial lactase enzyme applied to whole milk, which would be used as a control milk, and to a group of samples, each one containing milk at different concentrations of lactose and mineral salts.

An ultrafiltration pilot plant was used to obtain, through diafiltration, the samples of milk mentioned. Water was then added at the same rate at which permeate was removed.

Both the group of milk samples and the control milk were hydrolyzed, the results obtained with the first ones being compared to the numbers obtained from the latter. The effect of changes in temperature and length of time of hydrolysis were also studied.

Hydrolysis procedures were accomplished at four distinct temperatures : 25°C, 30°C, 35°C and 40°C, at which the rates of lactose hydrolysis achieved were evaluated for the several different lengths of time of the reactions.

The results obtained show diverse rates of lactose hydrolysis among all the samples.

Usually, the higher the content of lactose in milk the lower was the percentage of lactose hydrolyzed in that milk. Milk containing 50 g of lactose per liter, when hydrolyzed for 20 minutes at 35°C, resulted in 14 % of hydrolyzed lactose,

whereas 19 % of lactose was hydrolyzed when milk containing only 26 g of lactose per liter was submitted to hydrolysis under the same conditions. The same procedure was repeated at other temperatures with similar results, thus revealing a tendency.

In milk samples containing diverse amounts of mineral salts, differences found among their respective results were small, but, usually, the higher the amount of mineral salts present in milk, the higher the percentage of lactose hydrolyzed in it. A sample of milk containing 0.7 % mineral salts, after being hydrolyzed for 20 minutes at 35°C, resulted in 7.2 % hydrolysed lactose, whereas milk with 0.5 % mineral salts had 6 % of its lactose hydrolyzed under the same conditions. A trend can be noticed for, at other temperatures, similar numbers were obtained.

The effect of milk pasteurization on lactose hydrolysis was also studied. The process consisted in submitting whole milk to forewarming procedures for 5 minutes, at the following temperatures: 68°C, 76°C, 84°C e 92°C.

From the results obtained it can be said that the increase in lactase activity was proportional to the temperature of forewarming. It was possible to obtain 9.72 % of hydrolyzed lactose from milk pasteurized for 5 minutes at 68°C. But when milk was pasteurised at 92°C, 14,67 % of the lactose present in it was hydrolyzed. Both hydrolysis procedures mentioned above were accomplished for 20 minutes at 40°C. Another tendency was so revealed by the results obtained from hydrolysis procedures accomplished at other temperatures.

I. INTRODUÇÃO

A lactose é um dissacarídeo que está naturalmente presente no leite, sendo o seu maior componente sólido. A lactose é consumida como dissacarídeo, mas não é absorvida sob esta forma pela parede intestinal. Para que essa absorção ocorra, é necessário que seja hidrolisada nos monossacarídeos glicose e galactose, pela enzima intestinal lactase. Devido à insuficiência de lactase, muitos indivíduos de diferentes raças apresentam dificuldade no consumo de leite e de produtos lácteos. A dificuldade na digestão da lactose, além da redução do valor nutricional, também provoca efeitos colaterais desconfortáveis e desestímulo ao consumo do leite (MILLER & BRAND, 1980).

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para reduzir a concentração da lactose em produtos lácteos, como a cristalização, diálise, filtração em gel e ultrafiltração. Outros métodos visam a modificação química da lactose, e incluem redução, oxidação, fermentação e hidrólise.

Vários pesquisadores têm investigado a hidrólise enzimática da lactose em seus monossacarídeos antes do seu consumo. A hidrólise pode possibilitar a utilização de leite, que é rico em nutrientes essenciais, por indivíduos com insuficiência de lactase intestinal (BURVALL *et alii*, 1977).

A hidrólise enzimática pode ser conseguida pela ação das enzimas lactases, com quebra da ligação glicosídica β -1,4 entre os dois monossacarídeos, liberando 1 molécula de D-glicose e 1 molécula de D-galactose. A taxa e o grau de hidrólise são influenciados pela fonte da enzima β -galactosidase, pela concentração enzimática, pelo tempo de reação, e pelas condições e concentração do substrato (MILLER & BRAND, 1980).

Embora o potencial de utilização das enzimas lactases no leite tenha sido reconhecido no início do século, somente em 1970 é que foram feitas preparações da enzima para a produção de produtos com baixo teor de lactose (HARJU, 1987). O reconhecimento da existência da intolerância à lactose foi importante para o estabelecimento dos processos de obtenção da enzima lactase (NIJPELS, 1981).

A lactase (β -Galactosidase), pode ser isolada de plantas, animais e microrganismos, mas apenas as lactases de fontes microbianas são disponíveis comercialmente na forma purificada. As lactases que têm sido mais usadas para hidrólise da lactose no leite são: As lactases de *Kluyveromyces lactis* e de *Kluyveromyces fragilis* (WOYCHIK & WONDOLOWSKI, 1973; RICHMOND, GRAY & STINE, 1981).

A hidrólise enzimática da lactose possibilita uma série de aplicações na indústria de laticínios, como por exemplo: redução da areosidade em sorvetes, prevenção da cristalização em produtos congelados, aumento da taxa de produção de ácido em produtos fermentados, entre outras.

Assim sendo, teve-se como objetivos neste trabalho o estudo

da hidrólise da lactose (grau de hidrólise em função do tempo e da temperatura) em leites com diferentes teores de lactose e de sais minerais, produzidos através do processo de ultrafiltração, e também o estudo da influência da temperatura de pasteurização do leite na hidrólise da lactose do leite posterior a esta pasteurização.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. LACTOSE

A lactose é o carboidrato característico do leite. Nele é encontrada em altas concentrações, bem como na glândula mamária. Pode ainda aparecer, em pequenas porcentagens, no sangue e na urina, especialmente durante a gravidez e a amamentação, como resultado da lactose formada na glândula mamária (NICKERSON, 1974).

Durante as primeiras semanas de vida, a maioria dos recém-nascidos depende de alguma forma de leite para suas necessidades nutricionais. Mesmo que outros alimentos sejam introduzidos, o leite continua a fornecer-lhes mais da metade das necessidades calóricas e de nutrientes essenciais (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1974). Em leite humano, a energia biológica oriunda da lactose corresponde a cerca de 40 % a 50 % do total energético disponível. A lactose apresenta, ainda, a vantagem de não ser substrato facilmente disponível para as fermentações de bactérias patogênicas (ANGELIS, 1987).

A lactose é encontrada no leite de vaca em faixas de 4,4 % a 5,2 % . Já o leite humano contém mais lactose (7,0 %), daí a prática de se adicionar lactose ou outros carboidratos no leite de vaca para alimentação infantil (NICKERSON, 1974).

A lactose pode ser hidrolisada por ácidos minerais ou por enzimas lactases (WALSTRA & JENNESS, 1987).

Os produtos imediatos da hidrólise pelas lactases são a D-glicose e a D-galactose, em porções iguais, mas podem ocorrer reações paralelas de produção de oligossacarídeos (NICKERSON, 1974).

A lactose tem baixa solubilidade (15 % em água a 20°C) e tem baixa doçura (16 se comparada com sacarose a 100); Já o produto hidrolisado é mais solúvel, mais doce, e tem uma pressão osmótica duas vezes maior que a lactose (RICHARDSON, 1975).

Sendo um açúcar redutor, a lactose pode reagir com proteínas, peptídios e amino ácidos por reação de Maillard (TWEEDIE, MACBEAN & NICKERSON, 1978).

As reações de Maillard, entre a lactose e o grupo amino livre da lisina, são a principal razão para a diminuição do valor nutricional protéico do leite, durante a secagem e a estocagem. Quando a lactose é quebrada em glicose e galactose, o número de carboidratos redutores aumenta, e sendo os mesmos mais reativos que a lactose acarretam maior perda de lisina (BURVALL et alii, 1977; BURVALL et alii, 1978).

A formação de oligossacarídeos durante a hidrólise da lactose foi verificada por BURVALL, ASP & DAHLQVIST (1979), concluindo que a quantidade de oligossacarídeos formada aumentou com a concentração de lactose.

II.2. INTOLERÂNCIA À LACTOSE

O açúcar do leite não é absorvido, pelo organismo humano, sob a forma de lactose, a não ser quando sua concentração na luz intestinal é muito alta, ou quando a mucosa do intestino está lesada. Somente em tais situações é que pequenas quantidades de lactose podem entrar passivamente na corrente sanguínea, sendo, porém, eliminadas pelos rins mais tarde, ocasião em que ocorre a lactosúria (BEIGUELMAN & SEVÁ-PEREIRA, 1983). A lactosúria é encontrada em 9 % dos seres humanos saudáveis de ambos os sexos (NICKERSON, 1974).

Para que a lactose seja absorvida no intestino, ela tem que ser hidrolisada, dando origem à galactose e à glicose. Estes monossacarídeos são absorvidos pelas células epiteliais, por transporte ativo, e a galactose é metabolizada rapidamente em glicose no fígado (ANGELIS, 1987).

A hidrólise ocorre na mucosa do intestino delgado, pela enzima beta-galactosidase, mais comumente chamada lactase. A produção da lactase intestinal pode começar a diminuir progressivamente a partir da época do desmame, até atingir teores muito baixos, correspondentes a 5 % a 10 % dos níveis presentes durante a fase de lactação. A idade em que é atingida essa diminuição máxima da produção de lactase intestinal varia, entretanto, segundo as populações (BEIGUELMAN & SEVÁ-PEREIRA, 1983).

Em pessoas com deficiência de lactase, a lactose ingerida

permanece na luz do intestino delgado sem sofrer hidrólise. Isso faz com que a pressão osmótica do fluido intraluminal se torne superior à do plasma, o que provoca um fluxo de água extracelular para o interior do duodeno e do jejuno, bem como para o estômago. Essa elevação do volume do fluido intestinal, por sua vez, estimulará os movimentos peristálticos, aumentando, assim, a velocidade do trânsito intestinal. Afora isso, tem-se, ainda, que a lactose não absorvida no intestino delgado pode ser fermentada, em parte ou totalmente, pela microflora do cólon. Disso resulta a produção de ácidos orgânicos (ácido lático e ácido acético) e de gases (hidrogênio, dióxido de carbono e metano). Estes fenômenos fisiológicos podem provocar, portanto, as manifestações de intolerância à lactose, que incluem cólicas, meteorismo, borborigmos, flatulência e diarreias (BEIGUELMAN & SEVÁ-PEREIRA, 1983).

A intolerância à lactose é classificada como primária, secundária ou congênita, e estas três formas devem ser consideradas separadamente, para se evitar confusão (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1978).

A intolerância à lactose do tipo primária é a deficiência que se verifica geralmente em adultos, os quais, presumivelmente, tiveram níveis normais de lactase durante a infância. A explicação desta deficiência primária é dada considerando-se que a lactase é uma enzima induzível. Durante a infância o consumo de leite é alto, e a atividade da lactase também é alta, mas, com o tempo, com a diminuição do consumo do leite, que age como estímulo, a atividade da lactase também

diminui. Vários pesquisadores afirmaram ser o tipo primário típico dos grupos étnicos que não têm tradição de grandes consumidores de leite. Entre eles estão os asiáticos, africanos, índios americanos e os aborígenes australianos (FERREIRA, 1978).

Estudos têm mostrado que a deficiência de lactase do tipo secundária é uma complicação comum de infecções gastrointestinais e infestações, das quais decorre prejuízo para o revestimento intestinal (ROSENSWEIG, 1969; FERREIRA, 1978; LEE & LORENZ, 1979).

Já intolerância à lactose congênita é um raro distúrbio em cujos pacientes desenvolve-se grave diarreia fermentativa e flatulência, que se manifesta na ingestão de lactose. Ela está presente desde o nascimento; a histologia da mucosa intestinal é normal, e a atividade nas microvilosidades é baixa ou totalmente ausente (BRAND & MILLER, 1980; FURTADO, 1987).

O problema da intolerância à lactose em pessoas que apresentam sintomas desconfortantes no trato digestivo aparece na literatura médica a partir de 1900. Apesar disto, somente nos últimos 40 anos a intolerância à lactose começou a ser estudada (BRAND & MILLER, 1980). Estes estudos envolveram um grande número de pesquisadores em diferentes linhas de pesquisa (LIFSHITZ *et alii*, 1971; PAIGE, BAYLESS & GRAHAM, 1972; PAIGE *et alii*, 1975; BEAUFRAND *et alii*, 1977; PAYNE-BOSE *et alii*, 1977; SIMMONS, JOHNSON & KRETCHMER, 1977; WELSH, 1978; BARILLAS & SOLOMONS, 1987).

No Brasil, foram poucos os pesquisadores que relataram resultados de investigações sobre a deficiência de lactase

intestinal. A única pesquisa visando a estimativa da frequência da deficiência congênita da lactase em populações brasileiras sadias é a que forneceu informações sobre a distribuição dos indivíduos examinados segundo o aumento máximo da glicemia. Em tal pesquisa, a deficiência foi manifestada por 45 % dos caucasóides, 85 % dos negróides e por 100 % dos descendentes de japoneses, examinados em Campinas-SP (BEIGUELMAN & SEVÁ-PEREIRA, 1983).

Estudos têm revelado variações geográficas e raciais na incidência da intolerância à lactose (SANDINE & DALI, 1979; BRAND & MILLER, 1980; HOUTS, 1988).

A incidência da intolerância à lactose é alta em crianças subnutridas de países em desenvolvimento e em crianças aborígenes australianas (LEE & LORENZ, 1979).

Essa incidência é reconhecida, ainda, em 70 % dos adultos negros nos EUA, 95 % dos Africanos e em acima de 90 % dos Filipinos, Japoneses e Indianos (NICKERSON, 1974). Diferenças na má absorção de lactose entre vários povos do mundo podem ser verificadas na TABELA II.1 a seguir:

TABELA II.1 DIFERENÇAS DA MÁ ABSORÇÃO DE LACTOSE
ENTRE VÁRIAS POPULAÇÕES DO MUNDO

I. Grupos onde predomina 60 % a 100 % de má absorção A. Oriente Próximo e Mediterrâneo : Árabes, Judeus, Gregos, Chiprianos, Italianos (sul) B. Ásia : Tailandeses, Indonésios, Chineses, Coreanos Indianos (sul e leste), Vietnamitas. C. África : Povos Nigérios do sul e Bantos D. América do norte e sul : Esquimós, Índios Canadenses e Americanos (EUA), Negros dos EUA. E. Oceania : Aborígenes Australianos
II. Grupos onde Predomina 2 % a 30 % de má absorção A. Europa : Dinamarqueses, Finlandeses, Alemães, Franceses, Holandeses, Poloneses, Tchechos, Italianos (norte) Ingleses B. África : Hima, Tussi e Fulani (nômades) C. Índia : áreas de Punjab e Nova Delhi

(CHOURIGAN, 1984)

Pesquisadores australianos relataram os resultados de testes de leite lactose hidrolisado em crianças aborígenes. Leite lactose hidrolisado e leite normal foram dados a dois grupos de 25 crianças, num período de 7 a 71 dias. Os resultados

mostraram que crianças com menos de um ano de idade ganharam peso mais rapidamente com leite lactose hidrolisado do que aquelas alimentadas com leite normal (MANN, 1981).

MITCHELL & BAYLESS (1975), citados por NIJPELS (1981), fizeram testes clínicos em 32 adolescentes pretos saudáveis; 17 membros deste grupo foram considerados lactose intolerantes quando submetidos ao Teste de Tolerância à Lactose (LTT). Do grupo de 19, sintomas crônicos de intolerância foram acompanhados por um aumento do nível de glicose no sangue em 13 indivíduos. Sintomas clínicos apareceram em 7 destes indivíduos, o que corresponde a 37 % do grupo inicial de 19 pessoas.

As implicações nutricionais nos indivíduos que apresentam sintomas clínicos de deficiência de lactase consistem na má absorção de nutrientes presentes no leite. Há também uma diminuição da absorção de carboidratos, podendo afetar o ganho de peso em crianças. Em recém nascidos, a lactose pode contribuir com 30 % ou mais da energia ingerida (BRAND & MILLER, 1980).

É também conhecido que a lactose estimula a absorção intestinal de alguns minerais, entre os quais o cálcio, o que é um efeito benéfico (HOURIGAN, 1984; ANGELIS, 1987). Outros estudos mostram que a lactose aumenta a absorção intestinal de cálcio e diminui a excreção urinária de cálcio e fósforo. Há algumas evidências de que a osteoporose (degeneração dos ossos) possa ocorrer como consequência da intolerância à lactose (SANDINE & DALY, 1979).

MANN (1977), cita que pesquisadores tchecos têm ministrado leite livre de lactose em pessoas sadias e em pessoas intolerantes à lactose. Chegaram à conclusão de que, em pessoas sadias, a taxa de absorção de cálcio foi mais baixa com leite livre de lactose do que com leite normal; mas, em pessoas intolerantes à lactose, o cálcio foi absorvido mais rapidamente com o leite livre de lactose.

II.3. LACTASE : β - D - GALACTOSIDASE

As enzimas são catalizadores biológicos, de natureza protéica, que intervêm em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis, as quais aceleram por ativação específica. Todas são macromoléculas que pertencem à classe das proteínas globulares (RICHARD, 1984).

Lactase (EC 3.2.1.2.3) é o nome comum para a enzima β -D-Galactosidase, ou β -D-Galactosídeo-galactohidrolase (SHUKLA, 1975; GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985). A enzima β -galactosidase é uma hidrolase, a qual ataca o grupo o-glucosil da lactose (PRENOSIL, STUKER & BOURNE, 1987).

O sítio ativo da molécula da β -galactosidase é caracterizado por uma ligação -SH e um grupo imidazol. O número de sítios ativos por molécula na β -galactosidase é dependente da temperatura, sugerindo que, a baixas temperaturas, a conformação molecular é tal que não são todos os sítios ativos que estão disponíveis. A máxima atividade a temperaturas mais altas pode ser atribuída, em parte, a este fator (SHUKLA, 1975).

A galactose é geralmente considerada um inibidor competitivo da lactase, enquanto compete com a lactose pelos sítios ativos da enzima (PRENOSIL, STUKER & BOURNE, 1987).

A β -Galactosidase é uma das enzimas melhor definidas na literatura. É amplamente distribuída na natureza e pode ser encontrada em plantas, órgãos animais, leveduras, bactérias e fungos (SHUKLA, 1975; RICHMOND, GRAY & STINE, 1981). Esta enzima pode ser proveniente de diferentes fontes, variando consideravelmente em muitas de suas propriedades, embora a especificidade da enzima permaneça essencialmente a mesma (RICHMOND, GRAY & STINE, 1981). As melhores fontes de lactase são : As lactases de *Kluyveromyces fragilis*, de *Kluyveromyces lactis*, de *Aspergillus niger* e de *Escherichia coli* (KULP, 1975; RICHMOND, GRAY & STINE, 1981).

As lactases que têm sido mais usadas comercialmente para hidrólise de lactose são aquelas originárias da levedura *K. lactis* e do fungo *A. niger*. Estas lactases diferem em suas propriedades, particularmente no pH ótimo de atividade. A lactase obtida de *K. lactis* tem um pH ótimo de 6,8 a 7,0, máxima estabilidade na faixa de pH de 6,0 a 8,5 e temperatura ótima de 35°C. Embora apropriada para o tratamento do leite (pH 6,6) e do soro doce (pH 6,2), falta estabilidade a pH inferior a 6,0, impossibilitando seu uso em tratamento ácido do soro (pH 4,5). A lactase de *A. niger* com pH ótimo de 4,0 a 4,5, boa estabilidade em ampla faixa de pH (pH 3,0 a 7,0) e uma temperatura ótima de 55°C, é apropriada para a hidrólise da lactose de soro ácido (HOLSINGER, 1978).

Um resumo das propriedades das lactases microbianas pode ser verificado na TABELA II.2 abaixo :

TABELA II.2 PROPRIEDADES DAS LACTASES MICROBIANAS

FONTE	pH ÓTIMO	ESTABILIDADE	TEMPERATURA ÓTIMA (°C)	CO-FATORES NECESSÁRIOS	Km (mM)
<i>Aspergillus niger</i>	4-4,5	3,0-7,0	55	nenhum	85
<i>Aspergillus oryzae</i>	5	3,5-8,0	50-55	nenhum	50
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	6,5-7,5	37	Mn, K	14
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,8-7,0	6,0-8,5	35	Mn, Na	12-17
<i>Escherichia coli</i>	7,2	6,0-8,0	40	Na, K	2
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2	-	55	-	6
<i>Lactobacillus citrovarum</i>	6,5	-	60	nenhum	7,8

(GREENBERG & MAHONEY, 1981)

Estudos demonstraram que a lactase de *K. lactis* é instável ao calor, e torna-se inativa a temperaturas relativamente baixas (GUY & BINGHAM, 1978).

WOYCHIK & WONDOLOWSKI (1973), citam que a galactose é um inibidor competitivo da β -galactosidase de *A. niger*. Esta inibição aumenta durante a hidrólise, e reduz substancialmente a eficiência da enzima. Por exemplo, 0,01 mol de galactose causa inibição de 60 % da hidrólise de 0,1 mol de lactose. Assim, a taxa de hidrólise não é proporcional à quantidade de enzima adicionada em relação ao tempo exposto.

Reforçando a mesma conclusão, HOURIGAN (1976), citado por HOURIGAN (1984), também mostrou que as lactases de *A. niger* (LACTASE N) e de *K. lactis* (MAXILACT) foram seriamente inibidas por galactose em leite desnatado reconstituído. A galactose foi 13,5 vezes (a 50°C) e 7,5 vezes (a 35°C) mais atraída que a lactose ao sítio ativo da enzima.

De acordo com GUY & BINGHAM (1978), quando a concentração de lactase é aumentada, mais lactose é hidrolisada. Contudo, a taxa de hidrólise da lactose não aumenta em proporção direta.

Vários pesquisadores têm mostrado que as enzimas lactases são inibidas pelo produto (galactose) também, em sistemas tamponados (HOURIGAN, 1984).

DAHLQVIST *et alii* (1977) relataram que a inibição da reação de hidrólise é causada pela galactose, e se há crescimento bacteriano no leite, a atividade da lactase também diminui rapidamente.

MITTALL (1983), citado por HOURIGAN (1984), mostrou que o grau de hidrólise da lactose em leite integral varia linearmente com o logaritmo da atividade da lactase de *A. oryzae*, tanto a 55°C por 5 hs quanto a 5°C por 24 hs.

A atividade da lactase pode ser determinada com lactose como substrato; com isto os percentuais de glicose e galactose podem ser estimados. Alternativamente, orto - nitrofenil - β -D-galactosidase (ONPG) pode ser usado como substrato para lactase, e o resultado estimado em cromogênio orto-nitrofenol (KULP, 1975; BOUVY, 1975).

NIJPELS *et alii* (1980), relataram que o grau de hidrólise

da lactose no leite é inversamente proporcional à diminuição do ponto de congelamento, mostrando uma relação linear entre ambos.

A determinação do teor de lactose hidrolisada através de teste enzimático, baseado no uso do reagente Glicose Oxidase, é relatado por vários pesquisadores (DAHLQVIST, 1964; WIERZBICKI, EDWARDS & KOSIKOWSKI, 1974; PASTORE & PARK, 1981; MARTINEZ & SPECKMAN, 1987).

II.3.1. Propriedades da Lactase de *Kluyveromyces lactis* - "Maxilact"

Esta lactase é apresentada na forma líquida, purificada, isolada da levedura *K.lactis*. Esta levedura foi descrita pela primeira vez em 1889, e é um organismo bem conhecido, usado na produção de certos tipos de iogurtes e outros produtos fermentados. A lactase de *K. lactis*, sendo derivada de um organismo lácteo, tem sua atividade ótima perto do pH natural do leite fresco (6,6 a 6,8). Como consequência, pode ser aplicada ao leite e ao soro doce. Abaixo do pH 5, a enzima perde, completa, e irreversivelmente, a atividade. O perfil ótimo de atividade é encontrado entre 35°C e 40°C. Contudo, uma boa atividade pode ser encontrada entre 4°C e 6°C (NIJPELS, 1981).

Devido à galactose ser um inibidor competitivo da enzima, e devido à atividade transgalactosidase ser mais pronunciada a concentrações mais altas de lactose, é recomendado que a lactose seja diluída antes da hidrólise, e que a enzima seja

inativada antes de concentrar o leite ou o soro (BOUVY, 1975). Hidróxido de potássio e sais de fosfatos são ativadores da enzima, e sódio e cálcio são seus inibidores (NIJPELS, 1981).

II.4. REDUÇÃO DO TEOR DE LACTOSE EM LEITE

II.4.1. Métodos de Redução do Teor de Lactose e Hidrólise

A redução do teor de lactose pode ser conseguida por remoção física (ultrafiltração), por hidrólise ácida, ou ainda por catálise enzimática, com lactases. Diferente da hidrólise enzimática, a hidrólise ácida não pode ser aplicada à hidrólise da lactose em leite e a soluções contendo proteína livre, por causa da desnaturação da proteína, que ocorre a altas temperaturas e baixos valores de pH (MILLER & BRAND, 1980). Já quando há remoção física de lactose, ocorrem não só mudanças no sabor, como também perda de minerais, vitaminas e do valor energético do leite. Daí a preferência pela hidrólise enzimática, que não apresenta estas alterações (DAHLQVIST *et alii*, 1977).

A hidrólise enzimática pode ser conseguida por enzimas livres (simples uso), geralmente em processo de hidrólise em batelada, ou por sistema de reutilização com recuperação da enzima por membranas, ou ainda por imobilização das células contendo a enzima (GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985; ZADOW, 1986).

No caso do uso da enzima livre para a hidrólise, vários fatores devem ser considerados. Estes incluem substrato, pH de

operação, temperatura máxima e tempo de contato permitido, atividade das enzimas, e custos (ZADOW, 1986).

Segundo TWEEDIE, MACBEAN & NICKERSON (1978), para uma operação econômica, a hidrólise deve ser geralmente limitada a um máximo de 60 % a 70 % do total da lactose presente.

Da hidrólise resultam aumento da doçura, da solubilidade, e do poder redutor; maior pressão osmótica e fermentabilidade; e redução da viscosidade do leite (HOLSINGER, 1978; MILLER & BRAND, 1980).

A hidrólise total da lactose faz o leite tão doce quanto 4,5 % de solução de sacarose, o que é equivalente à doçura produzida por 6 gramas de sacarose em um copo de 125 ml de café ou chá (LANG & LANG, 1977).

Não foram observadas alterações no aroma, cor, pH e sedimentação em leites tratados com lactases de *Saccharomyces lactis*, nos experimentos de KOSIKOWSKI & WIERZBICKI (1973). No sabor, a doçura foi aumentada consideravelmente com o aumento da concentração de enzima.

Como mencionado anteriormente, devido ao problema da intolerância à lactose, tem crescido o interesse na fabricação de leites e derivados com baixos teores de lactose (MANN, 1981).

De acordo com GUY & BINGHAM (1978), os benefícios da hidrólise da lactose no preparo de produtos lácteos são numerosos.

A introdução de produtos lactose hidrolisados tem sido pesquisada por vários laboratórios e companhias do mundo. Contudo, a validade de tais produtos é limitada por fatores como

a estabilidade (aumento da susceptibilidade ao ataque microbiano), custo, aceitação do consumidor, e regulamentações (HOURIGAN, 1984).

O uso de leites lactose hidrolisados na fabricação de iogurte, ou outro produto fermentado, pode ser benéfico para pessoas com intolerância à lactose. Assim, a lactase (β -galactosidase) de *Saccharomyces lactis* (ou *Kluyveromyces lactis*, de acordo com a nova nomenclatura), hidrolisa de 90 % a 95 % de lactose em 2 a 3 hs, a 30°C, quando adicionado ao leite na razão de 0,3 g/l. Quando foi preparado iogurte a partir deste leite hidrolisado, THOMPSON & GYURICSEK (1974), observaram que a taxa de ácido desenvolvido para alcançar pH 4,6 foi menor que aquela desenvolvida no iogurte padrão. O produto comparado com o iogurte padrão era mais doce e menos ácido, e tinha maior aceitação por pessoas que normalmente não consomem iogurte. Em casos sérios de intolerância, o uso do iogurte, ou similares, pode não ser bem tolerado. De acordo com investigações clínicas, na Suíça, JUNGO (1978), encontrou que, de onze casos, o iogurte obtido com leite hidrolisado só não foi tolerado em dois casos.

Segundo RENNER (1978), durante a fabricação de iogurte, a lactose normalmente é diminuída de 20 % a 30 %. As quantidades relativas de galactose (0,2 % a 1,3 %) e, particularmente, de glicose, presentes no iogurte, são metabolizadas no organismo. Em pessoas que sofrem de galactosemia, a presença de galactose na sua dieta pode causar intolerância a leites fermentados, leite integral, ou a algum alimento contendo lactose.

Pesquisas do uso da lactase em produtos fermentados, tais

como o iogurte, creme ácido e queijo "cottage", mostraram o valor adicional destes produtos para pessoas intolerantes à lactose (KILARA & SHAHANI, 1976). De acordo com RASIK & KURMANN (1978), leites parcialmente lactose hidrolisados (50 % a 80 %) podem ser usados na fabricação de leites fermentados, especialmente quando a concentração de lactose pode ser aumentada através da adição de leite em pó desnatado ou evaporado.

A hidrólise parcial (25 % a 30 %) da lactose também previne a cristalização de outros açúcares em leite condensado açucarado e doce de leite. Na preparação de sorvete, e de concentrado congelado de leite, a hidrólise parcial da lactose previne a arenosidade e a floculação da proteína durante estocagem prolongada (NIJPELS, 1981).

Segundo BOUVY (1975), a hidrólise da lactose é um processo bastante econômico para a prevenção da cristalização em leite condensado ou evaporado, em concentrados de leite, e ainda em xaropes de soro concentrado. Isto porque apenas 20 % a 30 % da lactose tem que ser hidrolisada para inibir a cristalização, mesmo durante prolongada estocagem. Pequenas quantidades de glicose e galactose podem ser suficientes para inibir a formação de cristais de lactose.

O aumento da doçura de leite lactose hidrolisado oferece oportunidade para sua aplicação em diversos produtos, onde se requer pouca ou nenhuma adição de sacarose (ZADOW, 1986).

Em geral, hidrólise de cerca de 70 % da lactose do leite aumenta sua doçura em uma quantidade correspondente a uma adição

de cerca de 2 % de sacarose (ZADOW, 1986).

Segundo HOLSINGER (1978), leite lactose hidrolisado foi preparado em planta piloto, onde foram avaliadas propriedades físicas e organolépticas. Leites com hidrólises de 30 %, 60 % e 90 % foram equivalentes, em doçura, a leites contendo, respectivamente, 0,3 %, 0,6 % e 0,9 % de sacarose adicionada. O leite foi testado por painéis de 15 a 20 provadores, que usaram a escala hedônica de nove pontos. Os resultados mostraram uma aceitação positiva de leite hidrolisado, devido a todos os escores obtidos serem acima de cinco.

Em análise sensorial realizada por PAIGE *et alii* (1975), leite hidrolisado (90 % de hidrólise) foi servido a 32 provadores. Destes, apenas 1 não gostou do leite.

MANN (1981) cita desenvolvimentos recentes na aplicação da hidrólise enzimática de lactose de leite e soro na indústria de laticínios, a saber: a fabricação de leite parcialmente hidrolisado (75%), na Itália; leite lactose hidrolisado no Japão; iogurte com 30 % a 40 % de leite lactose hidrolisado, e o uso de leite lactose hidrolisado na fabricação de queijo. De acordo com o regulamento francês, o leite lactose hidrolisado pode ser usado no lugar de glicose e sacarose, biscoitos, sobremesas, e produtos de confeitaria.

Na Itália, em Milão, a Indústria de Laticínio Central tem testado o mercado com um leite parcialmente hidrolisado-UHT. O produto, com o nome "Accadi", tem sido bem aceito entre os consumidores, que pagam 30 % a mais do que pelo leite normal UHT (MANN, 1981; HOURIGAN, 1984).

Na Holanda uma companhia de leite produz leite hidrolisado com "Maxilact" (99 % de hidrólise). O nome do produto é "Lactalac", e é usado em hospitais e vendido em lojas especializadas em produtos dietéticos (BOUVY, 1975).

Nos Estados Unidos, os consumidores intolerantes à lactose podem adquirir lactase (derivada de *K. lactis*) em forma de pó, em pequenos envelopes de uso individual (LACTAID). Adicionando-se o conteúdo de 1 envelope a um copo de leite, um dia antes do consumo, a lactose será hidrolisada durante a noite (McCORMICK, 1976; LANG & LANG, 1977; HOURIGAN, 1984).

VARGAS (1987), propõe uma metodologia simples para a hidrólise doméstica de leite em residências, e em escolas de primeiro grau, com a adição de concentrados enzimáticos comerciais.

II.4.2. Métodos para a Produção de Leite Lactose Hidrolisado

Dois possíveis esquemas de processos enzimáticos para produção de leite lactose hidrolisado são mostrados na FIGURA II.1. Com o método A, a enzima é adicionada na linha de leite pasteurizado ou, assepticamente, ao leite longa vida. Neste último caso, a enzima deve ser estéril. A hidrólise ocorre durante o transporte do leite. Com o método B, a hidrólise é realizada nos tanques de leite, durante o período de estocagem de uma noite. As desvantagens do método B são a grande quantidade relativa de enzima exigida, e a necessidade de se incubar o leite em grandes tanques, por poucas horas, a 30°C, ou

por uma noite, em temperatura refrigerada, aumentando o custo e a carga bacteriana (NIJPELS, 1981).

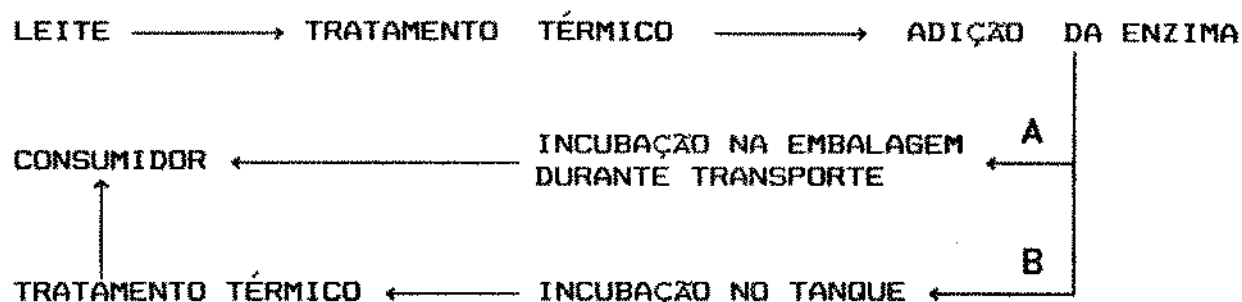


FIGURA II.1. DOIS POSSÍVEIS ESQUEMAS DE PROCESSO PARA HIDRÓLISE DA LACTOSE NO LEITE (NIJPELS, 1981).

A pasteurização normal é recomendada ao leite ou ao soro a serem hidrolisados, que devem ter boa qualidade microbiológica, pois a atividade da lactase pode ser inibida em caso contrário (BOUVY, 1975).

O processo onde a lactase é adicionada ao leite esterilizado foi patenteado pela Tetra-Pak Internacional, na Suécia (1981). Neste processo, a lactase permanece ativa no leite. Acima de 7 a 10 dias a enzima já foi capaz de hidrolisar toda a lactose. A vantagem do processo é a possibilidade de permanecer sem refrigeração e ser transportada para áreas distantes, onde a incidência da intolerância à lactose é alta (HOURIGAN, 1984).

O tempo de prateleira de leite esterilizado pode ser usado

para prolongação da incubação de uma a várias semanas, à temperatura ambiente. Assim, quantidades mínimas de enzima são necessárias para a diminuição do custo do processo (DAHLQVIST *et alii*, 1977; LANG & LANG, 1977).

MILLER & BRAND (1980), realizaram um processo de hidrólise por batelada, no qual pré-aqueceram o leite, tendo ajustado a temperatura em 35°C antes da adição de 300 mg/l de lactase (MAXILACT). A reação foi desenvolvida em 3 horas, e a pasteurização foi efetuada após a hidrólise. A hidrólise foi acompanhada pela determinação de glicose produzida.

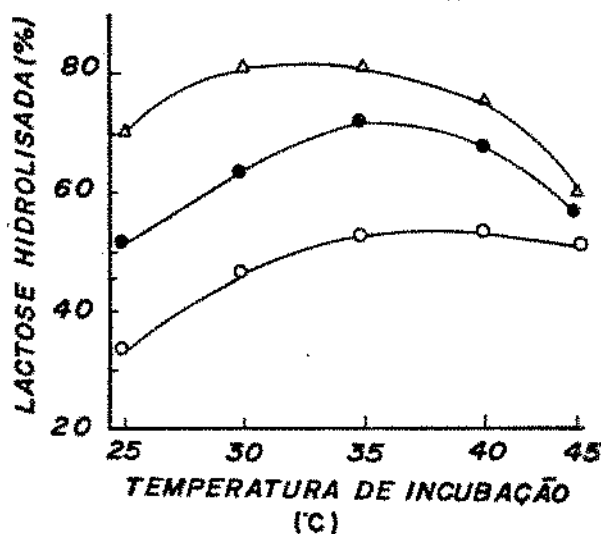
Similarmente, HOLSINGER (1978) relata que a hidrólise da lactose pode ser realizada em processo por batelada, por incubação de leite integral pasteurizado ou desnatado. O leite pode ser pré-aquecido a 32°C, com 300 ppm de lactase, durante 2,5 horas, ou por 16 a 18 horas, a 4°C, com 150 ppm de lactase.

Segundo MANN (1981), pode-se hidrolisar 80 % a 90 % da lactose de 1 litro de leite desnatado em 5 horas, a 35°C, ou em 18 horas, a 6°C, com 250 mg de β -galactosidase de *K. lactis*.

II.4.3. Efeitos da Temperatura de Incubação na Atividade da Lactase

Os efeitos da temperatura de incubação na atividade da lactase de *S. lactis* em leite desnatado foram testados por GUY & BINGHAM (1978), onde as temperaturas ótimas estiveram entre 30°C e 35°C por 2 horas, e entre 35°C e 40°C por 30 minutos. A temperatura ótima para atividade da lactase diminuiu quando o

tempo de incubação foi aumentado de 30 minutos para 2 horas. Os efeitos da temperatura de incubação na hidrólise da lactose observados podem ser verificados na FIGURA II.2.



GUY & BINGHAM (1978)

FIGURA II.2. EFEITOS DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NA HIDRÓLISE DA LACTOSE POR 300 mg DE LACTASE DE *Saccharomyces lactis*. OS TEMPOS DE INCUBAÇÃO FORAM : 0,5 h (°—°), 1h (•—•), e 2 hs (▲—▲).

Conforme RICHARD (1985), pode-se dizer que o efeito da temperatura se deve a um aumento da agitação das moléculas, que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima, aumentando, assim, a velocidade da reação.

Se houver um maior aquecimento, poderá ocorrer uma desnaturação com modificação das estruturas terciária e quaternária da proteína globular, e fazer, portanto, a enzima passar de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de

atividade. Na desnaturação das enzimas pelo calor, o que conta é o efeito combinado tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico (RICHARD, 1985).

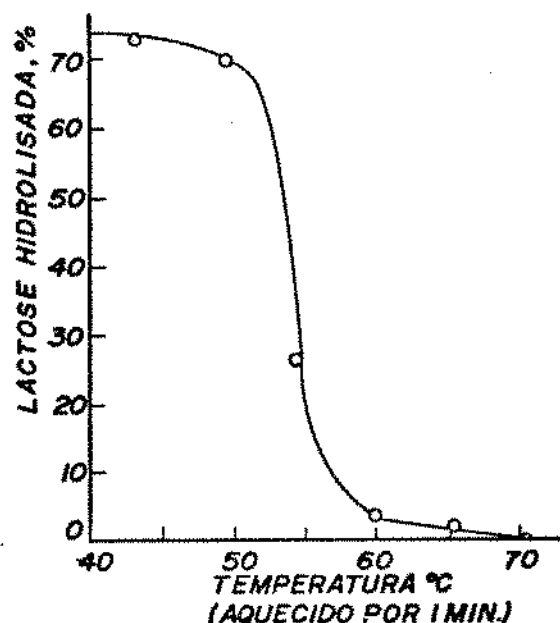
O efeito da temperatura na atividade da lactase de *S. lactis* em soro foi observado por GUY & BINGHAM (1978), que mediram a temperatura para encontrar as faixas necessárias para inativar a enzima. O aquecimento da lactase em soro (pH 6,6), acima de 50°C, por um minuto, causa redução de atividade. Quando a lactase foi aquecida a 70°C por 1 minuto, foi alcançada completa inativação. Inativação parcial ocorreu a 40°C pelo período de incubação acima de 1 hora. Os efeitos dos tratamentos térmicos na atividade da lactase podem ser visualizados na FIGURA II.3.

MILLER & BRAND (1980), relataram que a temperatura adequada para a estabilidade da lactase de leveduras é inferior a 40°C, e que tem atividade ótima entre 30°C e 35°C. A temperaturas superiores a 45°C, a enzima é rapidamente inativada.

Nos experimentos de KOSIKOWSKI & WIERZBICKI (1973), a inativação enzimática total para lactase de *S. lactis* foi alcançada após aquecimento por 1 minuto, a 80°C.

ZADOW (1984), diz que a inativação da enzima é acelerada pelo aumento da temperatura e do teor de minerais.

STIMPSON (1954), recomenda a pasteurização a 71,2°C, por 30 minutos, como sendo efetiva na inativação da lactase.



GUY & BINGHAM (1978)

FIGURA II.3. EFEITOS DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS SOBRE A HIDRÓLISE DE LACTOSE DE SORO RECONSTITUÍDO NA ATIVIDADE DE 300 mg DE LACTASE DE *Saccharomyces lactis*/kg de soro reconstituído a pH 6.6. (SORO CONTROLE-71 % DE LACTOSE HIDROLISADA)

II.4.4. Efeito da Pasteurização na Hidrólise da Lactose

KULP (1975), relata que, em substratos pasteurizados, a lactose é hidrolisada mais rapidamente do que em produtos não pasteurizados.

A pasteurização de leite desnatado aumentou a susceptibilidade da lactose à hidrólise enzimática, nos experimentos de GUY & BINGHAM (1978), como pode ser visto na TABELA II.3. Os leites que foram pasteurizados por 30 minutos a

63°C, 74°C e 85°C, foram hidrolisados em maior extensão que leites controles não pasteurizados.

TABELA II.3 EFEITO DA TEMPERATURA DE PASTEURIZAÇÃO NA HIDRÓLISE DA LACTOSE POR 300 mg DE LACTASE DE *S. lactis*/ kg de leite desnatado incubados a 32°C.

TEMPERATURA DE PASTEURIZAÇÃO POR 30 MINUTOS	% DE LACTOSE HIDROLISADA	
	45 MINUTOS	90 MINUTOS
CONTROLE	51,5	67
63°C	52,5	71
74°C	54,0	73
85°C	55,0	73

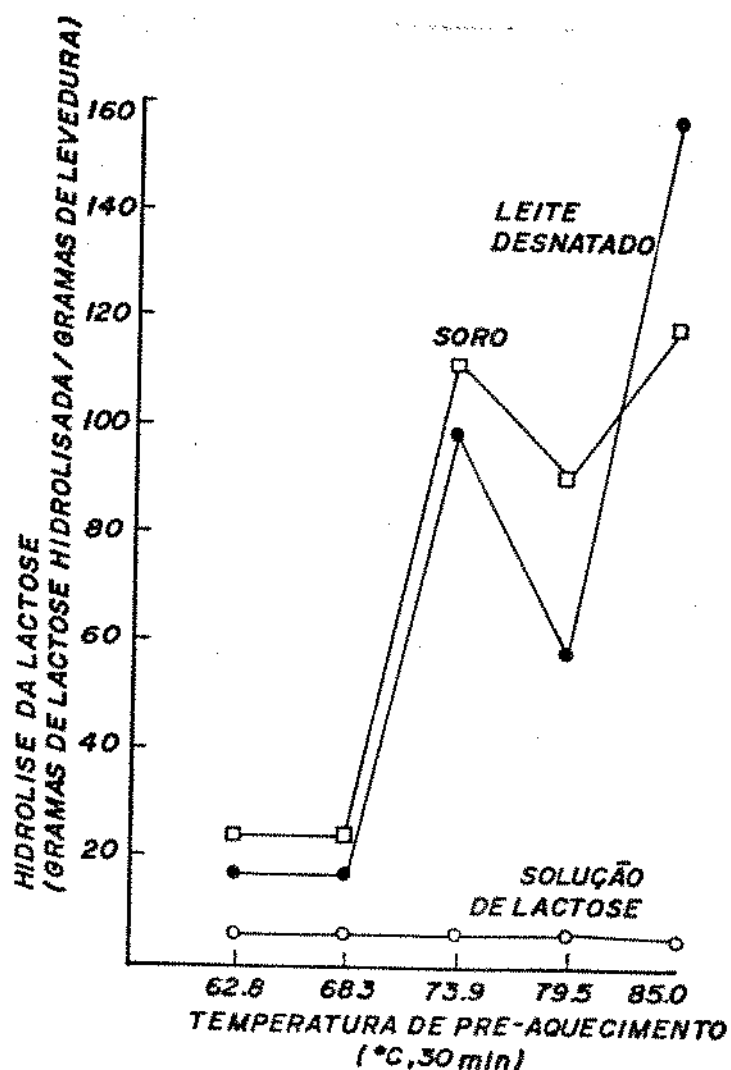
(GUY & BINGHAM, 1978)

Estes dados concordam com KOSIKOWSKI & WIERZBICKI (1973), que usaram lactase de *S. lactis* para hidrolisar a lactose de leite cru e pasteurizado. Com uma concentração de lactase de 25 mg/l, e incubados durante 48 horas a 4°C, foi possível hidrolisar 80 % da lactose em leite pasteurizado, e 75 % em leite cru. Com uma concentração de enzima de 100 mg/l, nas mesmas condições acima, a hidrólise foi de 95 % em leite pasteurizado, e de 90 % em leite cru.

Aumento da atividade da lactase em leite pré-aquecido foi também relatado por WERDORFF, AMUNDSON & OLSON (1970), que pasteurizaram leite desnatado, soro e uma solução com 5 % de lactose, a 62,8°C; 68,3°C; 73,9°C; 79,5°C e 85,0°C, por 30

minutos, e em seguida hidrolisaram com lactase de *Saccharomyces fragilis*. De acordo com os resultados, como mostrado na FIGURA II.4, os autores concluíram que é evidente que o aquecimento da lactose, na presença das proteínas do leite, tem grande efeito na hidrólise da lactose. Tanto em soro quanto em leite desnatado, a hidrólise foi mais alta quanto maior os tratamentos térmicos, enquanto a solução de lactose pura não mostrou variação. Segundo estes resultados, para atingir uma taxa máxima de hidrólise, o leite desnatado deve ser pré-aquecido a 85°C, durante 30 minutos. WENDORFF, AMUNDSON & OLSON (1970), relataram que através do pré-aquecimento do leite, o sistema proteína pode ser alterado para aumentar a hidrólise. Disto, SFORTUNATO & CONNORS (1958) e STIMPSON & STAMBERG (1956) sugerem que o leite cru contém substâncias inibidoras da atividade da enzima. Tais compostos poderiam ser de considerável interesse biológico, por causa de sua possibilidade de efeito na digestão da lactose em mamíferos.

WENDORFF *et alii* (1971), também observaram em seus experimentos, uma substância inibidora da atividade da enzima, onde este inibidor foi inativado com tratamento térmico de 74°C por 30 minutos.



WENDORFF, AMUNDSON & OLSON (1970)

FIGURA II.4. EFEITOS DO PRÉ-AQUECIMENTO DO LEITE NA HIDRÓLISE DA LACTOSE EM SORO, EM LEITE DESNATADO, E EM SOLUÇÃO DE LACTOSE.

STIMPSON (1954), verificou a influência da temperatura e do tempo de pasteurização do leite na atividade da lactase, como pode ser verificado nas TABELAS II.4 e II.5, e relatou que leites não pasteurizados continham algumas substâncias que reprimiam a atividade da enzima, não especificando quais poderiam ser.

TABELA II.4. EFEITO DA TEMPERATURA DE PASTEURIZAÇÃO
SOBRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTASE.

Temperatura de Pasteurização (°C) Tempo: 14 segundos	Lactose Hidrolisada (%)
50,5	40
71,2	47
73,9	55
76,7	57
79,4	71
82,2	87
85,0	87

(STIMPSON, 1954)

TABELA II.5. EFEITO DO TEMPO DE PASTEURIZAÇÃO
SOBRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTASE

Tempo de pasteurização do leite a 71,2°C	Lactose Hidrolisada (%)
5 min.	71
10 min.	75
20 min.	87
30 min.	87

(STIMPSON, 1954)

Segundo MAHONEY & ADAMCHUK (1980), o aumento da atividade da lactase, em leite pré-aquecido, poderia ser devido à exposição dos grupos sulfidrilas das proteínas do soro, devido ao aquecimento.

KULP (1975), diz que poder-se-ia especular que a alteração

dos grupos SH das proteínas do leite aquecido desempenha papel no efeito ativador da lactase, especialmente porque a literatura das patentes mostra exemplos de ativação com compostos redutores apenas com leites e soros não pasteurizados.

MERTENS & HUYGHEBAERT (1987), mencionaram que a influência positiva dos tratamentos térmicos na hidrólise enzimática da lactose em leite desnatado, também descrita por GUY & BINGHAM (1978) e WERDORFF, AMUNDSON & OLSON (1970), foi igualmente observada para MAXILACT LX-5000 em soro. Este efeito, segundo MERTENS & HUYGHEBAERT (1987), é devido à redução do cálcio livre, por precipitação de sais de cálcio insolúveis.

WENDORFF *et alii* (1971), estudaram o efeito do tratamento térmico do leite na taxa da hidrólise da lactose por β -galactosidase de *Saccharomyces fragilis*, onde foi determinada a atividade da enzima em leites desnatados crus e em leites desnatados submetidos a tratamentos térmicos na faixa de 62,8°C a 85°C por 30 minutos. No leite desnatado cru, 8,6 % da lactose foi hidrolisada, enquanto que 9,9 % de lactose foi hidrolisada no leite desnatado aquecido a 74°C por 30 minutos. Temperaturas maiores de 74°C, no mesmo tempo de aquecimento, não tiveram efeitos na hidrólise de leite desnatado.

WOYCHIK & WONDOLOWSKI (1973), observaram que, para β -galactosidase de *A. niger*, na hidrólise em soro ácido, leite integral e desnatado, não houve diferença na atividade da enzima, quando comparados com amostras cruas e pasteurizadas a 65°C por 30 minutos.

MAHONEY & ADAMCHUK (1980), também estudaram o efeito do

pré-aquecimento de leite e de soro, onde verificaram que o pré-aquecimento do leite não teve efeito na atividade da lactase de *K. fragilis*, mas relatam que há um aumento da atividade em soro pré-aquecido, o que pode estar relacionado com algumas interações entre as proteínas do soro e os sais, durante o aquecimento. Verificaram que a atividade da lactase foi mais alta em leite desnatado do que em leite integral.

II.4.5. Efeito dos Constituintes do Leite na Hidrólise da Lactose

A taxa de hidrólise de lactose catalizada enzimaticamente, pode ser dependente da concentração de minerais (sais), lactose e galactose, bem como da temperatura e do pH (MACBEAN, 1979). A reação enzimática é inibida por galactose, e um aumento na concentração do substrato pode também levar a uma redução na velocidade de reação, e daí a um mais baixo grau de hidrólise no produto final (GUY & BINGHAM, 1978; MACBEAN, 1979).

NICKERSON (1974), comenta que, se aumentarmos a concentração de lactose, ou a temperatura de hidrólise, aumenta-se também a taxa de hidrólise.

A lactose em solução é hidrolisada mais rapidamente que em leite desnatado ou soro, e nestes a lactose é mais facilmente hidrolisada que em leite integral ou leite integral concentrado (RICHARDSON, 1985).

Estas diferenças poderiam ser devidas ao meio iônico de cada substrato e/ou aos efeitos das proteínas do leite (MAHONEY

& ADAMCHUK, 1980).

MAHONEY & ADAMCHUK, (1980), estudaram os efeitos dos constituintes do leite na atividade da lactase de *Kluyveromyces fragilis*. Eles concluíram que a atividade da lactase em leite cru e soro é controlada por condições iônicas, com a máxima atividade ocorrendo na presença de íons de manganês. Os principais cátions presentes no leite, sódio e cálcio, foram inibidores da enzima, enquanto potássio e magnésio foram ativadores.

A adição de ativadores, tais como sulfitos e sulfetos, também tem sido sugerida na literatura, para aumentar a atividade da lactase em leite (RICHARDSON, 1985).

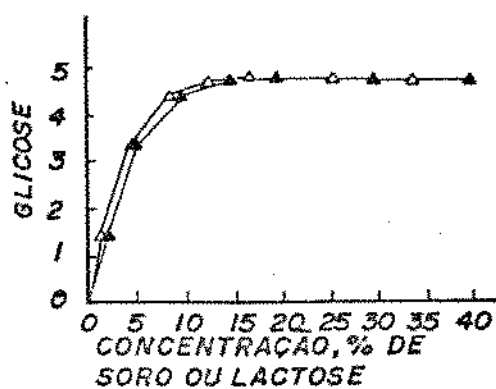
GUY & BINGHAM (1978) relataram que os íons potássio, magnésio e manganês aceleraram levemente a atividade da lactase de *S. lactis*, enquanto que os íons sódio e cálcio diminuíram significativamente a atividade da lactase. Também de acordo com autores, foi verificado que a atividade da enzima foi mais baixa em leite desnatado concentrado quando comparado com leite normal integral, e que isto poderia ser atribuído à formação de oligossacarídeos nos concentrados.

De acordo com DAHLQVIST *et alii* (1977), a atividade é mais alta na presença de potássio do que na de sódio, e os metais pesados são fortemente inibidores da enzima. Contudo, pequenas quantidades de manganês são essenciais para a atividade enzimática.

Para determinar o efeito da concentração dos sólidos do leite na atividade da β -galactosidase de *K. fragilis*, WENDORFF

et alii (1971), reconstituíram leite, soro, soro em pó e leite desnatado com água deionizada, contendo 10^{-4} M de $MnCl_2$ a várias concentrações de sólidos totais. A lactose foi hidrolisada mais intensamente em solução aquosa do que no leite. Componentes do leite, além da lactose, mostraram alguns efeitos inibidores na hidrólise. A máxima taxa de hidrólise em leite foi obtida quando leite ou soro foi fortificado com 0,1 M de sulfato de potássio e 10^{-4} M de $MnCl_2$ (WENDORFF *et alii*, 1971).

A influência da concentração do substrato na taxa inicial da hidrólise da lactose pode ser observada na FIGURA II.5. Aparentemente, o K_m é relativamente alto (0,1 M), e mesmo na solução supersaturada de lactose (30 %), não houve inibição pelo substrato. Do ponto de vista cinético, a enzima é adequada para uso em soluções com elevadas concentrações de lactose (DAHLQVIST *et alii*, 1977).



DAHLQVIST *et alii* (1977)

FIGURA II.5. TAXA DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SORO (▲) E DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE (△)

Usando lactose como substrato, WENDORFF & AMUNDSON (1971), observaram, para lactase de *S. fragilis*, uma cinética de reação típica de Michaelis-Mentem, entre a concentração de substrato e a velocidade inicial (cinética de ordem zero) da reação. A constante de Michaelis- Mentem (K_m), a pH 6,5, foi estimada do gráfico de Lineaweaver-Burk, e foi aproximadamente $2,4 \times 10^{-2} M$, enquanto a velocidade máxima da reação foi encontrada como sendo de $11,6 \mu \text{ mols /15 min.ml}$.

WEETALL *et alii* (1974), estudaram as propriedades de lactases comerciais. Para lactase solúvel de levedura, estimaram um K_m de 112 mM. Já MONTE ALEGRE (1988), encontrou um K_m médio de 60,32 mM para lactase de *S. fragilis*.

II.5. ULTRAFILTRAÇÃO

A ultrafiltração (UF) é um processo de fracionamento, que separa espécies moleculares com base no seu tamanho através do uso de uma membrana, que retém moléculas de maior peso molecular, permitindo que água e pequenas moléculas sejam filtrados. Assim, água, sais e lactose podem ser removidos, deixando um concentrado rico em proteína e gordura (GLOVER, 1986).

O leite contém três constituintes básicos: sais, lactose e proteínas, com pesos moleculares (daltons) de 60 a 300 para sais, 342 para lactose, e 15.000 ou mais para as proteínas. A separação total entre os três componentes é desejável, mas na prática é muito difícil encontrar-se uma membrana de

Ultrafiltração que evite a passagem de 100 % de um constituinte e permita a passagem de 100 % de outro. Isto é muito mais difícil entre sais e lactose (os quais são de peso molecular relativamente similares), do que entre lactose e proteína (COTON, 1974).

As membranas de ultrafiltração são capazes de evitar a passagem de 97 % das proteínas do soro, e permitem a passagem de 90 % da lactose (COTON, 1974).

Segundo GLOVER (1986), para um melhor entendimento da aplicação do processo de membranas no leite, é necessário destacar algumas propriedades físicas. O processo da ultrafiltração é governado pelo tamanho molecular. As dimensões são mais relevantes que o mais comumente conhecido peso molecular.

A TABELA II.6 mostra importantes pesos moleculares e diâmetros, onde se pode verificar a grande diferença do tamanho molecular entre lactose e α -lactoalbumina. Isto demonstra, como a UF pode ser convenientemente aplicada ao leite para fracionamento.

TABELA II.6. TAMANHOS MOLECULARES DOS COMPONENTES DO LEITE

COMPONENTE	PESO MOLECULAR (Daltons)	DIÂMETRO (nm)
ÁGUA	18	0,3
ION CLORO	35	0,4
ION CÁLCIO	40	0,4
LACTOSE	342	0,8
α - LACTOALBUMINA	14500	3,0
β - LACTOGLOBULINA	36000	4,0
SORO ALBUMINA	69000	5,0
MICELA DE CASEÍNA	$10^7 - 10^9$	25 - 130
GLÓBULO DE GORDURA	-	2000 - 10000

(GLOVER, 1986)

O uso da ultrafiltração para concentrar e separar constituintes do leite é amplamente reconhecido para a produção de leite com baixo teor de lactose, leite com baixo teor de sódio, e aumento da utilização do soro para alimentação humana (GLOVER *et alii*, 1978).

Durante a ultrafiltração, as proteínas do leite geralmente têm alta retenção, variando de 94 % a 100 %. A lactose passa através da membrana na mesma taxa que a água, e a retenção da gordura é de 100 % (GREENE & POTTER, 1986).

O propósito da pesquisa de GREENE & POTTER (1986), foi estudar os efeitos da ultrafiltração na retenção dos componentes do leite, especialmente dos minerais. Leite desnatado cru e

pasteurizado, leite integral cru e pasteurizado, e leite integral homogeneizado e pasteurizado foram estudados com diferentes tipos de membranas. Desde que as macromoléculas são retidas durante a ultrafiltração, espera-se a alta recuperação de muitos minerais. A retenção de Na e K foi próxima à da lactose nos experimentos de GREENE & POTTER (1986). Isto indicou que, como no caso da lactose, a passagem de Na e K através das membranas é similar à da água. Retenções de minerais variaram pouco de leite para leite. Em geral, retentados de leites concentrados por ultrafiltração tiveram recuperações de 85 % de cálcio, 80 % de fósforo, 50 % de sódio, 50 % de potássio, 70 % de magnésio, e acima de 90 % de zinco.

Outra vantagem da ultrafiltração na indústria láctea é a habilidade de fracionamento de soro e leite desnatado sem a aplicação de calor, e portanto, sem a destruição das proteínas do leite (COTON, 1974).

Como uma extensão do processo de ultrafiltração, a diafiltração é capaz de modificar as razões de proteína, lactose e sais. Se, após a concentração por ultrafiltração, for adicionada água ao concentrado, e o processo de ultrafiltração seguido, mais lactose e sais serão eliminados, e a proteína poderá ser concentrada e purificada (GLOVER *et alii*, 1978).

A diafiltração é mais eficiente se a adição de água for realizada na mesma taxa com que o permeado é removido (GLOVER *et alii*, 1986).

COVACEVICH & KOSIKOWSKI (1977), em seus experimentos com leite concentrado por ultrafiltração, reduziram o conteúdo de

lactose de 20 % para 9 % e 4,7 %, com diafiltração simples e dupla, respectivamente. Eles observaram que a redução do conteúdo de lactose do concentrado é proporcional à quantidade de água adicionada na ultrafiltração.

ROGER *et alii* (1976) estudaram a hidrólise da lactose em leites desmineralizados e em leites não desmineralizados, sendo que 47 % da lactose foi hidrolisada em leite desmineralizado, enquanto que 89 % da lactose presente foi hidrolisada em leite não desmineralizado. Segundo os autores, esta diferença na atividade da lactase pode ser atribuída à modificação da razão K/Na.

RIBEIRO (1989), preparou leites diafiltrados para produção de iogurtes com teor de lactose reduzido. A diafiltração do leite, visando a diminuição do conteúdo de lactose, aumenta o pH e diminui a acidez inicial dos leites durante o processo de fermentação.

Patente tchecoslovaca, citada por MANN (1977), trata de fabricação de leite e derivados livres de lactose. O primeiro estágio do processo envolve a remoção das proteínas do leite. A lactose é então separada usando Osmose Reversa e Ultrafiltração, sendo o leite residual misturado às proteínas previamente separadas.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. MATÉRIA PRIMA :

III.1.1. Leite

- Leite Cru Tipo B, proveniente da Fazenda São Francisco (Agropecuária Tuiuti), em Amparo-SP.

III.1.2. Enzima β - Galactosidase

- Enzima Comercial Lactase (EC 3.2.1.23) Maxilact, LX 5000, derivada da levedura *Saccharomyces (Kluyveromyces) lactis*, produzida pela GIST BROCADES.

III.2. EQUIPAMENTOS E APARELHOS UTILIZADOS :

- Unidade Piloto de Ultrafiltração, marca ALFA-LAVAL, modelo UFS-1;
- Cartucho de Ultrafiltração de fibras capilares de polissulfona, marca ROMICON, modelo HF-15-43, PM10, com área de 1,4 m² e 635 mm de comprimento;
- Tanques de aço-inox do sistema de ultrafiltração com capacidades para 100 e 200 litros;
- Tanque Pasteurizador com agitação, aquecimento e resfriamento, marca INADAL, modelo MIX-COMPLET, com

- capacidade para 100 litros;
- Agitador Magnético, modelo TE 089, marca TECNAL;
 - Balança Analítica, modelo AE 200, marca METTLER;
 - Balança Semi-analítica, modelo A 1000, marca MARTE;
 - Balança Comercial, modelo EXATA 3, marca TOLEDO;
 - Banho-maria, modelo 102/3, marca FANEM;
 - Banho-maria, modelo UNITEMP com controlador de temperatura constante, marca FANEM;
 - Bloco Digestor de Proteínas para micro Kjeldahl, marca SARGE Aparelhos Científicos Ltda.;
 - Centrífuga de Gerber, modelo 202, marca FANEM;
 - Destilador de Nitrogênio Kjeldahl, marca TECNAL, modelo TE 036;
 - Destilador Elétrico, modelo Q 341-25, marca QUIMIS;
 - Espectrofotômetro UV/Visível, marca MICRONAL, modelo B382;
 - Estabilizador de Voltagem Automático, marca KRON;
 - Estufa de Secagem e Esterilização, modelo 315 SE, marca FANEM;
 - Fogão marca CONTINENTAL 2001-Caprice;
 - Freezer Vertical METALFRID, 340 litros;
 - Máquina de Gelo modelo PGE 100, marca EVEREST;
 - Micro-seringa para cromatógrafo gasoso, marca SGEP;
 - Muflas, marca FORLABO;
 - Pipetador Automático, Pipetman P 5000, marca GILSON;
 - Potenciômetro DIGIMED, modelo DMPH-2;
 - Refrigerador Duplex, 440 litros, marca BRASTEMP.

III.3. OUTROS MATERIAIS :

- Agitador de aço inox, com haste e disco perfurado para latão de leite;
- Baldes plásticos de 5 e 10 litros;
- Cronômetro digital, marca Casio;
- Dessecadores;
- Detergente enzimático, tipo P3-Ultrasil-50, marca HENKEL;
- Filme de polietileno;
- Filtro para leite cru com tela de nylon;
- Lactose, P.A., monoidratada, marca REAGEN;
- Jarras de aço inox;
- Latões de leite de polietileno, com capacidade para 50 litros;
- Papel de filtro qualitativo;
- Reagentes e Corantes;
- Reagente GLICOSE ENZ-COLOR, da BIODIAGNÓSTICA Indústria Química Clínica Ltda.;
- Termômetros de mercúrio;
- Vidrarias de laboratório.

III.4. PRODUÇÃO DE LEITES DIAFILTRADOS

Foram realizados experimentos para obtenção de leites com baixos teores de lactose e sais minerais, através da técnica da diafiltração do leite, a qual consiste na adição de água ao leite durante o processo de ultrafiltração, para que se remova a lactose (GLOVER, 1986). Assim o mesmo volume de líquido é retirado no permeado, promovendo uma diminuição do teor de lactose e de sais minerais (cinzas) no leite.

Neste processo, visou-se obter concentrações de lactose com valores aproximados de 4 %, 3 % e 2 %. Foram realizadas três adições de água (3 leites diafiltrados) em cada experimento. Os balanços de massa relativos às quantidades de leite, de água adicionada, e de permeado retirado, estão demonstrados no ANEXO I.

III.4.1. Cálculo da Massa de Água para Diafiltração

Cálculo para o primeiro leite diafiltrado :

$$M_{T1} = \frac{L_L \times C_L}{C_1} ; \quad M_1 = M_{T1} - (L_L + A_T)$$

$$P_1 = M_{T1} - L_L$$

Cálculo para o segundo leite diafiltrado :

$$M_{T2} = \frac{L_1 \times C_1}{C_2} ; \quad M_2 = M_{T2} - L_1$$

$$P_2 = M_2$$

Cálculo para o terceiro leite diafiltrado :

$$M_{T3} = \frac{L_2 \times C_2}{C_3} ; \quad M_3 = M_{T3} - L_2$$

$$P_3 = M_3$$

Onde :

A_T = Massa de água nas mangueiras, tubulação, membrana e bombas (Kg).

C_L = Concentração de lactose inicial no leite integral (g/l).

C_1 = Concentração de lactose desejada no 1º leite diafiltrado (g/l).

C_2 = Concentração de lactose desejada no 2º leite diafiltrado (g/l).

C_3 = Concentração de lactose desejada no 3º leite diafiltrado (g/l).

L_L = Massa de leite integral no tanque (kg).

L_1 = Massa do 1º leite diafiltrado (Kg).

L_2 = Massa do 2º leite diafiltrado (Kg).

M_1 = Massa de água a ser adicionada para 1ª diafiltração
(Kg).

M_{T1} = Massa de leite e água adicionada para 1º leite
diafiltrado (Kg).

M_2 = Massa de água a ser adicionada para 2ª diafiltração
(Kg).

M_{T2} = Massa de leite e água adicionada para 2º leite
diafiltrado (Kg).

M_3 = Massa de água a ser adicionada para 3ª diafiltração
(Kg).

M_{T3} = Massa de leite e água adicionada para 3º leite
diafiltrado (Kg).

P_1 = Massa do 1º permeado a retirar (kg).

P_2 = Massa do 2º permeado a retirar (kg).

P_3 = Massa do 3º permeado a retirar (Kg).

III.4.2. Recepção do Leite

O leite cru foi recebido na planta piloto do Laboratório de Leite e Derivados da Faculdade de Engenharia de Alimentos. O leite foi filtrado com filtro para leite cru, com tela de nylon, e misturado com agitador de aço inox de placa perfurada.

III.4.3. Pasteurização

O leite recebido foi pasteurizado em tanque pasteurizador a 68°C por 1 minuto, e a seguir resfriado a 55°C.

Após o leite ter sido resfriado a 55 °C, dele foi retirada uma quantidade (geralmente 5 litros), que foi chamada de Leite Integral Controle.

III.4.4. Diafiltração do Leite

O leite foi pesado e colocado no tanque do sistema de ultrafiltração, com pressões de 1,70 Kgf/cm² e 0,65 Kgf/cm², respectivamente de entrada e de saída, operando com temperatura de 55°C. Ao leite adicionaram-se as massas de água previamente estabelecidas.

O sistema, com dois tanques, foi primeiramente ligado com água filtrada proveniente do segundo tanque, e com as mangueiras de permeado e concentrado colocadas neste mesmo tanque. Após 5 a 10 minutos de recirculação desta água, as mangueiras com a água foram colocadas no tanque de alimentação com o leite, fechando-se ao mesmo tempo a válvula de alimentação do tanque com água, e abrindo-se a válvula de alimentação do tanque com leite, circulando então, na unidade, leite com água filtrada em circulação fechada. A massa de água que estava presente na tubulação, nas bombas, no cartucho da membrana e nas mangueiras foi previamente determinada.

Após 5 a 10 minutos de recirculação de água e de leite, foi

iniciada a retirada de permeado da mangueira de permeado, cuja massa foi previamente calculada para a redução do teor de lactose no leite. Essa massa retirada está baseada na massa de água adicionada, conforme descrito no item III.4.1.

Após esta operação, foi retirada uma massa conhecida de leite do tanque de alimentação.

Procedeu-se da mesma forma para a obtenção do segundo leite com teor reduzido de lactose, sendo feita nova adição de água filtrada.

A recirculação foi mantida por 5 a 10 minutos para completa mistura de água e leite. A seguir foi coletado um volume de permeado igual à massa de água que foi adicionada.

Da mesma forma procedeu-se para a obtenção de um terceiro leite diafiltrado.

Estes três leites obtidos (leite diafiltrado 1, leite diafiltrado 2 e leite diafiltrado 3) e o leite controle foram pasteurizados novamente a 68°C por 1 minuto, e resfriados em banho de gelo a 4°C, acondicionados em baldes de 10 litros, e estocados em refrigerador a 5°C, para posterior ensaio de hidrólise.

III.4.5. Limpeza da Membrana

A limpeza da membrana de ultrafiltração foi realizada antes e após o processamento do leite, seguindo as seguintes etapas:

- Lavagem com água filtrada à temperatura ambiente;
- Recirculação de solução de hidróxido de sódio 1 % a

50°C por 30 minutos;

-Enxágüe com água filtrada à temperatura ambiente, até neutralização do pH;

-Recirculação de solução de ácido fosfórico 0,5 % a 50°C por 30 minutos;

-Enxágüe com água filtrada à temperatura ambiente, até neutralização do pH;

-Recirculação de solução de hipoclorito de sódio 200 ppm, à temperatura ambiente, por 30 minutos;

-Enxágüe com água filtrada à temperatura ambiente;

-Recirculação de solução de hipoclorito de sódio 20 ppm à temperatura ambiente;

O cartucho com a membrana, quando estava fora de uso ficou em imersão em solução de 20 ppm de hipoclorito de sódio.

Quando o fluxo de permeado se tornou menor do que o valor inicial, foi utilizado detergente enzimático:

Uma solução de 0,5 % de detergente enzimático foi recirculada pela membrana, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Conforme o desempenho da membrana, realizou-se outra limpeza, de acordo com os itens acima, ou deixou-se a membrana imersa na solução enzimática por 24 horas, e após este período, repetiu-se a operação de limpeza até a obtenção da vazão ideal.

O fluxograma do processamento para a produção de leites diafiltrados está apresentado na FIGURA III.1.

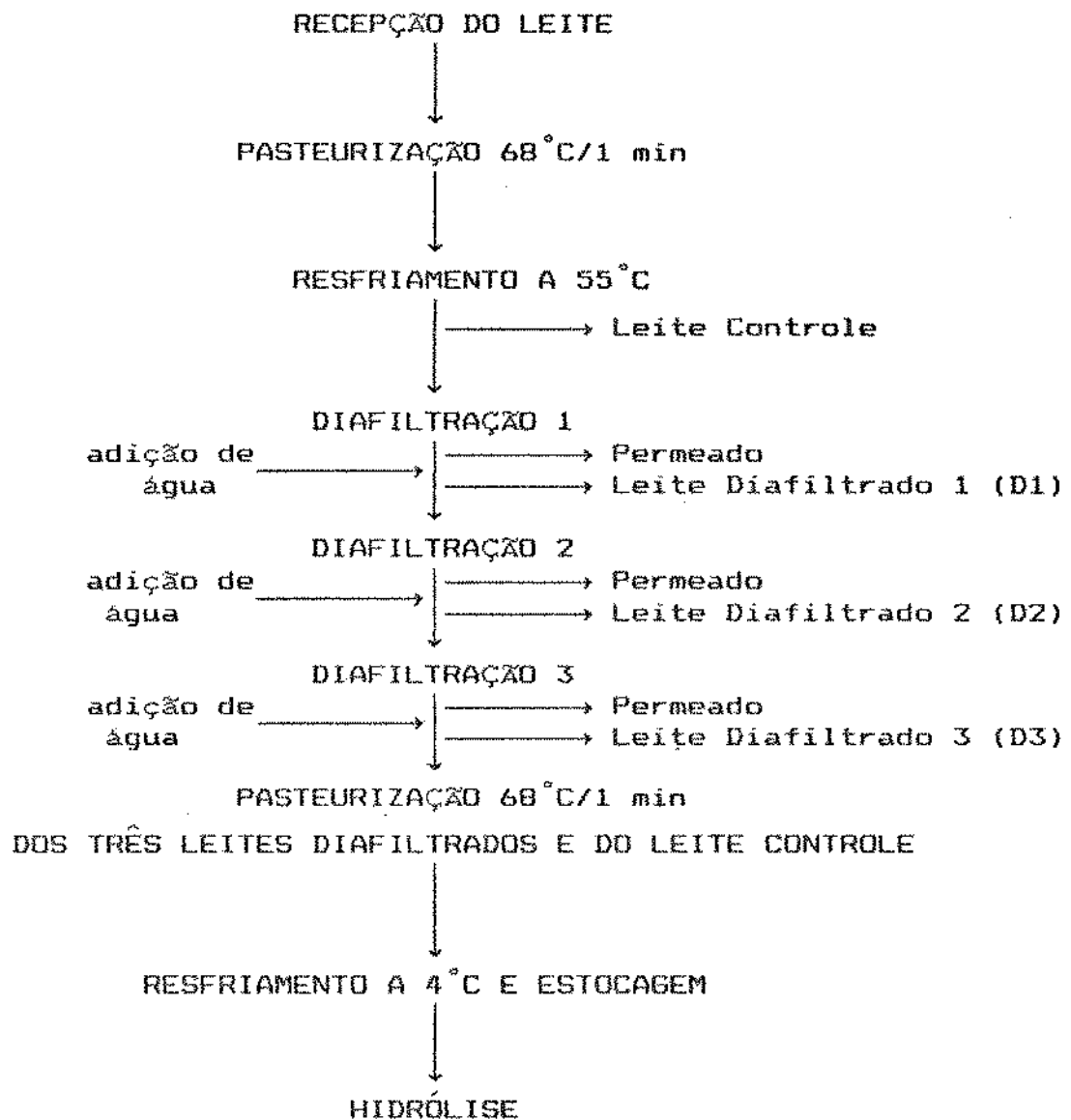


FIGURA III.1. FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO PARA OBTENÇÃO DE LEITES COM BAIXOS E DIFERENTES TEORES DE LACTOSE.

III.5. PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE

Foram realizados dois processamentos preliminares (PP1 e PP2) e dois processamentos finais (PF1 e PF2), estes últimos realizados em repetição, para a obtenção de leites com diferentes teores de lactose.

Os processamentos preliminares serviram como base para os ajustes das concentrações ideais de lactase e dos tempos necessários para a hidrólise da lactose presente nestes diferentes leites.

III.5.1. Amostras para Hidrólise com Diferentes Teores de Lactose

Os três leites, obtidos por diafiltração, e o leite integral controle foram mantidos em refrigerador pelo período de uma noite. No dia seguinte, foram separados em frascos "erlenmeyers" de 500 ml (com 400 ml de leite em cada frasco). Os leites foram divididos em quatro séries. Para os processamentos preliminares, foram preparados 4 frascos com leite integral, 4 frascos com o primeiro leite diafiltrado, 4 frascos com o segundo leite diafiltrado, e 4 frascos com o terceiro leite diafiltrado. Já para os processamentos finais, foram preparados 8 frascos com leite integral, 8 frascos com o primeiro leite diafiltrado, 8 frascos com o segundo leite diafiltrado, e 8

frascos com o terceiro leite diafiltrado. Estes leites foram utilizados para as diversas temperaturas empregadas na hidrólise.

III.5.2. Hidrólise da Lactose

Para a realização da hidrólise, foram utilizados dois banhos-maria, com controladores de temperatura ajustáveis para 25°C, 30°C, 35°C e 40°C. Inicialmente foram empregadas concentrações de enzima de 0,50 e 0,25 ml/litro de leite, para os processamentos preliminares PP1 e PP2, respectivamente.

Cada um dos processamentos finais (PF1 e PF2) foi realizado em repetição, tendo sido empregadas duas concentrações de enzima diferentes em cada repetição, respectivamente 0,20 e 0,12 ml/litro de leite.

A hidrólise foi realizada em quatro etapas, cada etapa com uma temperatura de 25°C, 30°C, 35°C e 40°C, respectivamente. Em cada etapa, foram colocados quatro frascos "erlenmeyers" em banho-maria, e cada frasco com uma amostra de leite diferente. Quando o leite atingiu a temperatura desejada, foi então colocada a enzima lactase nos frascos.

III.5.3. Tempo de Hidrólise

O tempo de hidrólise foi medido com o auxílio de um cronômetro, e as amostras foram tomadas em intervalos de tempo diferentes em cada processamento :

Processamento Preliminar PP1 : Retiraram-se amostras em 1, 2, 3 e 4 horas após a adição da enzima;

Processamento Preliminar PP2 : Retiraram-se amostras em 15 min, 30 min, 1 e 2 horas após a adição da enzima;

Processamentos Finais PF1 e PF2 : Retiraram-se amostras em 0, 4, 8, 12, 16 e 20 minutos após a adição da enzima.

Quando cada tempo foi completado, uma amostra foi retirada de cada frasco "erlenmeyer" e colocado em tubo de ensaio numerado.

III.5.4. Inativação da Enzima

Os tubos de ensaio numerados, contendo o leite lactose hidrolisado, foram colocados em banho de água em ebulição por um período de 5 minutos, efetuando-se assim a inativação da enzima. Os tubos com as amostras foram lacrados com filmes de polietileno, e congelados para posterior análise do grau de hidrólise.

III.6. PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES COM DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS

III.6.1. Amostras para Hidrólise com Diferentes Teores de Sais Minerais

Foram realizados dois processamentos (PS1 e PS2), nas mesmas condições, para a obtenção de leites com diferentes

teores de sais minerais.

Os três leites obtidos por diafiltração (item III.4.4), e o leite integral controle foram mantidos em refrigerador pelo período de uma noite. No dia seguinte, a cada um dos leites diafiltrados foi adicionada uma quantidade calculada de lactose P.A., para reconstituir o teor inicial de lactose do leite. Após a adição da lactose P.A. aos leites, em béquers de 2 litros, estes ficaram em agitação por uma hora com agitador magnético, para uma completa homogeneização. Após este período de tempo os leites foram separados em quatro séries: 4 frascos "erlenmeyers" com leite integral, 4 frascos com o primeiro leite diafiltrado reconstituído, 4 frascos com o segundo leite diafiltrado reconstituído, e 4 frascos com o terceiro leite diafiltrado reconstituído. Cada frasco continha 400 ml dos respectivos leites.

III.6.2. Hidrólise da Lactose

A hidrólise foi realizada de acordo com a metodologia III.5.2, com exceção da concentração de enzima, que foi de 0,12 ml/litro de leite para os dois processamentos desta etapa (PS1 e PS2).

III.6.3. Tempo de Hidrólise

O tempo de hidrólise foi medido com o auxílio de um crômetro, e as amostras foram tomadas em 0, 4, 8, 12, 16 e 20

minutos após a adição da enzima. Quando cada tempo foi completado, uma amostra foi retirada de cada frasco e colocada em tubo de ensaio numerado.

III.6.4. Inativação da Enzima

Os tubos de ensaio numerados, contendo leite lactose hidrolisado, foram colocados em banho de água em ebulição por um período de 5 minutos, para efetuar a inativação da enzima. Os tubos com as amostras foram lacrados com filmes de polietileno e congelados para posterior análise do grau de hidrólise.

III.7. PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO

III.7.1. Amostras para Hidrólise em Leites Submetidos a Diferentes Temperaturas de Pasteurização

Foram realizados dois processamentos (PT1 e PT2), nas mesmas condições, para a obtenção de leites submetidos a diferentes temperaturas de pasteurização.

O leite foi separado em quatro frações para ter distintos tratamentos térmicos de pasteurização.

Os tratamentos térmicos de pasteurização empregados foram 68°C, 76°C, 84°C, e 92°C, por 5 minutos.

Estes leites, submetidos a diferentes temperaturas de pasteurização, foram, em seguida, resfriados em banho de gelo a

4°C e estocados em refrigerador, para posterior hidrólise.

III.7.2. Preparo das Amostras para Hidrólise

Os quatro leites que tiveram distintos tratamentos térmicos foram mantidos em refrigerador pelo período de uma noite. No dia seguinte, foram separados em quatro frascos "erlenmeyers", em quatro séries: 4 frascos com leite pasteurizado a 68°C, 4 frascos com o leite pasteurizado a 76°C, 4 frascos com o leite pasteurizado a 84°C, e 4 frascos com o leite pasteurizado a 92°C. Cada frasco continha 400 ml dos respectivos leites.

III.7.3. Hidrólise da Lactose

A hidrólise foi realizada de acordo com a metodologia III.5.2., com exceção da concentração de enzima, que foi de 0,12 ml/litro de leite para os dois processamentos desta etapa (PT1 e PT2).

O tempo de hidrólise foi medido com o auxílio de um crômetro, e as amostras foram tomadas em 0, 4, 8, 12, 16 e 20 minutos após a adição da enzima. Quando cada tempo foi completado, uma amostra foi retirada de cada frasco e colocada em tubo de ensaio numerado. A inativação da enzima foi realizada de acordo com procedimento III.5.4.

III.8. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

III.8.1. Acidez Titulável

As medidas de acidez foram realizadas por titulação da amostra, em presença do indicador fenolftaleína, com solução de NaOH N/9 (solução Dornic) de acordo com Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (15.1.5.2). E o resultado expresso em °D (graus Dornic).

III.8.2. Cinzas

As cinzas foram determinadas pelo método de incineração em mufla a 550°C, de acordo como descrito na seção 16.035 da A.O.A.C.(1984).

III.8.3. Extrato Seco

O extrato seco foi determinado pelo método de secagem em estufa a 105°C, como descrito na seção 16.032 da A.O.A.C.(1984).

III.8.4. Gordura

A gordura foi determinada, segundo método de Gerber, como descrito por ATHERTON & NEWLANDER (1981).

III.8.5. Lactose

A porcentagem de lactose presente no leite foi determinada por método de Fehling, segundo procedimento descrito por LANARA(1981).

III.8.6. Proteína

Para a determinação da proteína foi utilizado o método Kjeldalh, como descrito na seção 16.036 da A.O.A.C.(1984).

III.8.7. Determinação do pH

As medidas de pH foram efetuadas em potenciômetro, devidamente calibrado antes das medidas.

III.8.8. Teste Enzimático Colorimétrico para Determinação do Teor de Lactose Hidrolisada

As amostras de leite hidrolisado, foram descongeladas em banho de água à temperatura ambiente. Estas amostras, nos tubos, foram homogeneizadas através de agitações por inversão, e de cada tubo foi retirada uma alíquota de leite (5 a 10 ml). À mesma foi adicionada igual quantidade de ácido wolfrâmico, preparado em concentração dupla, para promover a precipitação da fração protéica do leite. (POMBO & CASAGRANDE, 1982). A seguir foi feita a filtração desta solução em papel de filtro e funil

de vidro. A determinação do teor de lactose hidrolisada foi realizada através da medida da concentração de glicose, segundo DAHLQVIST (1964). Do filtrado obtido retirou-se uma alíquota de 10 µl com micro seringa, que foi adicionada a 2 ml do reagente Glicose Enz-Color. Da cor formada na reação foi lida a absorbância em espectrofotômetro, em comprimento de onda na faixa de 510 nm, conforme descrito na bula do reagente. Para leituras espectrofotométricas maiores que 0,4 unidades de absorbância (UA), diluiu-se uma alíquota do filtrado e repetiu-se a análise, até se obter leitura menor que 0,4 (UA). Este método colorimétrico da determinação da concentração de glicose com Reagente Glicose Enz-Color, da BIODIAGNÓSTICA, permite ler no espectrofotômetro a intensidade de cor formada na reação, que corresponde ao teor de glicose no leite, liberada na hidrólise. A leitura foi comparada com a de uma solução padrão de glicose (0,1%), e os cálculos da concentração e porcentagens de lactose hidrolisada foram realizados como segue:

$$\text{Concentração de lactose hidrolisada (g/l)} = \frac{\text{ABS(AMOSTRA)} \times 342}{\text{ABS(PADRÃO)} \times 180}$$

$$\text{Lactose Hidrolisada (\%)} = \frac{\text{ABS(AMOSTRA)} \times 342 \times 100}{\text{ABS(PADRÃO)} \times 180 \times \text{LACTOSE INICIAL(g/l)}}$$

III.8.9. Determinação da Atividade Enzimática da Lactase

A atividade da lactase (MAXILACT) foi determinada com ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactosidase), segundo procedimento descrito por MONTE ALEGRE (1987):

Dissolveu-se 0,1885g de ONPG em 500 ml de solução tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,6) que resultou numa solução $1,25 \times 10^{-3}$ m μ ONPG. Quatro mililitros desta solução de ONPG foram misturados em tubo de ensaio com 1 ml de lactase diluída, sendo a mistura incubada a 37°C, por 5 minutos, após o que acrescentou-se 1 ml de solução 0,5 M de NaCO₃ ao tubo, para interromper a reação. A cor resultante da liberação de orto-nitrofenol foi quantificada em espectrofotômetro a 420 nm.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. PARÂMETROS DE HIDRÓLISE

IV.1.1. Atividade da Enzima Lactase

A enzima utilizada foi a lactase de *Kluyveromyces lactis* (MAXILACT), conforme descrito no item III.1.2. A atividade desta enzima, medida de acordo com metodologia III.8.9., foi de 20.000 μmol ONPG/5 minutos.ml de enzima.

IV.1.2. Temperatura de incubação

Existe uma zona de temperatura, às vezes estreita, para a qual a atividade da enzima é máxima. Essa variação da atividade enzimática, em função da temperatura, é determinada pela medida das variações da velocidade inicial em função da temperatura do meio, em condições bem determinadas (concentração de substrato e de enzima, pH, força iônica), (RICHARD, 1985). Assim sendo, testaram-se quatro temperaturas diferentes para a realização da hidrólise : 25°C, 30°C, 35°C e 40°C, como descrito no item III.5.2.

IV.1.3. Temperatura de Inativação

A inativação foi realizada com água em ebulição, por 5 minutos, como descrito no item III.5.4. Esta temperatura está de acordo com os experimentos de GUY & BINGHAM (1978), como demonstrado na FIGURA II.3 do item II.4.3, que mostra que o aquecimento a 70°C, por 1 minuto, já inativa a enzima.

Verificou-se nos experimentos que a inativação foi adequada, analisando-se as amostras no mesmo dia e no dia seguinte após a inativação, e constatando-se que as mesmas não apresentaram diferenças no teor de glicose presente.

IV.2. PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE

IV.2.1. Processamentos Preliminares

Foram realizados dois processamentos preliminares PP1 e PP2, para obtenção de leites com baixos teores de lactose, conforme descrito na metodologia III.5. As TABELAS IV.1 e IV.2, que seguem, mostram os resultados das análises físico-químicas dos leites diafiltrados (D1, D2 e D3) e do leite integral, obtidos nestes processamentos preliminares.

No experimento preliminar PP1 utilizou-se as concentrações de enzima e os tempos necessários para a hidrólise máxima da lactose. No processamento preliminar PP2, utilizou-se tempos de hidrólise e concentrações de enzima mais baixos. Assim sendo, a

combinação concentração de enzima/tempo de hidrólise para os processamentos preliminares foram:

PP1 - 0,50 ml/litro de leite em 4 horas de hidrólise;

PP2 - 0,25 ml/litro de leite em 2 horas de hidrólise.

Como pode ser verificado nas TABELAS IV.1 e IV.2, os teores de gordura, proteína, sais minerais, extrato seco e lactose diminuíram consideravelmente no decorrer da operação de diafiltração. De acordo com a literatura, deve haver uma retenção, pela membrana, da gordura e da proteína. Segundo GLOVER (1978), o processo de ultrafiltração permite a passagem de água, lactose e sais minerais através da membrana. GREENE & POTTER (1986), citam que a retenção de gordura é de 100 %, e a de proteína varia de 94 % a 100 %. Os teores de gordura e de proteína diminuíram, provavelmente, devido a uma diluição dos leites, causada por excesso de água nos leites diafiltrados.

TABELA IV.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP1

Leite	pH	Acidez	Gordura (%)	Lactose (%)	Extrato Seco (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)
CON-TROLE	6,38	14	3,4	4,88	11,44	2,50	0,681
LEITE D1	6,52	10	3,1	3,52	9,54	2,35	0,503
LEITE D2	6,58	9	2,9	2,99	8,52	2,17	0,460
LEITE D3	6,68	7	2,7	2,14	7,28	2,00	0,451

TABELA IV.2. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP2

Leite	pH	Acidez	Gordura (%)	Lactose (%)	Extrato Seco (%)	Proteí- na (%)	Cinzas (%)
CON- TROLE	6,70	15,5	3,5	4,98	11,90	2,64	0,670
LEITE D1	6,75	10,0	3,0	3,32	9,47	2,53	0,552
LEITE D2	6,76	8,5	2,6	2,47	7,75	2,22	0,464
LEITE D3	6,82	8,0	2,4	2,16	7,11	2,10	0,450

Os leites correspondentes ao processamento preliminar PP1 foram hidrolisados com lactase, segundo o item III.5.2., e os resultados obtidos para as hidrólises realizadas a 25°C, 30°C, 35°C e 40°C estão apresentados, respectivamente, nas FIGURAS IV.1, IV.2, IV.3 e IV.4.

Conforme pode ser observado nas FIGURAS IV.1, IV.2, IV.3 e IV.4, nas concentrações de 21,40 g/l e 29,29 g/l, a reação de hidrólise foi completada ao redor do tempo de 120 minutos. No processamento PP1, o tempo total de hidrólise foi de 4 horas. Este tempo foi considerado grande, porque os teores de hidrólise são altos, atingindo de 80 % a mais de 90 % de hidrólise. Com as concentrações iniciais de lactose de 48,80 g/l e 35,20 g/l, em quatro horas, a 25°C, obtiveram-se, respectivamente, 88,41 % e 90,10 % de lactose hidrolisada. As hidrólises realizadas nos leites obtidos no processamento PP1 cessaram pelo próprio esgotamento de substrato e/ou pela formação de galactose, que atua como inibidor da lactase. A inibição da lactase pela

galactose foi também descrita por WOYCHIK & WONDOLOWSKI (1973), DAHLQVIST *et alii* (1977) e PRENOSIL, STKER & BOURNE (1987).

Na TABELA IV.3. podemos observar as porcentagens de lactose hidrolisada no processamento PP1, em 120 minutos de reação.

TABELA IV.3. LACTOSE HIDROLISADA (%) PARA O PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP1 EM 120 MINUTOS DE HIDRÓLISE

TH C(g/l)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
48,80	82	89	81	78
35,20	78	78	85	74
29,90	86	87	79	67
21,40	70	79	87	72

TH : TEMPERATURA DE HIDRÓLISE

C (g/l) : CONCENTRAÇÃO INICIAL DE LACTOSE NO LEITE

CONCENTRAÇÃO DE LACTASE: 0,5 ml/l

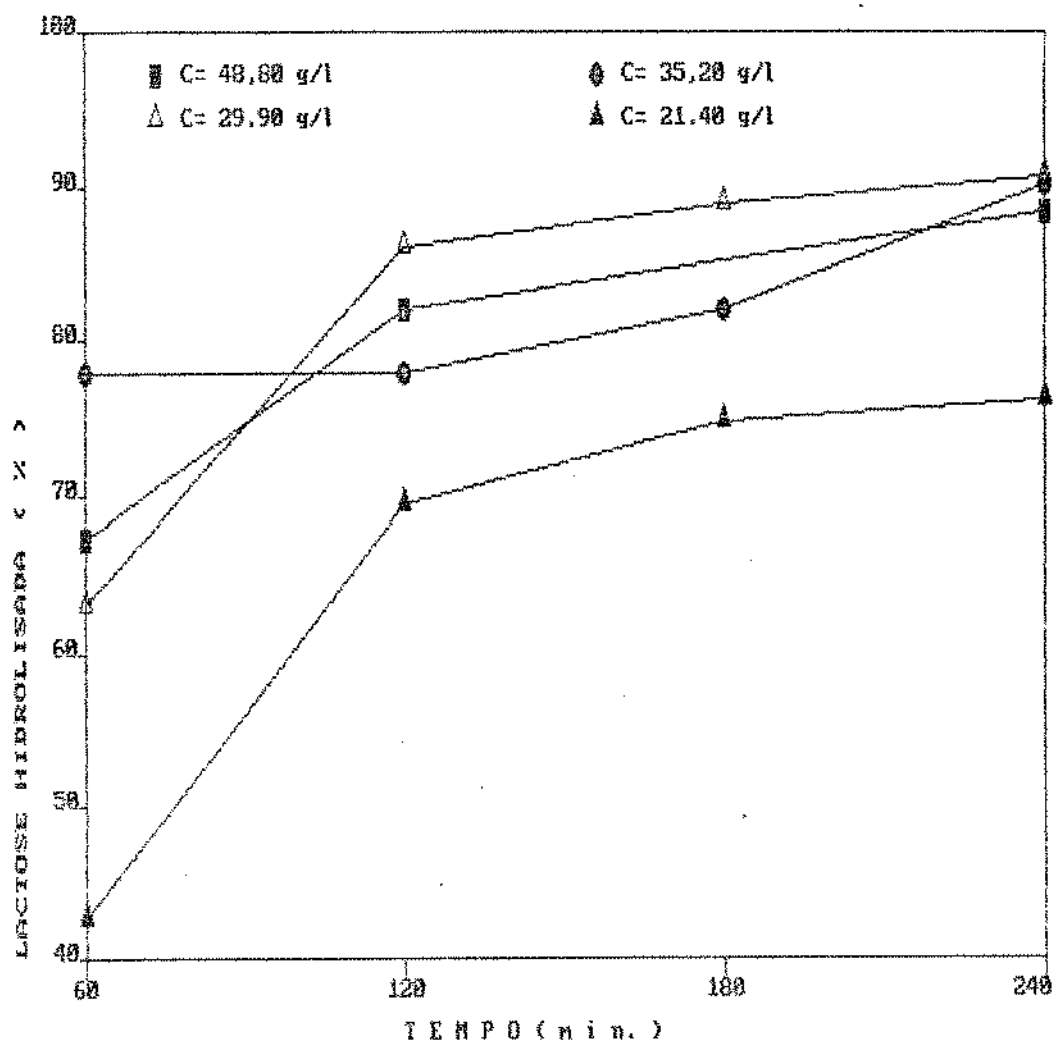


FIGURA IV.1. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,50 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 48,80 g/l; ● C= 35,20 g/l; △ C= 29,90 g/l; ▲ C= 21,40 g/l.

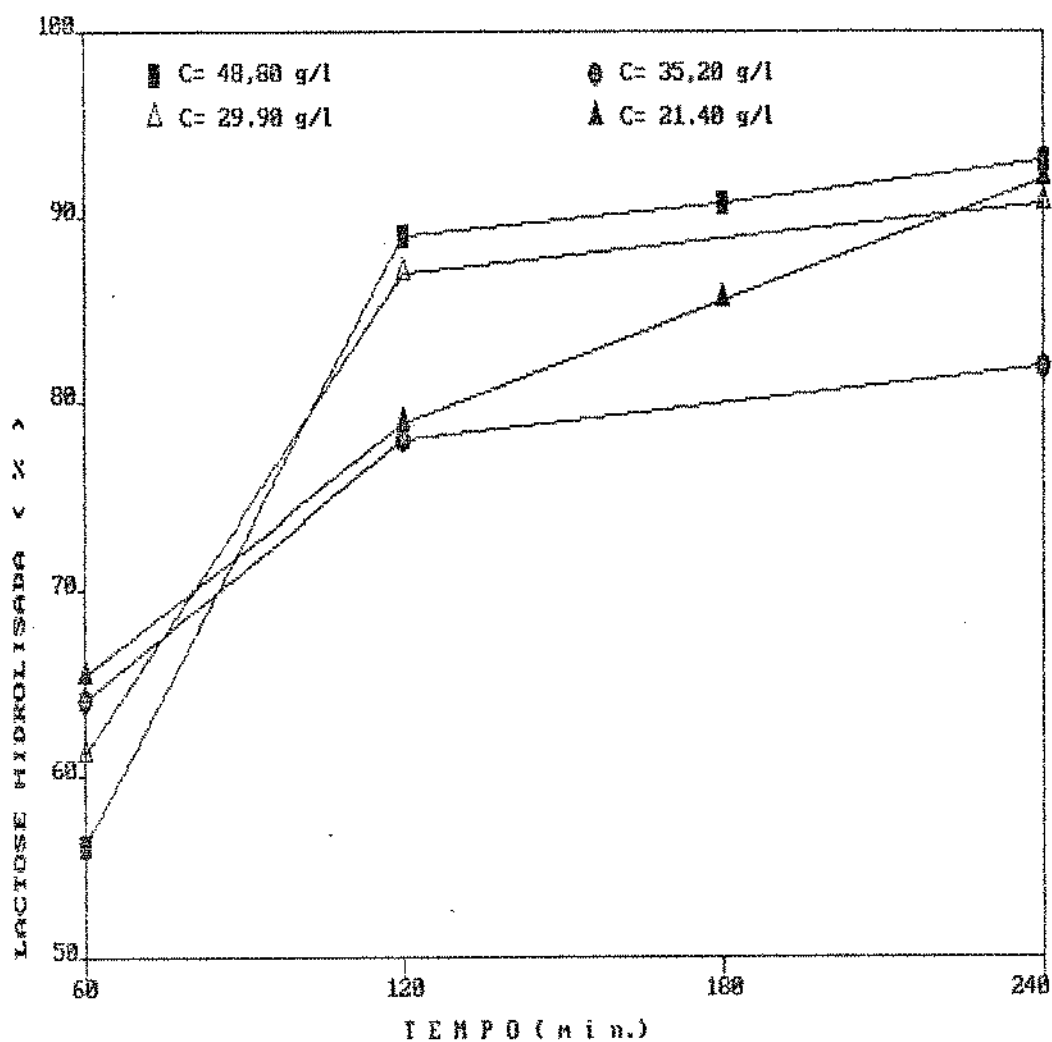


FIGURA IV.2. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,50 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 48,80 g/l; ● C= 35,20 g/l; ▲ C= 29,90 g/l; ▴ C= 21,40 g/l.

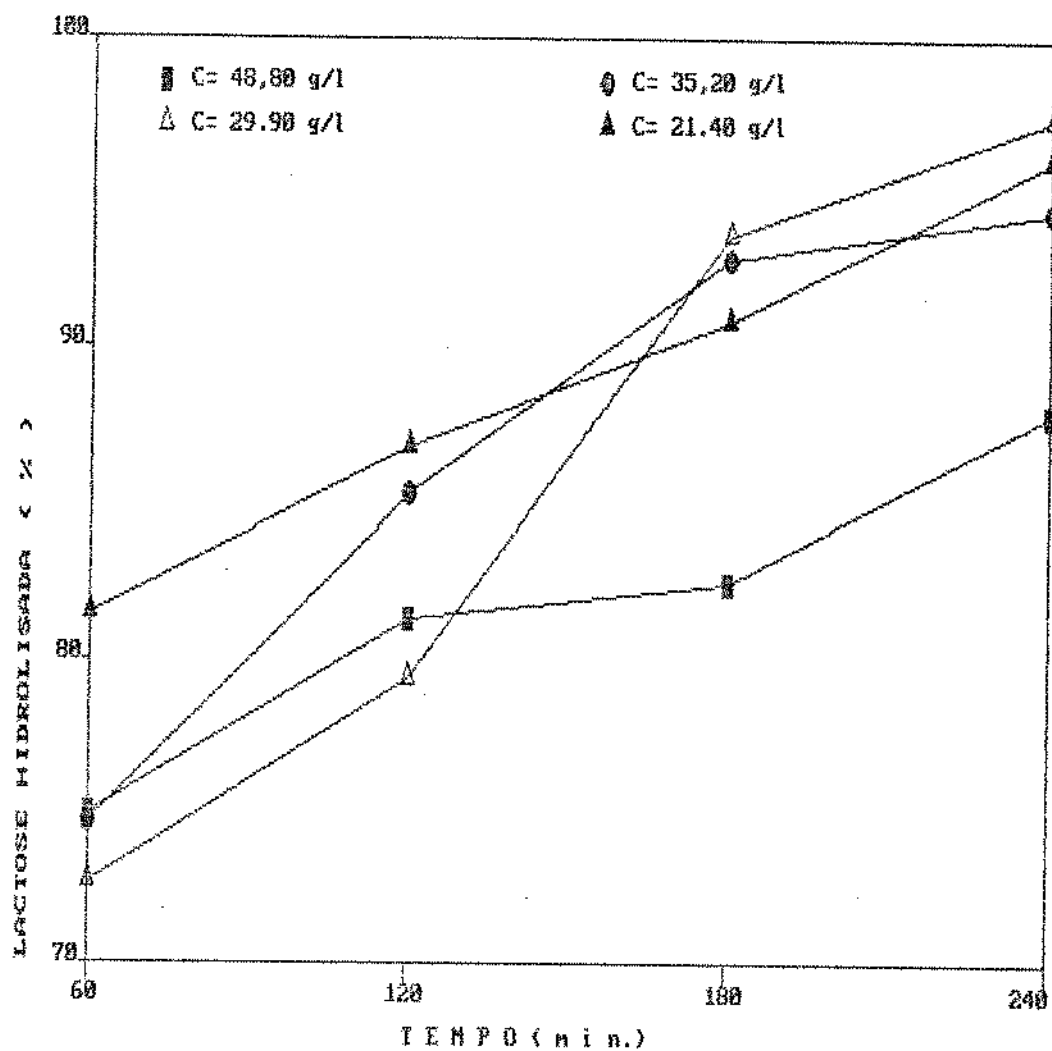


FIGURA IV.3. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,50 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

■ C= 48,80 g/l; ● C= 35,20 g/l; △ C= 29,90 g/l; ▲ C= 21,40 g/l.

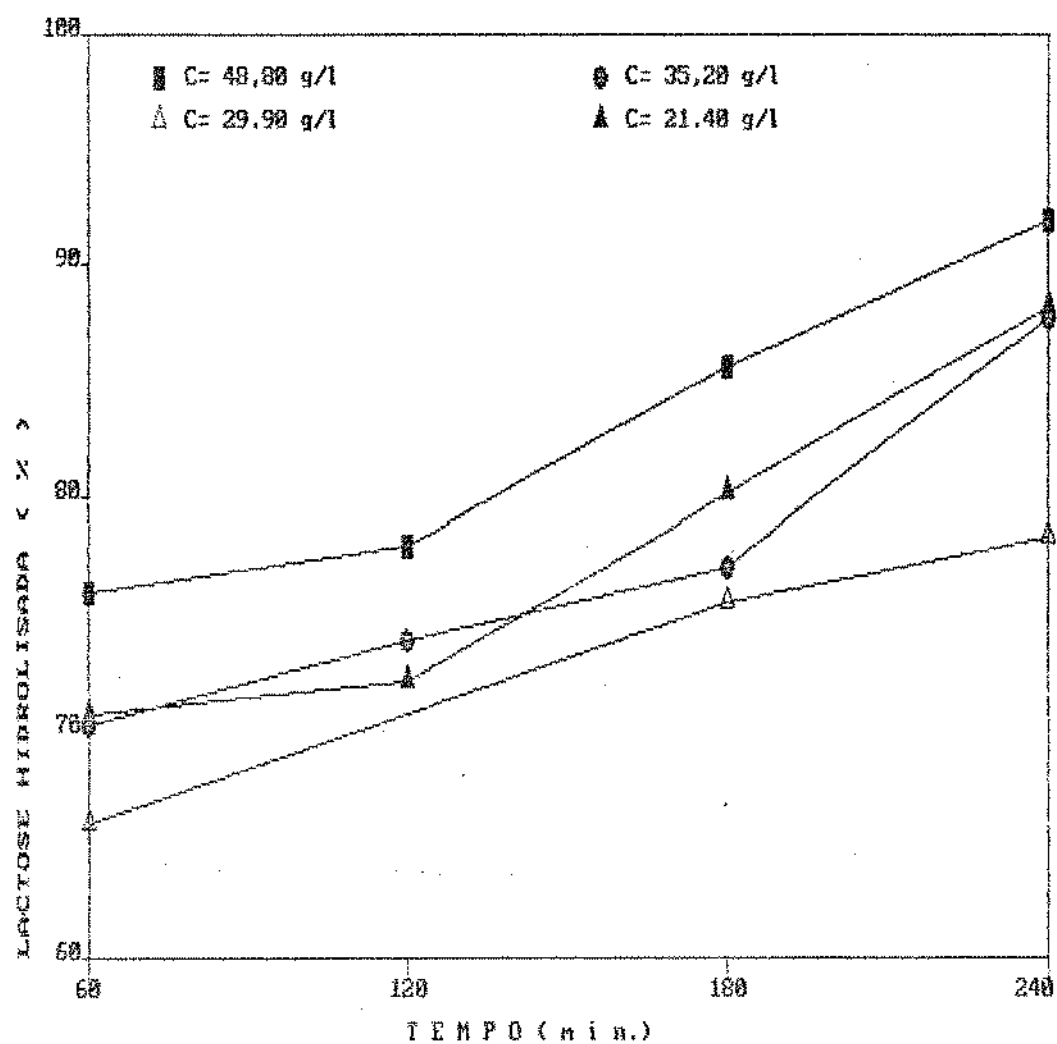


FIGURA IV.4. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,50 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

■ C= 48,80 g/l; ● C= 35,20 g/l; △ C= 29,90 g/l; ▲ C= 21,40 g/l.

Os leites obtidos no processamento preliminar PP2 foram hidrolisados segundo o item III.5.2, e os dados obtidos estão apresentados nas FIGURAS IV.5, IV.6, IV.7 e IV.8. Do exame das mesmas observa-se melhor o comportamento da reação de hidrólise em sua fase inicial da reação.

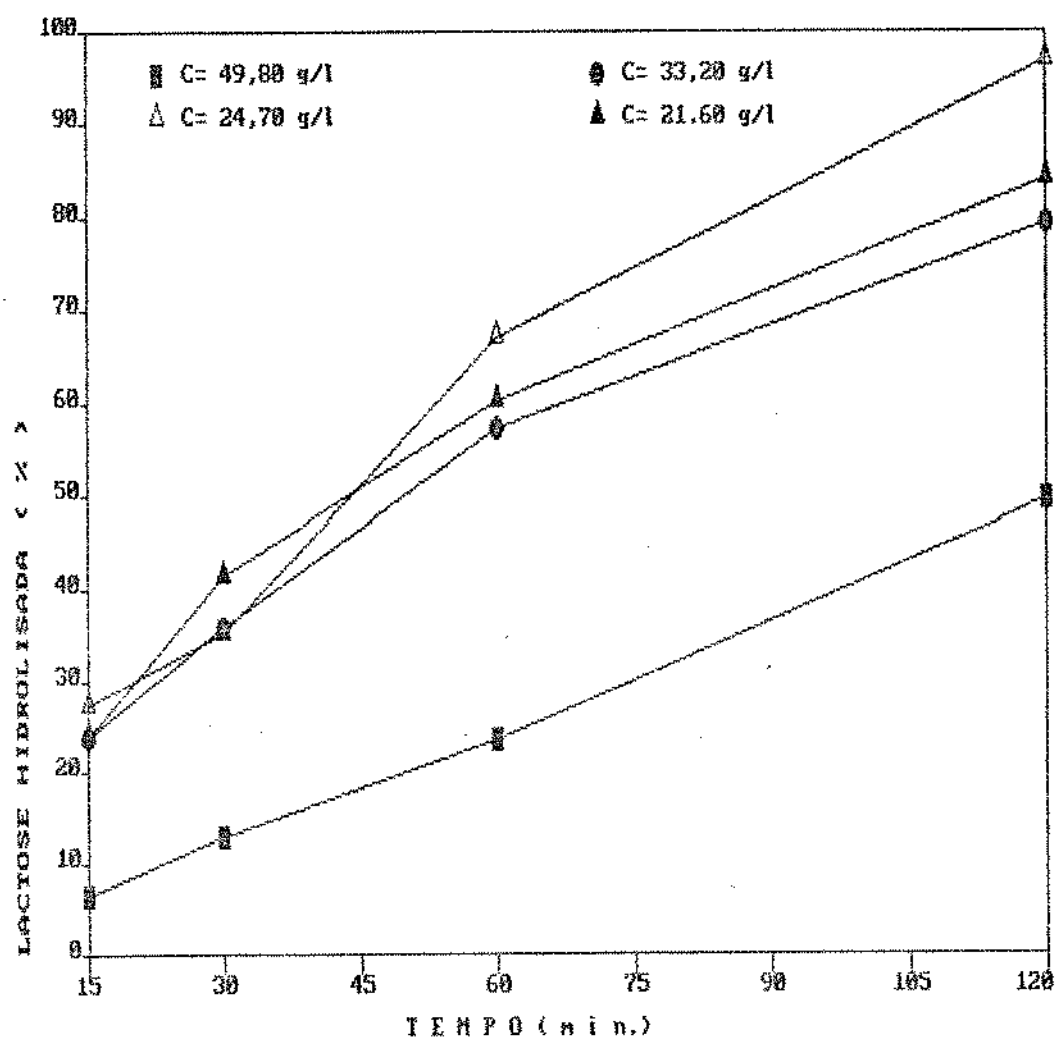


FIGURA IV.5. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,25 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 49,80 g/l; ● C= 33,20 g/l; △ C= 24,70 g/l; ▲ C= 21,60 g/l.

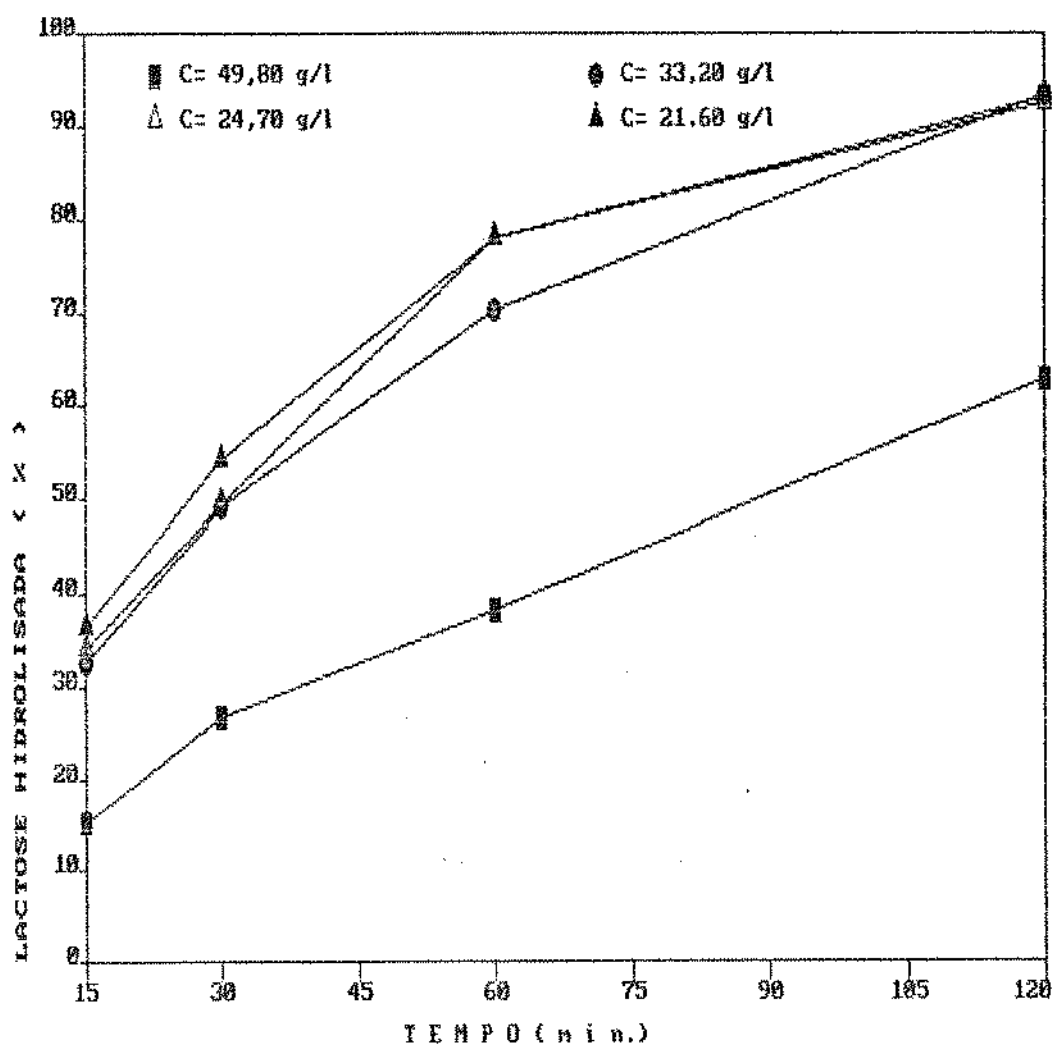


FIGURA IV.6. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,25 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

■ C= 49,80 g/l; ● C= 33,20 g/l; ▲ C= 24,70 g/l; ▴ C= 21,60 g/l.

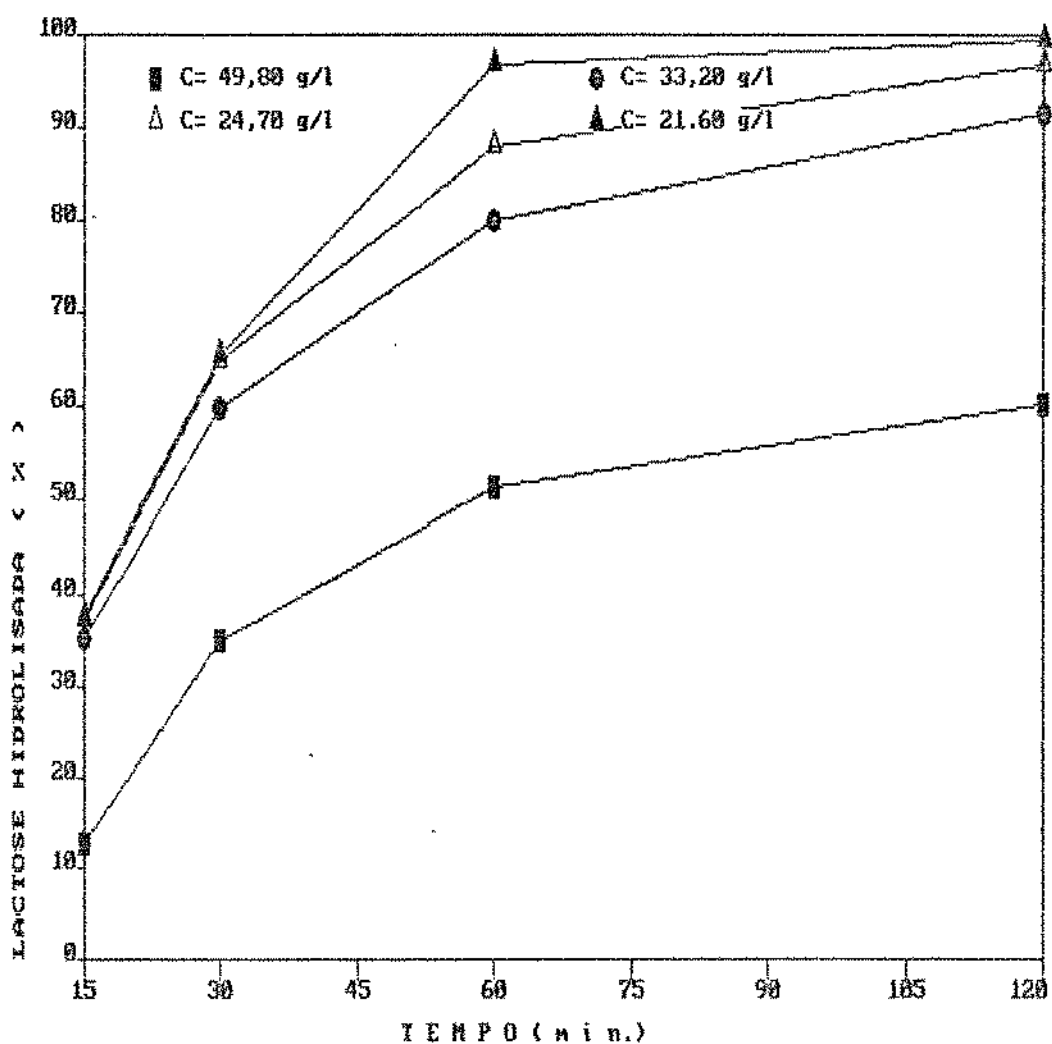


FIGURA IV.7. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,25 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

■ C= 49,80 g/l; ● C= 33,20 g/l; △ C= 24,70 g/l; ▲ C= 21,60 g/l.

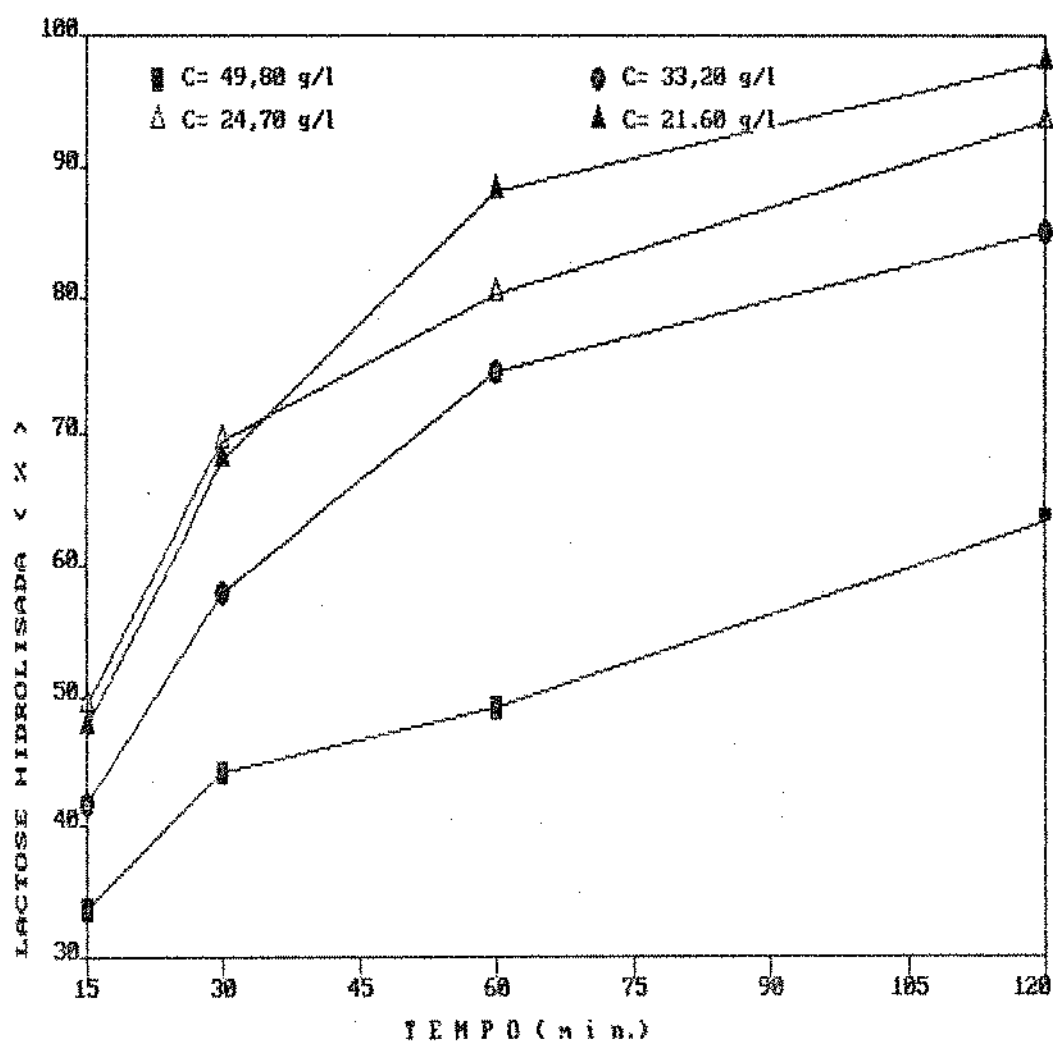


FIGURA IV.8. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PRELIMINAR PP2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,25 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

■ C= 49,80 g/l; ● C= 33,20 g/l; △ C= 24,70 g/l; ▲ C= 21,60 g/l.

IV.2.2. Processamentos Finais

Foram realizados dois processamentos finais PF1 e PF2 para obtenção de leites com baixos teores de lactose, conforme descrito na metodologia III.5. As TABELAS IV.4 e IV.5, que seguem, mostram a composição físico-química dos leites controles e dos leites diafiltrados (D1, D2, e D3) destes dois processamentos. Para cada um deles foram utilizadas duas combinações de concentração de enzima/tempo de hidrólise, conforme segue:

PF1 - 0,20 ml/litro de leite e 0,12 ml/litro de leite em 20 minutos.

PF2 - 0,20 ml/litro de leite e 0,12 ml/litro de leite em 20 minutos.

TABELA IV.4. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1

Leite	pH	Acidez	Gordura (%)	Lactose (%)	Extrato Seco (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)
CON-TROLE	6,56	14	4,0	5,05	12,35	2,67	0,674
LEITE D1	6,65	12	3,8	3,93	10,64	2,33	0,553
LEITE D2	6,71	11	3,8	3,49	10,16	2,31	0,538
LEITE D3	6,78	10	3,8	3,00	9,70	2,49	0,487

TABELA IV.5. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2

Leite	pH	Acidez	Gordura (%)	Lactose (%)	Extrato Seco (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)
CON-TROLE	6,76	14	3,8	4,95	12,47	3,08	0,714
LEITE D1	6,79	12	3,7	3,61	10,67	2,89	0,542
LEITE D2	6,82	11	3,8	3,13	10,22	2,86	0,470
LEITE D3	6,86	10	3,8	2,60	9,67	2,85	0,468

Os valores obtidos com relação à composição nos dois processamentos finais não são idênticos, mas o comportamento das variações é similar. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de serem leites diferentes, processados em dias diferentes.

Através dos dados apresentados nas TABELAS IV.4 e IV.5 verifica-se, tanto para os leites do PF1 como para os leites do PF2, que as porcentagens de lactose, do teor de cinzas e de extrato seco diminuem com o aumento do número de diafiltrações efetuadas, permitindo-nos dizer que os três leites obtidos no processo são distintos em suas características físico-químicas.

A diafiltração do leite, visando a diminuição do conteúdo de lactose, aumenta o pH e diminui a acidez titulável dos leites, conforme observa-se nas tabelas IV.4 e IV.5.

Estes dados também concordam com RIBEIRO (1989), que obteve, em seus experimentos de diafiltração, a diminuição do conteúdo de lactose, cinzas e extrato seco, e a manutenção do conteúdo de proteínas e de gordura em concentrações semelhantes

às dos leites controles.

Os resultados da hidrólise da lactose (metodologia III.8.8), para o processamento PF1, variaram de acordo com o teor de lactose. As FIGURAS IV.9, IV.10, IV.11, e IV.12 mostram a evolução de lactose hidrolisada versus tempo para cada concentração de lactose, com uma concentração de lactase igual a 0,20 ml/l. As FIGURAS IV.13, IV.14, IV.15 e IV.16 mostram essa evolução com uma concentração de lactase de 0,12 ml/l.

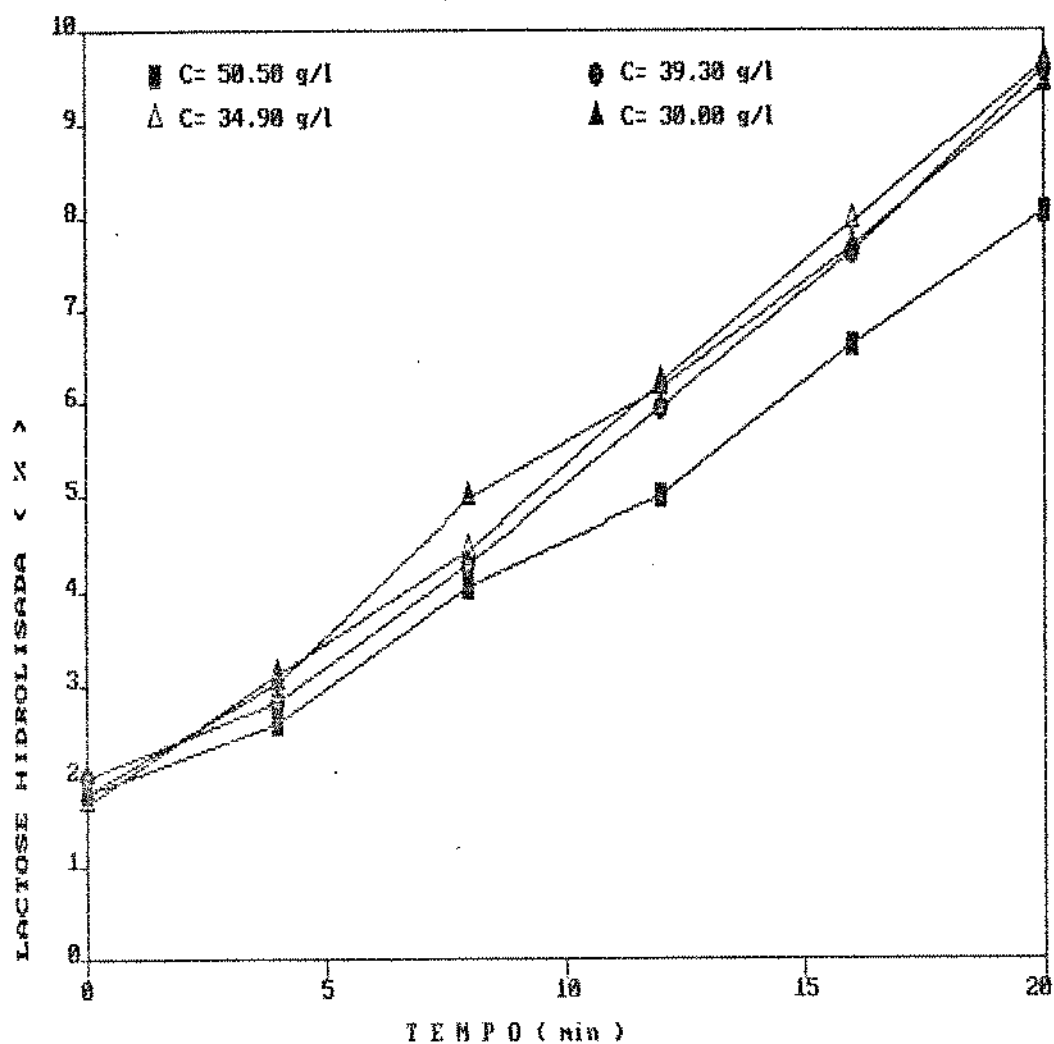


FIGURA IV.9. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 50,50 g/l; ● C= 39,30 g/l; △ C= 34,90 g/l; ▲ C= 30,00 g/l.

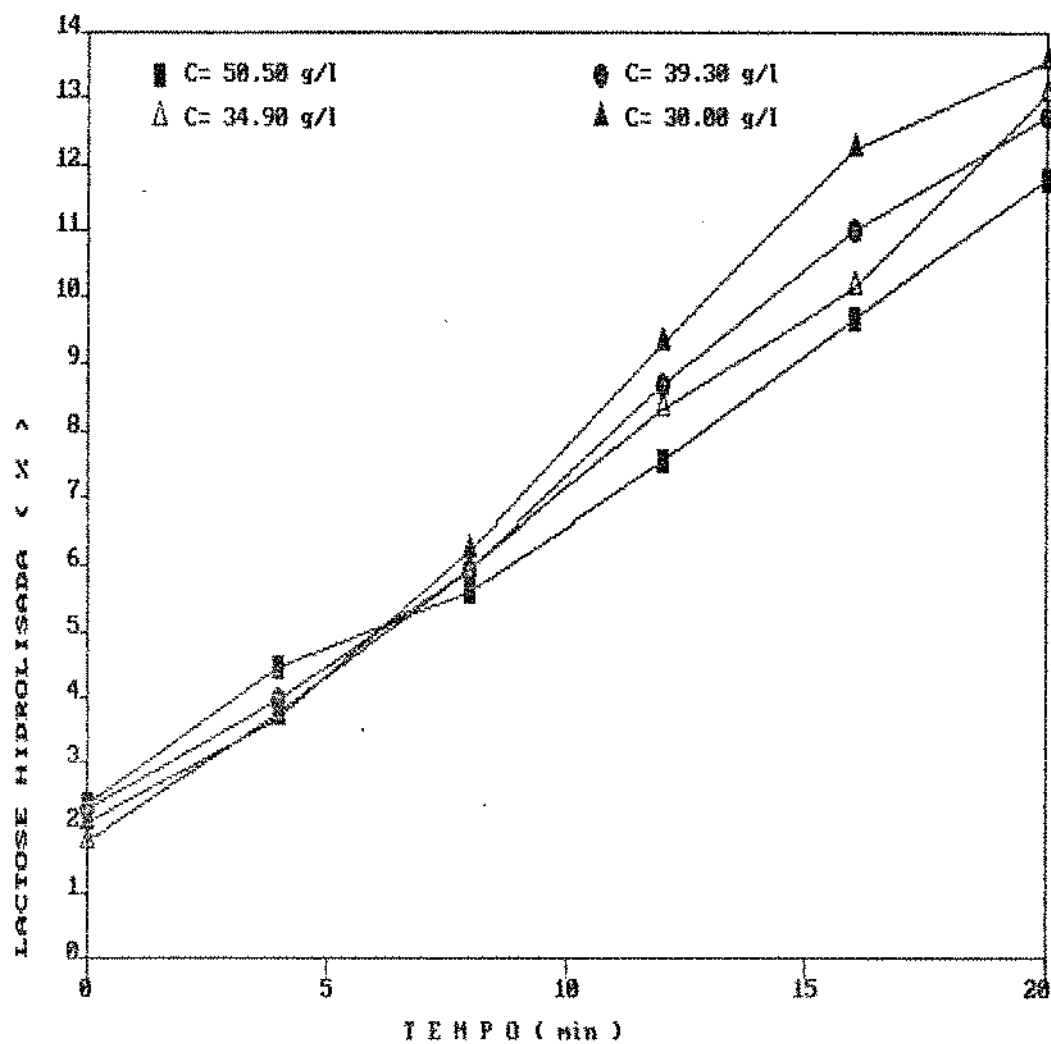


FIGURA IV.10. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite.

■ C= 50,50 g/l; ● C= 39,30 g/l; △ C= 34,90 g/l; ▲ C= 30,00 g/l.

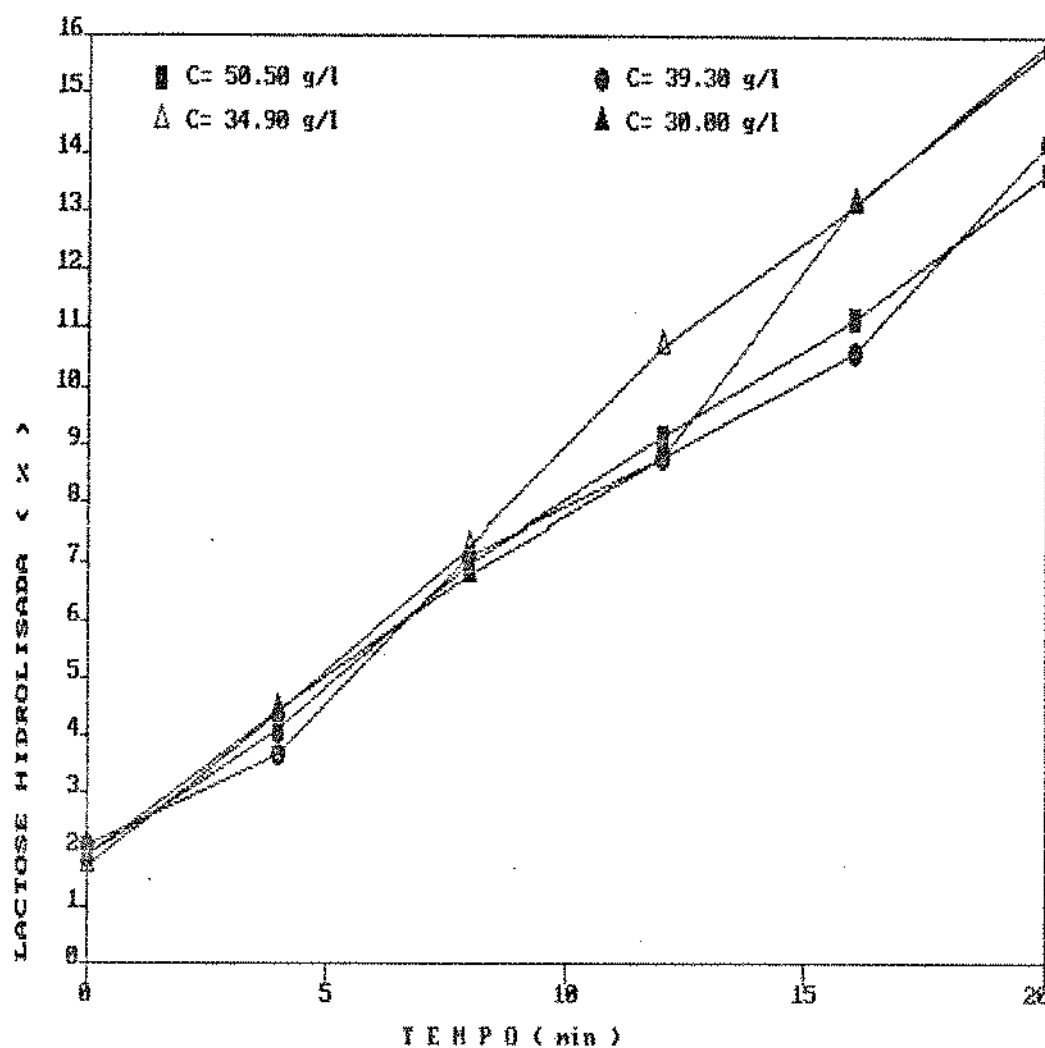


FIGURA IV.11. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite.

■ C= 50,50 g/l; ● C= 39,30 g/l; △ C= 34,90 g/l; ▲ C= 30,00 g/l.

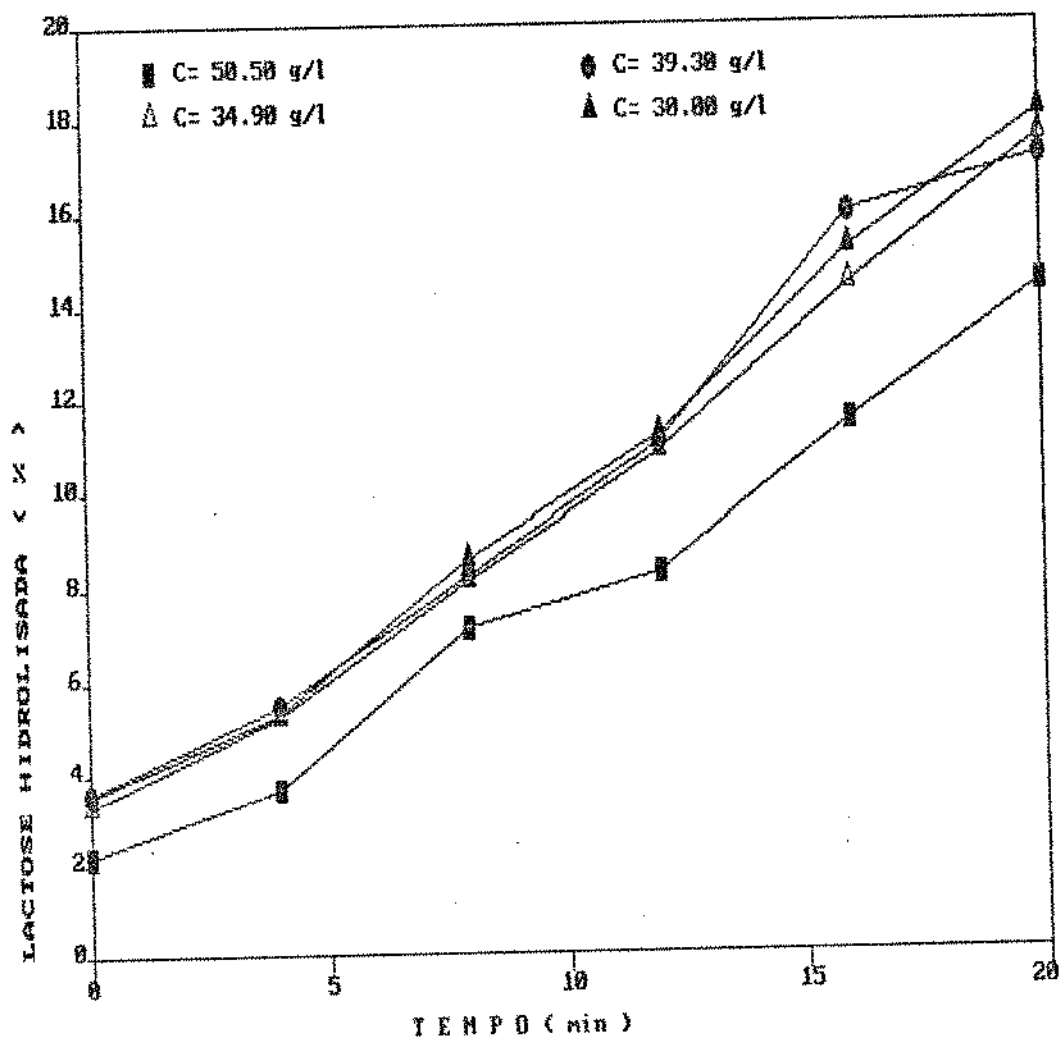


FIGURA IV.12. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite.

■ C= 50,50 g/l; ● C= 39,30 g/l; △ C= 34,90 g/l; ▲ C= 30,00 g/l.

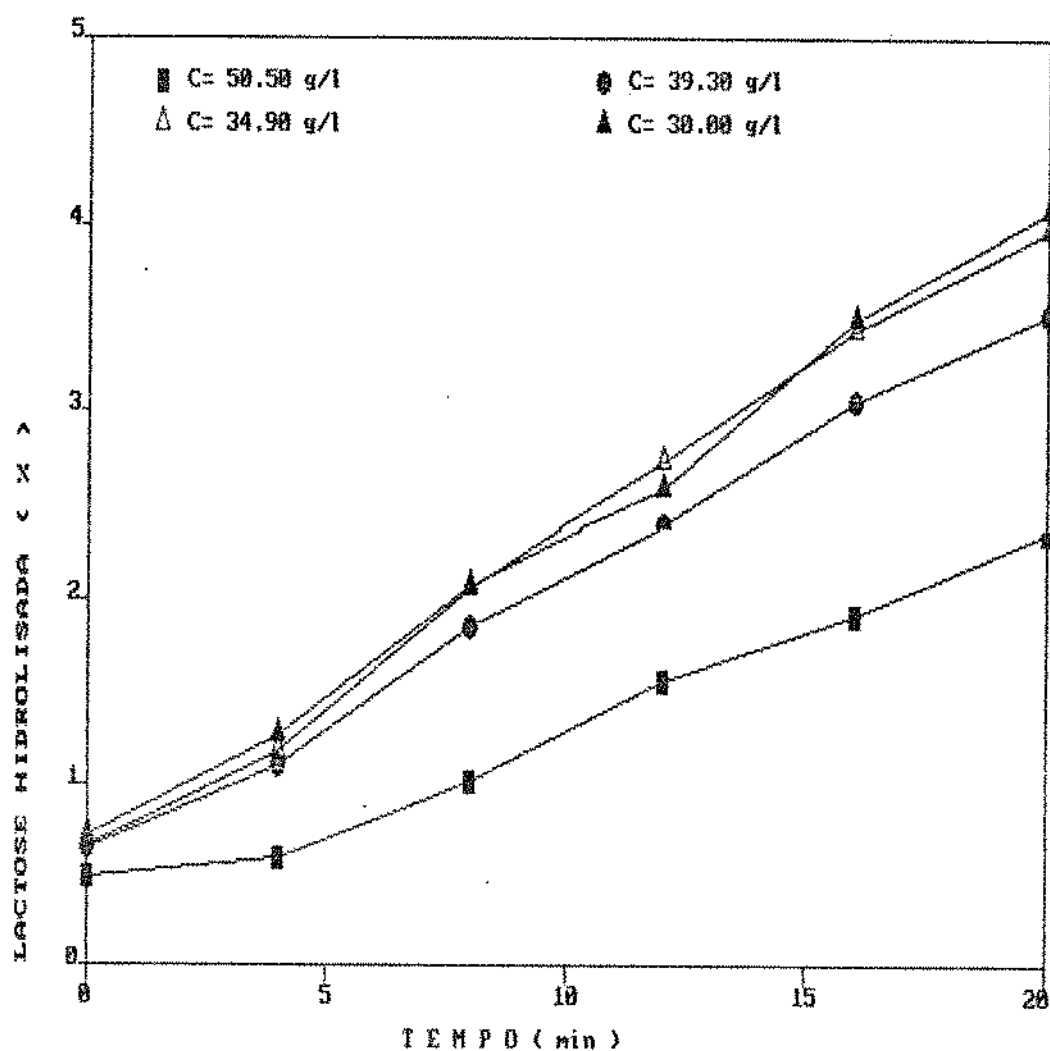


FIGURA IV.13. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DÍFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 50,50 g/l; ● C= 39,30 g/l; △ C= 34,90 g/l; ▲ C= 30,00 g/l.

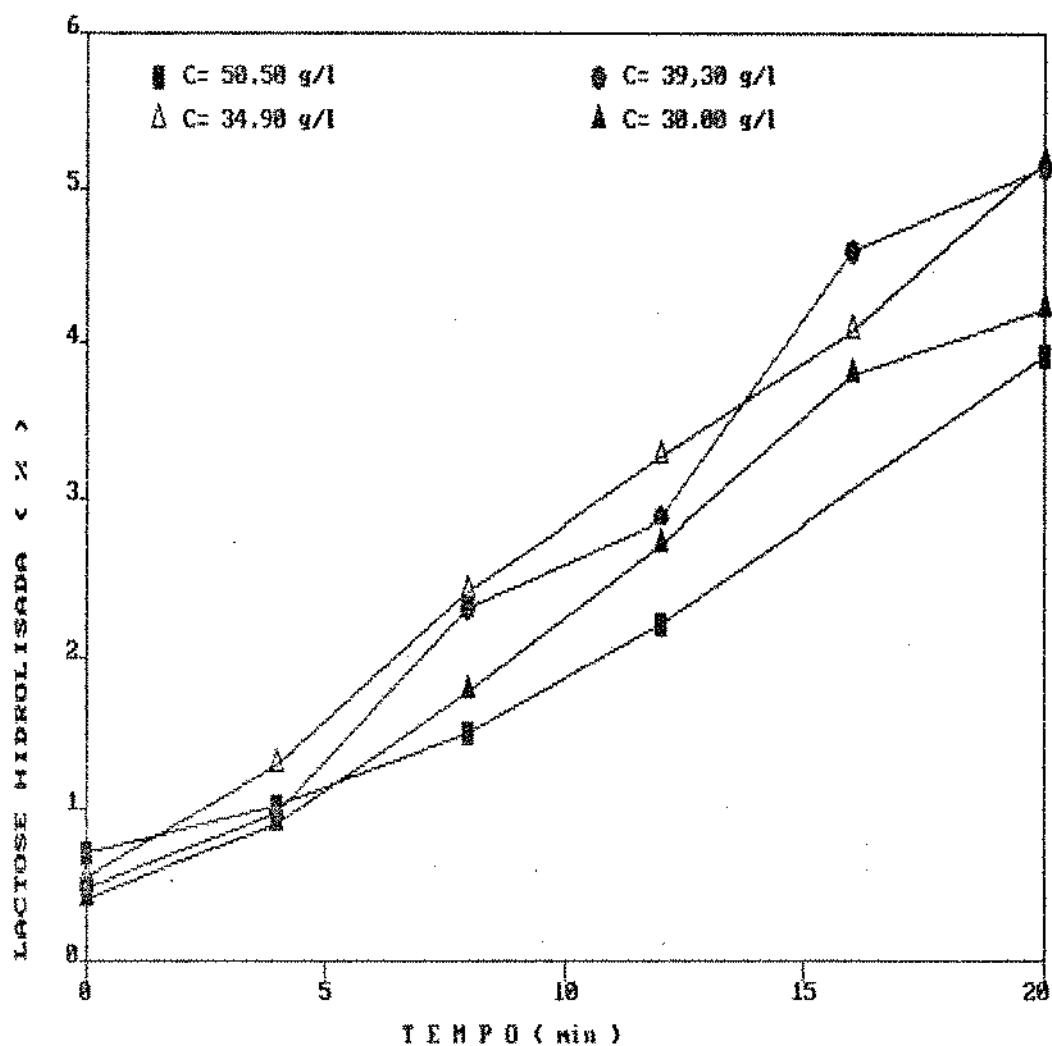


FIGURA IV.14. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 50,50 g/l; ● C= 39,30 g/l; △ C= 34,90 g/l; ▲ C= 30,00 g/l.

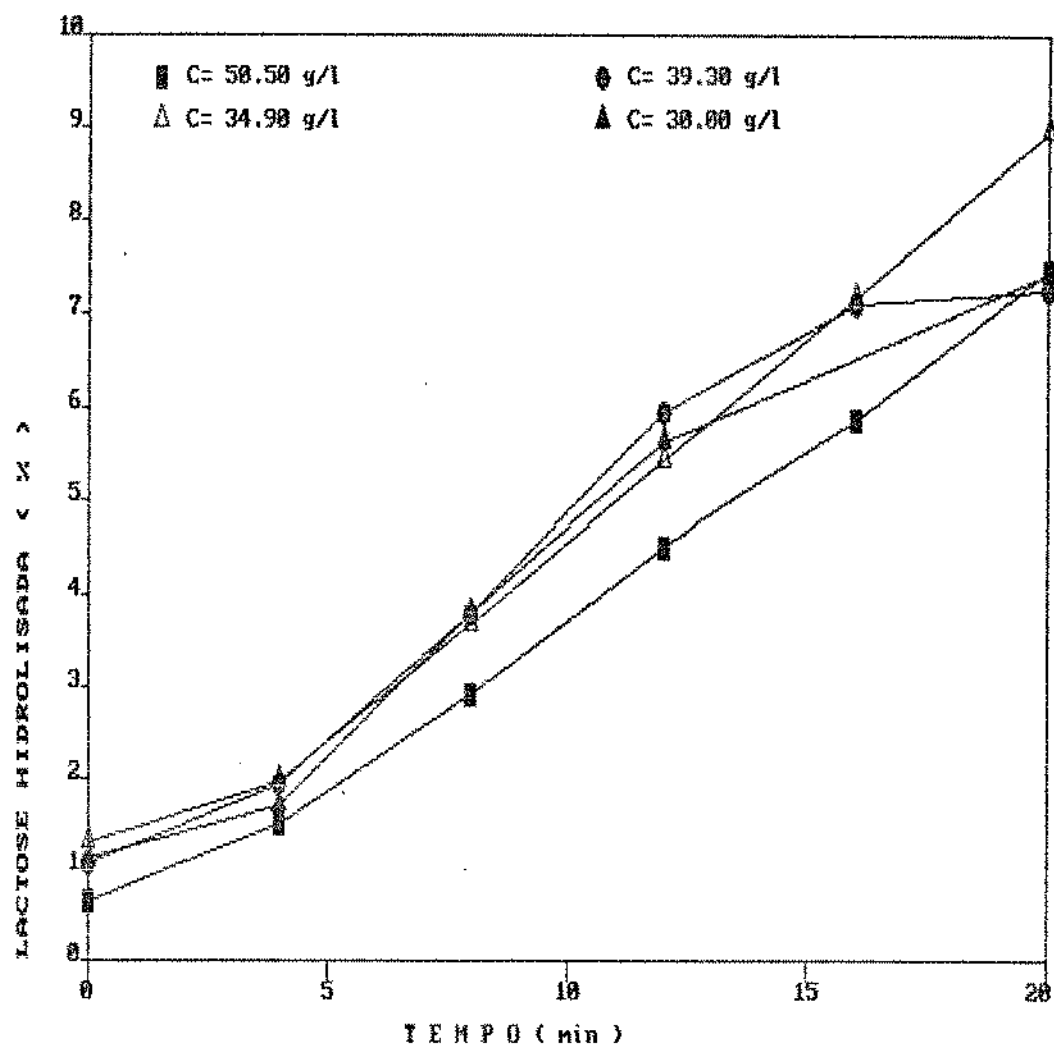


FIGURA IV.15. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 50,50 g/l; ● C= 39,30 g/l; △ C= 34,90 g/l; ▲ C= 30,00 g/l.

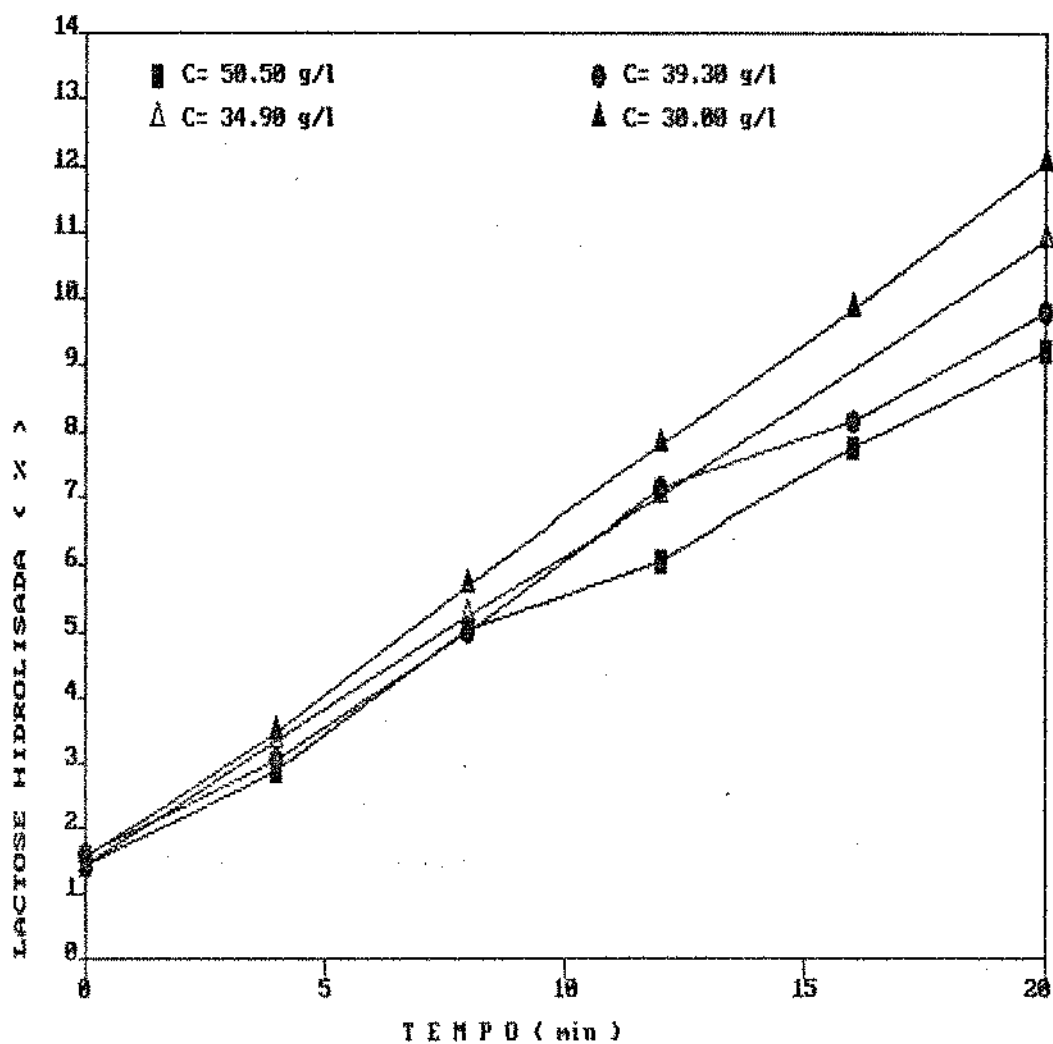


FIGURA IV.16. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 50,50 g/l; ● C= 39,30 g/l; △ C= 34,90 g/l; ▲ C= 30,00 g/l.

Os maiores graus de hidrólise foram obtidos nas temperaturas mais altas de incubação, como 35°C e 40°C. Nos experimentos de hidrólise realizados por GUY & BINGHAM (1978), a melhor temperatura de incubação foi também de 35°C.

Como pode ser observado nos dados das figuras do processamento PF1, a hidrólise da lactose ocorreu de forma mais pronunciada em leites com teores de lactose reduzidos. Nesse mesmo processamento, leite com concentração de lactose de 30 g/l teve 15,76 % de lactose hidrolisada, enquanto que leite com concentração de lactose de 50,50 g/l teve 13,66 % de lactose hidrolisada, ambos a uma temperatura de incubação de 35°C, em 20 minutos de reação, e com concentração de lactase de 0,20 ml/l.

Em geral, pode-se observar o mesmo comportamento para as outras temperaturas de incubação, bem como a uma concentração de lactase de 0,12 ml/l. Esse comportamento se repetiu nos dados obtidos do processamento PF2 (ANEXO II).

De acordo com RICHARD (1985), os estudos de cinética enzimática correspondem à parte linear da curva, o que implica em trabalhar com velocidades iniciais de reação, ou seja, a baixas concentrações de enzima.

As reduções de concentração de enzima e de tempo de hidrólise foram realizadas nos processamentos PF1 e PF2 para conseguirmos menores índices de hidrólise e, conseqüentemente, conseguirmos obter dados do início da reação.

Podemos observar nos processamentos PF1 e PF2 que, com concentração de lactose hidrolisada (gramas de lactose hidrolisada/litro de leite) versus tempo (min), as retas ficam

bem definidas, mostrando as diferenças de hidrólise entre as diversas concentrações do substrato. De todos estes gráficos foram calculados, por regressão linear, os coeficientes angulares de cada reta, que correspondem à velocidade inicial (V_i) da reação de hidrólise da lactose. Os cálculos de regressão linear foram realizados considerando-se todo o tempo de hidrólise, ou seja, 20 minutos de reação. A partir dos valores da velocidade inicial de reação, temos condições de plotarmos o gráfico $1/V_i$ versus $1/S$, e assim obtermos, para cada condição, as curvas de Lineweaver-Burk.

Um exemplo deste gráfico de Lineweaver-Burk pode ser visto na FIGURA IV.17, para o processamento final PF1 a 30°C , com concentração de enzima de 0,20 ml/l.

As diferentes velocidades iniciais de reação (V_i) encontradas para cada concentração do substrato e para cada temperatura, no experimento PF1, podem ser verificadas nas TABELAS IV.6 e IV.7, onde se observa um aumento da velocidade inicial de reação, com o aumento da temperatura de incubação e da concentração de substrato. Este comportamento foi verificado nas duas diferentes concentrações de enzima utilizadas : 0,12 e 0,20 ml/litro de leite. Dos gráficos de Lineweaver-Burk foram calculados os coeficientes angulares, e a intersecção com o eixo Y, para cada reta. Destes coeficientes angulares, e de cada ponto de intersecção no eixo Y, foram obtidas as constantes de Michaelis-Menten (K_m) e as Velocidades Máximas de reação (V_m), para as condições mencionadas. Estes valores de K_m e V_m , para o processamento finais PF1, podem ser vistos nas TABELAS IV.8 e

IV.9.

TABELA IV.6 VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO (g/l.min) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO PARA O PROCESSAMENTO PF1. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA: 0,20 ml/l.

T C(g/l)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
50,50	0,159	0,233	0,296	0,309
39,30	0,152	0,21	0,233	0,285
34,90	0,139	0,194	0,251	0,252
30,00	0,132	0,184	0,209	0,224

TABELA IV.7 VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO (g/l.min) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO. PARA O PROCESSAMENTO PF1. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA: 0,12 ml/l.

T C(g/l)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
50,50	0,0504	0,0825	0,176	0,197
39,30	0,0578	0,0974	0,136	0,164
34,90	0,0598	0,0804	0,138	0,145
30,00	0,0509	0,0614	0,170	0,156

TABELA IV.8. VALORES de Km E Vm PARA
HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE OBTIDO
NO PROCESSAMENTO PF1. CONCENTRAÇÃO DE
ENZIMA = 0,20 ml/l

T (°C)	Vm (g/l.min)	Km (mM)
25	0,24	71,50
30	0,40	214,00
35	0,60	162,00
40	0,79	218,00

TABELA IV.9. VALORES de Km E Vm PARA
HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE OBTIDO
NO PROCESSAMENTO PF1. CONCENTRACAO DE
ENZIMA = 0,12 ml/l

T (°C)	Vm (g/l.min)	Km (mM)
25	0,07	41,70
30	0,24	229,00
35	0,54	315,00
40	0,32	101,00

Nestes experimentos foram encontrados valores altos de Km, se comparados com os valores encontrados por MONTE ALEGRE (1988), com Km da ordem de 60,32 mM, e com o valor encontrado

por WEETALL *et alii* (1974), de 112 mM. Porém, estes pesquisadores não estudaram o Km da hidrólise da lactose em leite, mas em meio de lactose puro.

Quanto maior o Km menor a afinidade pelo meio em que ele se encontra, confirmando, assim, o fato do leite possuir inúmeras substâncias que podem agir como inibidores de lactase.

Os resultados da hidrólise da lactose para o processamento PF2, com concentrações de enzima de 0,20 ml/l e de 0,12 ml/l, estão apresentados no ANEXO II. Estes resultados confirmam, de uma maneira geral, os dados obtidos para o processamento PF1 nestas mesmas concentrações.

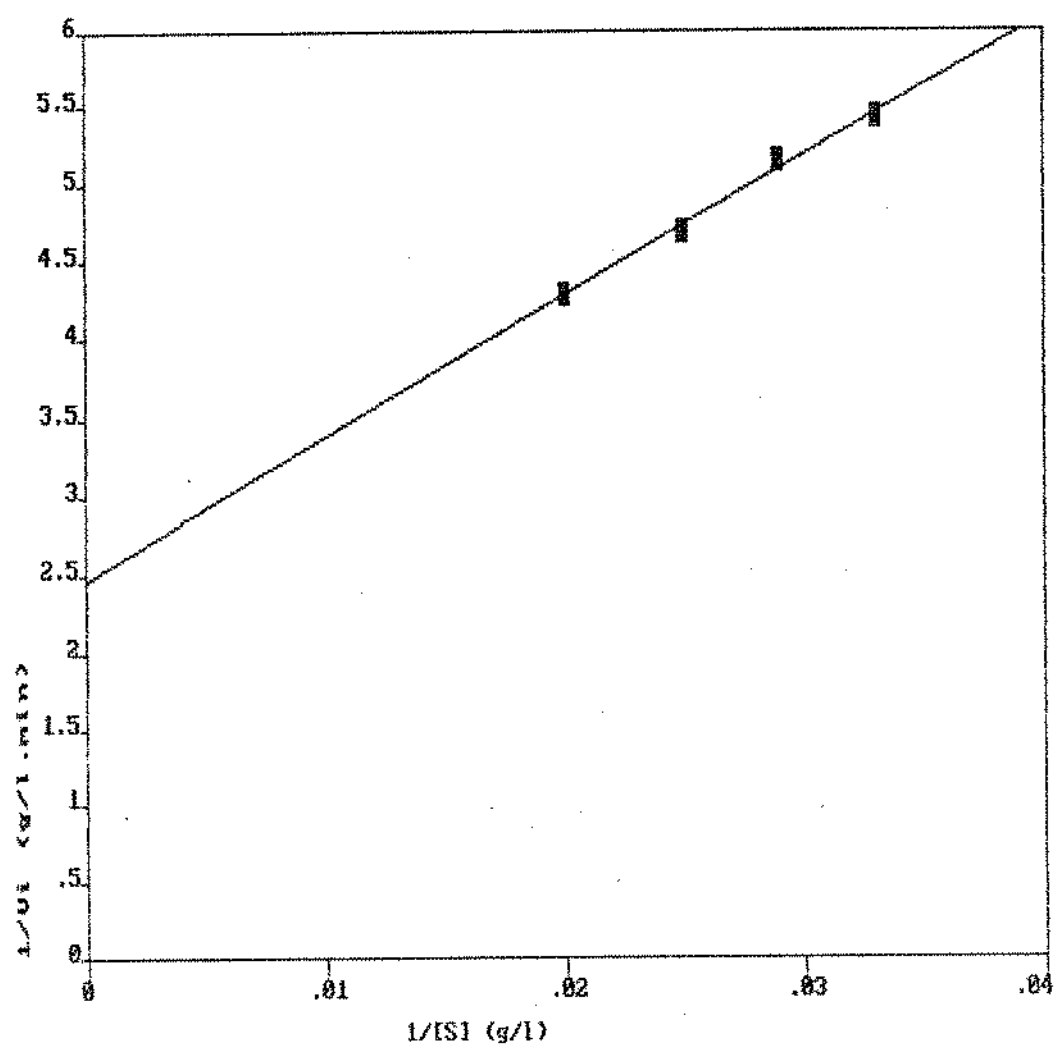


FIGURA IV.17. GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK, PARA O PROCESSAMENTO FINAL PF1, A 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE=0,20 ml/l.

IV.3. PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES COM DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS

Foram realizados dois processamentos (PS1 e PS2), para obtenção de leites com diferentes teores de sais minerais (cinzas), conforme descrito na metodologia III.6.

As TABELAS IV.10 e IV.11 mostram o resultado das análises físico-químicas para estes dois processamentos. Os leites diafiltrados foram recompostos ao seus teores iniciais de lactose, conforme as TABELAS IV.12 e IV.13.

TABELA IV.10. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS1

Leite	pH	Acidez	Gordura (%)	Lactose (%)	Extrato Seco (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)
CON-TROLE	6,70	16	3,4	5,01	11,83	2,90	0,717
LEITE D1	6,63	12	3,2	3,59	9,90	2,74	0,549
LEITE D2	6,58	12	3,2	3,11	9,53	2,74	0,524
LEITE D3	6,67	10	3,2	2,76	9,17	2,70	0,517

TABELA IV.11 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITES PASTEURIZADOS E DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS2

Leite	pH	Acidez	Gordura (%)	Lactose (%)	Extrato Seco (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)
CON-TROLE	6,83	15	3,6	4,98	11,85	2,90	0,700
LEITE D1	6,83	10	3,4	3,46	10,04	2,69	0,539
LEITE D2	6,82	10	3,4	2,94	9,65	2,66	0,488
LEITE D3	6,82	9	3,3	2,68	9,22	2,61	0,484

As composições dos leites controles e dos leites diafiltrados (D1, D2 e D3) apresentadas nas TABELAS IV.10 e IV.11, mostram a diminuição do conteúdo de lactose, de cinzas (sais minerais) e de extrato seco. Podemos observar também a pouca variação do conteúdo de proteínas e gordura, devida ao processo de diafiltração. Estes dados também estão de acordo com os experimentos de RIBEIRO (1989), como citado no item IV.3.

As TABELAS IV.12 e IV.13 mostram o teor de lactose dos leites diafiltrados antes e após a recomposição do teor de lactose.

TABELA IV.12 TEORES DE LACTOSE NOS LEITES DIAFILTRADOS ANTES E APÓS RECOMPOSIÇÃO PARA O PROCESSAMENTO PS1

Tipo de leite	Teor de Lactose antes da recomp.	Teor de Lactose após a recomp.
LEITE CONTROLE	5,01	—
LEITE D1	3,59	5,12
LEITE D2	3,11	5,28
LEITE D3	2,76	5,21

TABELA IV.13 TEORES DE LACTOSE NOS LEITES DIAFILTRADOS ANTES E APÓS RECOMPOSIÇÃO PARA O PROCESSAMENTO PS2

Tipo de leite	Teor de Lactose antes da recomp.	Teor de Lactose após a recomp.
LEITE CONTROLE	4,98	—
LEITE D1	3,46	5,02
LEITE D2	2,94	5,19
LEITE D3	2,68	4,98

As TABELAS IV.12 e IV.13 mostram que a recomposição da concentração da lactose no leite aos teores iniciais alcançou valores desejados em torno de 5 % de lactose.

Os resultados da hidrólise da lactose para leites com diferentes teores de sais minerais (cinzas) podem ser observados nas FIGURAS IV.18, IV.19, IV.20 e IV.21.

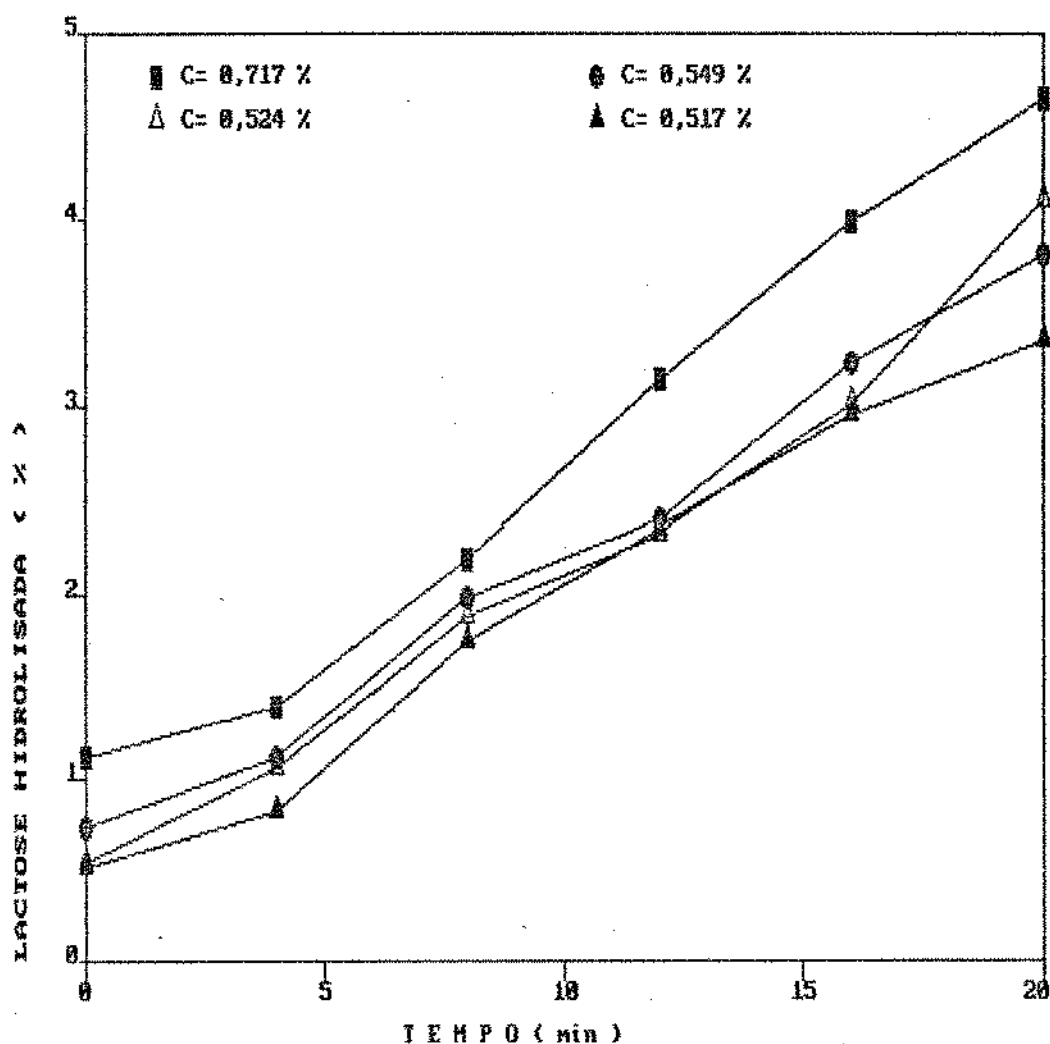


FIGURA IV.18. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 50,10 g/l; ● C= 51,20 g/l; △ C= 52,80 g/l; ▲ C= 52,10 g/l.

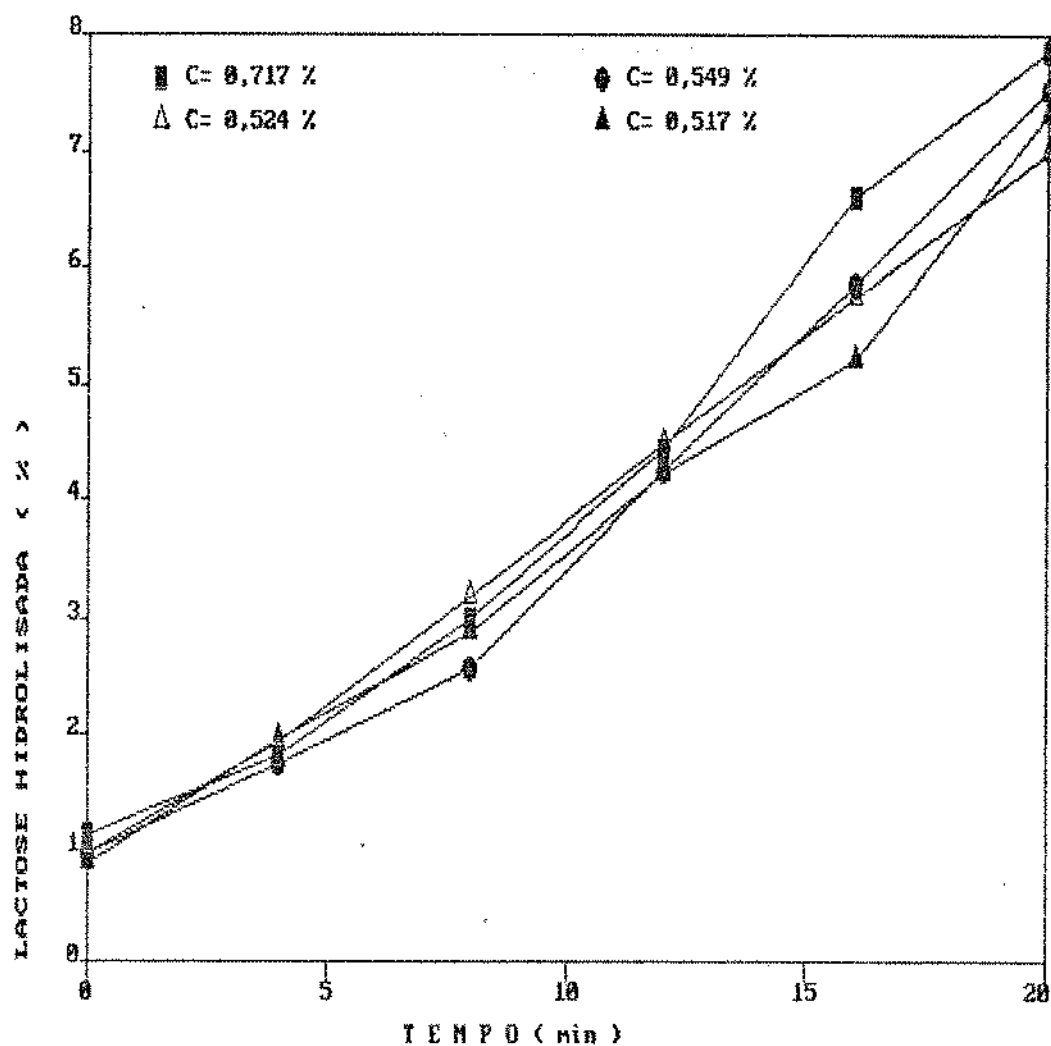


FIGURA IV.19. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DÍFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 50,10 g/l; ● C= 51,20 g/l; △ C= 52,80 g/l; ▲ C= 52,10 g/l.

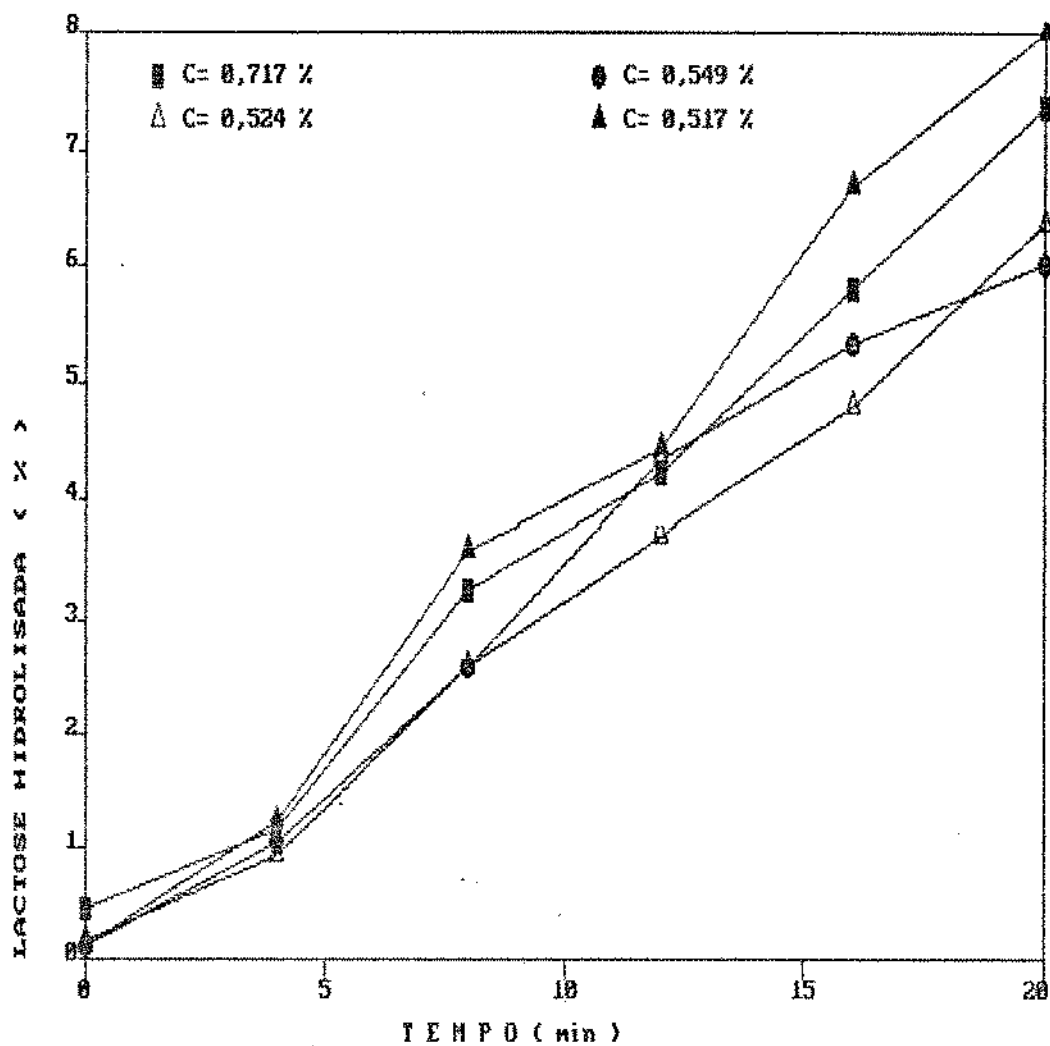


FIGURA IV.20. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 50,10 g/l; ● C= 51,20 g/l; △ C= 52,80 g/l; ▲ C= 52,10 g/l.

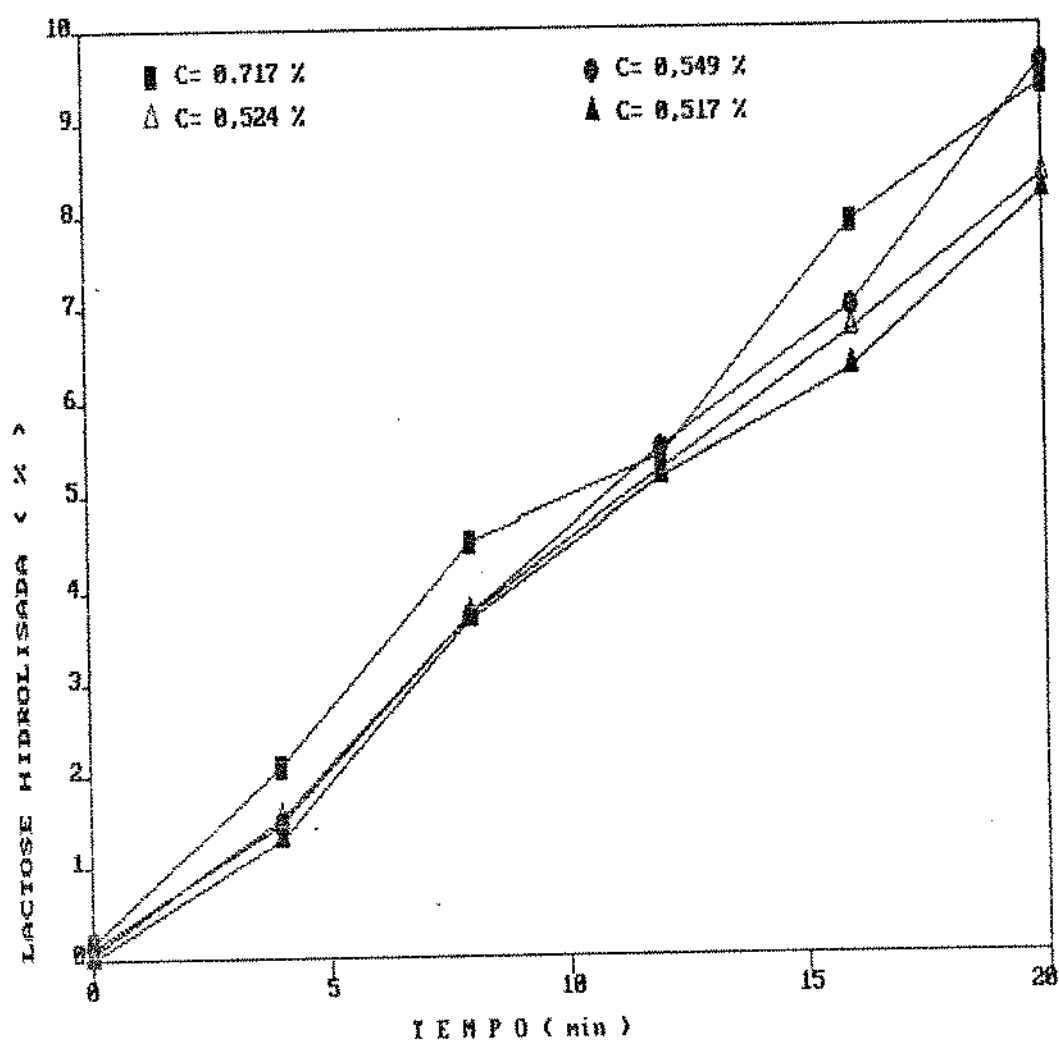


FIGURA IV.21. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE SAIS MINERAIS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

■ C= 50,10 g/l; ● C= 51,20 g/l; △ C= 52,80 g/l; ▲ C= 52,10 g/l.

Os resultados da hidrólise da lactose para o processamento PS2, com concentração de lactase de 0,12 ml/l estão apresentados nas FIGURAS IV.22, IV.23, IV.24 e IV.25. Estes resultados confirmam, de uma maneira geral, os dados obtidos para o processamento PS1.

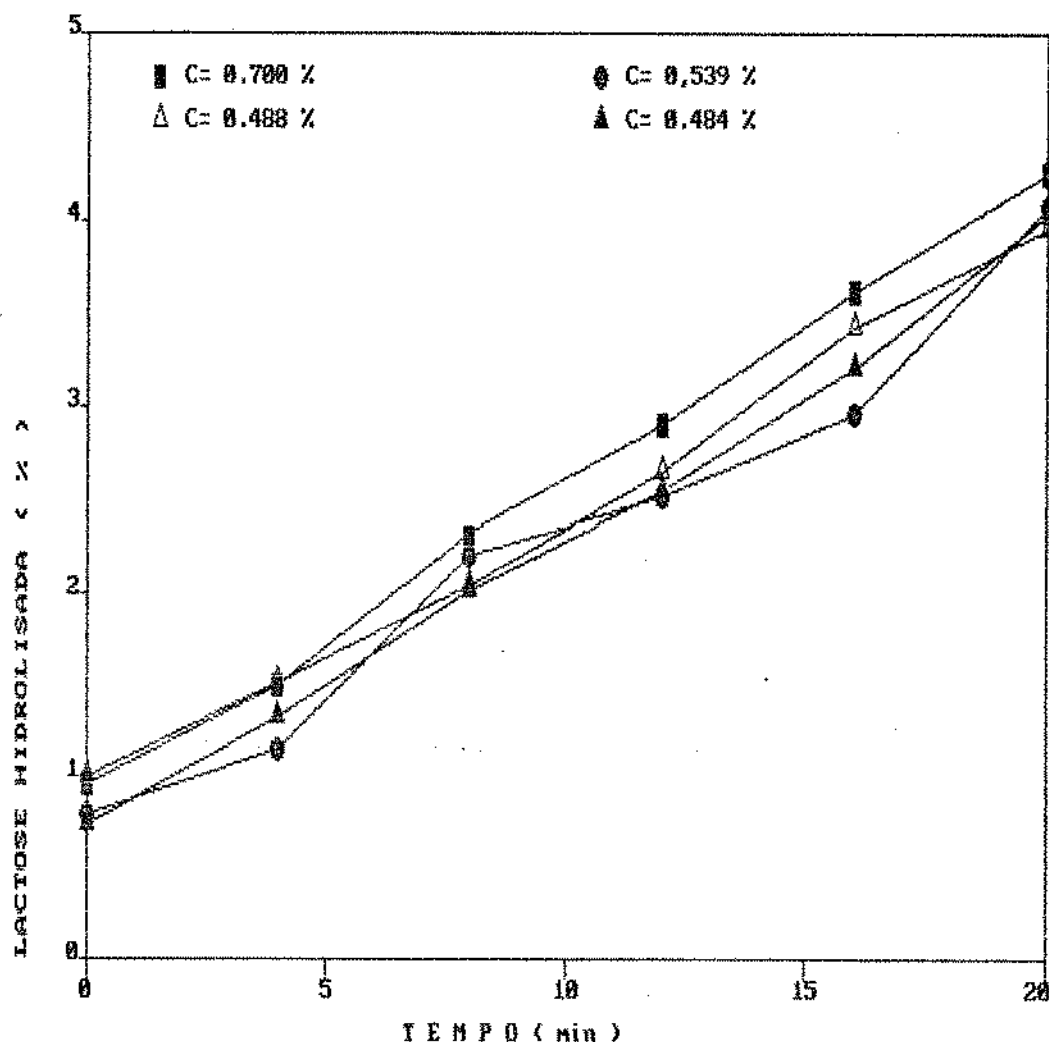


FIGURA IV.22. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PS2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE:
 ■ C= 49,80 g/l , ● C= 50,20 g/l; △ C= 51,90 g/l; ▲ C= 49,80 g/l.

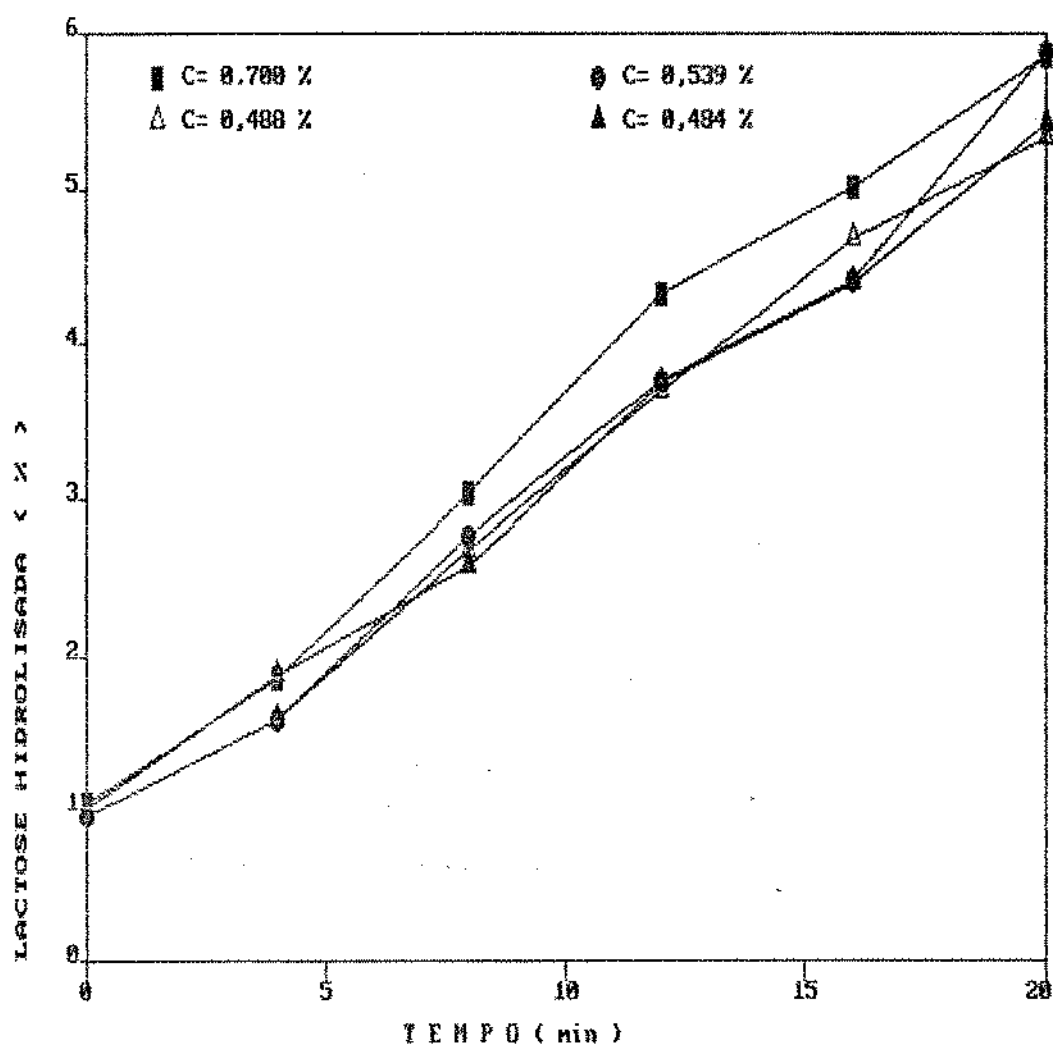


FIGURA IV.23. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PS2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE:
 ■ C= 49,80 g/l , ● C= 50,20 g/l; △ C= 51,90 g/l; ▲ C= 49,80 g/l.

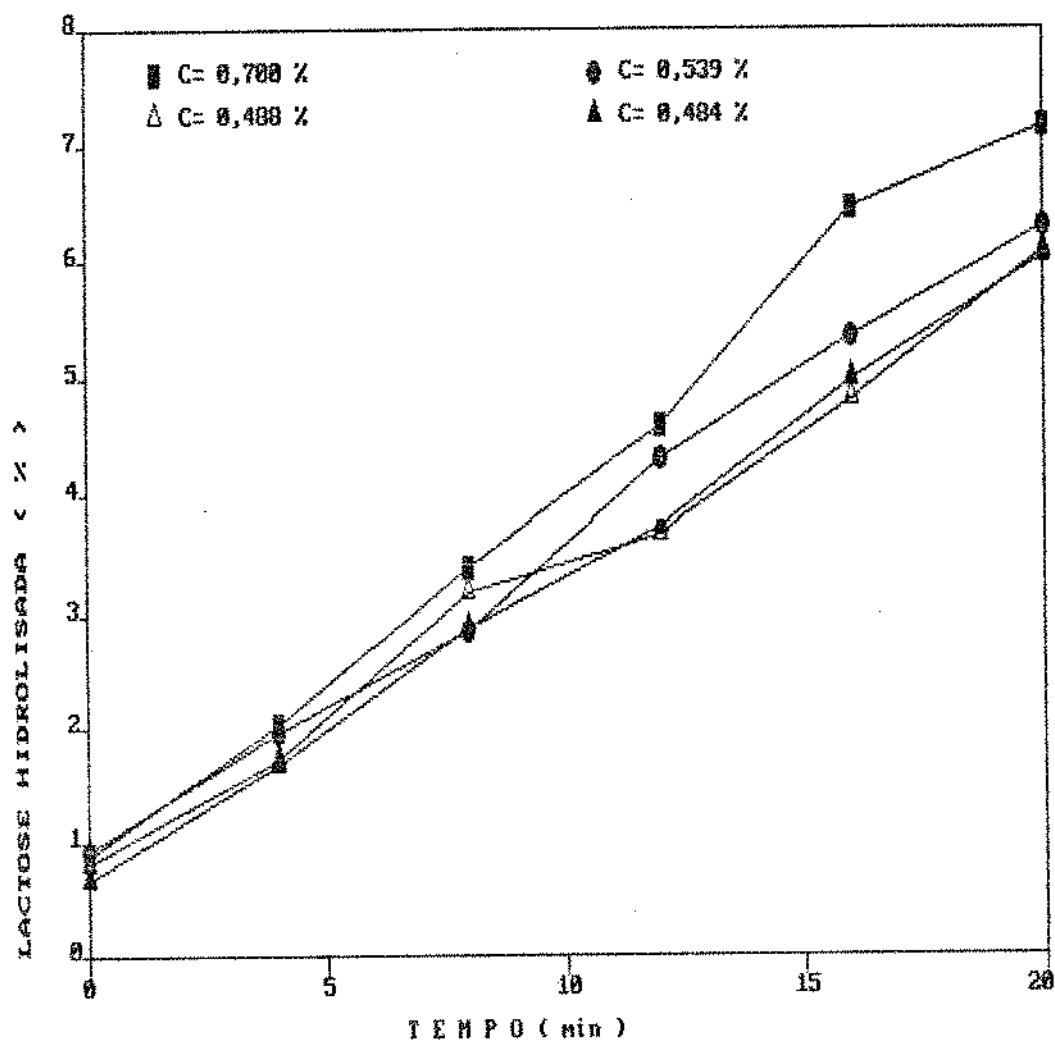


FIGURA IV.24. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PS2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE:
 ■ C= 49,80 g/l , ● C= 50,20 g/l; △ C= 51,90 g/l; ▲ C= 49,80 g/l.

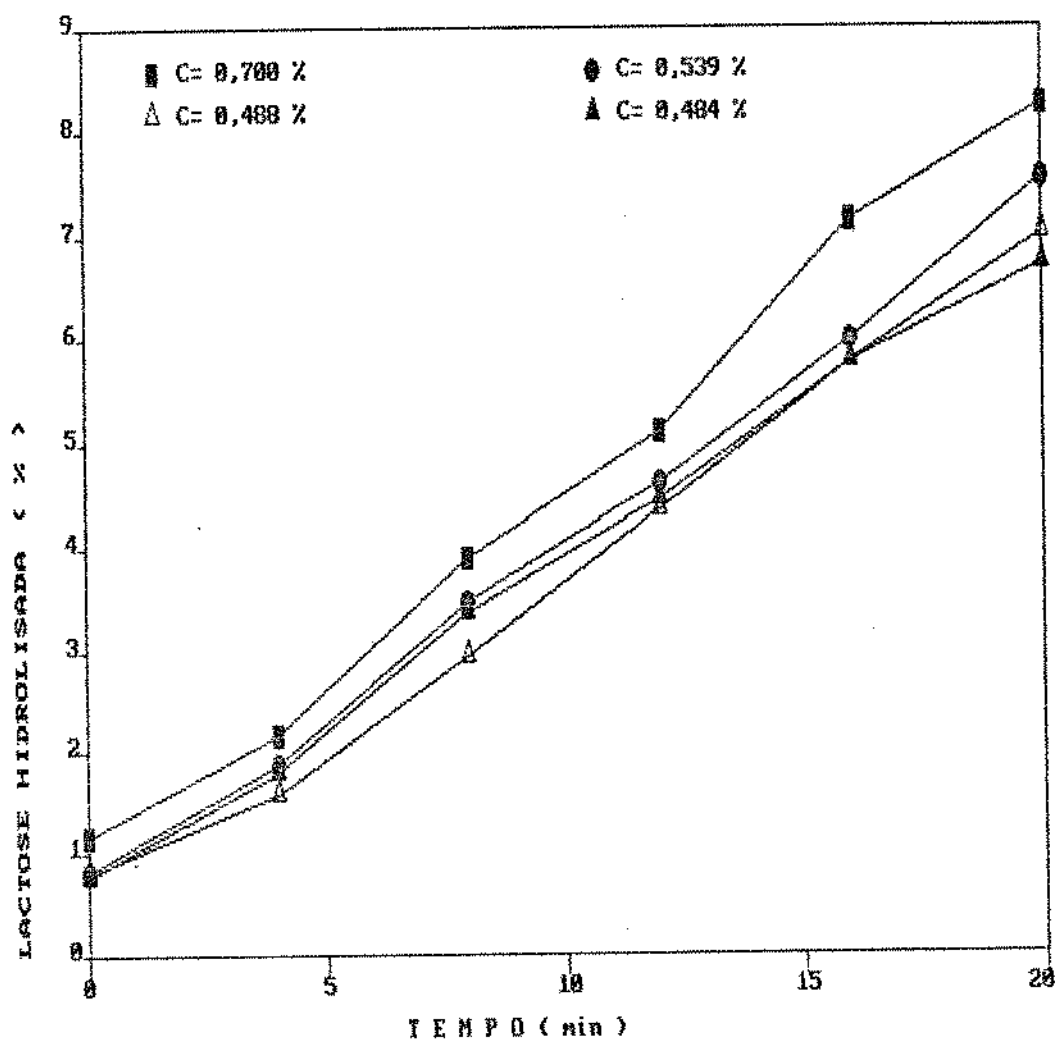


FIGURA IV.25. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PS2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE:
 ■ C= 49,80 g/l , ● C= 50,20 g/l; △ C= 51,90 g/l; ▲ C= 49,80 g/l.

Observando-se os dados dos processamentos PS1 (FIGURAS IV.18, IV.19, IV.20 e IV.21) e PS2 (FIGURAS IV.22, IV.23, IV.24 e IV.25), pode-se dizer que, quanto menor o teor de sais, menor a hidrólise da lactose. Leite obtido no processamento PS1, com 0,717 % de sais, teve 7,2 % de lactose hidrolisada em 20 minutos, a 35°C, enquanto que leite com 0,517 %, nas mesmas condições, teve 6 % de lactose hidrolisada. Em geral, esse comportamento foi verificado para todas as temperaturas de hidrólise.

De acordo com MACBEAN (1979), a taxa de hidrólise da lactose depende da concentração de sais. Com a adição de sais de $MnCl_2$ e $MgCl_2$, GUY & BINGHAM (1978), obtiveram, respectivamente, 74 % e 76 % de lactose hidrolisada. Sem a adição de sais, obtiveram 69 % de lactose hidrolisada.

Nos experimentos PS1 e PS2, as concentrações de sais foram modificadas devido ao processo de diafiltração, permanecendo nos leites diafiltrados um teor reduzido de sais, o que influenciou a diminuição do grau de hidrólise.

ROGER *et alii* (1986), afirmam que, devido ao processo de ultrafiltração, há uma alteração nas razões de sais, o que influencia a hidrólise da lactose. Em leite desmineralizado, obtiveram menores índices de hidrólise (47 %), comparando-se com leite não desmineralizado (89 %).

As diferentes velocidades iniciais de reação (V_i) encontradas para cada concentração de substrato e de sais, e para cada temperatura de hidrólise, nos processamentos PS1 e PS2, podem ser verificadas nas TABELAS IV.14 e IV.15.,

respectivamente.

TABELA IV.14. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS MINERAIS, DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA HIDRÓLISE DE LEITES DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS1. CONCENTRAÇÃO DE LACTASE: 0,12 ml/l.

Conc. Sais (%)	Conc. Lactose (g/l)	Velocidades iniciais (g/l.min)			
		25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
0,717	50,10	0,094	0,177	0,177	0,230
0,549	51,20	0,081	0,171	0,161	0,240
0,524	52,80	0,091	0,162	0,164	0,221
0,517	52,10	0,079	0,161	0,210	0,214

TABELA IV.15. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS MINERAIS, DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA HIDRÓLISE DE LEITES DIAFILTRADOS OBTIDOS NO PROCESSAMENTO PS2. CONCENTRAÇÃO DE LACTASE: 0,12 ml/l.

Conc. Sais (%)	Conc. Lactose (g/l)	Velocidades iniciais (g/l.min)			
		25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
0,700	49,80	0,083	0,124	0,163	0,183
0,539	50,20	0,079	0,122	0,138	0,168
0,488	51,90	0,078	0,119	0,134	0,167
0,484	49,80	0,080	0,109	0,134	0,152

Nestes dois experimentos, observa-se uma tendência do aumento da velocidade inicial de reação ser proporcional ao aumento da temperatura de hidrólise. Contudo, como as concentrações de lactose são similares, não se percebem diferenças na velocidade inicial entre os leites com diferentes teores de sais.

IV.4 PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO

Foram realizados dois processamentos (PT1 e PT2), para obtenção de leites submetidos a diferentes tratamentos térmicos (68°C, 76°C, 84°C e 92°C por 5 minutos), para serem hidrolisados, conforme descrito na metodologia III.7. Os dados apresentados na TABELA IV.16 mostram as composições dos leites pasteurizados nessas condições

TABELA IV.16 : COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS LEITES EMPREGADOS NOS PROCESSAMENTOS PT1 E PT2

Leite	pH	Acidez	Gordura (%)	Lactose (%)	Extrato Seco (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)
PT1	6,79	14,5	3,7	4,95	11,47	2,70	0,694
PT2	6,81	14,0	3,8	4,88	12,07	2,76	0,715

Os dados apresentados na TABELA IV.16, acima, mostram uma composição aproximada entre os leites dos processamentos PT1 e

PT2. Estas pequenas diferenças são devidas ao fato de serem leites diferentes, processados em dias diferentes.

A hidrólise da lactose em leites que tiveram diferentes tratamentos térmicos variaram com a temperatura empregada na pasteurização. Os dados obtidos para o processamento PT1 estão apresentados nas FIGURAS IV.26, IV.27, IV.28 e IV.29. Os dados obtidos no processamento PT2 encontram-se nas FIGURAS IV.30, IV.31, IV.32 e IV.33, e confirmam, de uma maneira geral, os dados obtidos para o experimento PT1.

As retas são distintas para os quatro diferentes tratamentos térmicos. O pré-tratamento térmico a 68°C, por 5 minutos, apresenta os valores mais baixos de hidrólise.

Diferentemente dos processamentos realizados e até aqui discutidos, estes experimentos (PT1 e PT2) foram realizados em leites com iguais composições. A única variável foi a temperatura de pasteurização.

Nas FIGURAS IV.26, IV.27, IV.28, IV.29, IV.30, IV.31, IV.32 e IV.33, correspondentes a estes processamentos, pode-se observar que as diferentes temperaturas empregadas nos pré-tratamentos foram importantes em cada hidrólise, mostrando uma diferença nítida entre os resultados obtidos para cada temperatura de pasteurização.

Como pode ser observado nos dados apresentados, a taxa de hidrólise foi muito maior em leites submetidos a temperaturas de pasteurização mais altas (92°C e 84°C, por 5 minutos), do que a temperaturas mais baixas (68°C e 76°C, por 5 minutos). Isto está de acordo com KOSIKOWSKI & WIERZBICKI (1973), que obtiveram 80 %

de lactose hidrolisada em leite pasteurizado e 75 % de lactose hidrolisada em leite cru, nas mesmas concentrações de lactase. GUY & BINGHAM (1978), tiveram 67 % de lactose hidrolisada em leite cru, e 73 % em leite pasteurizado a 85°C.

De acordo com STIMPSON (1956), a razão pelas diferenças de hidrólise entre leites crus e pasteurizados seria a presença de inibidores da lactase no leite cru. SFORTUNATO & CONNORS (1958), relatam que estes inibidores seriam inativados por tratamento térmico a 74°C por 30 minutos.

STIMPSON (1956) ainda relata que a combinação de tempo/temperatura para pasteurização de leite cru são também importantes. Conforme a TABELA II.4. do item II.4.5, STIMPSON (1954), mostra que o tempo em que o leite é pasteurizado influi na hidrólise da lactose.

As velocidades iniciais de reação, calculadas pelos coeficientes angulares de cada reta, podem ser verificadas nas TABELAS IV.17 e IV.18, para o processamento PT1 e PT2, respectivamente.

TABELA IV.17 : VELOCIDADE INICIAL DE REAÇÃO
(g/min.l) NO PROCESSAMENTO PT1EM FUNÇÃO DAS
TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO (TP) E
TEMPERATURAS DE HIDRÓLISE (TH)

TH TP	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
68 °C	0,088	0,143	0,206	0,217
76 °C	0,129	0,179	0,229	0,297
84 °C	0,125	0,143	0,269	0,314
92 °C	0,125	0,211	0,325	0,325

TABELA IV.18 : VELOCIDADE INICIAL DE REAÇÃO
(g/min.l) NO PROCESSAMENTO PT2 EM FUNÇÃO DAS
TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO (TP) E
TEMPERATURAS DE HIDRÓLISE (TH)

TH TP	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
68 °C	0,129	0,146	0,208	0,243
76 °C	0,132	0,159	0,208	0,234
84 °C	0,138	0,183	0,230	0,286
92 °C	0,137	0,171	0,241	0,296

Verifica-se um aumento da velocidade inicial de reação com o aumento das temperaturas de pasteurização e de hidrólise. As maiores atividades enzimáticas foram observadas nos leites pasteurizados a 92 °C e hidrolisados a 40 °C.

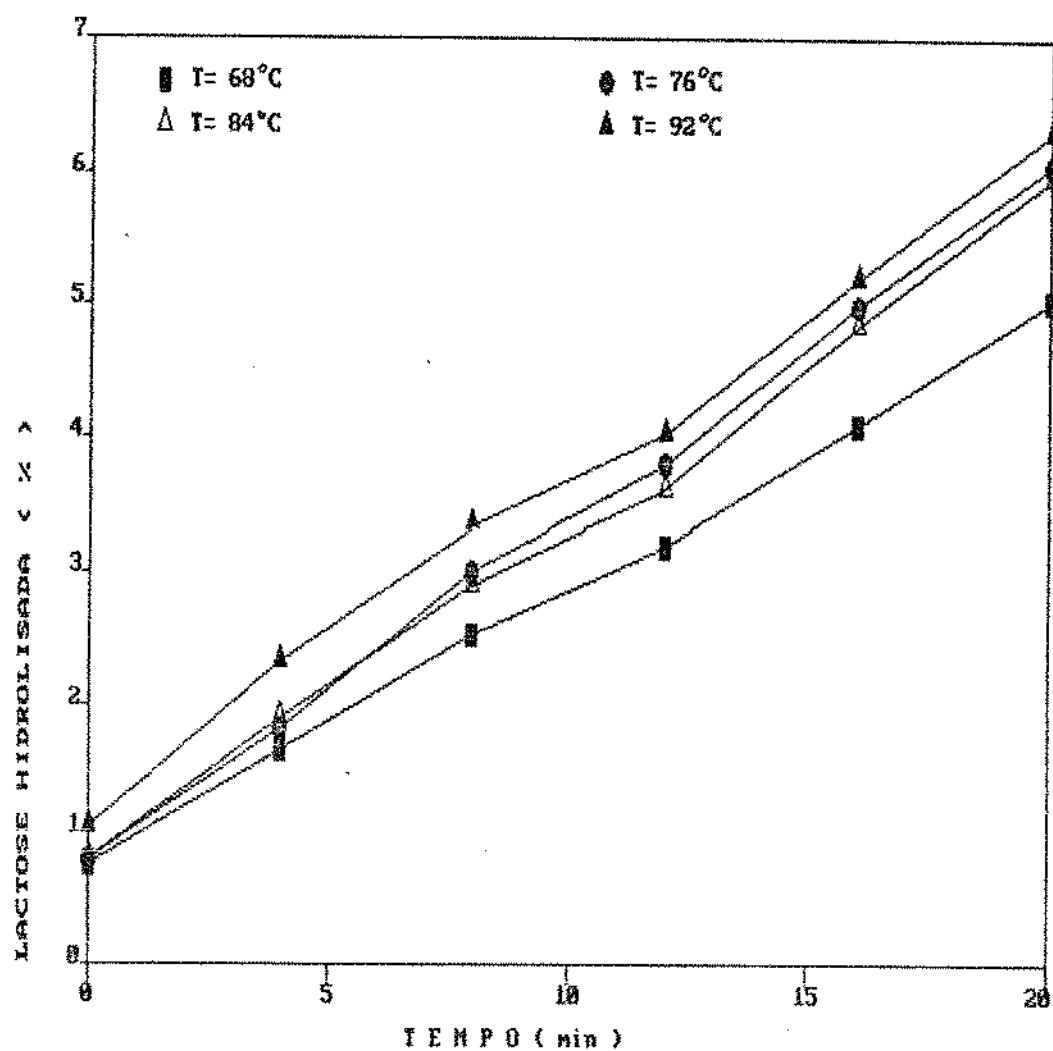


FIGURA IV.26. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.

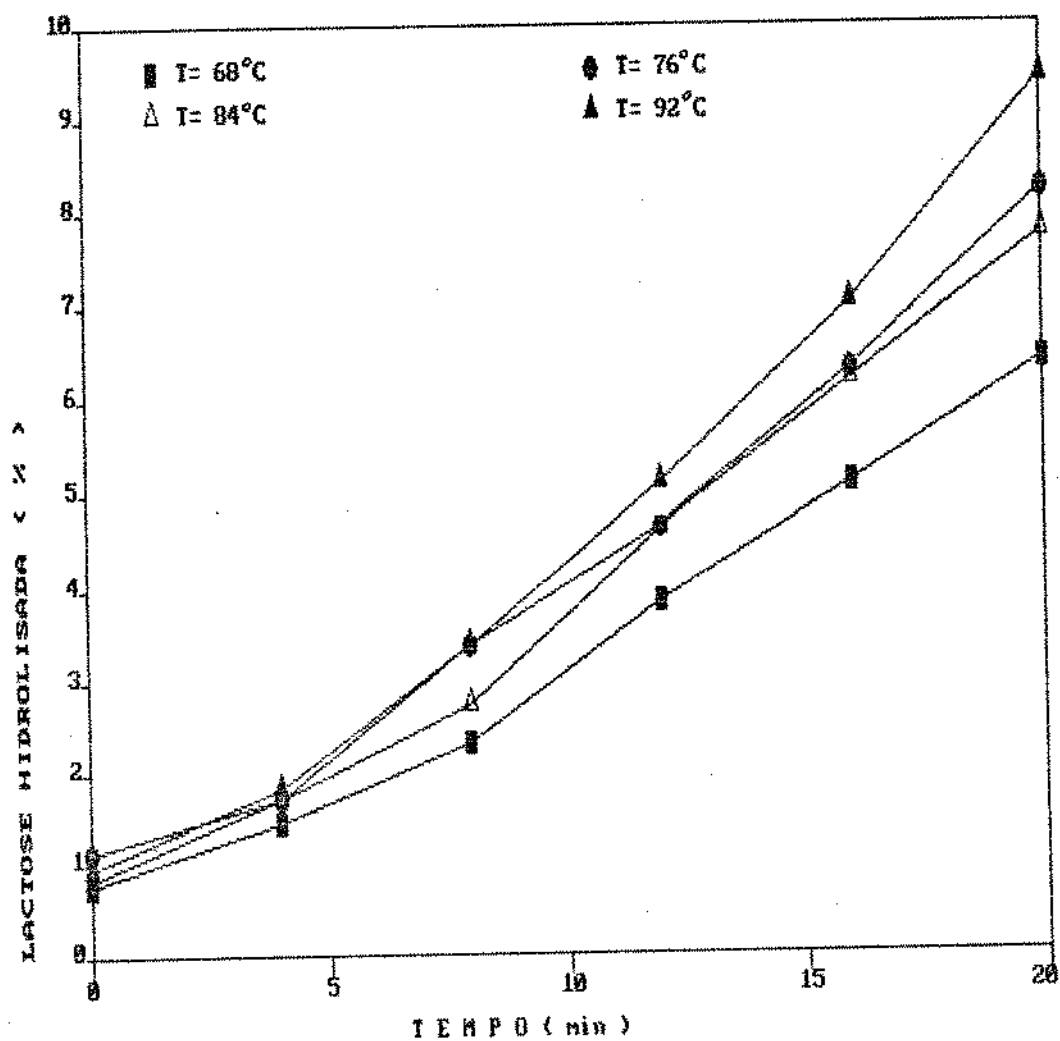


FIGURA IV.27. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.

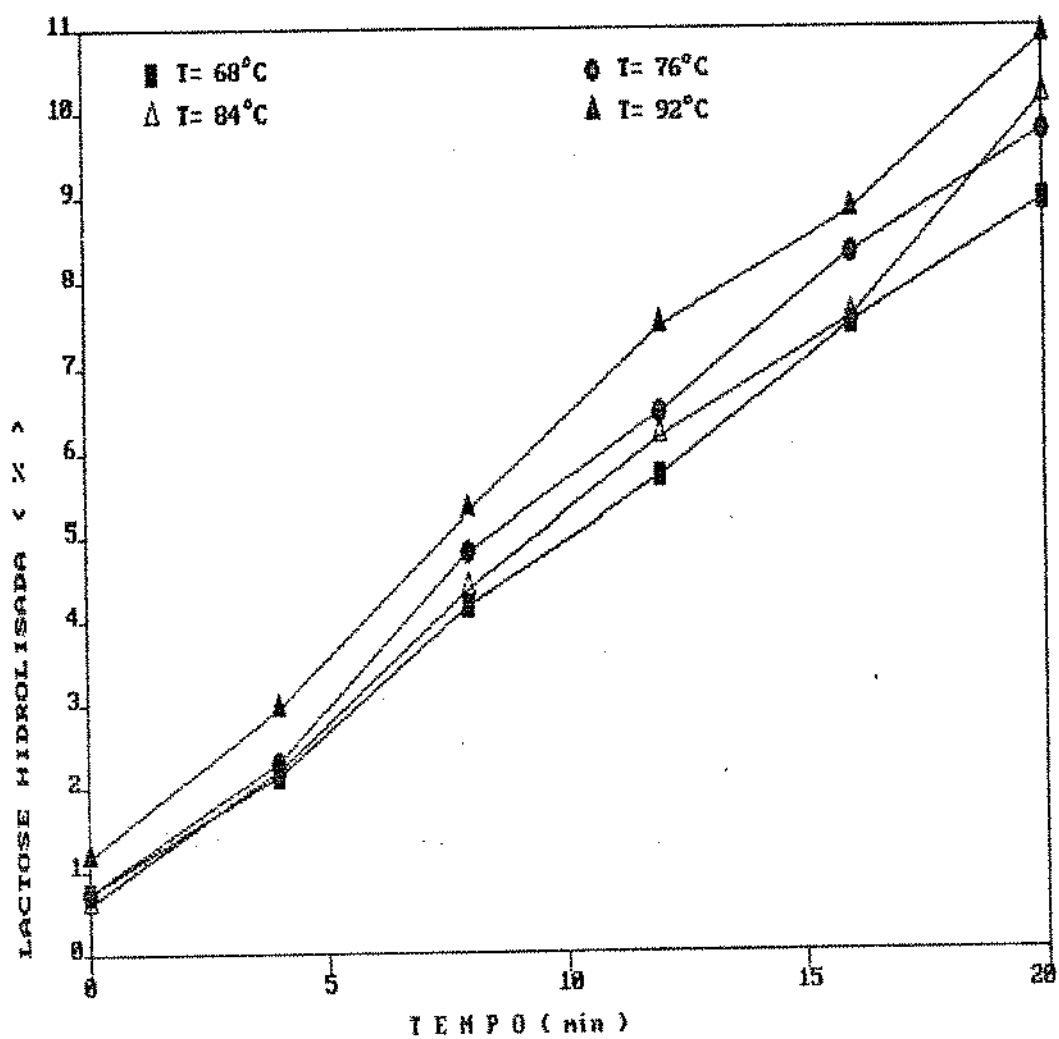


FIGURA IV.28. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.

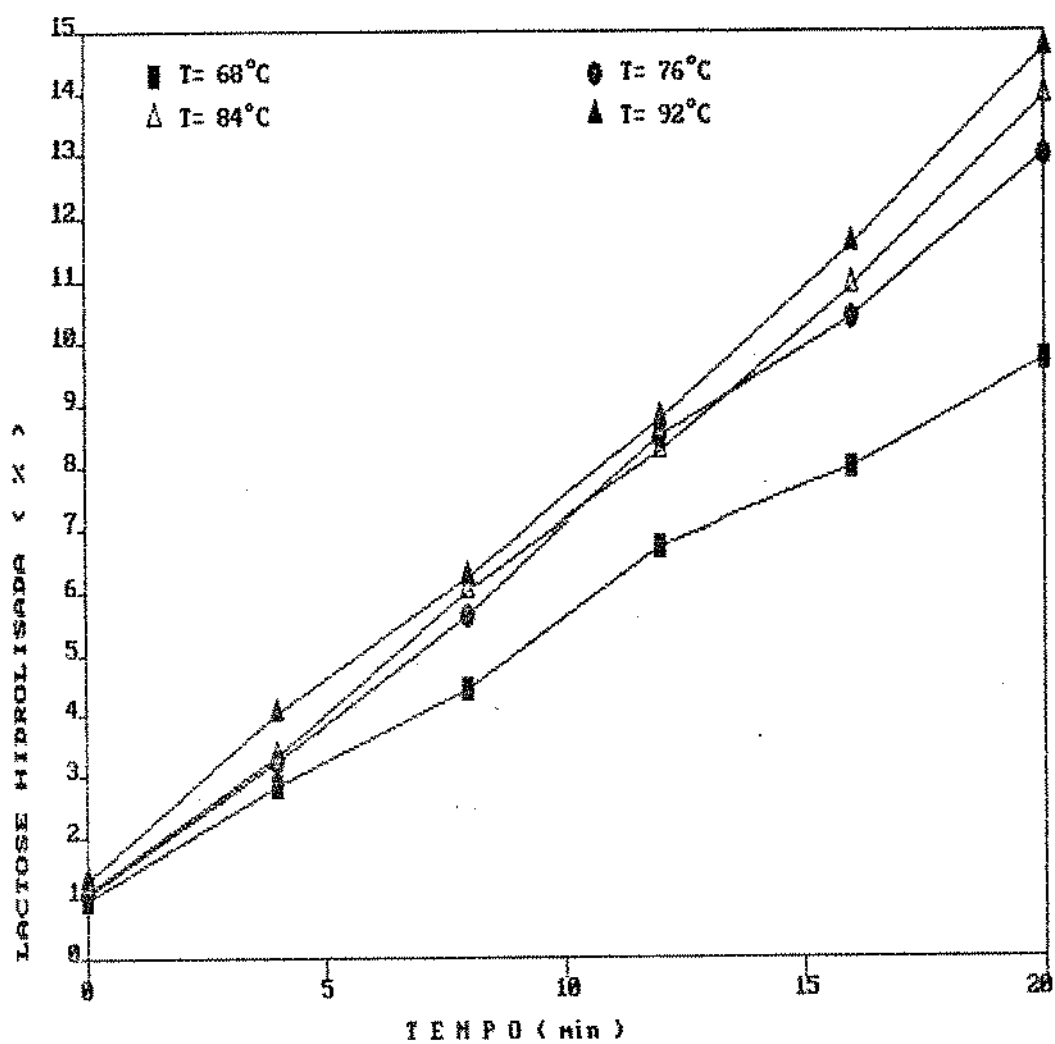


FIGURA IV.29. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT1, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.

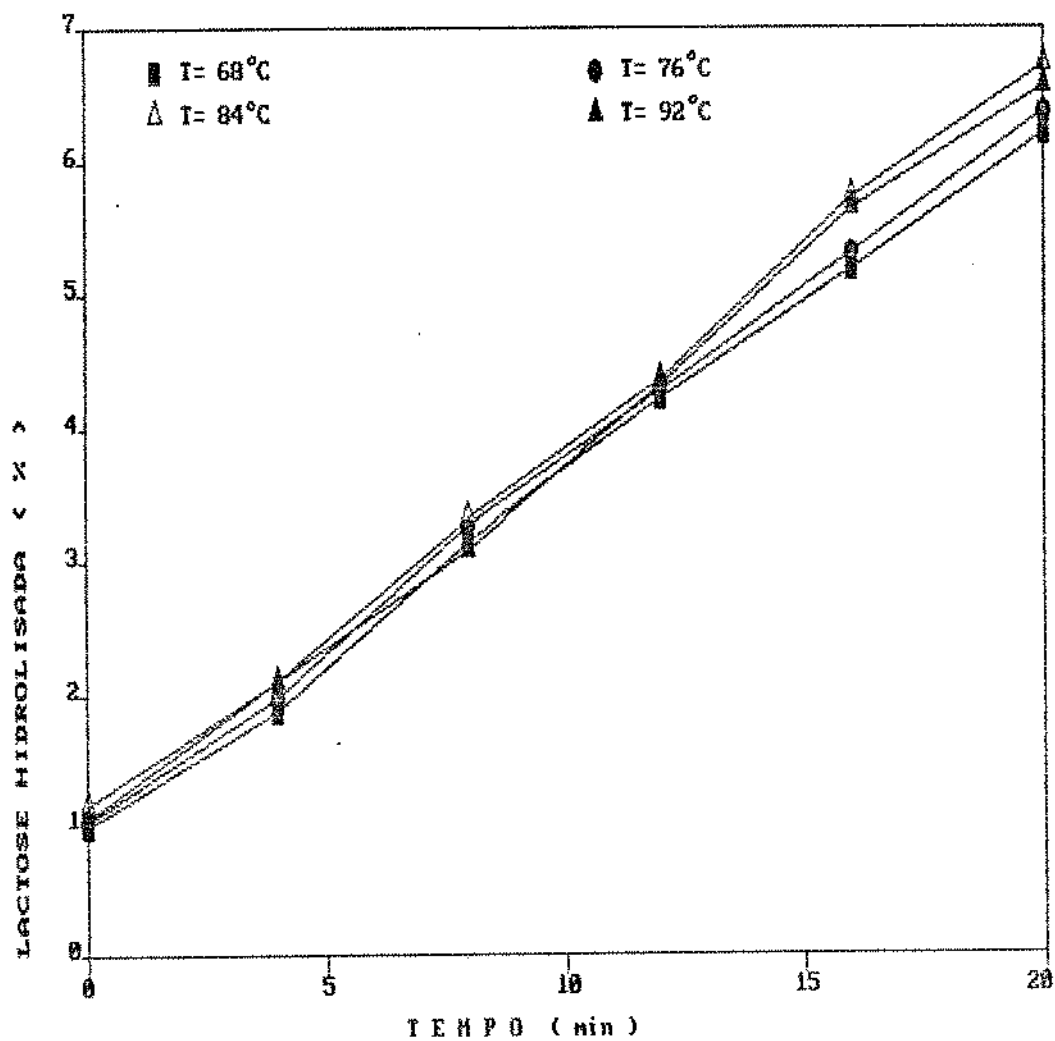


FIGURA IV.30. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C , COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.

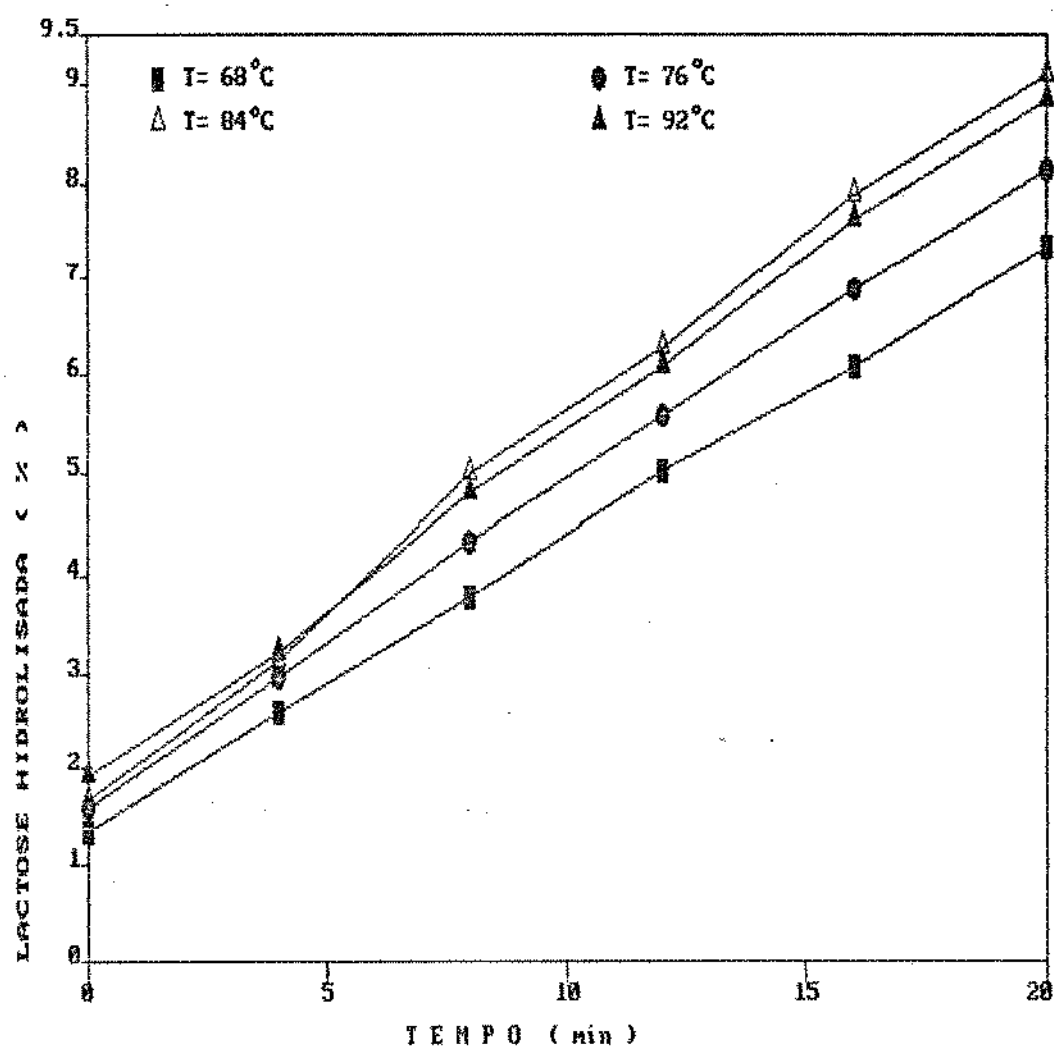


FIGURA IV.31. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.

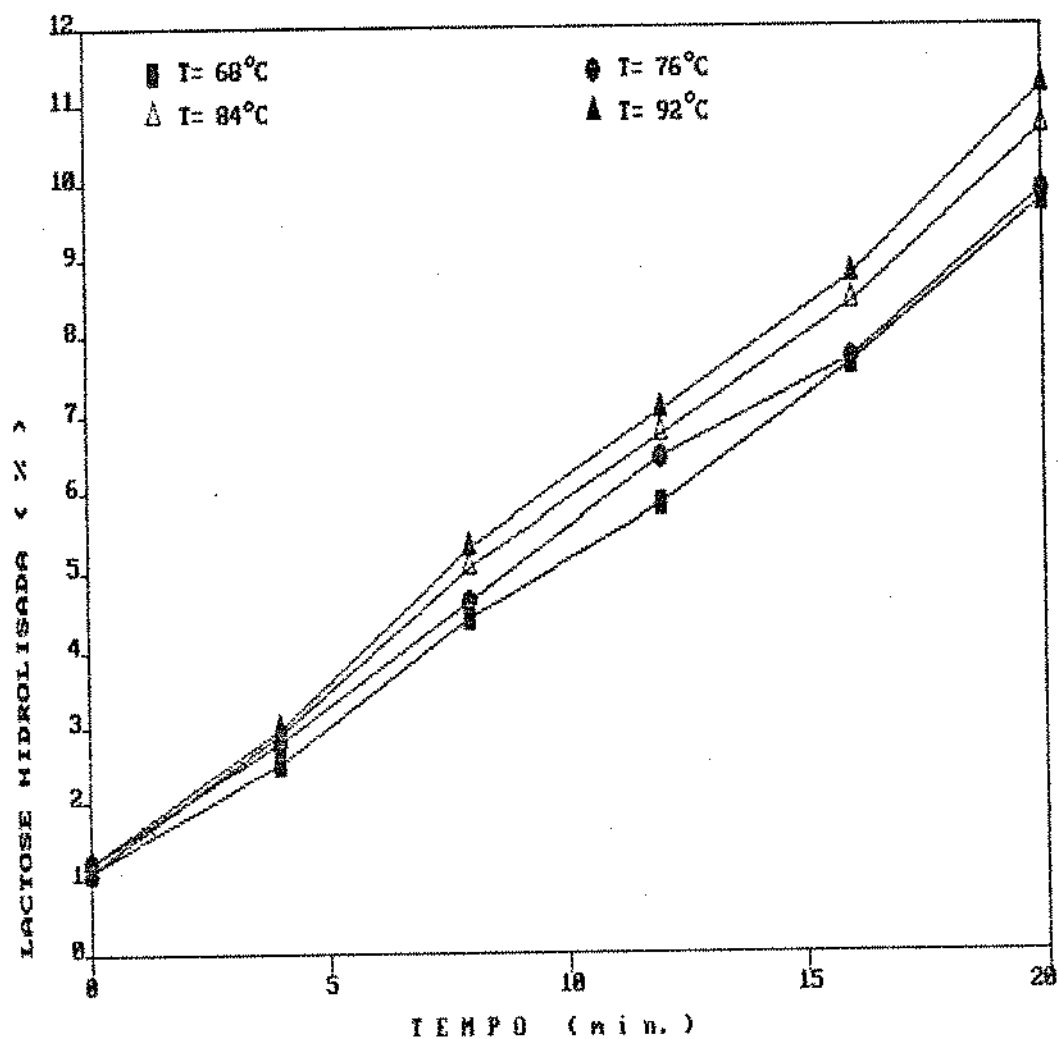


FIGURA IV.32. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C , COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.

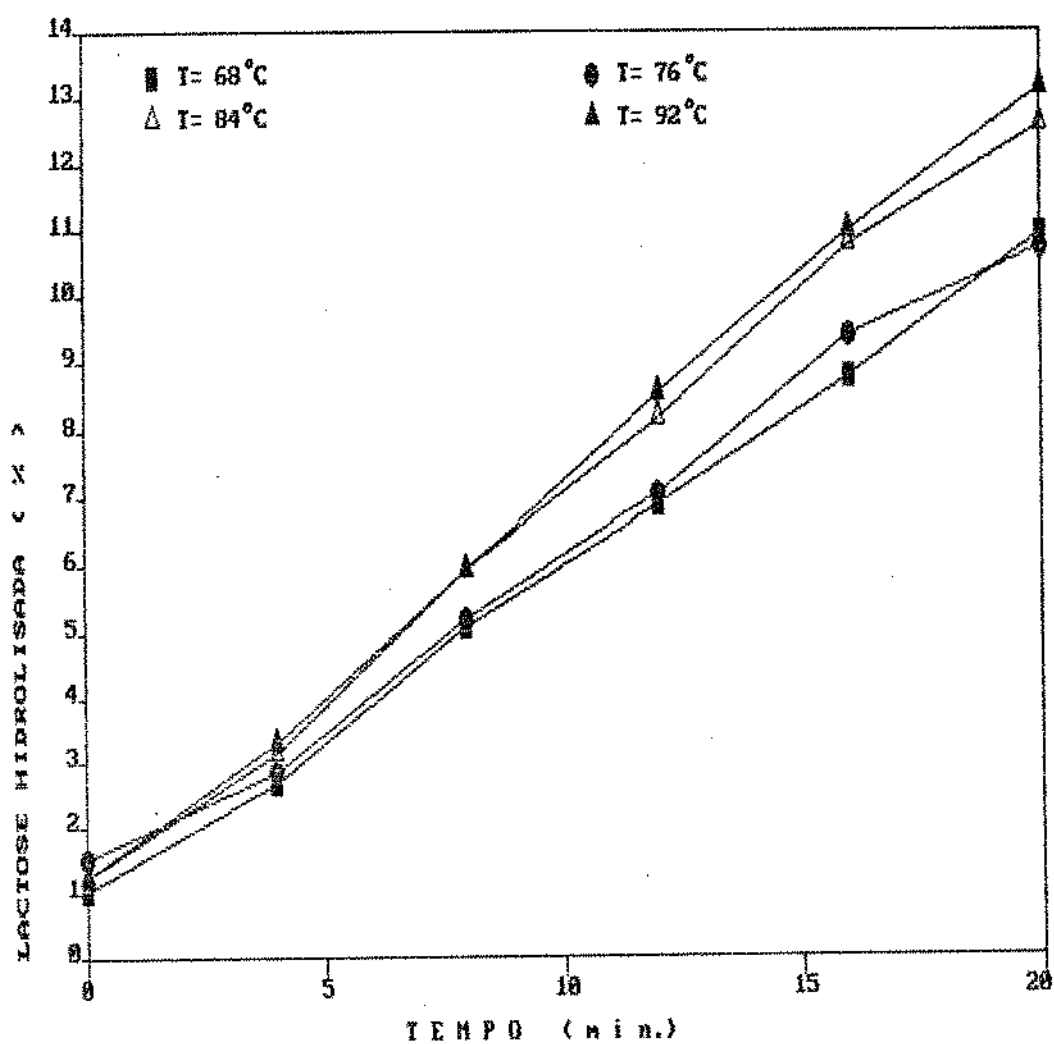


FIGURA IV.33. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO PT2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite.

V. CONCLUSÕES

Através da utilização do processo de diafiltração, foi possível obter-se leites com baixas concentrações de lactose e de sais minerais.

Houve diferenças no grau de hidrólise da lactose efetuada em leites diafiltrados e em leites controles. Geralmente, quanto maior o teor de lactose presente no leite, menor a porcentagem de lactose hidrolisada. Leite com 26 g/l de lactose teve 8,9 % de lactose hidrolisada, e leite com 49,5 g/l de lactose teve 6,2 % de lactose hidrolisada, ambos a uma temperatura de incubação de 35°C, em 20 minutos de reação.

A hidrólise realizada em leites com diferentes teores de sais minerais apresentou pouca diferença entre cada um dos leites, mas ainda pode-se concluir que a porcentagem de lactose hidrolisada foi em geral, maior nos leites que continham maiores teores de sais minerais, como, por exemplo, leite com 0,717 % de sais minerais, que teve 9,36 % de lactose hidrolisada, enquanto que leite com 0,517 % de sais teve 8,19 % de sua lactose hidrolisada, ambos em 20 minutos de hidrólise, a 40°C.

Foi possível concluir que o pré - tratamento térmico dos leites a serem hidrolisados foi importante para aumentar o grau de hidrólise. Enquanto que 14,7 % da lactose presente no leite pasteurizado a 92°C foi hidrolisada, leite pasteurizado a 68°C teve 9,72 % de lactose hidrolisada, ambos a uma temperatura de

hidrólise de 40°C, em 20 minutos de reação.

As velocidades iniciais de reação nos processamentos finais de leites com diferentes teores de lactose, foram mais altos quanto maiores as temperaturas de incubação e as concentrações de substrato. Os valores obtidos para Km na hidrólise da lactose em leite, nestes processamentos, foram mais altos do que aqueles encontrados na literatura, para soluções de lactose pura.

V.1. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

-Determinar a viabilidade econômica da produção de leite pasteurizado lactose hidrolisado na Indústria de Laticínios no Brasil.

-Avaliação do processo de produção de leite pasteurizado lactose hidrolisado em escala industrial com acompanhamento da vida de prateleira do produto.

-Estudar o processo de hidrólise da lactose em soro, avaliando a influência dos pré-tratamentos térmicos.

-Estudar o processo de hidrólise da lactose em leite, avaliando a influência dos pré-tratamentos térmicos em uma faixa de temperaturas maior daquelas estudadas neste trabalho.

-Estudar a hidrólise da lactose em leite, considerando o efeito dos inibidores da lactase presentes no leite.

-Estudo da produção de leite em pó lactose hidrolisado, avaliando as características físico-químicas após o processo de secagem.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS : COMMITTEE ON NUTRITION, Should milk drinking by children be discouraged. Nutrition Reviews, 32 (12): 363-369, 1974.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS : COMMITTEE ON NUTRITION, The practical significance of lactose intolerance in children. Pediatrics, 62 (2): 240-244, 1978.

ANGELIS, R. C. Capacidade de hidrolisar lactose no intestino; verdades e inverdades. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 42 (249): 47-48, 1987.

A.O.A.C.- Official Methods of Analysis of the Association of the Examination of Dairy Products. 14^{ed.}, Arlington, USA, 1984. 1141 p.

ATHERTON, H. V. & NEWLANDER, J.A. Chemistry and Testing of Dairy Products. Avi Publishing Company, 2^{ed.}, Westport-USA, 1981. 396 p.

BARILLAS, C. & SOLOMONS, N. W. Effective reduction of lactose maldigestion in preschool children by direct addition of β -galactosidases to milk at mealtime. Pediatrics, 79 (5):

766-772, 1987.

BEAUFRAND, M. J.; POULLAIN, B.; MUNSCH, B. & DEBRY, G.
Comparaison chez l'homme de l'absorption du lactose et du
lactose hydrolyse. *Le Lait*, 568: 501-508, 1977.

BEIGUELMAN, B. & SEVÁ-PEREIRA, A. Deficiência de lactase
intestinal e intolerância ao leite. *Ciência e Cultura*, 35
(6): 722-734, 1983.

BOUVY, F.A.M. Applications for lactase-treated whey. *Food
Product Development*, 9 (2): 10-13, 1975.

BRAND, J.C. & MILLER, J.J. Trials of lactose hydrolysed milk
in Australian aboriginal children. *Food Technology in
Australia*, 32 (3): 152-156, 1980.

BURVALL, A.; ASP, N. G.; BOSSON, A.; SAN JOSÉ, C. DAHLQVIST, A.
Storage of lactose-hydrolysed dried milk: effect of water
activity on the protein nutritional value. *Journal of Dairy
Research*, 45: 381-389, 1978.

BURVALL, A.; ASP, N. G.; DAHLQVIST, A.; ØSTE, R. Nutritional
value of lactose-hydrolysed dried milk: protein quality
after some industrial process. *Journal of Dairy Research*,
44: 549-553, 1977.

- BURVALL, A.; ASP, N. G.; DAHLQVIST, A. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* Lactase (Maxilact[®]): Part 1- Quantitative Aspects. Food Chemistry, 243-250, 1979.
- COTON, S.G. Ultrafiltration-Fractionation applications. Journal of the Society of Dairy Technology, 27 (3): 121-127, 1974.
- COVACEVICH, H. R. & KOSIKOWSKI, F.V. Skim milk concentration for cheesemaking by alternative ultrafiltration procedures. Journal of Food Science, 42 (5): 1359-1379, 1977.
- DAHLQVIST, A; Method for assay of intestinal disaccharidases. Analytical Biochemistry, 7: 18-25, 1964.
- DAHLQVIST, A; ASP, N. G.; BURVALL, A.; RAUSING, H. Hydrolysis of lactose in milk and whey with minute amounts of lactase. Journal of Dairy Research, 44: 541-548, 1977.
- FERREIRA, C. L. L. F. Intolerância à lactose: O problema e as soluções. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Julho-Agosto: 10-13, 1978.
- FURTADO, M. M. Intolerância à lactose: Uma revisão. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 42 (252): 5-9, 1987.

GEKAS, V. & LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose : a literature review. Process Biochemistry, 20 (2): 02-12, 1985.

GIST-BROCADES - INFORMAÇÃO TÉCNICA DO FABRICANTE - Technical data sheet - Maxilact LX 5000 - Mil - 03/80-03.En.03.

GLOVER, F.A. In : ROBINSON, R. K. Modern Dairy Technology, Advances in Milk Processing. Elsevier Applied Science Publishers, vol 1, Londres e Nova York, 1986. p. 235-271.

GLOVER, F. A.; SKUDDER, P.J.; STOTHART, P.H.; EVANS, E.W. Reviews of the progress of dairy science: reverse osmosis and ultrafiltration in dairying. Journal of Dairy Research , 45: 291-318, 1978.

GREENBERG, N. A. & MAHONEY, R. R. Immobilisation of lactase (β -galactosidase) for use in dairy processing: a review. Process Biochemistry, 16: 2-8, 49, 1981.

GREENE, L. F. & POTTER, N. N. Effects of ultrafiltration on retention of minerals and other components of milk. Journal of Food Science, 51 (2): 345-347, 1986.

GUY, E. J. & BINGHAM, E. W. Properties of β -galactosidase of *Saccharomyces lactis* in milk and milk products. Journal of

- Dairy Science. 61 (2): 147-149, 1978.
- HARJU, M. Lactose hydrolysis. Bulletin of the IDF, 212: 50-55, 1987.
- HOLSINGER, V. H. Lactose-modified milk and whey. Food Technology, 32 (3): 35-40, 1978.
- HOURIGAN, J. A.; Nutritional implications of lactose. The Australian Journal of Dairy Technology, 39 (3): 114-120, 1984.
- HOUTS, S. S. Lactose intolerance. Food Technology, 42 (3): 110-113, 1988.
- JUNGO, O In : RASIK, J. & KURMANN, J. A. YOGHURT. Vol. 1, Scientific Grounds, Technology House, 1978. p. 100-103.
- KILARA, A. & SHAHANI, K. M. Lactose activity of cultured and acidified dairy products. Journal of Dairy Science, 59 (12): 2031 - 2035, 1976.
- KOSIKOWSKI, F. V., WIERZBICKI L. E., Lactose hydrolysis of raw and pasteurized milks by *Saccharomyces lactis* lactase, Journal of Dairy Science, 56 (1): 146-148, (1973).
- KULP, K. In: REED, G. Enzymes in Food Processing, 2 ed, Academic Press, E.U.A., 1975, 596p, cap. 6, p. 92-97.

LANARA (Laboratório Nacional de Referência Animal) Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, M.A. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II. Metodos físicos e químicos. Brasília, DF, 1981.

LANG, F. & LANG, A. New developments in lactose hydrolysis and its use in dairy products. The Milk Industry, 79 (3): 4-6,10, 1977.

LEE, V. A. & LORENZ, K. The nutritional and physiological impact of milk in human nutrition, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 01: 41-116, 1979.

LIFSHITZ, F.; COELLO-RAMIREZ, P.; GUTIERREZ-TOPETE, G. & CORNADO-CORNET, M.C. Carbohydrate intolerance in infants with diarrhea, Pediatrics, 79 (5), 760-767, 1971.

MACBEAN, R. D. Lactose crystallization and lactose hydrolysis. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 14: 113-119, 1979.

MAHONEY, R. R. & ADAMCHUK, C., Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*, Journal of Food Science, 45 (4): 962-964, 968, 1980.

MANN, E. J. Low-lactose milk and milk products. Dairy

- Industries International, 42 (4): 22-23, 1977.
- MANN, E. J. Lactose - hydrolysed milk and dairy products. Dairy Industries International, 46 (9): 17,19, 1981.
- MARTINEZ, S. B. & SPECKMAN, R. A. β -Galactosidase treatment of frozen dairy product. Mixes containing whey. Journal of Dairy Science, 71 (4): 893-900, 1987.
- MCCORMICK, R. D. A nutritious alternative for the lactose-intolerant consumer. Food Product Development, 17-18, 1976.
- MERTENS, B. & HUYGHEBAERT, A. Lactose hydrolysis in an enzymatic membrane reactor. Milchwissenschaft, 42 (10): 640-645, 1987.
- MILLER, J. J. & BRAND, J. C. Enzymic lactose hydrolysis. Food Technology in Australia, 32 (3): 144, 146-147, 1980.
- MONTE ALEGRE, R. Contribuição ao Estudo de Aproveitamento de Soro de Queijo Para Produção de Lactose e Etanol. Campinas, UNICAMP, 1988, 180 p. Tese (Mestr.).
- NICKERSON, T. A. Lactose. In : WEEB, B. H.; JOHNSON, A. H.; ALFORD, J. A. eds. Fundamentals of Dairy Chemistry. 2 ed.

Westport, AVI, 1974. p. 314-316.

NIJPELS, H. H. Application of cryoscopy for the measurement of enzymatic hydrolysis of lactose. *Journal of Food Science*, 45: 1684-1687, 1980.

NIJPELS, H. H. Lactase and their applications. In: BIRCH, G. G.; BLAKEBROUGH, N. & PARKER, K. J. *Enzymes and Food Processing*. Applied Science Publishers LTD, Londres, 1981. cap. 5, p. 89-104.

NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. vol.1 "Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos". 2a ed., São Paulo, 1976. 371 p.

PAIGE, D. M.; BAYLESS, T. M.; GRAHAM, G.G.; Milk Programs: Helpful or Harmful to Negro children ? *AJPH*, 62 (11): 1486 - 1488 , 1972.

PAIGE, D. M.; BAYLESS, T M.; HUANG, S. S. & WEXLER, R. Lactose hydrolysed milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 28: 818-822, 1975.

PASTORE, G. & PARK, Y. K.; β -Galactosidase de *Scopulariopsis* sp: imobilização em resina fenol-formaldeído (Duolite) e sua eficiência na hidrólise de lactose em soro de leite, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 1 (1): 65-72, 1981.

PAYNE-BOSE, D.; WELSH, J. D.; GEARHART, H. L. & MORRISON, R. D.
Milk and lactose-hydrolyzed milk. American Journal of
Clinical Nutrition 30: 695-697, 1977.

POMBO, A.F.W. & CASAGRANDE, H.R. Nova técnica para a
determinação da lactose e sacarose no doce de leite. Revista
do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 37 (222): 3-7,
1982.

PRENOSIL, J. E.; STUKER, E. & BOURNE, J. R. Formation of
Oligosaccharides during Enzymatic lactose : Part 1. State of
art. Biotechnology and Bioengineering, 30: 1019-1025, 1987.

RASIK, J. & KURMANN, J. A. YOGHURT. Vol. 1, Scientific Grounds,
Technology manufacture & preparation - Technical Dairy
Publishing House, Copenhagen-Denmark, 1978. p. 100 - 103.

RENNER, E. In : RASIK, J. & KURMANN, J. A. YOGHURT. Vol. 1,
Scientific Grounds, Technology House, 1978. p.100 - 103.

RIBEIRO, E. P. Aplicação de Ultrafiltração de leite no Processo
de Fabricação de Iogurte. Campinas, UNICAMP, 1989. 189 p.
Tese (Mestr.).

RICHARD, H. Enzimologia e Biocatálise. In: SCRIBAN, R.
Biotecnologia, Ed. Manole Ltda, São Paulo, 1985.

RICHARDSON, G. H. LACTASE. In : REED, G. Enzymes in Food Processing, 2 ed., Academic Press. E.U.A., 1975. p. 383-389.

RICHMOND, M. L.; GRAY, J. J. & STINE, C. M. Beta - Galactosidase: Review of recent research related to technological application nutritional concerns and immobilization. Journal of Dairy Science. 64 (9) : 1759-1771, 1981.

ROGER, L.; THAPON, J. L.; MAUBOIS, J. L. & BRULE, G. Hydrolyse du lactose contenu dans l'ultrafiltrat de lait ou de lactosérum en réacteur enzymatique à membrane. Le Lait. 551-552 : 56-75, 1976.

ROSENSWEIG, N. S. ; Adult human milk intolerance and intestinal lactase deficiency: A review. Journal of Dairy Science, 52 (5): 585-587, 1969.

SANDINE, W. E. & DALY, M. Milk intolerance. Journal of Food Protection, 42 (5): 435-437, 1979.

SFORTUNATO, T. & CONNORS, W. M. ; E.U.A. PAT. 2.826.502. Conversion of lactose to glucose and galactose with a minimum production of oligosaccharides, 11 mar., 1958.

SHUKLA, T. P. Beta-Galactosidase technology: a solution to the lactose problem. Critical Reviews in Food Technology, 5 (3):

325-356, 1975.

SIMOONS, J. F.; JOHNSON, J. D.; KRETCHMER, N.; Perspective on milk-drinking and malabsorption of lactose. Pediatrics, 59 (1): 98 - 108, 1977.

STIMPSON, E.G. ; E.U.A. PAT. 2.681.858. Conversion of lactose to glicose and galactose, 22 Jun., 1954.

STIMPSON, E. G. & STAMBERG, O. E. ; E.U.A. PAT. 2.749.242. Conversion of lactose to glicose, galactose and others sugars in the presence of lactase activators, 05 Jun., 1956.

THOMPSON, M. P. & GYURICSEK, D. M. Manufacture of yogurt, butter milk and cottage cheese from hydrolysed lactose milks. Journal of Dairy Science. 57 : 584, 1974.

TWEEDIE, L. S.; MACBEAN, R. D. & NICKERSON, T.A. Present and potencial uses for lactose and some lactose derivatives. Food Technology in Australia, 30: 57-62, 1978.

VARGAS, O. L. Hidrólise lactoglicosídica e reposição de nutrientes para leite de vaca pasteurizado tipo C. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 42 (256): 10-16, 1987.

WALSTRA. P. & JENNESS, R. Química y física lactológica.

Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, Espanha, 1984. 423 p.

WELSH, J. D. Diet therapy in adult lactose malabsorption present practices. The American Journal of Clinical Nutrition, 31: 592-596, 1978.

WENDORFF, W. L. & AMUNDSON, C. H. Characterization of beta-galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. Journal of Milk and Food Technology, 34 (6): 300-306, 1971.

WENDORFF, W. L.; AMUNDSON, C. H. & OLSON, N. F. The effect of heat treatment of milk upon the hydrolyzability of lactose by the enzyme lactase. Journal of Milk and Food Technology, 33 (9): 377-379, 1970.

WENDORFF, W. L.; AMUNDSON, C. H.; OLSON, N. F. & GARVER, J. C. Use of yeast beta-galactosidase in milk and milk products Journal of Milk and Food Technology, 34 (6): 294-299, 1971.

WEETALL, H. H.; HAVEWALA, N. B.; PITCHER, W. H. Jr.; DETAR, C. C.; VANN, W. P. & YAVERBAUM, S. The preparation of immobilized lactase and its use in enzymatic hydrolysis of acid whey. Biotechnology and Bioengineering, XVI, 295 - 313, 1974.

WIERZBICKI, L. E.; EDWARD, V. H. & KOSIKOWSKI, F. V. Hydrolysis of lactose in acid whey using β -galactosidase immobilized on

porous glass particles: preparation and characterization of reusable catalyst for the production of low-lactose dairy products. *Biotechnology and Bioengineering*, 16: 397-411, 1974.

WOYCHICK, J.H. & WONDOLOWSKI, M.V. Lactose hydrolysis in milk and milk products by bound fungal beta-galactosidase. *Journal of Milk and Food Technology*, 36 (1): 31-33, 1973.

ZADOW, J. G. Lactose hydrolized dairy products. *Food Technology in Australia*, 38 (11), 460 - 462, 471, 1986.

ZADOW, J. G. Lactose: Properties and uses. *Journal of Dairy Science*, 67 (11): 2654-2679, 1984.

ANEXO I

ANEXO I. CÁLCULOS DA MASSA DE ÁGUA PARA A DIAFILTRAÇÃO

BALANÇOS DE MASSA OBTIDOS NA PRODUÇÃO DE LEITE DIAFILTRADO NOS PROCESSAMENTOS PP1, PP2, PF1 E PF2, CALCULADOS CONFORME METODOLOGIA III.4.

Leite Diaf.	Permeado (Kg)	Água(Kg)	Leite diaf.(Kg)	Leite diaf.sep.(Kg)
1	7,50	1,30*	30	4
2	3,71	3,71	26	4
3	6,67	3,67	22	4

* $7,5 - 6,2 = 1,30$

BALANÇOS DE MASSA OBTIDOS NA PRODUÇÃO DE LEITE DIAFILTRADO NOS PROCESSAMENTOS PS1 E PS2, CALCULADOS CONFORME METODOLOGIA III.4.

Leite Diaf.	Permeado (Kg)	Água(Kg)	Leite diaf.(Kg)	Leite diaf.sep.(Kg)
1	7,30	1,10*	33	5
2	4,00	4,00	28	5
3	4,53	4,53	23	5

* $7,30 - 6,20 = 1,10$

Os dados das tabelas acima mostram que as massas de permeado retirado e de água adicionada são iguais, com exceção da massa de água adicionada no primeiro leite, que foi somada a massa de 6,2 Kg de água que estava nos equipamentos.

ANEXO II

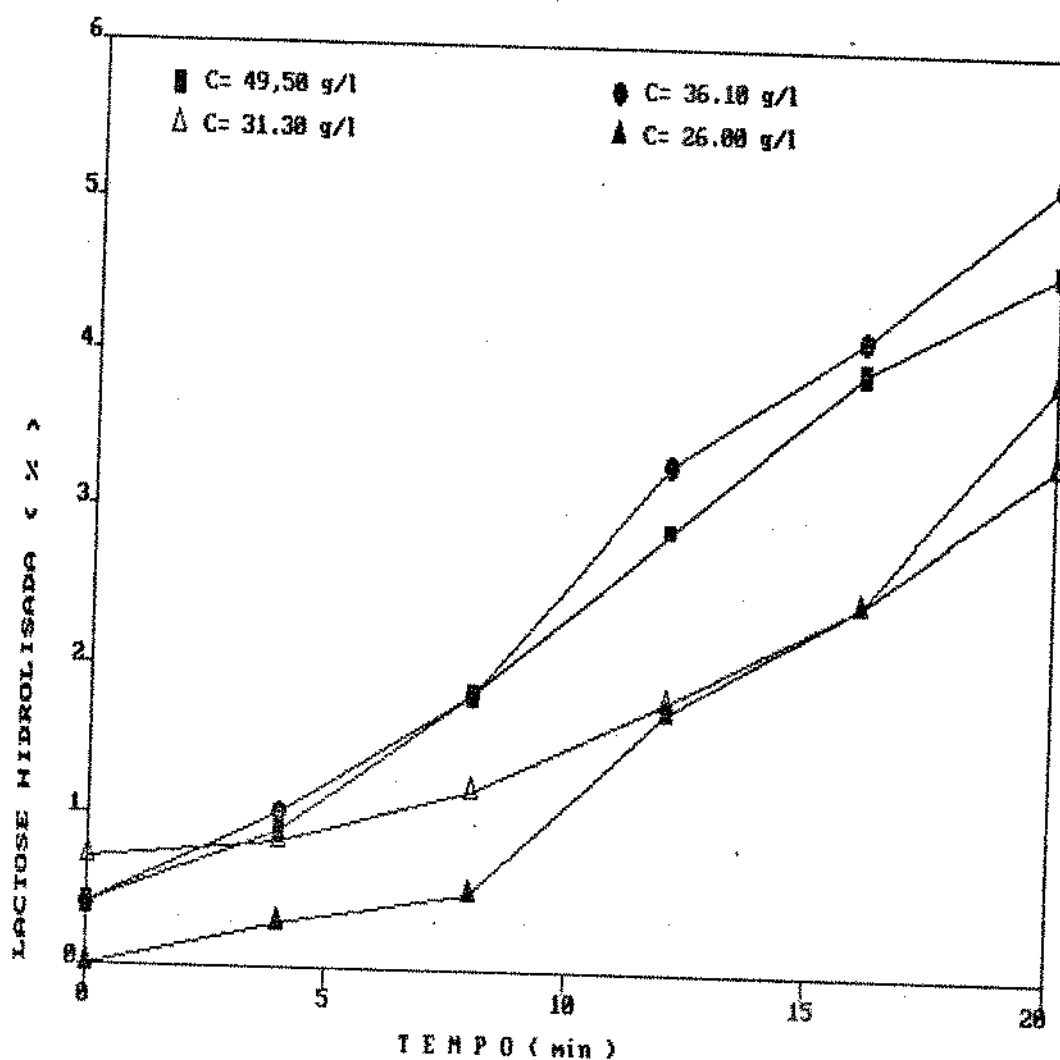


FIGURA IV.34. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 49,50 g/l; ● C= 36,10 g/l; △ C= 31,30 g/l; ▲ C= 26,00 g/l.

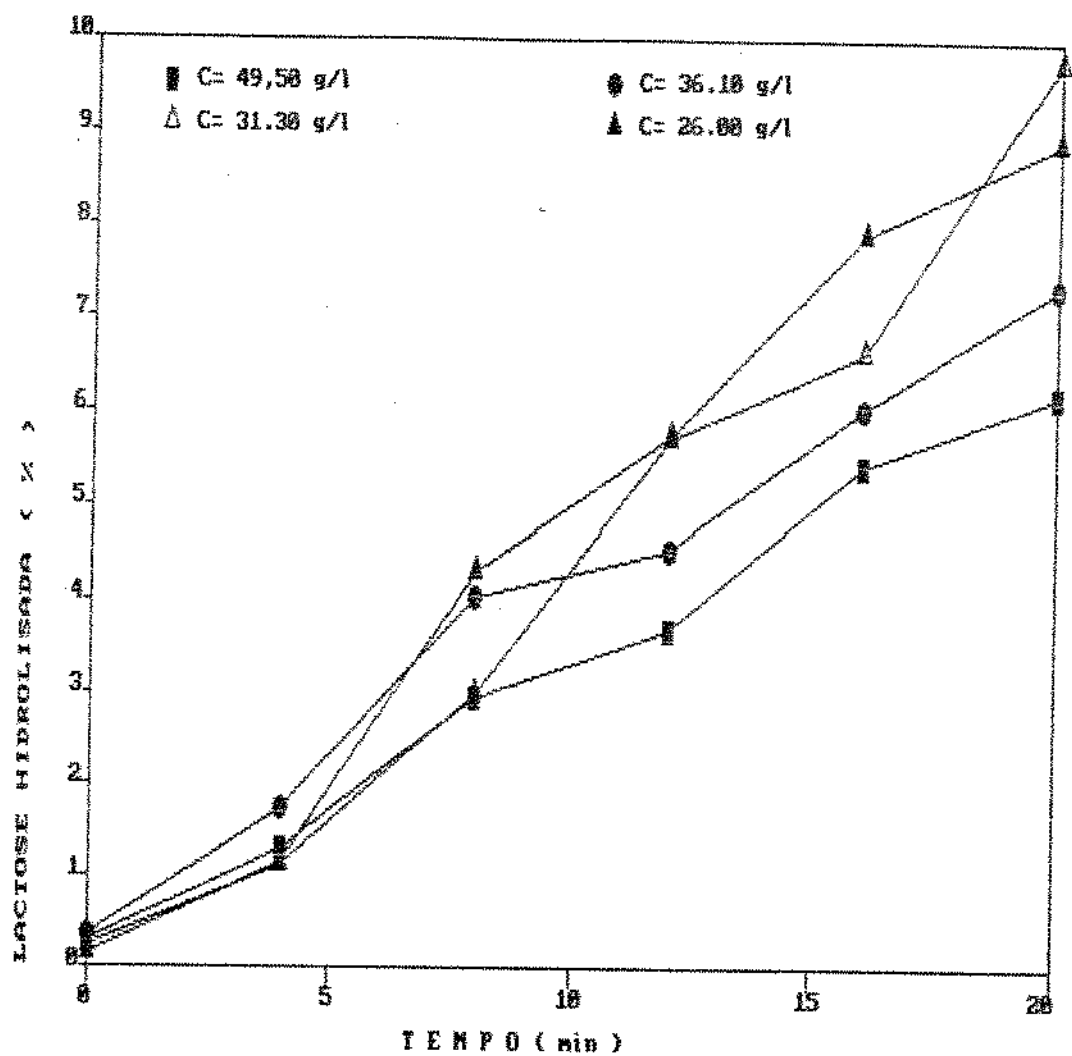


FIGURA IV.35. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

■ C= 49,50 g/l; ● C= 36,10 g/l; △ C= 31,30 g/l; ▲ C= 26,00 g/l.

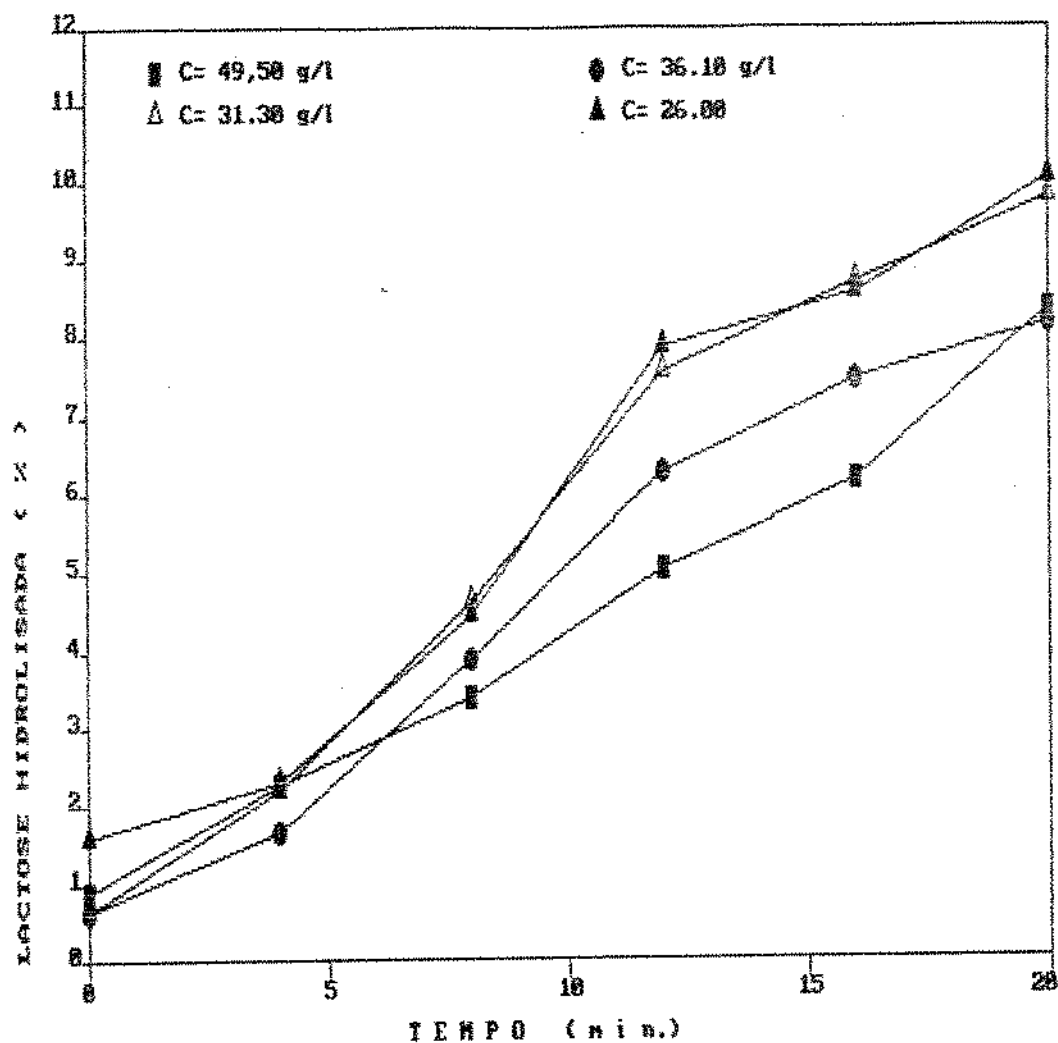


FIGURA IV.36. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 49,50 g/l; ● C= 36,10 g/l; △ C= 31,30 g/l; ▲ C= 26,00 g/l.

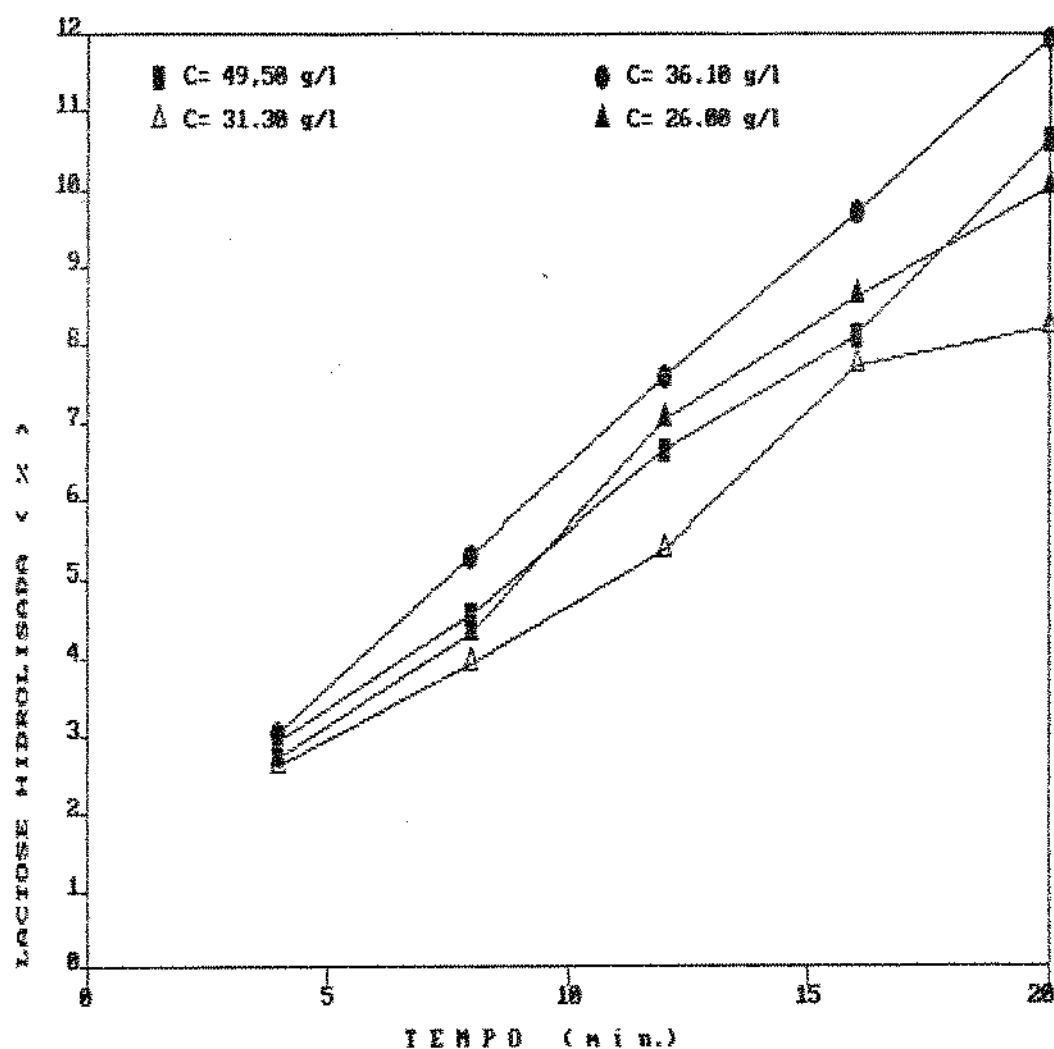


FIGURA IV.37. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,12 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :
 ■ C= 49,50 g/l; ● C= 36,10 g/l; △ C= 31,30 g/l; ▲ C= 26,00 g/l.

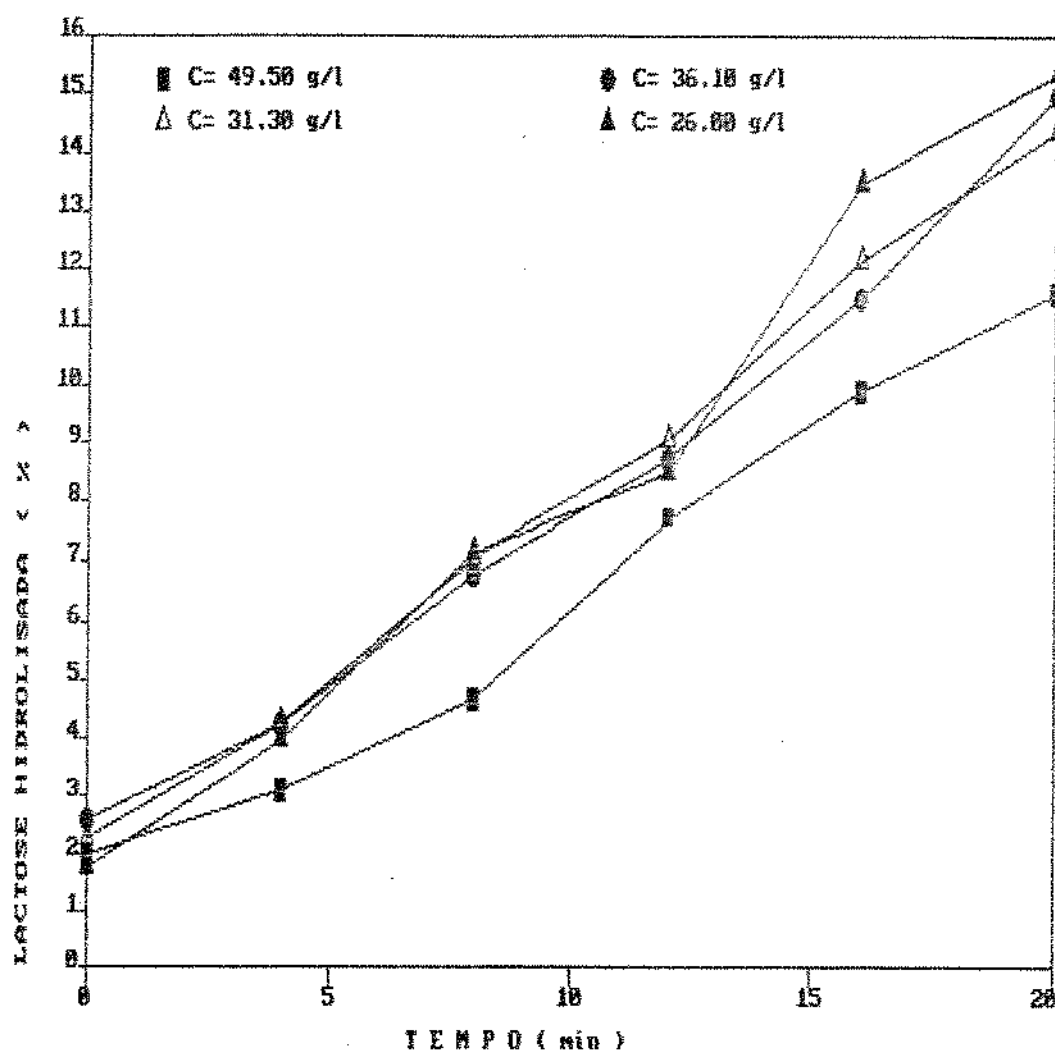


FIGURA IV.38. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

■ C= 49,50 g/l; ● C= 36,10 g/l; ▲ C= 31,30 g/l; ▲ C= 26,00 g/l.

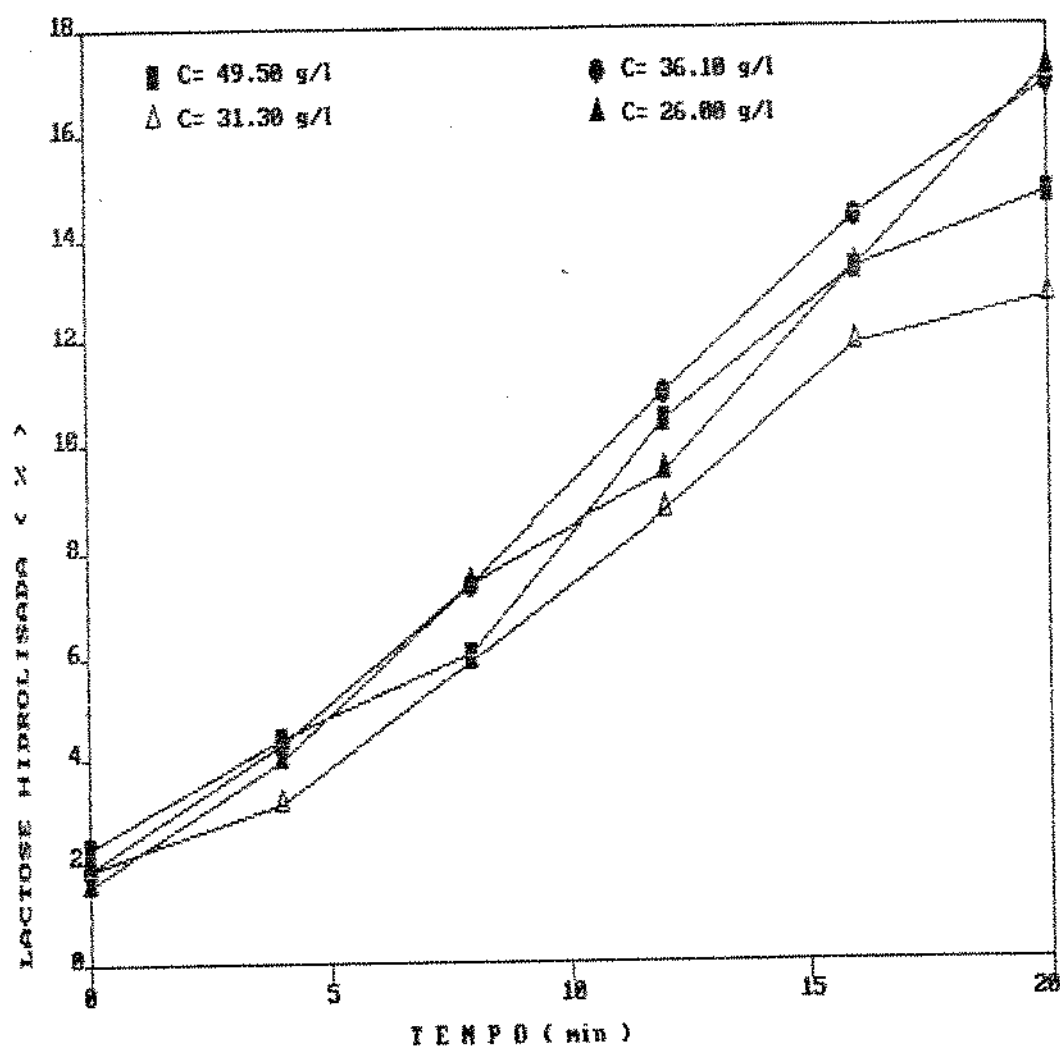


FIGURA IV.39. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

■ C= 49,50 g/l; ● C= 36,10 g/l; △ C= 31,30 g/l; ▲ C= 26,00 g/l.

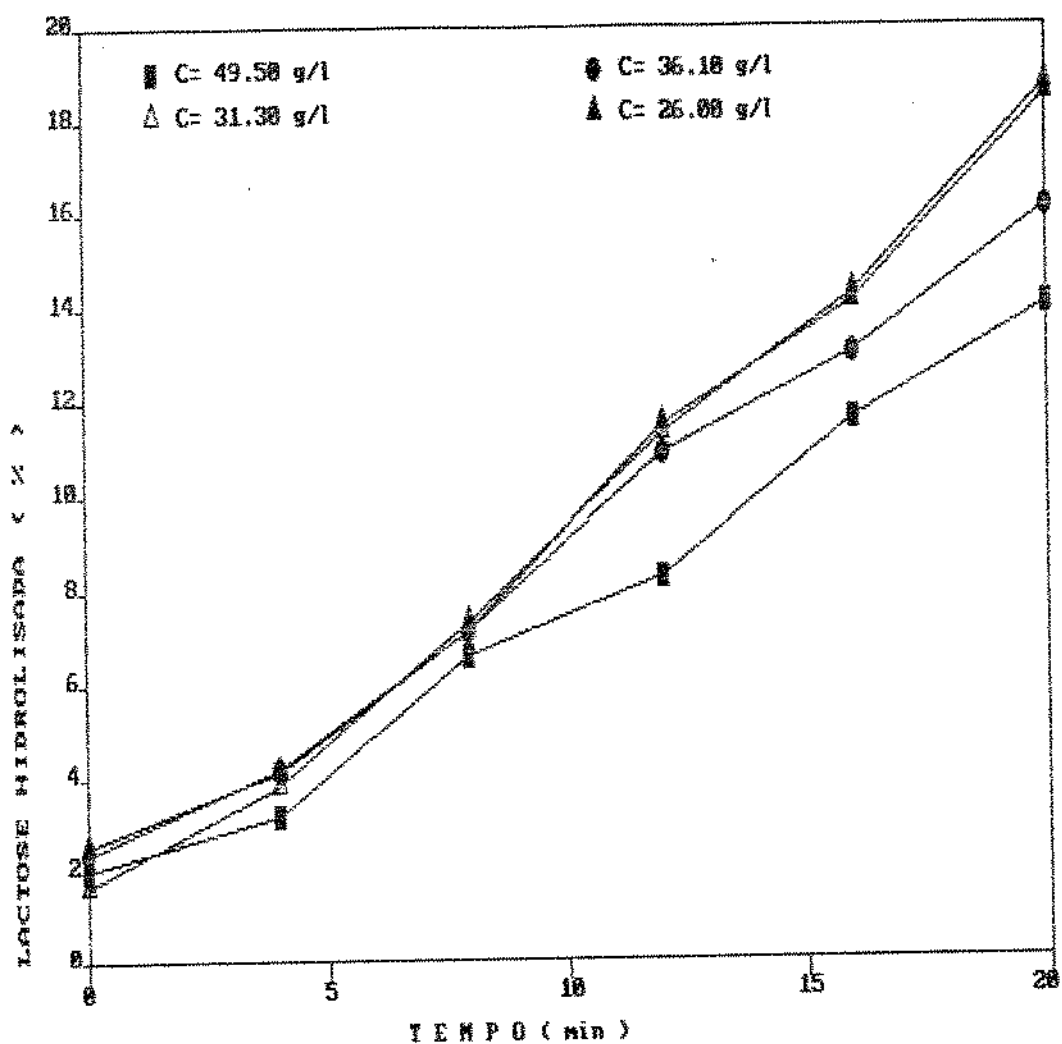


FIGURA IV.40. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 35°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

$\blacksquare$ C = 49,50 g/l; $\bullet$ C = 36,10 g/l; $\triangle$ C = 31,30 g/l; $\blacktriangle$ C = 26,00 g/l.

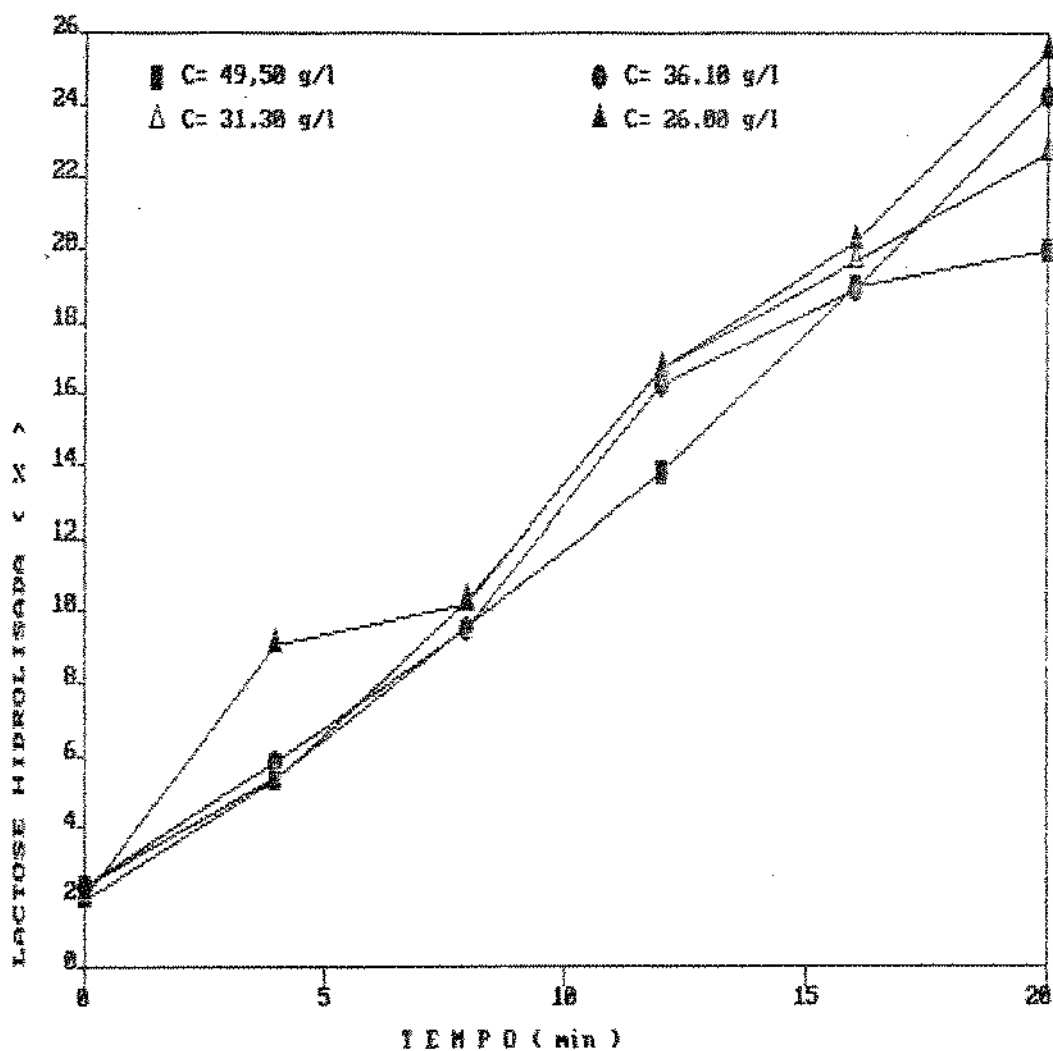


FIGURA IV.41. HIDRÓLISE DA LACTOSE DE LEITES COM DIFERENTES TEORES DE LACTOSE OBTIDOS NO PROCESSAMENTO FINAL PF2, A UMA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 40°C, COM CONCENTRAÇÃO DE LACTASE DE 0,20 ml/litro de leite. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LACTOSE :

■ C= 49,50 g/l; ● C= 36,10 g/l; △ C= 31,30 g/l; ▲ C= 26,00 g/l.

TABELA IV.19. VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO (g/l.min) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO PARA O PROCESSAMENTO PF2. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA: 0,20 ml/l.

T C(g/l)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
49,50	0,252	0,331	0,307	0,471
36,10	0,221	0,281	0,255	0,402
31,30	0,193	0,231	0,270	0,343
26,00	0,182	0,210	0,211	0,292

TABELA IV.20 VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO (g/l.min) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO. PARA O PROCESSAMENTO PF2. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA: 0,12 ml/l.

T C(g/l)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
49,50	0,110	0,150	0,179	0,235
36,10	0,089	0,125	0,148	0,200
31,30	0,077	0,149	0,152	0,155
26,00	0,067	0,121	0,120	0,119

TABELA IV.21. VALORES de Km E Vm PARA
HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE OBTIDO
NO PROCESSAMENTO PF2. CONCENTRAÇÃO DE
ENZIMA = 0,20 ml/l

T (°C)	Vm (g/l.min)	Km (mM)
25	0,458	118
30	1,06	312
35	0,583	126
40	0,79	367

TABELA IV.22. VALORES de Km E Vm PARA
HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE OBTIDO
NO PROCESSAMENTO PF2. CONCENTRAÇÃO DE
ENZIMA = 0,12 ml/l

T (°C)	Vm (g/l.min)	Km (mM)
25	0,260	202
30	0,185	37
35	0,376	155
40	0,581	208