



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SORO DE QUEIJO
UTILIZANDO AS LACTASES LACTOZYM® E PROZYN®**

ALINE ALVES MELO TOSTES VIEIRA

UBERLÂNDIA - MG

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SORO DE QUEIJO
UTILIZANDO AS LACTASES LACTOZYM® E PROZYN®**

Aline Alves Melo Tostes Vieira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

UBERLÂNDIA - MG

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

V658e Tostes, Aline Alves Melo, 1979-
Estudo da hidrólise enzimática do soro de queijo utilizando as lactases
Prozyn® e Lactozym® / Aline Alves Melo Tostes. - 2006.
61f. : il.

Orientador: Euclídes Honório de Araújo.

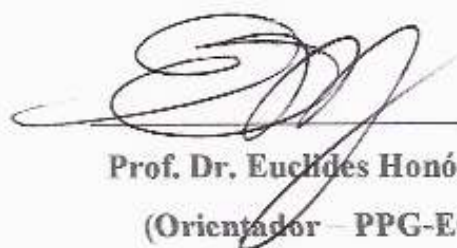
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Soro de queijo - Teses. 3. Hidrólise da lactose - Teses. I. Araújo, Euclídes Honório de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

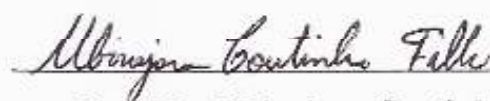
CDU: 62.0

**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE ALINE ALVES MELO TOSTES VIEIRA, APRESENTADA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DE UBERLÂNDIA, EM 27/02/2006**

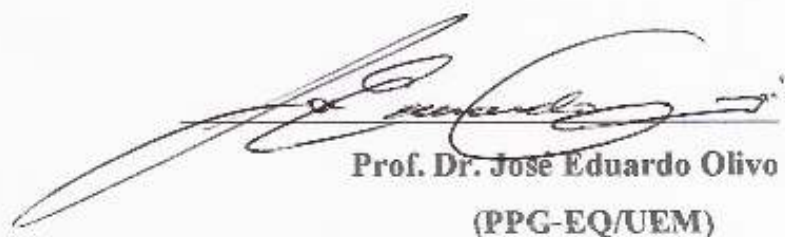
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Euclides Honório de Araújo
(Orientador – PPG-EQ/UFU)



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(PPG-EQ/UFU)



Prof. Dr. José Eduardo Olivo
(PPG-EQ/UEM)

Dedico este trabalho ao meu esposo Jardel pelo incentivo, amor e paciência, aos meus pais, Edneida e Ebivane, que sempre fizeram tudo por mim sem medir esforços e aos meus irmãos, Kátia e Bruno pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

Ao meu esposo, Jardel, pelo incentivo e paciência.

Aos meus pais, Edneida e Ebivaine, meus irmãos Kátia e Bruno pelo apoio.

Aos meus sobrinhos, Bruna, Gabriela e Érick pela alegria.

Ao professor Euclides Honório Araújo pela orientação e confiança.

Ao professor Daniel Tostes Oliveira pelo incentivo.

Aos professores Eloízio Júlio Ribeiro, Ubirajara Coutinho Filho e José Eduardo Olivo pela colaboração e sugestões para conclusão deste trabalho.

A Renata Collen pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Cnpq, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do trabalho.

SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tabelas	ii
Nomenclatura.....	iii
Resumo	v
<i>Abstract</i>	vi

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 - LEITE	3
2.2 - LACTOSE	8
2.2.1 - Hidrólise da Lactose	10
2.2.2 - Produtos da hidrólise da lactose	11
2.3 - ENZIMAS.....	11
2.3.1 - Cinética Enzimática.....	12
2.3.2 - Modelo Cinético de Michaelis-Menten	13
2.3.3 - Fontes de Enzimas	14
2.3.4 - A Importância das β -galactosidases	15
2.3.5 - Influência da Temperatura na Atividade e Estabilidade das Enzimas.....	18
2.4 - INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS ENZIMAS	21
2.5 - QUEIJO	22
2.6 - SORO DE QUEIJO	25
2.6.1 - Tipos de Soro de Queijo	27
2.6.2 - Poder Poluente do Soro	28

2.6.3 - Dificuldades para o aproveitamento do soro de queijo	29
2.6.4 - O Soro como Matéria-Prima e suas Aplicações	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 - MATERIAIS.....	31
3.1.1 - Soro de Queijo	31
3.1.2 - Enzimas	31
3.1.3 - Reagentes.....	32
3.1.4 - Tampão Láctico	32
3.1.5 - Unidade Experimental para Hidrólise da Lactose do Soro de Queijo e Ensaio de Atividade Enzimática.....	33
3.2 - MÉTODOS EXPERIMENTAIS	35
3.2.1 - Determinação da Concentração de açúcares redutores.....	35
3.2.2 - Determinação da Concentração de Glicose	35
3.2.3 - Determinação da Atividade das Enzimas	36
3.2.4 - Determinação da Hidrólise Enzimática do Soro de Queijo.....	37
3.2.5 - Estabilidade Térmica das Enzimas no Soro de Queijo.....	38
3.2.6 - Estabilidade das Enzimas em Relação ao pH.....	38
3.2.7 - Influência da Concentração de Lactose na Atividade das Enzimas	38
3.3 - ENSAIOS REALIZADOS DURANTE O TRABALHO	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 - RESULTADOS	41
4.1.1 - Hidrólise do Soro de Queijo	41
4.1.2 - Ensaio com a Enzima Prozyn	42
4.1.3 - Ensaio com a Enzima Lactozym.....	44
4.1.4 - Estabilidade Térmica da Enzima β -Galactosidase	47
4.1.5 - Estabilidade das Enzimas em relação ao pH	49
4.1.6 - Determinação da Atividade Enzimática	49
4.1.7 - Influência da Concentração de Lactose na Atividade de β -galctosidase.....	50

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	53
5.1 - CONCLUSÕES	53
5.2 - SUGESTÕES.....	53
6. ANEXOS.....	55
A. MÉTODOS ANALÍTICOS	55
A.1 - ÁCIDO DINITROSSALICÍLICO.....	55
A.2 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2-1: PAÍSES COM MAIOR CRESCIMENTO NA PRODUÇÃO DE LEITE (PREVISÃO ATÉ 2010).	6
FIGURA 2-2: DISTRIBUIÇÃO DA INDUSTRIALIZAÇÃO DE LEITE NO BRASIL NO ANO DE 2002 ...	7
FIGURA 2-3: ESTRUTURA MOLECULAR DA LACTOSE (WALSTRA E JENNESS, 1984).....	8
FIGURA 2-4: HIDRÓLISE DA LACTOSE UTILIZANDO A ENZIMA β -GALACTOSIDASE (LOPEZ LEIVA E GUZMAN, 1985).....	15
FIGURA 2-5: PRODUÇÃO BRASILEIRA DE QUEIJO	22
FIGURA 2-6: PRODUÇÃO DE QUEIJO DISTRIBUÍDA POR GRUPOS DE PAÍSES.....	23
FIGURA 2-7: CONSUMO PER CAPITA MUNDIAL DE QUEIJO EM 2004	24
FIGURA 3-1: REATOR UTILIZADO PARA O ESTUDO DA HIDRÓLISE DO SORO DE QUEIJO	33
FIGURA 3-2: BANHO TERMOSTATIZADO DA THERMOMIX.....	34
FIGURA 3-3: ESPECTROFOTÔMETRO GENESYS.....	34
FIGURA 4-1: ESTUDO COMPARATIVO DA HIDRÓLISE DA LACTOSE PRESENTE NO SORO DE QUEIJO UTILIZANDO A ENZIMA PROZYN	43
FIGURA 4-2: ESTUDO COMPARATIVO DA HIDRÓLISE DA LACTOSE PRESENTE NO SORO DE QUEIJO UTILIZANDO A ENZIMA LACTOZYM	45
FIGURA 4-3: CONJUNTO DE ENSAIOS DA HIDRÓLISE DAS ENZIMAS PROZYN E LACTOZYM COM PH 6,5; CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA 4 G/L E AGITAÇÃO 300 RPM	46
FIGURA 4-4: TAXAS INICIAIS DE REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE LACTOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA MESMA UTILIZANDO A ENZIMA LACTOZYM.	51
FIGURA 4-5: TAXAS INICIAIS DE REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE LACTOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA MESMA UTILIZANDO A ENZIMA PROZYN.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 2-1: COMPOSIÇÃO MÉDIA DO LEITE BOVINO (BOBBIO & ORSATTI, 1992)	4
TABELA 2-2: CLASSIFICAÇÃO MUNDIAL DOS PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES DE LEITE NO ANO DE 2004.....	5
TABELA 2-3 : PREVISÃO PARA 2010 DE LÁCTEOS NO BRASIL.....	7
TABELA 2-4: PODER ADOÇANTE RELATIVO E SOLUBILIDADE DE VÁRIOS AÇÚCARES.....	9
TABELA 2-5: PRINCIPAIS LACTASES E SUAS PROPRIEDADES (PIVARNIK ET AL., 1995).....	17
TABELA 2-6: MODELOS DE DESATIVAÇÃO E ENERGIA DE ATIVAÇÃO (E_A) PROPOSTOS PARA AS β -GALACTOSIDASES DE DIFERENTES AUTORES.....	18
TABELA 2-7 - PRINCIPAIS COMPONENTES DO EXTRATO SECO DO SORO DE QUEIJO IN NATURA (VILANI, 2001 APUD SANTIAGO, 2002).	26
TABELA 2-8: COMPOSIÇÃO MÉDIA DO SORO DE LEITE	28
TABELA 3-1: COMPOSIÇÃO DO SORO DE QUEIJO UTILIZADO.....	31
TABELA 3-2: COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO LÁCTICO E CONCENTRAÇÃO DOS SAIS UTILIZADOS EM SUA PREPARAÇÃO (NOVO NORDISK, 1993).....	32
TABELA 3-3: CONDIÇÕES ESTUDADAS NA REALIZAÇÃO DESSE TRABALHO	39
TABELA 4-1– DADOS DE TEMPO E ATIVIDADE RELATIVA PARA DIFERENTES TEMPERATURAS.....	47
TABELA 4-2 – VALORES DE K_D E $T_{1/2}$ EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.....	48
TABELA 4-3: VALORES DA ESTABILIDADE DA ENZIMA EM RELAÇÃO AO PH.....	49

NOMENCLATURA

Símbolo	Definição	Unidade
C	Concentração	g/L
pH	Potencial hidrogeniônico onde $\text{pH} = \log[\text{H}^+]$	
T	temperatura	°C
rpm	rotações por min	rpm
h	hora	h
l	litro	L
ton	toneladas	ton
DBO	demandas bioquímica de oxigênio	Kg/m^3
E	enzima não complexada	
S	substrato	
ES	complexo enzima-substrato	
EP	complexo enzima-produto	
k_i	constante da taxa de reação das etapas elementares	g/L
k_p	constante da taxa de liberação do produto P	g/L.min
V	taxa de reação	g/L.min
V_m	velocidade máxima da reação se toda enzima estiver complexada	g/L.min
K_m	constante de Michaelis- Menten	g/L
FCC	unidade de atividade enzimática	FCC/g

ILU	unidade de atividade enzimática	ILU/g
NLU	unidade de atividade enzimática	NLU/g
LAU	unidade de atividade enzimática	LAU/g
$t_{1/2}$	tempo de meia vida	min
A_r	atividade relativa	A/A_0
ABS	Comprimento de onda	nm

RESUMO

O estudo da hidrólise enzimática da lactose tem sido de grande importância, devido a ausência ou carência da enzima lactase presente no processo digestivo humano. A enzima β -galactosidase é a mais utilizada no processamento de produtos lácteos por ser de baixo custo, eficiente e bastante estudada em todo o mundo. A utilização desta enzima nos laticínios previne a cristalização da lactose dos produtos e proporciona às pessoas intolerantes a lactose melhor qualidade de vida. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo da hidrólise da lactose presente no soro de queijo, utilizando β -galactosidase originária das leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* adquiridas da Prozyn e Lactozym. Os ensaios de hidrólise do soro de queijo foram realizados em um reator com controle de agitação e temperatura. A concentração de soro foi de 60 g/L, temperaturas de 43, 45, 48 e 53°C, concentração da enzima de 4 g/L, pH 6,0 e 6,5 e agitação 300 e sem agitação mecânica. Ambas as enzimas forneceram melhor resultado à 45 °C, no entanto, a enzima Prozyn converte a lactose em menor tempo. O teor de lactose presente no soro de queijo com concentração 60 g/L foi de 75%. A concentração de glicose em função do tempo determinou a duração da hidrólise, onde a lactose foi quebrada pela enzima e resultou na formação de glicose e galactose em quantidade equimolar. Verificou-se a influência da concentração de lactose na enzima, utilizando solução de lactose na faixa de 10 a 120 g/L em solução tampão láctico pH 6,5 e temperatura 30°C. A atividade enzimática foi crescente da concentração 20 g/L até 100 g/L. A estabilidade enzimática em relação ao pH apresentou melhor resultado em pH 6,0 para a Prozyn e pH 6,5 para a Lactozym. A estabilidade térmica da enzima livre foi determinada pelo tempo de meia vida. A enzima Prozyn à 50°C, apresentou tempo de meia vida de 4,62 min e à 55°C, 2,77 min e a enzima Lactozym à 50°C, 6,30 min e à 45°C, 115,52 min. Na determinação da atividade enzimática utilizou-se o método das taxas iniciais da reação de hidrólise do soro. A atividade enzimática obtida foi $75,03 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/(\text{g}_{\text{enz.}} \cdot \text{h})$ e $44,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/(\text{g}_{\text{enz.}} \cdot \text{h})$ para Prozyn e Lactozym, respectivamente.

Palavras-chave: soro de queijo, lactose, β -galactosidase, hidrólise enzimática

ABSTRACT

The study of the enzymatic hydrolysis of the lactose has been of great importance, due to absence or lack of the enzyme present lactase in the process digestive human. The enzyme β -galactosidase is very used in the processing of milk products by being of low cost and enough studied all over the world. The use of this enzyme in the dairy products prevents the crystallization of the products and it provides to the intolerant people the lactose better life quality. The objective of this work was accomplish a comparative study of the hydrolysis of the cheese whey using two different manufactures β -galactosidase Prozyn and Lactozym, respectively, *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces fragilis*, of origin of yeasts. The tests of hydrolysis of the cheese whey were accomplished in a reactor with agitation control and temperature. The cheese whey concentration was of 60 g/L, temperatures of 43, 45 and 48°C, concentration of the enzyme of 4 g/L, pH 6,0 and 6,5 and agitation 300 rpm. Both enzymes obtained better result to 45 °C, however the enzyme Prozyn converts the lactose in smaller time. An analysis was accomplished to verify the concentration of total sugar of the cheese whey, 75%, to evaluate the hydrolysis, obtaining the glucose concentration in function of the time for each studied condition. The influence of the lactose concentration was verified in the enzyme, using lactose solution in erlenmeyer. The enzymatic activity was growing of the concentration 10 g/L up to 120 g/. The enzymatic stability in relation to the pH presented better result pH 6,5 for both enzymes Prozyn and Lactozym. The thermal stability of the free enzyme was certain for the time of half life. The enzyme Prozyn to temperature of 50°C it presented time of life 4,62 min and to 55°C was 2,77 min and enzyme Lactozym to the 50°C was 6,32 min and to 45°C was 115,52 min. In the determination of the enzymatic activity the method of the initial rates of the reaction of hydrolysis of the cheese whey was used. The obtained enzymatic activity was $75,03 \cdot 10^{-3}$ mol/(g_{enzyme}.h) and $44,6 \cdot 10^{-3}$ mol/(g_{enzyme}.h) for Prozyn and Lactozym, respectively.

Keywords: Cheese whey, lactose, β -galactosidase, enzymatic hydrolysis

1. INTRODUÇÃO

O leite é a primeira fonte de alimento dos mamíferos. Possui alto valor nutritivo, baixo custo e é acessível à grande parte da população. Vários estudos relacionados ao leite e seus derivados vêm sendo realizados, visto que, cerca de 70% da população mundial apresentam sintomas de intolerância à lactose (NOGALES; DELGADILLO, 2005).

A produção mundial de leite nos principais países é de aproximadamente 515.837 mil toneladas em 2004 (EMBRAPA). No Brasil este valor corresponde a 23,32 mil toneladas (EMBRAPA, 2004). As indústrias lácteas e os programas nutricionais estimulam o consumo de leite e seus derivados, principalmente o queijo, portanto, exige-se uma demanda por produtos lácteos com rigoroso controle de qualidade. Para cada mil litros de leite processados são gerados cerca de 820 litros de soro. Há a necessidade de melhor aproveitamento do leite e subprodutos gerados por ele, principalmente, o soro de queijo que devem ser descartado ou utilizado de acordo com os padrões e normas exigidas.

O soro de queijo é o subproduto gerado em grande quantidade na indústria de laticínios. Para cada quilo de queijo processado são gerados de 27 a 55 kg de soro. Na produção de queijo gera-se de 3 a 4 L de água residuária para cada litro de leite processado, além de mais 5 a 10 L de soro para cada quilo de queijo produzido. A produção de queijos em 2004 foi de 4.050 mil toneladas, portanto o volume de soro produzido foi de 20.250 a 40.500 mil L. O soro de queijo torna-se um grande problema se descartado no meio ambiente, devido sua alta carga poluidora, possui elevada DBO, em torno de 30-60 kg/m³ e é constituído principalmente de alta concentração de lactose, em torno de 4 a 8% (peso/volume) (HATZINIKOLAU et al., 2005). Portanto há uma necessidade do estudo de alternativas da utilização da lactose presente no soro de queijo. Uma destas aplicações com alta tecnologia e interesse na área de problemas de diabetes é a hidrólise enzimática da lactose, cuja importância econômica tem sido estudada desde 1960 (NOVALIN et al., 2005).

A enzima β -galactosidase é muito importante para a solução dos problemas de disposição do soro de leite e de pessoas intolerantes à lactose. A partir dos 40 anos, 70% das pessoas tem intolerância à lactose em maior ou menor grau e acima dos 60 anos, 80% sofrem esta deficiência (OLIVEIRA, 14 de julho de 2005).

A lactose é um dissacarídeo presente no leite e tem como característica uma baixa solubilidade, 18% em água, e baixo poder adoçante. Devido a estes problemas, a redução da lactose presente no leite e derivados é de fundamental importância e a enzima β -galactosidase é comercialmente utilizada para este propósito. A enzima também é utilizada na produção de lácteos para melhoria das propriedades físicas como: maior solubilidade dos produtos e menor presença de “arenosidade”, devido à cristalização da lactose, principalmente, doce de leite e leite condensado (TOMÁS, 1998).

A hidrólise pode ser realizada por ácidos ou pelo tratamento enzimático com β -galactosidase. A hidrólise ácida da lactose do soro pode ser empregada na produção de um hidrolisado que é fonte de carbono para a produção de etanol por fermentação de microrganismos. A hidrólise enzimática da lactose presente no soro ou da lactose pura tem sido aplicada em várias configurações de reator (HATZINIKOLAU et al, 2005). A lactose hidrolisada otimiza a produção de derivados do leite, reduz o tempo de processamento e aumenta a vida de prateleira dos produtos.

As enzimas β -galactosidases trabalham em ampla faixa de pH: variando entre 3 e 4, quando as enzimas são originárias de fungos; com variações entre 6 e 7, quando originárias de leveduras. O valor do pH depende da fonte natural de lactose (LADERO et al., 2005).

A atividade e estabilidade térmica das enzimas são influenciadas por diversos fatores, como a temperatura, pH, concentração de íons e agitação, que podem afetar fortemente a estrutura tridimensional ou conformação espacial da proteína.

Com a crescente competitividade, melhor aproveitamento do soro de queijo e aumento da demanda por produtos lácteos sem lactose, esse trabalho teve como objetivo: estudar a hidrólise enzimática do soro de queijo em diferentes condições de pH, temperatura e agitação; a estabilidade térmica das enzimas; estabilidade das enzimas em relação ao pH e influência da concentração de lactose produzidas por duas enzimas originárias de *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - LEITE

O leite é produzido pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos durante o período de lactação para a alimentação de seus filhotes. Devido ao seu alto valor nutritivo e custo relativamente baixo, o leite, geralmente, é a principal fonte de alimento das crianças e complemento indispensável na dieta dos adultos (WALSTRA&JENNES, 1984; OLIVEIRA, 1982; SCRIBAN, 1985).

O leite é caracterizado como um líquido branco opaco, duas vezes mais viscoso que a água, de sabor ligeiramente adocicado e de odor pouco acentuado, apresenta pH entre 6,5 e 6,7 (VEISSEYRE, 1972). Os componentes principais do leite são os que se apresentam em maior concentração e distribuídos em diferentes estados de dispersão, uma solução composta de sais e lactose, uma emulsão contendo gorduras em solução e uma dispersão coloidal de proteínas estabilizada por vitaminas, enzimas, anticorpos, oligossacarídeos, enzimas, anticorpos e hormônios (WALSTRA & JENNES, 1984; apud SANTIAGO, 2002).

De um modo geral, a composição qualitativa básica do leite das várias espécies de mamíferos é a mesma, porém, a porcentagem de cada um dos componentes varia bastante. Essa variação é mais acentuada entre espécies diferentes, enquanto, nas raças a variação é menor. Também pode variar com o estado de saúde, idade, tipo e qualidade da alimentação (OLIVEIRA, 1982; BOBBIO & ORSATTI, 1992).

Do ponto de vista comercial, o leite produzido pela espécie bovina é o de maior interesse. A Tabela 2-1 apresenta a composição média do leite bovino.

Tabela 2-1: Composição média do leite bovino (BOBBIO & ORSATTI, 1992)

Componentes	Composição (%)
Água	86
Proteína	3,5 (85% caseína)
Gordura	4,0
Lactose	5,0
Minerais	0,7
Fosfolipídeos	0,03
Cálcio	0,1

O Brasil, sexto maior produtor de leite do mundo, com 21,3 bilhões de litros produzidos (IBGE, 2002), tem sido historicamente um dos principais importadores de leite do mundo. Em 1995 importou mais de US\$ 500 milhões em lácteos, o que representava, à época, cerca de 10% do déficit da balança comercial brasileira. Este fato deve-se ao cenário econômico da época, sendo este gradativamente amenizado e nos últimos dois anos começaram a surgir iniciativas de exportação de lácteos, criando uma tendência de auto-suficiência na comercialização desses produtos. A Tabela 2-2 apresenta a classificação mundial dos principais países produtores de leite.

Tabela 2-2: Classificação mundial dos principais países produtores de leite no ano de 2004.

Classificação	Países	Produção de Leite (mil ton)	Percentual do	
			Total	Acumulado
1º	Estados Unidos	77.565	15,0	15,0
2º	Índia	37.800	7,3	22,3
3º	Rússia	30.850	6,0	28,3
4º	Alemanha	28.000	5,4	33,7
5º	França	24.200	4,7	38,4
6º	Brasil	23.320	4,5	42,9
7º	Nova Zelândia	14.780	2,9	45,8
8º	Reino Unido	14.600	2,8	48,6
9º	Ucrânia	13.700	2,7	51,3
10º	Polônia	12.400	2,4	53,7
11º	Itália	10.730	2,1	55,8
12º	Holanda	10.700	2,1	57,9
13º	Austrália	10.377	2,0	59,9
14º	México	9.950	1,9	61,8
15º	Argentina	8.100	1,6	63,4
	Outros Países	188.765	36,6	100
	TOTAL	515.837	100,0	100,0

Fonte: FAO, 2005.

Elaboração: R. ZOCCAL- Embrapa Gado de Leite

A produção de leite no Brasil ainda é baixa quando comparada à quantidade de rebanho bovino.

A previsão de crescimento da produção de leite no Brasil é em torno de 9,5 bilhões de litros anual até o ano de 2010, o que representa uma taxa de crescimento anual de 3,6%. Segundo as previsões o Brasil atingirá a produção de 29,129 bilhões de litros anuais em 2010, a Figura 2-1 apresenta os países com maior crescimento da produção de leite.

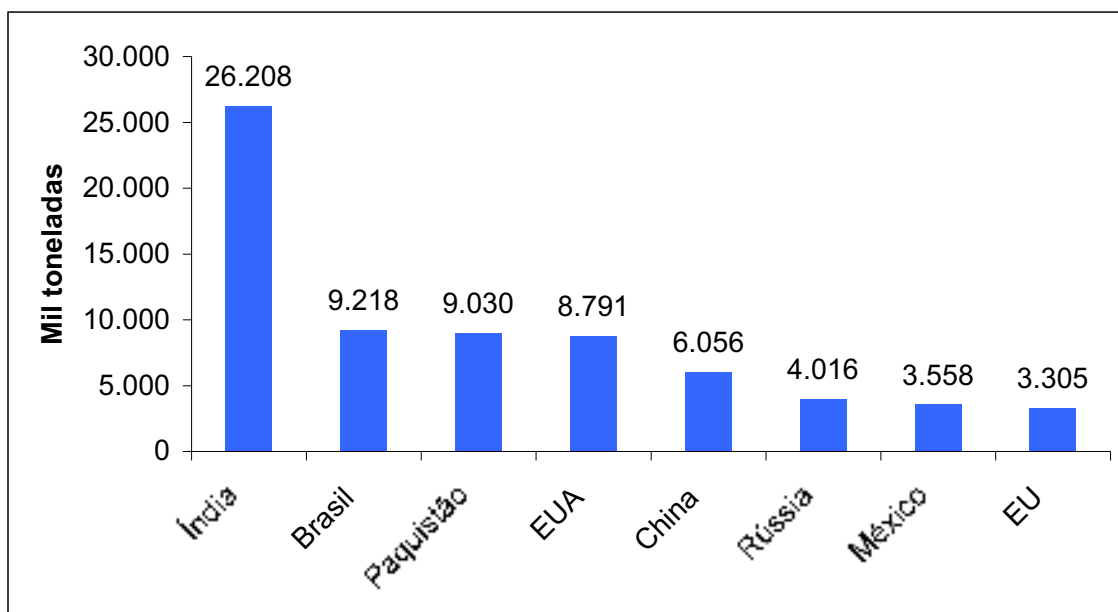


Figura 2-1: Países com maior crescimento na produção de leite (previsão até 2010).

Fonte: FAO
ANUALPEC, 2004

A elevada produção da Índia deve-se a cultura de não abater seus animais que o consideram sagrados, enquanto países como a China não tem produção de leite suficiente para toda a população, necessitando de importar para suprir a demanda. Com esses dados, em 2010, o Brasil teria um déficit anual de cerca de 1,8 bilhão de litros como mostra a Tabela 2-3, representando cerca de 6% do consumo nacional.

Tabela 2-3 : Previsão para 2010 de lácteos no Brasil

Produção	29,13 bilhões de litros
Consumo	30,96 bilhões de litros
Exportações	0,018 bilhões de litros
Importações	1,85 bilhão de litros

Fonte: ANUALPEC, 2004

A distribuição percentual dos produtos resultantes da industrialização do leite no Brasil em 2002 é apresentada Figura 2-2.

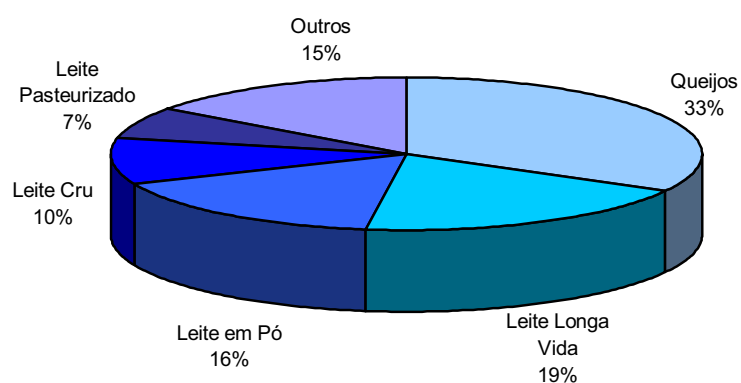


Figura 2-2: Distribuição da Industrialização de Leite no Brasil no Ano de 2002

Fonte: CBCL/ CNA/ IBGE, 2002

A industrialização de queijos representa grande parte da produção, como consequência gera-se soro em grande quantidade.

2.2 - LACTOSE

A lactose, cujo nome sistemático é o 4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranoose, é o principal carboidrato do leite de todos os mamíferos, sendo formado nas glândulas mamárias a partir da glicose do sangue (FREYER, 1972; FERREIRA, 2003; ANDRADE, 2005). É um dissacarídeo encontrado no leite constituído equimolarmente de galactose e glicose, que são ligadas através de uma ligação beta 1 – 4, e é responsável pelo sabor adocicado do soro e leite. A Figura 2-3 apresenta uma representação esquemática da lactose.

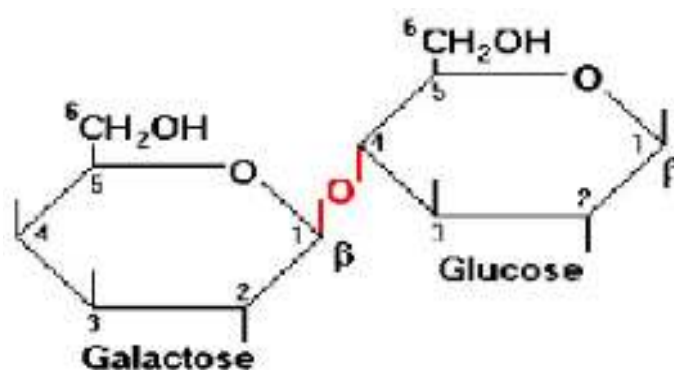


Figura 2-3: Estrutura Molecular da Lactose (WALSTRA E JENNES, 1984)

A lactose é um carboidrato de baixa solubilidade com composição percentual, cerca de 18% em água, a 20 °C, contra 50% da D-glicose e 32% da D-galactose. Em relação a outros açúcares, a lactose possui baixo poder adoçante e baixa solubilidade (HOLSINGER et al., 1974). Contudo, seus componentes monossacarídeos, glicose e galactose possuem maior poder adoçante que a lactose, além de outras características desejáveis. Adicionando-se a esta propriedade o problema da baixa solubilidade, a lactose não possui características para ser utilizada como adoçante (ZADOW, 1984). A Tabela 2-4 apresenta o poder adoçante de vários açúcares e sua solubilidade.

Tabela 2-4: Poder adoçante relativo e solubilidade de vários açúcares

	Poder adoçante relativo	Solubilidade (%)		
		10°C	30°C	50°C
Sacarose	100	66	69	73
Lactose	16	13	20	30
D- Galactose	32	28	36	47
D-Glicose	74	40	54	70
D-Fructose	173	-	82	87

Fonte: ZADOW (1984)

Cerca de 70% da população mundial são intolerantes a lactose. O problema pode surgir em maior ou menor intensidade em função de alguns fatores como: idade, etnia e região de procedência. A intolerância trata-se de uma reação adversa, que envolve a digestão, deficiência ou ausência da enzima intestinal chamada lactase, mas não o sistema imunológico. O nível de lactase presente na infância tende a diminuir na fase adulta em algumas pessoas. Devido a esse fato, muitas pessoas desconhecem os sintomas causados pela deficiência da lactase na fase adulta, pois os sintomas são: náuseas, dores abdominais, diarreia ácida e abundante. A severidade dos sintomas depende da quantidade ingerida e da quantidade de lactose que cada pessoa pode tolerar (ABC da Saúde, 2001).

Há três tipos de intolerância à lactose, que são decorrentes de diferentes processos. São eles:

- 1) deficiência congênita da enzima;
- 2) diminuição enzimática secundária a doenças intestinais;
- 3) deficiência primária ou ontogenética.

O primeiro tipo é um defeito genético muito raro, no qual a criança nasce sem a capacidade de produzir lactase.

O segundo tipo é bastante comum em crianças no primeiro ano de vida e ocorre devido à diarreia persistente, pois há morte das células da mucosa intestinal (produtoras de lactase). Assim, o indivíduo fica com deficiência temporária de lactase até que estas células sejam repostas.

Estatisticamente, o terceiro tipo é o mais comum na população. Com o avançar da idade, existe a tendência natural à diminuição da produção da lactase. A intolerância à lactose ocorre em cerca de 25% dos brasileiros. Nos EUA, um a cada quatro ou cinco adultos podem sofrer de algum grau de intolerância ao leite (ABC da Saúde, 2001).

2.2.1 - Hidrólise da Lactose

A hidrólise da lactose do soro de queijo e derivados resulta em produtos alternativos para pessoas intolerantes a lactose. Esta pode ser realizada por ácido ou tratamento enzimático com β -galactosidase. O primeiro método é caracterizado por severas condições de pH e temperatura (pH de 1 a 2 e temperaturas entre 100 °C e 150 °C). Um alto grau de hidrólise é obtido em um curto período de tempo com o método ácido. Um exemplo típico é a conversão em torno de 80% de hidrólise em 3 minutos, à temperatura de 150 °C e pH igual a 1,2 (GEKAS, 1985). O método enzimático depende das propriedades das enzimas utilizadas. Suas condições de operação são mais suaves, pH na faixa de 3,5 a 8,0 e temperatura no intervalo de 5 °C a 60°C.

A hidrólise ácida da lactose do soro tem sido empregada na produção de um hidrolisado que serve como fonte de carbono para a produção de etanol por microrganismos. O processo de hidrólise ácida, geralmente, requer o uso de ácido de elevada concentração e elevada temperatura. No entanto os produtos da hidrólise, glicose e galactose, não são produzidos em quantidade equimolar a partir da concentração da lactose inicial uma vez que um número de subprodutos indesejados também é formado (HATZINIKOLAOU et al., 2005).

A hidrólise enzimática do soro ou da lactose pura tem sido estudada em várias configurações de reator. O custo da enzima é o fator que determina a viabilidade econômica do processo, apenas sistemas contínuos que envolvem reuso de uma batelada simples pode ser considerada.

Um processo eficiente e economicamente viável da hidrólise da lactose do soro depende do custo da produção da enzima em combinação com cinética favorável e propriedades de estabilidade. Fontes de β -galactosidase comercial utilizado na hidrólise da

lactose são, principalmente, a espécie de levedura *Kluyveromyces* e espécie de fungo *Aspergillus* (DIMITRIS et al, 2005).

A lactose presente no soro pode ser hidrolisada e produzir xaropes doces constituídos de glicose e galactose. Comparada com a sacarose, cujo valor adoçante relativo é de 100%, o xarope possui um valor adoçante relativo de 70% e a lactose 40% (TOMÁS, 1998).

2.2.2 - Produtos da hidrólise da lactose

O xarope doce formado a partir da hidrólise da lactose, pode ser utilizado como fonte de açúcar e pode ser utilizado como fonte de proteína em alguns produtos, como: os de padaria, refrigerantes, sobremesas, sorvetes, bebidas lácteas e alimento para gado. Diferentes teores de concentração e proporção de mistura com outros produtos podem ser utilizados. Um xarope concentrado com 80% total de sólidos é preparado com soro de queijo ricota, através de desproteínização, hidrólise e concentração. O xarope possui agradável sabor adoçante e um leve coloração amarela. Ele dá ao sorvete de baunilha uma qualidade comparável ao que é dado pelo xarope de milho. Uma bebida com sabor de laranja, preparada da hidrólise e desproteínização do soro de queijo é recomendada para atletas. A empresa Nutrisearch Company dos EUA utiliza o produto da hidrólise do soro para crescimento das leveduras de pão (TOMÁS, 1998).

2.3 - ENZIMAS

As enzimas são um dos componentes essenciais no sistema vivo. Estas macromoléculas catalisam as transformações químicas que ocorrem no metabolismo celular. A natureza e especificidade de sua atividade catalítica é devido, primeiramente a estrutura tridimensional da proteína enovelada, que é determinada pela seqüência de aminoácidos que formam a enzima, e pelas interações intermoleculares entre grupamentos dos átomos de aminoácidos e as moléculas dos reagentes (BLANCH; CLARK, 1997). A

especificidade inerente da enzima, reside no sítio de ligação do substrato. O sítio ativo é um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certos aminoácidos que ligam o substrato por ligação não-covalentes. Muitas vezes, os resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo ficam em regiões distantes, na sequência primária, mais próximos no sítio ativo, pelo enovelamento de cadeia polipeptídica (estrutura terciária). Algumas enzimas têm outra região na molécula, o sítio alostérico, afastada do sítio ativo, aumentando ou reduzindo a atividade enzimática.

As enzimas são utilizadas em uma ampla variedade de aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e químicas. Também são extensivamente utilizadas para fins analíticos. Enquanto alguns processos envolvem o uso de enzima em grande escala, outros requerem uma quantidade modesta. A produção de enzima comercial teve origem com a introdução de glicoamilase em 1960, com o reestabelecimento da hidrólise ácida ou enzimática do amido (BLANCH; CLARK, 1997).

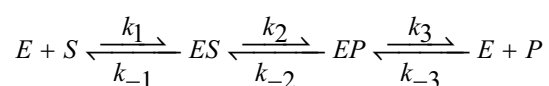
2.3.1 - Cinética Enzimática

A cinética determina os fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Os fatores mais importantes são: a concentração de enzima, a concentração de ligantes (substratos, inibidores, ativadores), pH, força iônica e temperatura. A análise de todos esses fatores é importante no conhecimento da natureza da reação enzimática. Por exemplo, variando-se a concentração de substrato e produto, é possível deduzir o mecanismo cinético da reação.

Os modelos cinéticos são determinados de duas maneiras, a primeira é o tratamento em equilíbrio rápido e o segundo tratamento do estado estacionário, mas ambos chegam a mesma equação matemática representativa do modelo, com uma pequena diferença na definição da constante de saturação do substrato (BLANCH; CLARK, 1997).

2.3.2 - Modelo Cinético de Michaelis-Menten

A reação enzimática mais simples envolve um único substrato transformando em um único produto. Algumas teorias tentam explicar a elevada especificidade e atividade das enzimas, porém os conceitos de sítio ativo e complexo enzima-substrato são universalmente aceitos e é o ponto de partida para determinação da maioria das equações de taxa de reação (RIBEIRO, 1989). A dedução da equação da taxa por Michaelis-Menten parte do conceito de formação do complexo enzima-substrato, ES, e do conceito de equilíbrio rápido. A sequência de reação é apresentada abaixo:



Onde:

E: enzima não complexada

S: substrato

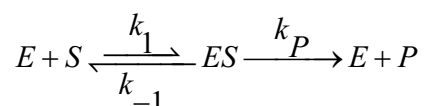
ES: complexo enzima-substrato

EP: complexo enzima-produto

k_i : constante da taxa de reação das etapas elementares

P: produto

Na dedução do modelo de Michaelis e Mentem são feitas algumas simplificações, como: considerar apenas o complexo central ES e a reação de regeneração é desprezível. Assim, o mecanismo simplificado para a reação é:



A taxa de reação para o modelo acima, em função do complexo ES é dada pela Equação 2.1:

$$V = k_p \cdot [ES] \quad Eq.2.1$$

Onde:

k_p : constante da taxa de reação de liberação do produto P

V: taxa de reação

A partir da Equação 2.1 e um balanço de massa para a enzima, chega-se à equação da taxa de reação em função da concentração de substrato apresentada pela Equação 2.2 :

$$V = \frac{V_m \cdot S}{(K_s + S)} \quad Eq.2.2$$

Onde:

V_m : velocidade máxima da reação se toda enzima estivesse complexada

K_s : constante de Michaelis-Menten

O valor de K_s estabelece um valor aproximado para o nível intracelular de substrato, além de estabelecer uma comparação entre enzimas de diferentes organismos através do seu valor numérico.

2.3.3 - Fontes de Enzimas

Algumas fontes de enzimas podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, particularmente em amêndoas, pêssego, damasco, maçã, em órgãos de animais, como: intestino, cérebro, testículos, placenta e também são produzidas por grande quantidade de microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (ALMEIDA, 2001; GEKAS, 1985; HOLSINGER, 1997 apud SANTIAGO et al, 2004), sendo as leveduras e fungos as fontes preferidas da enzima β -galactosidase para aplicações comerciais (JURADO, 2001 apud SANTIAGO, 2004). Várias destas são utilizadas na produção de enzimas comerciais. Há várias fontes de β -galactosidase, mas nem todas são aceitáveis ou recomendadas como seguras. As produções de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e de *Saccharomyces sp* (*lactis* ou *fragilis*) são consideradas fontes seguras de

utilização, porque essas fontes já têm uma história de uso e têm sido submetidas a numerosos testes. A lactase de *Escherichia coli*, embora seja uma espécie bastante estudada, não é utilizada no processo alimentar devido ao seu alto custo e provocar problemas de toxicidade com extratos brutos de coliformes (GEKAS, 1985 apud TOMÁS, 1998).

2.3.4 - A Importância das β -galactosidases

Lactase é o nome mais comum para a enzimas β -galactosidases ou mais formalmente β -D-galactosideo-galactohidrolases (β -galactosidases, E.C.3.2.1.23), classificadas como hidrolases e com capacidade transferase para grupos galactosil, catalisando o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose, além de enriquecer o produto hidrolisado com galactoligossacarídeos. A Figura 2-4 representa a hidrólise da lactose utilizando a enzima β -galactosidase.

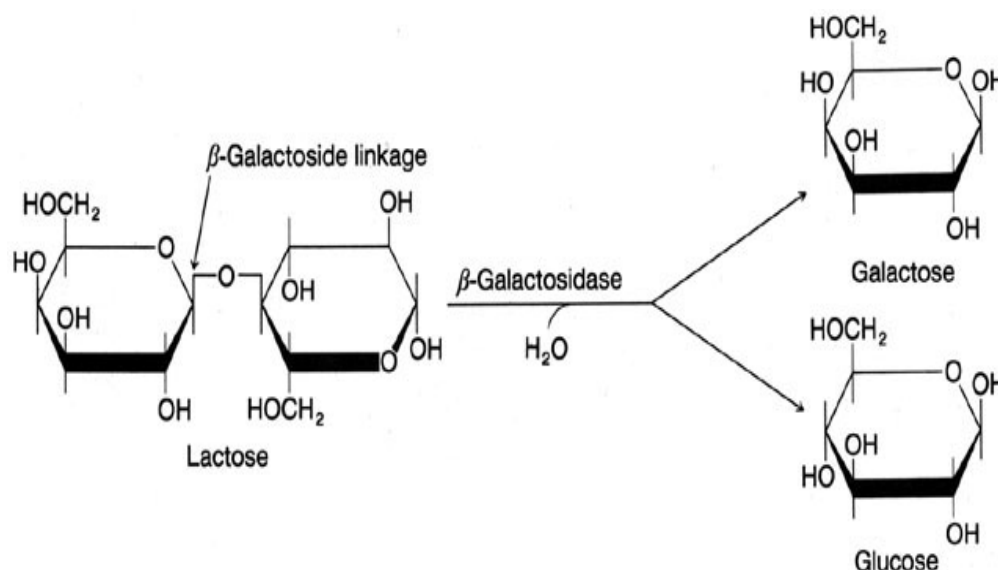


Figura 2-4: Hidrólise da lactose utilizando a enzima β -galactosidase (LOPEZ LEIVA E GUZMAN, 1985)

As lactases apresentam diferenças marcantes em várias de suas propriedades, tanto químicas como cinéticas como resultado das diferentes fontes. Como exemplo das

diferenças das enzimas dos diferentes microrganismos, pode-se citar as lactases produzidas pela bactéria *Escherichia coli*, cujo peso molecular varia entre 520.000 a 850.000 Daltons, quando comparado aos 201.000 e 90.000 Daltons da *Kluyveromyces marxianus* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente (GÉKAS E LOPEZ-LEIVA, 1985 apud SANTIAGO, 2002)

A importância industrial da β -galactosidase está na sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite e conhecido popularmente como “açúcar do leite”, em seus monossacarídeos: glicose e galactose, obtendo assim, alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose (JURADO, 2001; KARDEL, 1995; MAHONEY, 1997 e PIVARNIK, 1995 apud SANTIAGO, 2004). Além dessa vantagem, a hidrólise da lactose previne sua cristalização em produtos lácteos como doce de leite, leite condensado, leite concentrado congelado, misturas para sorvetes e iogurtes e melhora as características organolépticas destes alimentos como cor e sabor. A hidrólise deste açúcar também aumenta a facilidade de corte e dá cremosidade às misturas para sorvete, diminui o tempo de maturação dos queijos Manchego e Cheddar, além de aumentar em cerca de 10% a produção dos queijos Cottage e Quark (KARDEL, 1995; MAHONEY, 1997 apud SANTIAGO, 2004).

As β -galactosidases são enzimas capazes de atuar em valor de pH entre 3 e 4, para aquelas originárias de fungos e em pH entre 6 e 7, para aquelas originárias de levedura e bactéria. Dependendo da fonte natural onde a lactose está presente, os valores de pH estão entre 6,5 e 4,5, que é o pH do leite, ou pH igual a 5, do soro ácido (LADERO et al, 2004).

Em geral, as preparações comerciais de lactases de origem fúngicas, especialmente *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, são de grande importância, quando as condições de operação estão numa faixa de pH ácido (2,5-4,5), sendo apropriadas para a hidrólise do soro ácido.

As β -galactosidases provenientes de leveduras, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* são intracelulares, induzidas por lactose e galactose e produzidas na sua maioria por fermentação em cultura submersa. Com pH ótimo concentrado na região neutra, elas são bem adaptadas para a hidrólise da lactose do leite. Entretanto, ambas as enzimas são fortemente inibidas pela alta concentração de cálcio

no leite e pequenas concentrações de sódio. São também inibidas pela presença de galactose (competitivamente) e pela glicose (não-competitiva) (REED & NAGODAWITHANA, 1993; NUNES et al, 1993; MAHONEY, 1997 apud SANTIAGO, 2002).

As enzimas de leveduras podem ser obtidas em grandes quantidades através da fermentação do soro de queijo e são relativamente baratas. Elas também apresentam temperatura ótima de atividade na faixa de 30 a 40°C, o que representa uma desvantagem, pois facilita a contaminação microbiana, sendo aconselhável, assim, um período curto de hidrólise, de 2 a 3 horas (MAHONEY, 1997 apud SANTIAGO, 2002). Na Tabela 2-5 são apresentados as principais β -galactosidases encontradas no mercado, seus nomes comerciais, a fonte de extração, valores de pH ótimo e temperatura ótima para sua utilização e a atividade enzimática de cada enzima.

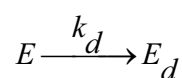
Tabela 2-5: Principais lactases e suas propriedades (PIVARNIK et al., 1995)

Lactase (nomes comerciais)	Fonte	Substrato	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Unidades de atividade *
Enzeco fungal lactase	A. orzae	lactose	4,5-5,0	55	100.000 FCC/g
Enzeco lactase	A. orzae	-	4,5-5,0	50	2.000 ILU/g
Yeast lactase L 50.000	K. lactis	lactose	6,0	45	50.000 ONPG units/g
Funga lactase L 100.000	A. orzae	lactose	4,5-5,0	50-55	100.000 FCC/g
Lactozym 3.000 L	K. marxianus	lactose	6,5	37	3.000 LAU/mL
Lactase F	A. orzae	lactose	4,5	55	14.000 FCC/g
Neutral lactase	K. lactis	lactose	6,0	45	8.000 NLU/g
Biolactase	A. orzae	-	4,5-5,0	55-60	30.000 FCC/g
Maxilact L2000	K. lactis	Soro em pó	6,3-6,7	35-40	2.000 NLU/g
Maxilact LX5000	K. lactis	Soro em pó	6,3-6,7	35-40	5.000 NLU/g
Neutral lactase	K. lactis	-	6,5	37	3.100 NLU/g

FCC, Federal Chemistry Codex Lactase Units; ILU, International Lactase Units; NLU, Neutral Lactase Units; LAU, Lactase Activity Units

2.3.5 - Influência da Temperatura na Atividade e Estabilidade das Enzimas

O estudo da estabilidade das enzimas é um importante aspecto considerado nos processos biotecnológicos, assim como a informação contida na estrutura das enzimas. Mecanismos de desativação podem ser complexos, desde que as enzimas tenham estruturas definidas, e desvios despresíveis em sua forma natural podem afetar a sua atividade específica. Entre os modelos mais utilizados para explicar a desativação das β -galactosidases está o modelo de desativação de primeira ordem:



Onde E é a concentração inicial da enzima, E_d , concentração da enzima desativada e k_d , a constante cinética de desativação. Este modelo surge para reproduzir, principalmente, resultados experimentais de enzimas imobilizadas. A desativação de primeira ordem pode ser atribuída primariamente para a ruptura formada de uma cadeia simples ou estrutura sensível, ou a ocorrência de um evento letal ou simples desnaturação. A Tabela 2-6 apresenta modelos de desativação e energia de ativação propostos para as β -galactosidases.

Tabela 2-6: Modelos de desativação e energia de ativação (E_a) propostos para as β -galactosidases de diferentes autores

Fonte de enzima	Tampão	Modelo de desativação	T (°C)	E_a (kcal.mol ⁻¹) (sol.)	Referência
K. fragilis	Tampão com íons K ⁺ e Mg ⁺²	$E \xrightarrow{k_d} E_d$	40-50	77,8	LADERO et al., 1998
K. fragilis/K. lactis	Tampão cítrico K ⁺ e Mg ⁺²	$E \xrightleftharpoons[k_{ih}]{k_h} E_h \xrightarrow{k_d} E_d$	30-50	108/108	JURADO et al., 2004
K. fragilis/K. lactis	Tampão cítrico Na ⁺	$E \xrightleftharpoons[k_{ih}]{k_h} E_h \xrightarrow{k_d} E_d$	25-40	44,7	JURADO et al., 2004

Onde:

sol. é a enzima solúvel

k_h, k_{i_h} e k_d são constantes individuais de reação

E_h é a enzima inativa, mas pode ser transformada na forma ativa

E_d é a enzima desnaturada

Um melhor conhecimento da estabilidade da enzima sob condições de operação ajudam na otimização da viabilidade econômica do processo enzimático. Vários agentes são capazes de promover a desnaturação e inativação de uma enzima: temperatura, agentes químicos, pH e força iônica (JURADO et al., 2004).

Na maioria das reações químicas ocorre um aumento da velocidade da reação com a elevação da temperatura. Um aumento na temperatura provoca maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando maior número de colisões produzidas por unidade de tempo. A atividade catalítica das enzimas provém de uma estrutura tridimensional bem definida, altamente ordenada que justapõe os grupamentos R específicos dos aminoácidos, de modo, a formar sítios estéreo-específicos de ligação com o substrato e o centro catalítico. A enzima possui uma estrutura bastante delicada e frágil, se a molécula absorve muita energia, a estrutura tridimensional altera-se. Logo, à medida que a temperatura aumenta, pode ocorrer redução na taxa de reação, devido a desnaturação da enzima. (TOMÁS, 1998).

A relação entre a taxa de reação e temperatura é descrita pelo modelo de Arrhenius. Representado pela Equação 2.3. O intervalo de validade do modelo é bastante limitado, pois qualquer temperatura superior a do ambiente pode desnaturar a enzima (BAILEY, 1986).

$$k = Z \cdot \exp\left(\frac{-E_a}{R \cdot T}\right) \quad \text{Eq.2.3}$$

Onde:

k = constante da taxa da reação (min^{-1});

T = temperatura em K;

R = constante dos gases (cal/mol K);

Z = frequência de colisões favoráveis entre reagentes (NAGODAWITHANA, 1993);

E_a = energia de ativação (cal/mol)

O conhecimento da cinética de desativação das enzimas é de grande importância no projeto de reatores enzimáticos. Na maioria dos casos considera-se cinética de primeira ordem para relacionar a atividade enzimática com o tempo, a uma dada temperatura. (RIBEIRO, 1989). Para o caso de desativação da enzima de primeira ordem, obtém-se a Equação 2.4:

$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot t \quad \text{Eq.2.4}$$

Onde:

A =atividade enzimática num tempo qualquer

k_d =constante de velocidade da taxa de desativação

Integrando a Equação 2.4 entre $t=0$ e t , obtém-se a Equação 2.5:

$$-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = k_d \cdot t \quad \text{Eq.2.5}$$

Em cinética enzimática pode-se determinar o tempo de meia vida, $t_{1/2}$, que é o tempo necessário, à temperatura T , sob condições específicas, para que a atividade catalítica seja reduzida à metade da inicial. A partir da Eq. 2.5 e com o conceito de meia vida, chega-se à Eq. 2.6:

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad \text{Eq.2.6}$$

Por outro lado k_d varia com a temperatura segundo modelo de Arrhenius, dado pela Equação 2.7.

$$k_d = A \exp\left(\frac{-E_d}{RT}\right) \quad \text{Eq.2.7}$$

A Equação 2.8 representa uma forma linearizada da Equação 2.7:

$$\ln(k_d) = \ln(A) - \frac{E_d}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad Eq.2.8$$

Onde:

E_d =energia de desativação do processo de inativação da enzima

R =constante da lei dos gases

2.4 - INFLUÊNCIA DO pH Na ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS ENZIMAS

O efeito do pH nas reações enzimáticas deve-se à ionização reversível do substrato e resíduos de aminoácidos da enzima. Esses efeitos geram mudanças na atividade catalítica da enzima, altera a estabilidade, as interações com ligantes e o valor da constante de equilíbrio da reação (NAGODAWITHANA, 1993).

Os efeitos do pH na estabilidade de uma enzima devem ser levados em conta em qualquer estudo do efeito do pH na ligação do substrato e na catálise. A queda na atividade das enzimas pode ser devido à constituição de formas iônicas impróprias do substrato ou da enzima, ou ambos, ou consequência da inativação das enzimas ou combinação desses efeitos. O pH ou intervalo de pH de maior estabilidade da enzima depende de muitos fatores, tais como: temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de substratos, cofatores e concentração de enzimas (TOMÁS, 1998).

A melhor condição de pH das enzimas, em um dado substrato, pode variar de 2,0 como no caso da pepsina, até 10,0, como no caso para a fosfatase alcalina, e muitas exibem pH próximo ao neutro, como a lactase. A mesma enzima isolada, de fontes diferentes, pode exibir diferentes valores de pH ótimos, provavelmente refletindo a necessidade fisiológica do organismo de onde a enzima foi isolada (NAGODAWITHANA, 1993).

A atividade enzimática, utilizando solução tampão com $K^+ Mg^{+2}$ com composição de: 0,01M de K_2HPO_4 , 0,015M de KCl e 0,012 de $MgCl_2.6H_2O$ em solução de ácido cítrico com pH ajustado em 6,5, foi 78 e 77 $mmol_{\text{glicose}}/g_{\text{enzima}}.h$, respectivamente, para a Lactozym e Maxilact. Quando adicionado íons Na^+ , utilizando solução tampão $Na^+(0,07 M$ de

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, com ácido cítrico e valor de pH 6,5, a atividade enzimática foi 3,06 e 3,04 $\text{mmol}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{enzima}} \cdot \text{h}$ (JURADO et al, 2004).

2.5 - QUEIJO

O queijo é um alimento sólido derivado dos seguintes produtos: leite, nata, leite desnatado (total ou parcialmente), soro de manteiga ou de mistura de qualquer um deles, obtido a partir da coagulação enzimática (com renina) ou ácido láctico, seguido da dessoragem do coágulo (SANTIAGO et al, 2002).

A proteína é o componente mais importante do queijo, sendo referenciado como um concentrado protéico-gorduroso, embora os teores de água e gordura podem variar bastante, dependendo do tipo e conservação do produto (PORTO, 2001 apud SANTIAGO, 2002).

A produção de queijo gera um grande volume de soro que pode se tornar um subproduto utilizado na alimentação humana e de animais ou em um efluente, constituído, principalmente, de soro de queijo, que possui elevada carga poluidora que se for lançado em rios torna-se um grande problema ambiental. A produção brasileira de queijo de 1991 á 2005 é apresentada na Figura 2-5 a seguir:

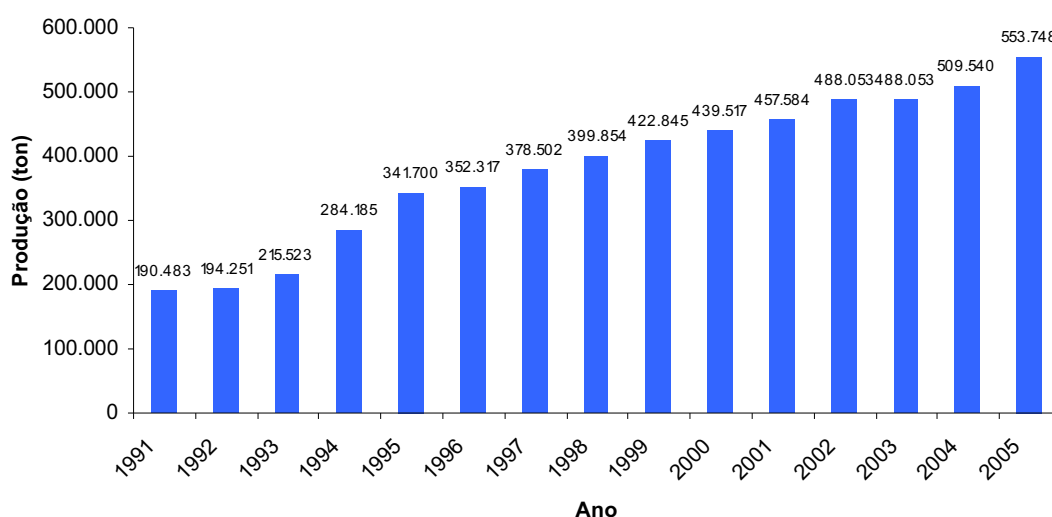


Figura 2-5: Produção Brasileira de Queijo

Fonte: ANUALPEC, 2004

A produção brasileira de queijo aumentou em aproximadamente 300% de 1991 à 2005, como mostra a Figura 2-5, ou seja, a produção de soro também aumentou na mesma proporção. Logo, é necessário utilizar o soro como matéria-prima .

A produção mundial de queijos distribuídas em grupos de países no ano de 2003 é apresentada na Figura 2-6.

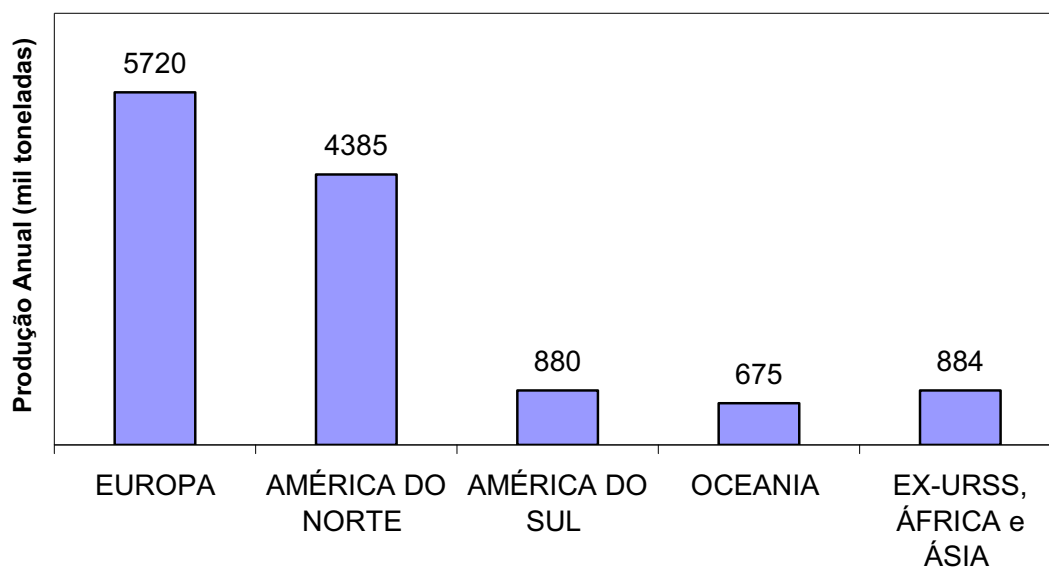


Figura 2-6: Produção de queijo distribuída por grupos de países.

Fonte: USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Na América do Sul, o Brasil possui uma produção de 480 mil toneladas do total de 880 mil toneladas; na Europa, a França com 1.513 mil toneladas; América do Norte os Estados Unidos, com 3.925 mil toneladas por ano; na África, o Egito com 400 mil toneladas; na Oceania, a Austrália com 405 mil toneladas de queijo por ano.

A Figura 2-7 apresenta o consumo per capita mundial de queijo.

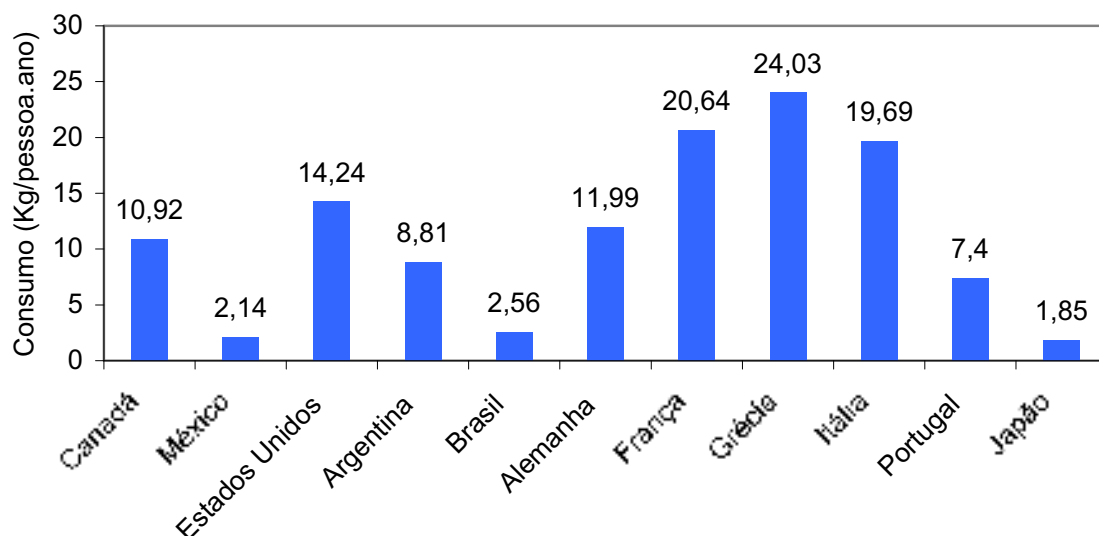


Figura 2-7: Consumo per capita mundial de queijo em 2004

Fonte: Anualpec, 2004

Como nota-se na Figura 2-7 no Brasil, o consumo de queijo ainda é baixo quando comparada com sua produção de leite, enquanto em países mais desenvolvidos nota-se que há um expressivo aumento do consumo de queijo.

O processamento de queijo segue as seguintes etapas:

- 1) coagulação e corte - ao leite pasteurizado dependendo do tipo de queijo, são acrescentados, coalho, fermento ou ácido láctico, para possibilitar a coagulação do leite. Após a coagulação, corta-se a coalhada para a separação do soro;
- 2) agitação, aquecimento - dependendo do tipo, cada queijo passa então um processo diferente de agitação e aquecimento da massa;
- 3) enformagem - a massa é então enformada em diferentes moldes e tamanhos que conferem ao queijo seu formato final;
- 4) prensagem - depois de enformados, os queijos são prensados para expulsar o excedente de soro;
- 5) salga - em geral, após a prensagem, os queijos são imersos em banho de salmoura antisséptica, responsável pelo teor de sal e pela formação de cascas que os protegem. Alguns queijos recebem a salga na massa ou a seco;

- 6) maturação – após a salga, os queijos passam por processos de secagem em câmaras frias. Em seguida vão para câmaras de maturação, onde permanecem a temperaturas e com teor de umidade adequados, até atingir o ponto ideal, que varia conforme cada queijo. A maturação é muito importante na definição da aparência, da textura e do sabor do queijo;
- 7) embalagem - em geral, os queijos são embalados após a maturação quando mantidos sob refrigeração nas fábricas ou durante o transporte.

2.6 - SORO DE QUEIJO

O soro de queijo pode ser definido como a parte líquida do leite, após a precipitação da caseína, seja para fabricação desta ou na confecção de queijos. O soro engloba aproximadamente metade dos sólidos contidos no leite, dos quais a lactose é o constituinte presente em maior quantidade. A composição dos soros é variável, sendo dependente do tipo de leite empregado e também das perdas que ocorrem durante a fabricação do queijo. No entanto, é de esperar que os componentes solúveis do leite estejam presentes nas mesmas proporções que se encontravam originalmente, uma vez que os mesmos permeiam juntos como soro durante a separação do mesmo. Deve-se levar em conta que as quantidades desses componentes que ficaria no queijo, depende, em grande parte, da quantidade de soro retida no mesmo (RAMOS, 1985).

Para cada litro de leite processado para fabricação de queijo são gerados de 0,6 a 0,9 litros de soro. A produção mundial diária de queijo resulta em 3,2 milhões de toneladas de lactose, dissolvida no soro. Aproximadamente metade é utilizada para nutrição humana e animal. O restante é rejeito de difícil disposição e aumenta a poluição ambiental (NOVALIN et al, 2005). O soro representa a maior quantidade de subproduto desperdiçado da indústria láctea. Ele possui alto valor de DBO, em torno de 30 a 60 kg/m³, principalmente pelo alto teor de lactose, a qual representa entre 4 e 8% (peso por volume). (HATZINIKOLAOU et al, 2005).

As quantidades de proteínas, sais minerais, ácidos graxos, lactose e ácido láctico são bastante variáveis no soro de queijo (PONSANO apud FERREIRA, 2003), sendo afetadas

pelo tipo de queijo fabricado e pelo tratamento térmico, dentre outros fatores. Vários fatores influenciam sua composição e seu valor nutricional. São eles: a quantidade característica do leite, o tipo de queijo produzido, eventuais tratamentos térmicos do leite ou soro, aditivos e fermentos, tempo de ruptura do coágulo, valor final de acidez, desnate, adição de água, tempo e permanência na fábrica de queijo e condições de transporte do soro (BERTOL e SANTOS FILHO apud FERREIRA, 2003). Cerca de metade dos sólidos totais presentes no leite permanecem no soro, no qual a quantidade de extrato seco representa em média 7% do peso total. Os componentes hidrossolúveis do leite, tais como, lactose, alguns sais, vitaminas e as proteínas que não coagulam com a caseína, as albuminas e as globulinas ficam dissolvidos no soro (OLIVEIRA, 1982 apud SANTIAGO, 2002). Este extrato é bastante rico e sua composição média em peso é apresentada na Tabela 2-7.

Tabela 2-7 - Principais componentes do extrato seco do soro de queijo in natura (VILANI, 2001 apud SANTIAGO, 2002).

Componentes	Composição (%)
Lactose	70 a 80
Compostos nitrogenados	10 a 14
Sais minerais	1,5 a 4
Lipídeos	0,05 a 0,6

O soro ainda representa um grande problema de disposição, pois é gerado em grande quantidade. Como este possui elevada concentração de lactose, torna-se necessário um estudo sobre a possibilidade de melhor aproveitamento da lactose do soro. Sua aplicabilidade tem sido desenvolvida afim de eliminar o problema de disposição. Uma das alternativas é na produção de alimentos, como: biscoitos, bebidas lácteas e ração animal. Outra alternativa é o uso do soro como um meio para vários processos de fermentação incluindo produção de etanol, metano, fermento, levedura, proteína, goma xantana ou ácido orgânico como lactato, propionato ou acetato. Contudo, o número de microrganismos que fermentam a lactose é limitado e a utilização da engenharia genética de microrganismos para a bioconversão da lactose está distante do uso industrial.

2.6.1 - Tipos de Soro de Queijo

A classificação do soro de queijo, segundo RICHARDS (1997) é apresentado a seguir:

- soro doce – obtido a partir da fabricação de queijo cheddar, suíço e similares, obtido por coagulação enzimática do leite;
- soro ácido – obtido a partir da fabricação de queijo tipo cottage ou de caseína, obtidos pela coagulação utilizando-se ácido;
- soro desproteínizado – obtido a partir da coagulação das proteínas a quente.

Queijos maturados originam soro doce, pH entre 5,9 e 6,3, e queijos frescos originam soro ácido, com pH entre 4,4 e 4,6. No soro ácido há mais ácido láctico, cálcio e fósforo e uma maior resistência à aceitação por parte dos consumidores, devido ao seu sabor ácido. No soro em pó, aminoácidos livres, peptídeos e minerais são encontrados em proporções menores que no soro ácido (FERREIRA, 2003).

Dos constituintes da fração sólida do soro, a lactose é o que se encontra em maior quantidade, tanto no soro doce, quanto no soro ácido. Entretanto, a sua quantidade no soro ácido pode ser menor, devido à fermentação durante a manufatura de queijos que produzem este tipo de soro.

A composição média do soro de leite doce composto por caseína, obtida através da coagulação com renina e queijo cheddar, e do soro ácido constituído por caseína, obtida através da coagulação, utilizando ácido láctico e com ácido mineral, segundo PONSANO et al. (1995) estão apresentados na Tabela 2-8.

Tabela 2-8: Composição Média do Soro de Leite

Componente	Composição (g/L)			
	Soro de leite doce		Soro de leite ácido	
	Caseína	Queijo Cheddar	Caseína/Ácido láctico	Caseína/Ácido mineral
Sólidos totais	66	67	64	63
Proteína total	6,57	6,47	6,20	6,10
Nitrogênio não protéico	0,37	0,27	0,40	0,3
Lactose	52,3	52,4	44,3	46,9
Gordura	0,2	0,2	0,3	0,3
Minerais	5,0	5,2	7,5	7,9
Cálcio	0,5	0,4	1,6	1,4
Fosfato	1,0	0,5	2,0	2,0
Sódio	0,53	0,5	0,51	0,5
Lactato	-	2,0	6,4	-
PH	6,4	5,9	4,6	4,7

Fonte: KOSIKOWSKI & WZOREM, 1977 apud PONSANO et al., 1995

O soro também é uma excelente fonte de vitaminas e minerais essenciais à nutrição humana.

2.6.2 - Poder Poluente do Soro

O soro lácteo quando lançado em cursos d'água produz um efeito poluidor elevado, devido ao consumo de oxigênio dissolvido na água pelos microrganismos, diminuindo assim a sua concentração, levando à morte de peixes e outras espécies.

O potencial poluidor do soro de queijo é, aproximadamente, cem vezes maior que o do esgoto doméstico.

O descarte do soro de leite diretamente no solo, no entanto, conduz ainda a outros sérios problemas ambientais: compromete a estrutura físico-química do solo e diminui o rendimento da colheita (PONSANO et al., 1995).

2.6.3 - Dificuldades para o aproveitamento do soro de queijo

A visão que se tem do soro de queijo como um rejeito e não como matéria-prima dificulta o aproveitamento deste produto. Desta maneira, ocorre o aproveitamento inadequado do soro na maioria dos locais onde é produzido, sendo na maior parte estocado de forma inadequada até o seu descarte.

O aproveitamento do soro encontra alguns obstáculos como:

- A maioria das queijarias é pequena ou média empresa, o que dificulta a implantação de uma política de aproveitamento ou tratamento;
- Nestas unidades, a quantidade gerada de soro é relativamente pequena;
- Não há recursos humanos qualificados na maioria das unidades produtivas;
- Uma deficiente malha viária e grandes distâncias, o que dificulta o rápido escoamento deste produto (MINAS AMBIENTE, 1998).

2.6.4 - O Soro como Matéria-Prima e suas Aplicações

O soro de queijo após a pasteurização é perecível por conter uma rica fonte de nutrientes. Devido a estes nutrientes, o mesmo pode ser utilizado em alimentos, como por exemplo, na substituição da água de bebidas, ou ainda em sopas, pães e outros alimentos (FERREIRA, 2003).

A necessidade crescente de novos usos para o soro tem levado ao desenvolvimento de um grande número de experimentos em todo o mundo. Os resultados têm sido satisfatórios na indústria da panificação, confeitos e sobremesas geladas. Uma nova utilidade para os sólidos do soro é como substrato, após enriquecimento com substâncias promotoras de crescimento, no preparo de culturas lácticas (MINAS AMBIENTE, 1998).

Existem atualmente tecnologias disponíveis para aproveitar o soro de queijo e dentre estas pode-se, segundo MINAS AMBIENTE (1998) citar além do uso para alimentação animal e como substrato para a fermentação, a fabricação de: queijos de soro, bebidas, soro concentrado, soro em pó, soro demineralizado, concentrados protéicos por ultrafiltração, proteínas do soro, lactose e alimentação animal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 - Soro de Queijo

O soro de queijo em pó utilizado neste trabalho foi adquirido da Vigor Alimentos S/A e sua composição é apresentada a seguir Tabela 3-1.

Tabela 3-1: Composição do soro de queijo utilizado.

Composição	Mínimo	Máximo
Proteínas (%peso/peso)	11,0	-
Lactose (%peso/peso)	72,0	-
Teor de cloreto (%peso/peso)	-	5,0
pH, solução a 10%	5,80	-
Sais minerais (%peso/peso)	7,0	9,0

Fonte: Vigor Alimentos S/A

3.1.2 - Enzimas

Neste trabalho foram utilizadas as enzimas β -D-galactoside galactohidrolase (β -galactosidase, E.C. 3.2.1.23) de dois fabricantes diferentes, Prozyn[®] Lactase e Lactozym[®] da Novo Nordisk. O produto da Prozyn é constituído de lactase, obtida através da fermentação de uma cepa selecionada e específica da levedura *Kluyveromyces lactis*. O produto da Lactozym é produzida a partir da fermentação de uma cepa selecionada da levedura *Kluyveromyces fragilis*. Ambas se apresentam como um líquido amarelo claro de densidade igual a 1,2 g/mL. A Lactozym declara ter uma atividade de 3000 LAU mL⁻¹ (1

LAU: enzima comercial que produz 1 μ mol de glicose por minuto sobre condições padrões: concentração de 4,7 % de lactose, pH=6,5, 30°C e solução tampão padrão do leite).

3.1.3 - Reagentes

Foi utilizado um kit GLICOSE PAP Liquiform da Labtest Diagnóstica S.A para determinação da concentração de glicose descrito no Anexo A2.

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica.

3.1.4 - Tampão Láctico

A solução de tampão láctico foi preparada com os compostos listados na Tabela 3-2 e azida sódica a 0,01%, como conservante e água destilada. Este tampão foi escolhido baseado no trabalho de TOMÁS (1998).

Tabela 3-2: Composição da solução tampão láctico e concentração dos sais utilizados em sua preparação (NOVO NORDISK, 1993).

Componentes	Concentração (g/L)
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ . 2H ₂ O	0,795
C ₆ H ₈ O ₇ . H ₂ O	1,663
K ₂ SO ₄	0,180
K ₂ HPO ₄	0,520
KH ₂ PO ₄	1,470
KOH	1,090
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,830
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,750
NaOH	0,800
NaHCO ₃	0,280

Os componentes, depois de pesados e dissolvidos em água destilada, foram transferidos para um balão volumétrico de 1L, adicionado de água destilada até completar 500 mL, em seguida ajustou-se o valor do pH em 6,5 com solução de ácido clorídrico 0,1 N completando o volume restante com água destilada.

3.1.5 - Unidade Experimental para Hidrólise da Lactose do Soro de Queijo e Ensaio de Atividade Enzimática

A unidade consistia de um reator da marca MULTIGENTM como apresentado na Figura 3-1, no qual havia controle de temperatura e agitação e volume útil de 2L.



Figura 3-1: Reator utilizado para o estudo da hidrólise do soro de queijo

Um pHmetro da GEHAKA foi utilizado para controle do pH da solução. Foi colocado na bancada próximo ao reator, um bico de Bunsen, para o aquecimento da água em um becker, onde ocorria a reação de inativação das enzimas. Para a determinação da

concentração de glicose, utilizando o kit GLICOSE PAP Liquiform da Labtest Diagnóstica S.A., foi utilizado um banho termostatzado da marca THERMOMIX apresentado na Figura 3-2 e um espectrofotômetro GENESYS, modelo 10UV apresentado na Figura 3-3.



Figura 3-2: Banho termostatzado da THERMOMIX



Figura 3-3: Espectrofotômetro GENESYS

3.2 - MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 - Determinação da Concentração de açúcares redutores

Para a determinação do teor de lactose presente no soro de queijo, utilizou-se o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). A metodologia consistia em:

- 1) Retirar 1mL da amostra pura ou diluída de acordo com as condições e colocar em um tubo Folin-Wu acrescido de 2mL de DNS, preparado como descrito no Anexo A1.
- 2) Em seguida a amostra era colocada em banho-maria por 5 minutos.
- 3) Após este período a amostra era lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm, tendo como padrão uma amostra de branco, preparado com a substituição da amostra por água destilada.
- 4) Para a determinação da concentração de açúcar presente fez-se uma curva de calibração com amostras de concentrações conhecidas de lactose. A curva de calibração encontra-se no Anexo A1.

3.2.2 - Determinação da Concentração de Glicose

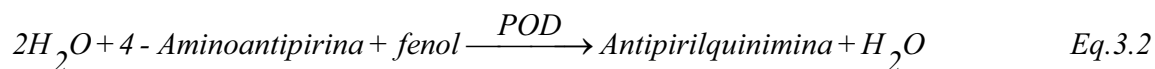
A concentração de glicose foi determinada pelo método da glicose-oxidase. Foi utilizado kits de GLICOSE PAP Liquiform da Labtest Diagnóstica S.A..

O método baseia-se na oxidação da glicose catalisada pela glicose oxidase, representada pela Equação 3.1



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando um

antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.



O kit de GLICOSE PAP Liquiform é composto por dois reagentes de 500 mL, cada um, contendo tampão e um padrão contendo 10 mL.

Para a determinação da concentração da glicose foi necessário traçar a curva de calibração de absorbância em função de concentrações conhecidas de glicose. O procedimento para obtenção da curva foi realizado pela preparação das amostras de concentração de glicose, variando a concentração de 0,1 g/L à 1,0 g/L. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 0,01 mL de amostra, seguido de 0,01 mL do padrão e 1 mL do reagente. Também foi preparado um branco. Em seguida os tubos eram levados ao banho termostatizado à 37 °C por 15 min. Após o tempo de reação, a absorbância das amostras eram lidas utilizando cubetas de vidro em espectrofotômetro apresentado na Figura 3-3, com comprimento de onda a 505 nm. Após obtido os valores de absorbância em função da concentração de glicose, as curvas de calibração foram construídas e determinadas suas equações pelo método de regressão linear. A concentração de glicose das amostras foram determinada utilizando curva de calibração no Anexo A2.

3.2.3 - Determinação da Atividade das Enzimas

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se em tubo de ensaio, contendo 1 mL de solução de lactose monohidratada 50 g/L preparada com solução tampão, descrito no item 3.4, e 1 mL de solução de enzima 10 g/L preparada com o mesmo tampão. O tubo era colocado em banho termostatizado a 30°C por 10 min, em seguida a amostra era levada em banho fervente por 15 min para inativação da enzima. Depois determinava-se a concentração de glicose pelo método 3.2.2. A atividade expressa a massa de glicose por volume de enzima por tempo.

Também foi determinada a atividade pelo método da taxa inicial da reação de hidrólise da lactose. Em um erlenmeyer foram colocados 80 mL de solução de lactose, na concentração do experimento a ser estudado, em tampão láctico no pH desejado, esperava-se a estabilização da temperatura no valor a ser estudado e adicionava 1 mL das enzima, diluída a 2% em tampão láctico. Amostras de 1 mL eram retiradas e colocadas em tubos de ensaio com tampa em intervalos de 5 min até 25 min e levadas em banho de água fervente por 15 min para inativação da enzima. Em seguida eram determinadas as concentrações de glicose em função do tempo, cuja inclinação da reta passando pela origem fornecia a taxa inicial da reação ou a atividade catalítica da enzima.

3.2.4 - Determinação da Hidrólise Enzimática do Soro de Queijo

A hidrólise do soro de queijo foi estudada em condições de temperatura e agitação diferentes para as duas enzimas. Foi utilizado o reator da MULTIGENTM com controle de temperatura e agitação. A concentração do soro de queijo adicionada foi de 60 g/L, onde 75% corresponde a concentração de lactose, ou seja, 45 g/L. Esperava-se atingir a temperatura a ser estudada e ajustava-se o pH em 6,5. Em seguida adicionava-se a enzima na quantidade 4,0 g/por L de reação, valor escolhido após testes preliminares de hidrólise com concentração de enzima 1,0 g/L e 2,0 g/L, e iniciava-se a marcação do tempo. As amostras eram retiradas em intervalos de tempo variados e colocadas em tubos de ensaio e levadas em banho fervente para inativação da enzima, de acordo com as variáveis a serem estudadas. Após o término do ensaio, a concentração de glicose era determinada pelo método de glicose-oxidase, utilizando o kit GLICOSE PAP Liquiform da Labtest S.A Diagnóstica. A partir dos resultados da concentração de glicose, traçava-se o gráfico de hidrólise da lactose presente no soro de queijo e verifica-se quais as melhores condições de operação e a enzima que apresentava melhor resultado.

3.2.5 - Estabilidade Térmica das Enzimas no Soro de Queijo

A estabilidade térmica das enzimas Prozyn e Lactozym foi estudada através de ensaios, cujas amostras de enzimas foram colocadas no reator com solução de soro de queijo com concentração 60 g/L e mantidas em diferentes temperaturas: 45, 50 e 55°C e pH 6,5. Em intervalos de tempos diferentes duas amostras de 2 mL eram retiradas, uma era colocada em banho fervente e a outra determinava-se a atividade enzimática em solução de lactose 50 g/L em tampão láctico e pH 6,5. Depois determinava a concentração de glicose em cada amostra e por diferença em cada tempo determinava-se a atividade enzimática.

3.2.6 - Estabilidade das Enzimas em Relação ao pH

Amostras das enzimas Prozyn e Lactozym diluídas a 1% em solução de 50 mL tampão láctico e 2 mL da enzima diluída com valores de pH 5,0; 6,0; 6,5; 7,0 e 8,0 foram colocadas em banho termostatzado à temperatura de 30°C por 24 h. Depois determinou-se a atividade enzimática em cada tubo em solução de lactose 50 g/L, pH 6,5 e temperatura 30 °C pelo método descrito no item 3.2.3.

3.2.7 - Influência da Concentração de Lactose na Atividade das Enzimas

A influência da concentração da lactose na taxa inicial de hidrólise da lactose foi determinada experimentalmente através das taxas iniciais de reação, utilizando-se concentrações de lactose: 20, 40, 60, 80, 100 e 120 g/L. Os ensaios foram realizados a 30°C e pH 6,5. As amostras foram colocadas em erlenmeyer com volume de 80 mL de solução de lactose a ser estudada e 1 mL de enzima diluída a 2%, ambas em tampão láctico. Depois as amostras eram retiradas em intervalo de 5 min até 25 min e colocadas em banho fervente para desativação das enzimas. Em seguida era determinada a concentração de glicose em cada tempo e obtida a equação da taxa de reação.

3.3 - ENSAIOS REALIZADOS DURANTE O TRABALHO

Os ensaios realizados nesse trabalho são apresentados na Tabela 3-3.

Tabela 3-3: Condições estudadas na realização desse trabalho

Ensaio realizado	Temperatura (°C)	pH	Agitação (rpm)	Conc. de soro de queijo (g/L)	Conc. de lactose (g/L)
Hidrólise do soro de queijo (Prozyn)	43	6,5	300	60	...
	45	6,5	300	60	...
	48	6,5	300	60	...
	45	6,5	...	60	...
	45	6,0	300	60	...
Hidrólise do soro de queijo (Lactozym)	43	6,5	300	60	...
	45	6,5	300	60	...
	48	6,5	300	60	...
Estabilidade térmica do soro (Prozyn)	50	6,5	300	60	...
	55	6,5	300	60	...
Estabilidade térmica do soro (Lactozym)	45	6,5	300	60	...
	50	6,5	300	60	...
Estabilidade em relação ao pH (Prozyn)	30	8,0	...	...	50
	30	7,0	...	...	50
	30	6,5	...	...	50
	30	6,0	...	...	50
	30	5,0	...	...	50
Estabilidade em relação ao pH (Lactozym)	30	8,0	...	...	50
	30	7,0	...	...	50
	30	6,5	...	...	50
	30	6,0	...	...	50
	30	5,0	...	...	50
Influência da concentração da lactose	30	6,5	...	...	10
	30	6,5	...	...	20
	30	6,5	...	...	40
	30	6,5	...	...	60

continuação...					
	30	6,5	...	...	80
(Prozyn)	30	6,5	...	...	100
	30	6,5	...	...	120
	30	6,5	...	...	10
Influência da	30	6,5	...	...	20
concentração da lactose	30	6,5	...	...	40
(Lactozym)	30	6,5	...	...	60
	30	6,5	...	...	80
	30	6,5	...	...	100
	30	6,5	...	...	120

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - RESULTADOS

Numa etapa inicial deste trabalho foi realizada uma análise da concentração de lactose no soro de queijo, para avaliação do resultado da conversão na hidrólise. Inicialmente foi realizada hidrólise do soro de queijo com quantidade de enzima 1 g/L de reator e 2 g/L de reator e concentração de soro de queijo 60 g/L.

Após esta etapa inicial foram realizados ensaios de hidrólise do soro de queijo, variando as condições de temperatura, pH e agitação com concentração de soro 60 g/L e 4 g/L de enzima para os dois fabricantes da enzima β -galactosidase.

Foram realizados ensaios para verificação da estabilidade das enzimas em relação ao pH, temperatura e influência da concentração da lactose na enzima

4.1.1 - Hidrólise do Soro de Queijo

As concentrações de glicose durante a hidrólise do soro de queijo são apresentadas nos gráficos a seguir, para temperaturas na faixa de 43 °C a 48 °C para as enzimas Prozyn e Lactozym, determinadas em pH 6,5 e 6,0 com agitação de 300 rpm e sem agitação, concentração de enzima 4 g/L, concentração de soro 60 g/L. A porcentagem de lactose presente no soro foi de 75%, após a hidrólise, a concentração teórica de glicose esperada é de 22,5g/L, correspondente a 50% da concentração de lactose inicial. O ajuste do pH foi realizado a partir de uma amostra da solução de soro de queijo retirada do reator que era lida no pHmetro.

4.1.2 - Ensaios com a Enzima Prozyn

A hidrólise do soro de queijo com a enzima Prozyn foram estudadas nas seguintes condições:

- concentração de soro 60 g/L, pH 6,5, agitação 300 rpm, temperatura 43°C e concentração da enzima 4 g/L;
- concentração de soro 60 g/L, pH 6,5, agitação 300 rpm, temperatura 45°C e concentração da enzima 4 g/L;
- concentração de soro 60 g/L, pH 6,5, agitação 300 rpm, temperatura 48°C e concentração da enzima 4 g/L;
- concentração de soro 60 g/L, pH 6,5, sem agitação, temperatura 45°C e concentração da enzima 4 g/L;
- concentração de soro 60 g/L, pH 6,0, agitação 300 rpm, temperatura 43°C e concentração da enzima 4 g/L.

A Figura 4-1 apresenta os resultados da hidrólise do soro de queijo nas diferentes condições de ensaio realizadas.

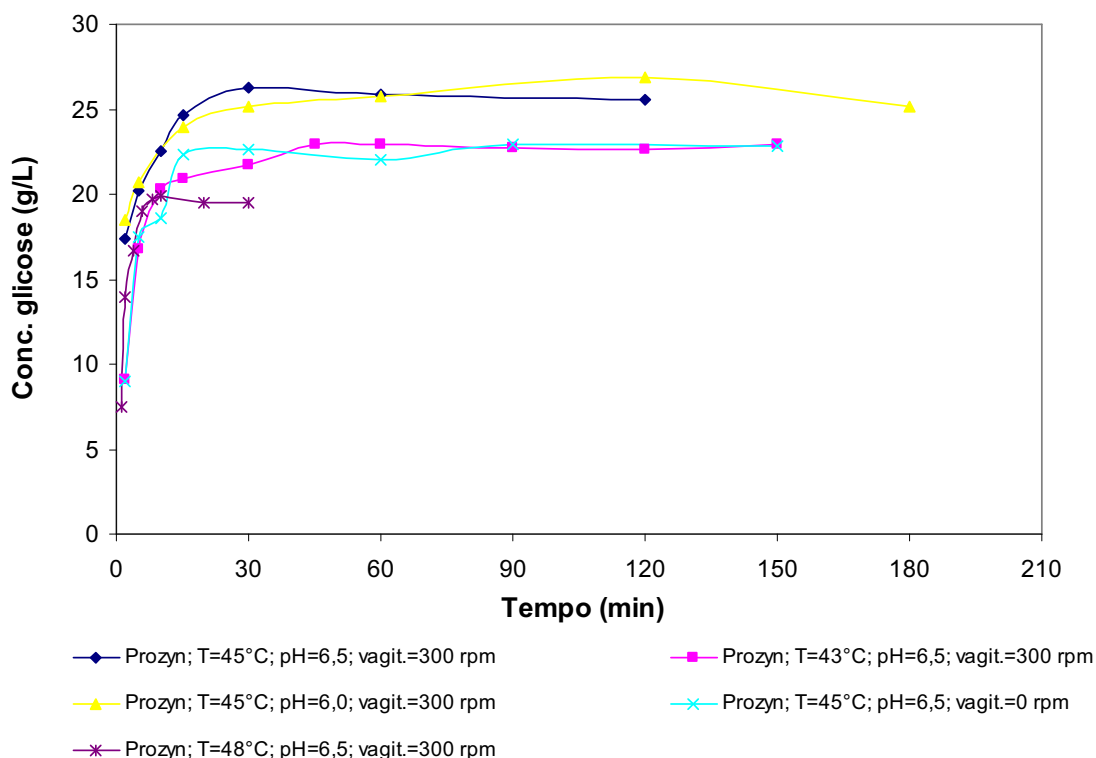


Figura 4-1: Hidrólise da lactose presente no soro de queijo utilizando a enzima Prozyn em diferentes condições

Pela Figura 4-1 verifica-se que:

- à temperatura de 43°C, pH 6,5 e agitação 300 rpm, a concentração de glicose aumenta até toda a lactose ser convertida em glicose e galactose, a conversão de toda a lactose presente no soro em glicose foi atingida em 45 min com concentração de 22,9 g/L, que corresponde a aproximadamente 50% da concentração da lactose inicial de 45 g/L;
- à temperatura de 45°C, pH 6,5 e agitação 300 rpm, a concentração de glicose aumenta até toda a lactose ser convertida em glicose e galactose, a conversão de toda a lactose presente no soro em glicose foi atingida em 30 min com concentração 22,6 g/L;
- à temperatura de 48°C, pH 6,5 e agitação 300 rpm, a lactose não é totalmente convertida, a concentração máxima de glicose obtida foi 19,91 g/L, a enzima começa a desativar depois de 10 min de reação;

- à temperatura de 45°C, pH 6,5 com e sem agitação, a agitação mecânica parece não ter interferência na conversão da lactose, portanto, não há necessidade de um agitador mecânico. A concentração de glicose atingida foi 26,26 g/L em 30 min.
- à temperatura de 43°C, pH 6,0 e agitação 300 rpm, a conversão da lactose em glicose ocorre em aproximadamente 60 min.

4.1.3 - Ensaios com a Enzima Lactozym

A hidrólise do soro de queijo com a enzima Lactozym foram estudadas nas seguintes condições:

- concentração de soro 60 g/L, pH 6,5, agitação 300 rpm, temperatura 48°C e 4 g/L de enzima;
- concentração de soro 60 g/L, pH 6,5, agitação 300 rpm, temperatura 45°C e 4 g/L de enzima;
- concentração de soro 60 g/L, pH 6,5, agitação 300 rpm, temperatura 43°C e 4 g/L de enzima.

A Figura 4-2 apresenta os resultados da hidrólise do soro de queijo nas diferentes condições de ensaio realizadas.

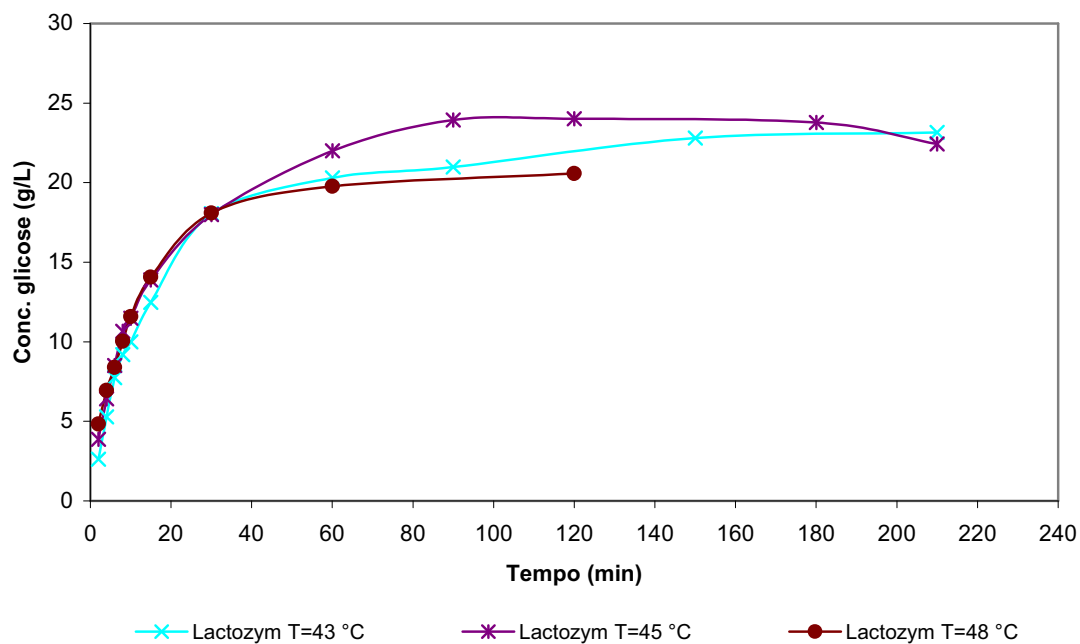


Figura 4-2: Estudo comparativo da hidrólise da lactose presente no soro de queijo utilizando a enzima Lactozym

Pela Figura 4-2 verifica-se que:

- à 48°C, pH 6,5 e 300 rpm, a conversão total da lactose em glicose é atingida em 120 min de hidrólise, a concentração de glicose obtida foi 20,58 g/L. Em 30 min a concentração de glicose atingida foi 18,10 g/L, apresentando uma diferença mínima para mais 90 min de hidrólise;
- à 45°C, pH 6,5 e 300 rpm, o tempo de hidrólise é maior, aproximadamente 90 min, com concentração de 23,95 g/L e 60 min com concentração 22 g/L.
- à 43°C, pH 6,5 e 300 rpm, a conversão total da lactose em glicose foi de aproximadamente 150 min, 22,81 g/L de glicose e no tempo 210 min, 23,16 g/L.

A Figura 4-3 apresenta o resultado em conjunto da hidrólise do soro de queijo de ambas as enzimas em pH 6,5, 300 rpm e 4 g/L de enzima .

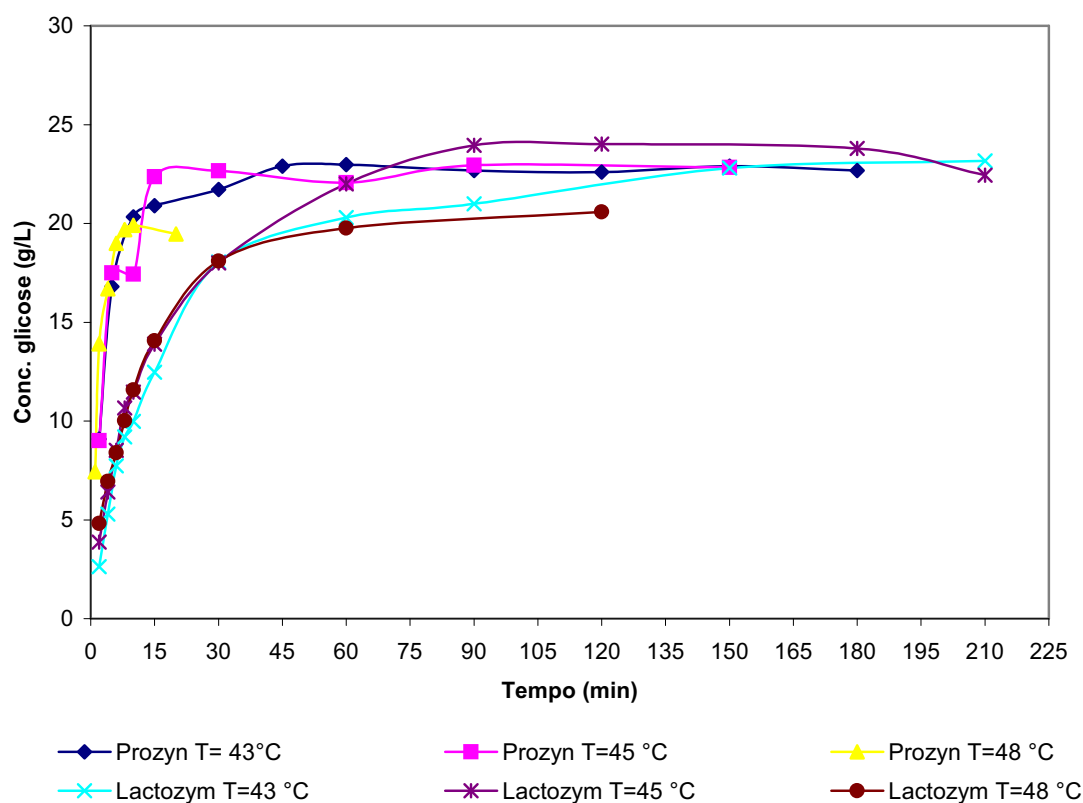


Figura 4-3: Hidrólise da lactose das enzimas Prozyn e Lactozym com pH 6,5; concentração da enzima 4 g/L e agitação 300 rpm

A velocidade da reação para a enzima Prozyn é maior a 45 °C, ela converte toda a lactose em glicose e galactose em entrede 15 e 45 min, e a 48 °C ela começa a desativar em torno de 10 min. A enzima Lactozym possui taxa diferente da hidrólise da Prozyn, a 45°C, ela converte a lactose em torno de 60 min e a 48 °C ela ainda não desativou. No estudo da enzima Lactozym verificou-se que ela não atinge a mesma conversão da Prozyn nas condições estudadas.

4.1.4 - Estabilidade Térmica da Enzima β -Galactosidase

A influência da temperatura na estabilidade das enzimas Prozyn e Lactozym foi estudada conforme citado no item 3.2.5 e os resultados de atividade relativa em função do tempo são apresentados na Tabela 4-1.

Tabela 4-1: Dados de tempo e atividade relativa para diferentes temperaturas

Tempo (min)	Prozyn			Lactozym		
	A _r (45 °C)	A _r (50 °C)	A _r (55 °C)	A _r (45 °C)	A _r (50 °C)	A _r (55 °C)
0	1,00	...	1,0000	...	1,000	1,0000
2	0,652	1,00	0,8094	...	...	...
4	...	0,989	0,5802	...	...	...
5	...	...	...	1,00	0,538	0,8094
6	...	0,859	0,3868	...	...	...
8	...	0,631	0,2208	...	...	...
10	...	0,463	0,1472	...	0,538	0,5802
15	...	0,274	...	...	0,493	0,3868
20	...	0,210	0,1028	...	...	...
25	...	0,211	...	...	...	...
30	0,652	...	...	1,056	0,234	0,2208
60	0,606	...	...	0,762	0,091	0,1472
90	0,597	...	...	0,668	0,058	...
120	0,458	...	...	0,479	...	0,1028
150	0,542	...	...	0,432	...	...
180	0,512	...	...	0,393	...	...

Aplicando a Equação 2.5 aos resultados da Tabela 4-1 para cada temperatura, calculou-se o valor de k_d e com o valores de k_d foi determinado o tempo de meia vida pela Equação 2.6, onde os resultados são apresentados na Tabela 4-2.

Tabela 4-2: Valores de k_d e $t_{1/2}$ em função da temperatura

Enzima	Temperatura (°C)	k_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
Prozyn	45	0,0093	74,53
Prozyn	50	0,08	4,62
Prozyn	55	0,25	2,77
Lactozym	45	0,006	115,52
Lactozym	50	0,11	6,30
Lactozym	55	0,66	2,47

Para determinar a energia de ativação do processo de inativação da enzima correlacionou-se $\ln(k_d)$ em função de $1/T$ nas temperaturas estudadas, utilizando a Equação 2.8. O valor de E_d encontrado para as enzimas Prozyn e Lactozym foram 68.319 cal/mol e 97.529,91 cal/mol, respectivamente. As Equações 4.1, 4.2 e 4.3 mostram a relação entre k_d (min⁻¹) e $1/T$ (K⁻¹), e o coeficiente de correlação para a enzima Prozyn e Lactozym, respectivamente.

$$\ln(k_d) = 103,6 - 34383 \frac{1}{T} \quad r^2 = 0,97 \quad Eq.4.1$$

$$\ln(k_d) = 149,41 - 49084 \frac{1}{T} \quad r^2 = 0,98 \quad Eq.4.2$$

4.1.5 - Estabilidade das Enzimas em relação ao pH

A influência do pH na estabilidade das β -galctosidases foi estudada pela incubação das amostras em pH variando de 5,0 a 8,0 conforme descrito no item 3.9, por 24 horas. Em seguida foram determinadas as atividades de cada amostra, em pH 6,5 e temperatura 30 °C numa solução de lactose 50 g/L e comparado com a atividade inicial da enzima. Os resultados em termos da atividade relativa são apresentados na Tabela 4-3.

Tabela 4-3: Valores da estabilidade da enzima em relação ao pH

pH	Atividade relativa (%)	
	Prozyn	Lactozym
8,0	86,99	98,85
7,0	82,80	100
6,5	94,74	98,95
6,0	100	68,91
5,0	0	0

A atividade relativa foi igual a 100% em pH 7,0 para a enzima Lactozym e pH 6,0 para Prozyn, onde a enzima apresentou maior atividade. Verificou-se que para pH entre 6 e 8 para a enzima Prozyn praticamente não ocorreu desativação, pois a atividade ficou em torno de 80% e 100%. A enzima Lactozym também apresentou atividade relativa entre pH 6,0 e 8,0, porém apresentou atividade relativa de 100% em pH 7,0.

4.1.6 - Determinação da Atividade Enzimática

Os valores obtidos por JURADO et al em 2004 para as enzimas Lactozym e Maxilact foram 3,06 e 3,04 mmol_{glicose}/g_{enzima}h, respectivamente, utilizando solução tampão Na⁺ em solução de ácido cítrico com pH igual a 6,5. A atividade enzimática foi determinada em meio de solução tampão láctico em pH igual a 6,5 a 30 °C. A atividade da

enzima Prozyn e Lactozym , respectivamente, foi 75,03 e 44,6 mmol_{glicose}/g_{enzima}h. Verificou-se que ambas as enzimas apresentaram maior valor de atividade, utilizando solução tampão láctico em pH igual a 6,5.

4.1.7 - Influência da Concentração de Lactose na Atividade de β -galctosidase

As taxas iniciais de reação de hidrólise de lactose pela enzima livre, na ausência de produtos da reação, foram determinadas experimentalmente na faixa de concentração de 10 a 120 g/L e estão apresentadas nas Figura 4-4 e Figura 4-5. Esses resultados foram ajustados ao modelo de Michaelis-Menten conduziram as Equações 4.3 e 4.4 para Prozyn e Lactozym, respectivamente, cujos parâmetros determinados por regressão não linear. Para a enzima Prozyn $K_m=12,47$ g/L e $V_m=0,27$ g/(L.min), com coeficiente de correlação 0,99 e para a Lactozym $K_m=0,09$ g/L e $V_m=7,10$ g/(L.min) e coeficiente de correlação 0,98.

$$V = \frac{0,27.S}{12,47 + S} \quad Eq.4.3$$

$$V = \frac{0,09.S}{7,10 + S} \quad Eq.4.4$$

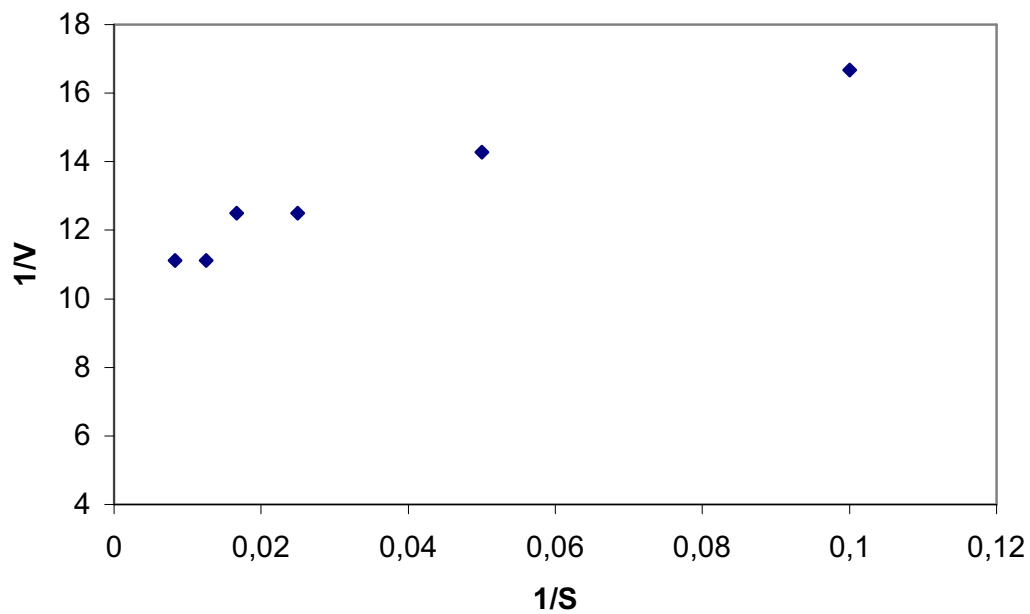


Figura 4-4: Taxas iniciais de reação de hidrólise de lactose em função da concentração da mesma utilizando a enzima Lactozym.

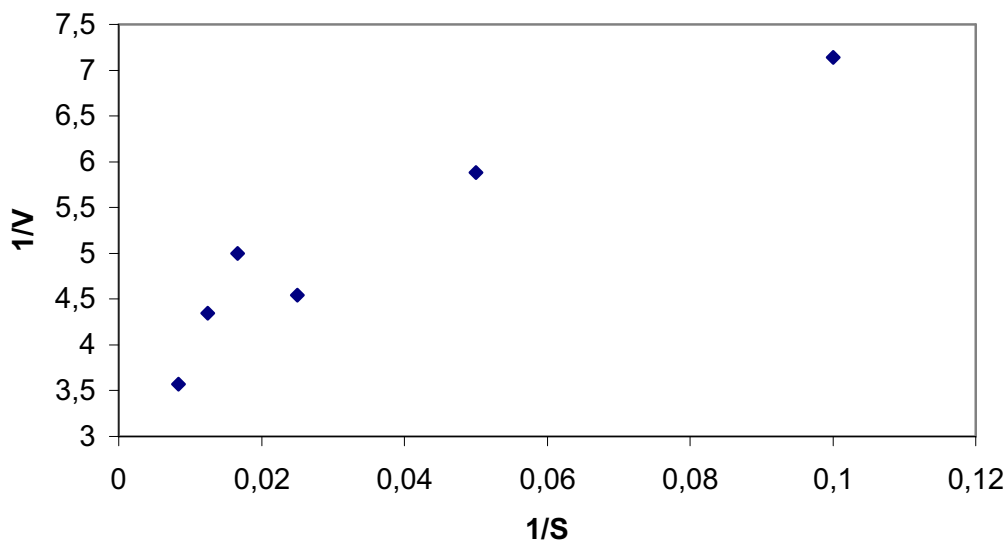


Figura 4-5: Taxas iniciais de reação de hidrólise de lactose em função da concentração da mesma utilizando a enzima Prozyn.

Verifica-se que pelo valor de K_m a enzima Lactozym apresenta maior afinidade pelo substrato, a lactose, atingindo uma eficiência catalítica para baixas concentrações de substrato.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho pode concluir-se que:

- As melhores condições de hidrólise do soro de queijo foram: à temperatura de 45°C e agitação de 300 rpm para Prozyn e Lactozym. O tempo de hidrólise da lactose presente no soro nessas condições é menor quando utilizou-se a enzima Prozyn;
- A atividade enzimática da β -galactosidase é extremamente dependente do pH do meio reacional. A enzima desativa-se rapidamente para valores de pH menores que 6,0 tanto para Prozyn quanto para Lactozym.
- A estabilidade térmica da enzima foi maior a temperatura de 45°C, tanto para a Prozyn quanto para a Lactozym. O tempo de meia vida da Lactozym foi de 99,02 min. enquanto a Prozyn, à 45°C foi de 74,53 min;
- Apesar da enzima Prozyn apresentar melhor resultado de hidrólise, com tempo de hidrólise menor, a enzima Lactozym obteve melhor afinidade pela lactose devido ao valor de K_d menor;
- A atividade enzimática de ambas as enzimas com solução tampão láctico com valor de pH 6,5 foram mais elevados do que com solução tampão de ácido cítrico com pH 6,5 e pH 6,75.

5.2 - SUGESTÕES

Para trabalhos futuros sugere-se:

- Verificar a influência de outra solução tampão na hidrólise do soro de queijo e estabilidade das enzimas;

- Realizar testes de hidrólise do soro de queijo e estabilidade com outras enzimas;
- Estudar a influência da inibição pelo produto e o processo de transferase;
- Estudar a viabilidade da hidrólise de produtos lácteos da indústria de laticínios do município.

6. ANEXOS

A. MÉTODOS ANALÍTICOS

A.1 - ÁCIDO DINITROSSALICÍLICO

Preparação do reagente:

Dissolvia-se à temperatura ambiente, 1 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 20 mL de NaOH 2N e 50 mL de água.

Adicionava-se 30 g de Sal de Rochele (tartaratoduplo de Na e K- $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e completava-se o volume com água destilada até atingir 1000mL. Este frasco era mantido em frasco escuro.

Curva padrão: 1 mL de amostras de soluções de lactose com concentração variando de 0,1 g/L à 1,0 g/L eram adicionadas à 2 mL de DNS, em seguida aquecia-se por 5 min em banho de água fervente. Depois resfia a amostra em água corrente e completava-se o tubo Folin-Wu até 25 mL. A seguir era realizada a leitura da absorbância da amostra à 540nm.

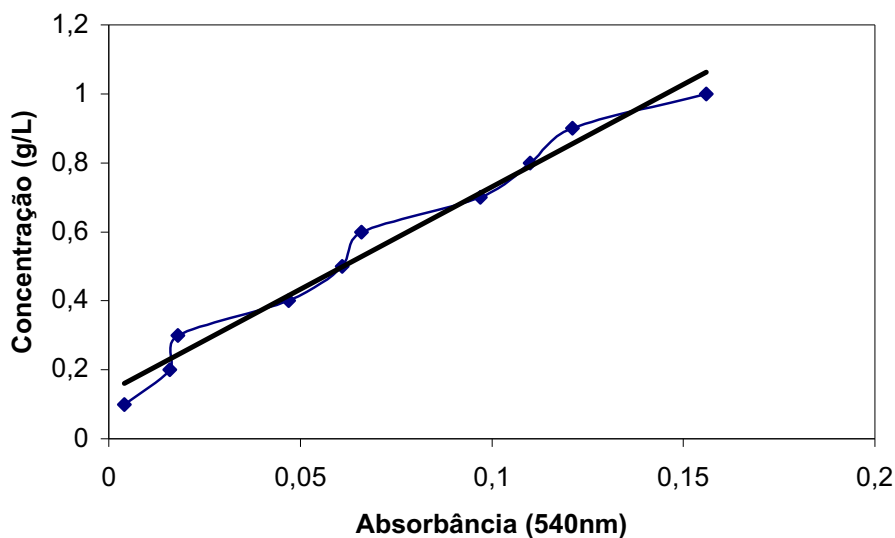


Figura A.1: Curva de calibração para a determinação da concentração de lactose da amostra

Da Figura A.1 obteve-se a equação a seguir:

$$C = 5,93.A + 0,14$$

$$r^2 = 0,97$$

Onde C: concentração de lactose (g/L)

A: Absorbância

A composição da lactose no soro de queijo determinada pela concentração de açúcar redutor pelo método DNS foi de 75%.

A.2 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

Na Tabela A.1 e Tabela A.2 são apresentados os dados de absorbância para a construção da curva padrão utilizada em todos os ensaios para determinação da concentração de glicose.

1 – Preparo da solução mãe de glicose

Pesar exatamente 10 g de glicose anidra P.A e colocar em balão volumétrico de 1000 mL, adicionar água destilada até o menisco. A solução obtida é 10 g/L.

2 – Preparar 6 balões de 100 mL e pipetar:

Balão 1: 5 mL da solução mãe e completar até o menisco – solução final 0,5 g/L

Balão 2: 10 mL da solução mãe e completar até o menisco – solução final 1,0 g/L

Balão 3: 20 mL da solução mãe e completar até o menisco – solução final 2,0 g/L

Balão 4: 30 mL da solução mãe e completar até o menisco – solução final 3,0 g/L

Balão 5: 40 mL da solução mãe e completar até o menisco – solução final 4,0 g/L

Balão 6: 50 mL da solução mãe e completar até o menisco – solução final 5,0 g/L

Balão 7: 60 mL da solução mãe e completar até o menisco – solução final 6,0 g/L

- 3 – Pipetar 0,1 mL de cada solução de glicose, com 10 mL da solução do kit da Labtest.
- 4 – Levar os tubos em banho termostático à 37 °C por 15 min.
- 5- Fazer a leitura da amostra no espectrofotômetro em comprimento de onda 505 nm para absorbância.
- 6 – Determinar a curva de calibração pelo gráfico de concentração (eixo y) versus absorbância (eixo x). Obter a equação por regressão linear, na forma:

$$Conc.(y) = a + b.absorbancia(x)$$

Verifica-se que o coeficiente de correlação linear deve ser o mais próximo de 1, caso não ocorra repetir a curva padrão.

Tabela A.1 : Valores obtidos para a curva de calibração para determinação da concentração de glicose.

Concentração de glicose (g/L)	Absorbância
0,5	0,160
1,0	0,314
2,0	0,648
3,0	0,990
4,0	1,311
5,0	1,548
6,0	1,822

Curva padrão obtida:

$$C = 3,2583.(abs) - 0,0906$$

$$r^2 = 0,996$$

Tabela A.2 : Valores obtidos para a curva de calibração para determinação da concentração de glicose.

Concentração de glicose (g/L)	Absorbância
0,5	0,158
1,0	0,327
2,0	0,686
3,0	1,023
4,0	1,316
5,0	1,646
6,0	1,872

A curva padrão obtida foi:

$$C = 3,1464.abs - 0,0876$$

$$r^2 = 0,9967$$

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABC DA SAÚDE. www.abcdasaude.com.br/artigo.php?269

ABIQ. www.abiq.gov.br

ANDRADE, A.C. Soro de Queijo, utilizando Lactase e *Saccharomyces cerevisiae*. Uberlândia, UFU, 2005. 100 f.

ANUALPEC-ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA. FNP Consultoria & Agroinformativos, 2004.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd ed. Singapore, McGRAW-HILL, 1986.

BLANCH, H. W.; CLARCK, D. S. Biochemical Engineering. New York, Marcel Dekker, Inc, 1997.

BURIN, L.; BUERA, M.P.; HOUGH, G.; CHIRIFE, J. Thermal resistance of β -galactosidase in dehydrated dairy model systems as affected by physical and chemical changes. Food Chemistry, v.76, p.423-430. 2002

BOBBIO, P. A. & ORSATTI, F. Química do Processamento de Alimentos. São Paulo, Livraria Varela. 1992.

CARRARA, C. R.; RUBIOLO, A.C. A method for evaluating lactose hydrolysis in a fixed bed reactor with β -galactosidase immobilized chitosan. Chem Eng J, v. 8, 1997, p.65.

CARUSO, E. C.; OLIVEIRA, A.J. Quantificação de lactose em queijos Minas Frescal. Scientia Agrícola, Piracicaba, v.56, n.1, 1999.

CRUZ, R.; CRUZ, V. d' A; BELOTE, J. G.; KHENAYFES, M. O; DORTA, C.; OLIVEIRA, L. H. Properties of a new fungal β -galactosidase with potential application in the dairy industry. Revista de Microbiologia, v.30, p.265-271, 1999.

EMBRAPA. www.embrapa.gov.br

FERREIRA, R. M. Produção de etanol a partir do soro de queijo utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus*. Uberlândia, UFU, 2003. 69 f.

HATZINIKOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A. D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Modelling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of the whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal, v. 24, p.161-172. 2005

HOLSINGER, V.H.; POSATI, L. P.; De VILDISS, E.D. Whey beverages: a review. J. Of dairy science v. 57 n.8: 849-859. 1974.

HOLSINGER, V. H. Physical and chemical properties of lactose. In: Lactose, water, salts and vitamins, London, Advanced Dairy Chemistry, v.3, p.1-38. 1997

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. Enzyme and Microbial Technology, v. 34, p. 33-40. 2004.

LADERO, M.; FERRERO, R.; VIAN, A.; OCHOA, F.G. Kinetic modelling of the thermal and pH inactivation of thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2. Enzyme and Microbial Technology, v.37, p.505-513. 2005

MINAS AMBIENTE/ CETEC. Pesquisa Tecnológica para Controle Ambiental em Pequenos e Médios Laticínios de Minas Gerais: Estado da Arte. Belo Horizonte, Minas Ambiente/CETEC, v.2, 1998.

NAGODAWITHANA, T. ; REED, G. Enzymes in Food Processing, 3rd ed. San Diego, Academic Press, Inc., 1993.

NOGALES, J.M.R.; DELGADILLO, A. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated β -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration-rehydration method. Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic, v33, p.15-21. 2005

NOVALIN, S.; NEUHAUS, W.; KULBE, K. D. A new innovative process to produce lactose-reduced skim milk. Journal of Biotechnology, p.1-7. 2005

OLIVEIRA, A. P. Leite de beber. Folha de São Paulo, 14 de julho de 2005. Folha Equilíbrio, p. 4-5.

OLIVEIRA, J. S. de. Queijo Fundamentos Tecnológicos. In: Série: Tecnologia Agroindustrial. São Paulo. 1982.

PIVARNIK, L. F.; SENEGAL, A. G.; RAND, A. G. Hydrolytic and transgalactosyl activities of commercial β -galactosidase (lactase) in food processing. Advances in Food and Nutrition Research, New York, v. 38, p.33. 1995

PONSANO, E.H.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Fermentação do soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como alternativa para a redução de sua capacidade poluente. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SBCTA, v. 15, n.1, p. 170-173. 1995.

PORTO, L. M. Estudo e Determinação das Melhores Condições Operacionais do Processo de Produção de Ricota. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UFMG. 2001.

RAMOS, D. C. Utilização do Soro de Queijos. Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Dezembro, 1985.

RICHARDS, N. S. P. S. Emprego Racional do Soro Láctico. Indústria de Laticínios. Mai/Jun 1997. 67-69

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microbial Technology*, v.22, p.67. 1998;

SANTIAGO, P. A. Contribuição ao estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. Uberlândia, UFU, 2002. 83 f.

SANTIAGO, P. A 2; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. Ciência de Tecnologia e Alimentos, Campinas, v.24(4): 567-572, out.-dez. 2004 567.

SCRIBAN, R. Biotecnologia. Editora Manole Ltda. 1985.

TOMÁS, C. M. Estudo da hidrólise da lactose por β -galactosidase na forma livre e imobilizada. Uberlândia, UFU, 1998. 67 f.

TREVISAN, H. C.; BERGAMO, E. P.; CONTIERO, J., HOJO, O; MONTI, R. (1997). β - Galactosidase immobilization on controlled pore, v. 14 n. 4 São Paulo Dez., Brazilian Journal of Chemical Engineering

VALSILJEVIC, T.; JELEN, P. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. Innovative Food Science & Emerging Technologies, v.2, p.75-85. 2001

VEISSEYRE, R. Lactologia Técnica, Zaragoza, Espanha, Editora Acribia. 1972.

WALSTRA, P.; JENNES, R. Química y Física Lactologia, Editora Acribia, S. A., Zaragoza, 1984.

WANG, D. I. C.; COONEY, C. L.; DEMAINE, A. L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A. E.; LILLY, M. D. Fermentation and Enzyme Technology, 1st ed. Canada, John Wiley & Sons, Inc., 1979

WONG, P. N.; JENNESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E. H. Fundamentals of Dairy Chemistry. New York, Van Nostrand Reinhold, p. 279-342. 1988.

ZADOW, J.G. Lactose: proprieties and uses. Journal of Dairy Science. Champaign, v.67, p.2654-2679. 1984