

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE ENZIMAS LACTASE E TEMPERATURAS SOBRE
A HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITE
PASTEURIZADO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Paula Trevisan

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
ENZIMAS LACTASE E TEMPERATURAS SOBRE A
HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITE PASTEURIZADO**

por

Ana Paula Trevisan

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientador: Prof. Ernesto Hashime Kubota

Santa Maria, RS, Brasil

2008

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENZIMAS
LACTASE E TEMPERATURAS SOBRE A HIDRÓLISE DA LACTOSE
EM LEITE PASTEURIZADO**

elaborada por
Ana Paula Trevisan

como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia dos Alimentos

Comissão Examinadora

Prof. Ernesto Hashime Kubota, Dr.
(Presidente/Orientador)

Prof. Neila S.P.S. Richards, Dra.
(Co-orientadora)

Prof. Luisa Helena R. Hecktheuer, Dra. (UFSM)

Prof. Clair Jorge Olivo, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 28 de abril de 2008.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha existência e pelas oportunidades concedidas por ele ao longo de minha vida.

Aos meus pais, Felipe e Claudete, e à minha irmã, Rafaela, pelo carinho e apoio não apenas durante a execução deste trabalho, mas em todos os momentos de minha vida.

Ao meu noivo Douglas, pelo carinho, atenção, compreensão e grande colaboração durante todo o experimento e a redação da dissertação, especialmente nas companhias, caronas e lanches noturnos na UFSM, e às leituras e correções do texto.

Ao professor Ernesto Hashime Kubota e à professora Neila S.P.S. Richards (UFSM), pela orientação prestada durante a elaboração deste estudo, pelas sugestões, pela amizade, pelo respeito e disposição constante.

À professora Rosane Coradine Noal (UFSM), pela grande disposição em ajudar, apoiar e aconselhar em todos os momentos ao longo do experimento, inclusive em questões pessoais.

À UFSM, por me possibilitar a oportunidade de participar desse mestrado, “um sonho realizado”.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, por me auxiliarem e dirimirem dúvidas.

Aos funcionários Marialene Manfio e Moisés Alves Dias, pela disposição e prontidão em auxiliar-me nas técnicas laboratoriais de análise de alimentos, tão conhecidas e praticadas por eles.

À professora Luisa Helena R. Hecktheuer (UFSM) e ao professor Clair Jorge Olivo (UFSM), por me concederem a honra de integrar a banca examinadora.

A todos os colegas de mestrado, especialmente à Diala, pelo auxílio no experimento, principalmente na análise microbiológica.

Às amigas Carline, Laura e Larissa, pela ajuda e pela companhia nos longos períodos de experimento.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENZIMAS LACTASE E TEMPERATURAS SOBRE A HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITE PASTEURIZADO

AUTORA: ANA PAULA TREVISAN
ORIENTADOR: ERNESTO HASHIME KUBOTA
CO-ORIENTADORA: NEILA S. P. S. RICHARDS
Data e local de defesa: Santa Maria, 28 de abril de 2008.

A intolerância à lactose é a intolerância a carboidrato mais comum entre pessoas de todas as faixas etárias e afeta cerca de 70% dos adultos do mundo. Devido à prevalência desta condição na população mundial, tem aumentado o interesse comercial nos leites e derivados com teor reduzido de lactose. E isto pode ser obtido através da hidrólise da lactose, principalmente pelo método enzimático, com a utilização da enzima lactase. O grau de hidrólise da lactose depende da dosagem da β -galactosidase no leite e das condições de processamento e por isto, é extremamente importante avaliar a influência dessas condições para obtenção do leite com teor reduzido de lactose, como temperatura durante a hidrólise e concentração da lactase, sobre a eficiência do processo de hidrólise e sobre as características físico-químicas e microbiológicas do produto final. O objetivo do presente estudo foi observar a influência de diferentes temperaturas e concentrações de enzimas lactase sobre a hidrólise da lactose em leites pasteurizados. Foram utilizadas amostras de leite pasteurizado, proveniente da Usina Escola de Laticínios (UFSM). A enzima lactase, fornecida por duas empresas, foi adicionada ao leite em diferentes concentrações (0,1g/L; 0,2g/L; 0,5g/L; 0,8g/L e 0,9g/L) e a hidrólise foi realizada a diferentes temperaturas (7,9°C; 12°C; 22°C; 32°C e 36,1°C), sendo estas duas variáveis combinadas entre si através da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) por delineamento central composto rotacional. A hidrólise foi acompanhada por crioscopia até que esta se estabilizasse. Foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas antes e após a hidrólise da lactose e análise sensorial após. A adição da enzima lactase modificou características e propriedades físico-químicas do leite, reduzindo pH, crioscopia, teores de gordura e lactose e aumentando densidade, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), teores de proteína e glicose. Houve diferença entre a eficiência das duas enzimas na redução do teor de lactose. A hidrólise da lactose atingiu valores de 80% a 100%, reduzindo o teor de lactose para menos de 1g/100g, possibilitando a ingestão do leite por indivíduos intolerantes a este carboidrato. As maiores porcentagens de hidrólise e, conseqüentemente, os menores teores de lactose foram verificados em temperaturas de 15 a 30°C e com o uso de concentrações de enzima de 0,6 a 1,0 g/L. A média da contagem total após a hidrólise ultrapassou o limite estabelecido pela legislação, porém, nas contagens realizadas por amostra de leite, com o uso da enzima 1, três tratamentos não excederam esse limite e com o uso da enzima 2, sete. Os maiores valores de contagem total foram encontrados nas maiores temperaturas e com o uso de menores concentrações de enzimas. As diferenças entre amostras de leite com teores de lactose diferentes, não foram sensorialmente percebidas através do teste triangular.

Palavras-chave: Leite; hidrólise da lactose; intolerância à lactose; lactase; análise microbiológica; análise sensorial.

ABSTRACT

Master Thesis
Post-Graduation Program in Food Science and Technology
Universidade Federal de Santa Maria

INFLUENCE OF DIFFERENT LACTASE ENZYMES CONCENTRATIONS AND TEMPERATURES OVER THE HYDROLISIS OF LACTOSE IN PASTEURIZED MILK

AUTHOR: ANA PAULA TREVISAN
SUPERVISOR: ERNESTO HASHIME KUBOTA
CO-SUPERVISOR: NEILA S. P. S. RICHARDS
Date and place of defense: Santa Maria, April 28, 2008.

The intolerance to lactose is the most common intolerance to carbohydrates among people of all ages and it affects about 70% of the adult population worldwide. Due to the prevalence of this condition on the world population, the commercial interest on milk and derivatives with reduced amount of lactose has increased. Such product can be obtained through lactose hydrolysis, mainly through the enzymatic method, using lactase enzyme. The level of lactose hydrolysis depends on the dosage of β -galactosidase in milk, as well as on its processing conditions and, for this reason, it is extremely important to evaluate the influence of such conditions concerning obtainment of milk with reduced amount of lactose, such as temperature during hydrolysis and lactase concentration, over the efficiency of the hydrolysis process and over the physical, chemical and microbiological characteristics of the final product. The aim of the present study was to observe the influence of different temperatures and concentrations of lactase enzymes over the lactose hydrolysis in pasteurized milks. Samples of pasteurized milks from the Usina Escola de Laticínios (UFSM) were used. Lactase enzyme, supplied by two companies, was added to the milk in different quantities (0.1g/L; 0.2g/L; 0.5g/L; 0.8g/L e 0.9g/L) and hydrolysis was accomplished in different temperatures (7.9°C; 12°C; 22°C; 32°C e 36.1°C). These two variables were combined through Response Surface Methodology (RSM) by rotational composed central delineation. Hydrolysis was followed by crioscopy until it reached stabilization. Physical, chemical and microbiological analysis were carried out before and after lactose hydrolysis, and sensorial analysis was carried out after hydrolysis. Lactase enzyme input modified physical and chemical properties and characteristics of milk, reducing pH, crioscopy, fat and lactose levels and increasing density, total dry extract (TDE), free-fat dry extract (FDE), glucose and protein levels. There was a difference between the efficiency of the two enzymes on the reduction of the lactose level. Lactose hydrolysis reached values in between 80% and 100%, reducing lactose level to less than 1g/100g, thus enabling milk ingestion by individuals who are intolerant to this carbohydrate. Higher percentages of hydrolysis and, consequently, lower lactose levels were verified in temperatures in between 15 and 30°C, using enzyme concentrations in between 0.6 and 1.0 g/L. The average total count after hydrolysis was beyond the limit established by law, but concerning the count per milk sample, using enzyme 1 and 2, treatments three and seven did not exceed this limit, respectively. Higher values of total count were found at the highest temperatures and using lowest enzyme concentrations. Differences among milk samples with different lactose levels were not sensorially perceived through triangular test.

Key words: Milk; lactose hydrolysis; lactose intolerance; lactase; microbiological analysis; sensorial analysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química da lactose.....	16
FIGURA 2 – Hidrólise da lactose.....	18
FIGURA 3 – Modelo central composto rotacional para 2 fatores.....	28
FIGURA 4 – pH do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.....	33
FIGURA 5 – pH do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.....	33
FIGURA 6 – Densidade do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.....	35
FIGURA 7 – Densidade do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.....	36
FIGURA 8 – Crioscopia do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.....	37
FIGURA 9 – Crioscopia do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.....	37
FIGURA 10 – Percentual de hidrólise estimada, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.....	38
FIGURA 11 – Percentual de hidrólise estimada, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.....	39
FIGURA 12 – Valor estimado de lactose final conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.....	40
FIGURA 13 – Valor estimado de lactose final conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.....	41
FIGURA 14 – Percentual de hidrólise encontrada, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.....	42
FIGURA 15 – Percentual de hidrólise encontrada, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.....	43

FIGURA 16 – Valor encontrado de lactose, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.....	44
FIGURA 17 – Valor encontrado de lactose, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.....	45
FIGURA 18 – Valor estimado de lactose durante a hidrólise, para as enzimas 1 e 2, na temperatura de 12 °C e nas concentrações de enzima de 0,2 e 0,8 g/L.....	47
FIGURA 19 – Valor estimado de lactose durante a hidrólise, para as enzimas 1 e 2, na temperatura de 22 °C e nas concentrações de enzima de 0,1; 0,5 e 0,9 g/L.....	47
FIGURA 20 – Valor estimado de lactose durante a hidrólise, para as enzimas 1 e 2, na temperatura de 32 °C e nas concentrações de enzima de 0,2 e 0,8 g/L.....	48
FIGURA 21 – Valor estimado de lactose durante a hidrólise, para as enzimas 1 e 2, nas temperaturas de 7,9 e 36,1 °C e na concentração de enzima de 0,5 g/L.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição aproximada do leite (% em peso).....	14
TABELA 2 – Aplicações biotecnológicas da enzima β -galactosidase.....	22
TABELA 3 – Variáveis independentes e níveis de variação.....	29
TABELA 4 – Delineamento experimental para as duas variáveis independentes.....	30
TABELA 5 – Parâmetros físico-químicos da matéria-prima e das amostras após a reação de hidrólise.....	31
TABELA 6 – Quantidades de lactose final estimadas para cada temperatura, enzima e concentração utilizadas.....	46
TABELA 7 – Contagem total da matéria-prima e das amostras após a reação de hidrólise.....	50
TABELA 8 – Contagem total de microrganismos presentes nas amostras e período por tratamento e enzima utilizada.....	51

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 Leite.....	13
3.2 Lactose.....	16
3.2.1 Hidrólise da lactose.....	17
3.2.2 Intolerância à lactose.....	19
3.3 Lactase.....	21
3.4 Análise Sensorial.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Material.....	24
4.1.1 Matéria-prima.....	24
4.1.2 Enzima lactase.....	24
4.2 Métodos.....	24
4.2.1 Tratamentos.....	24
4.2.2 Análises físico-químicas.....	25
4.2.3 Análise microbiológica.....	26
4.2.4 Análise sensorial.....	26
4.2.5 Planejamento estatístico.....	27
4.2.6 Análises estatísticas.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Análises físico-químicas.....	31
5.2 Análise microbiológica.....	50
5.3 Análise sensorial.....	52
6 CONCLUSÕES.....	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado o mais nobre dos alimentos, pois sua composição rica em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas, proporciona nutrientes e proteção imunológica ao neonato, e além de suas propriedades nutricionais, oferece elementos anticarcinogênicos (MÜLLER, 2002). Porém, cerca de 70% da população adulta do mundo não pode consumir este alimento, pois é incapaz de digerir a lactose, principal carboidrato do leite (BEYER, 2002; SCHLIMME, BUCHHEIM, 2002).

A intolerância à lactose é a reação adversa a carboidrato mais comum e afeta pessoas de todas as faixas etárias. É causada por uma deficiência de lactase, a enzima que digere o açúcar do leite. A lactose que não é hidrolisada em galactose e glicose permanece no intestino e atua osmoticamente para atrair a água para o intestino. As bactérias colônicas fermentam a lactose não digerida, gerando ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono e gás hidrogênio, podendo resultar em inchaço, flatulência, cólicas e diarreia (BEYER, 2002). A severidade desses sintomas depende da quantidade ingerida e da quantidade de lactose que cada pessoa pode tolerar (SUENAGA *et al.*, 2001).

Em vários estudos, a ingestão de leite com lactose hidrolisada tem reduzido os sintomas em pessoas intolerantes a esse carboidrato (VESA, MARTEAU, KORPELA, 2000). A hidrólise da lactose é um processo promissor para a indústria de alimentos, pois possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição (LONGO, 2006) ou com um teor reduzido desse carboidrato, que pode ser consumido por indivíduos intolerantes, além de prevenir a cristalização da lactose na produção de sorvetes, de produtos fermentados como o iogurte, de leite condensado e doce de leite (CARMINATTI, 2001; SANTIAGO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2005).

A hidrólise enzimática, através da enzima β -galactosidase, é um dos métodos mais interessantes para redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados (MATIOLI *et al.*, 1994), sendo que o grau de hidrólise da lactose depende da dosagem da lactase no leite e das condições de processamento (VINHAL, 2001).

Assim sendo e tendo em vista os fatos acima, torna-se extremamente importante avaliar a influência das condições de processamento para obtenção do leite com teor reduzido de lactose, como temperatura durante a hidrólise e concentração da lactase, sobre a eficiência do processo de hidrólise e sobre as características físico-químicas e microbiológicas do produto final.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado.

2.2 Objetivos específicos

- Acompanhar a hidrólise da lactose e comparar o máximo percentual de hidrólise alcançado e o tempo para atingir este valor conforme temperatura, enzima utilizada e sua concentração.

- Avaliar a eficiência de enzimas de marcas diferentes na hidrólise da lactose.

- Determinar e comparar as características físico-químicas do leite antes e após a redução do teor de lactose.

- Determinar e comparar as características microbiológicas do leite antes e após a hidrólise da lactose.

- Comparar as características sensoriais dos leites com teores reduzidos de lactose, verificando a percepção de diferenças entre amostras com teores de lactose diferentes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leite

Segundo a legislação brasileira, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). É um alimento líquido que contém aproximadamente 86% de água e está constituído por uma mistura de várias substâncias como lactose e minerais em solução, proteínas, gorduras na forma de emulsão, vitaminas e gases (ORNELLAS, 1995).

Desde os primórdios da civilização, o leite tem sido utilizado na alimentação humana como fonte de proteína, gordura, energia e outros constituintes essenciais (TRONCO, 2003). É considerado a primeira fonte de nutrientes para os mamíferos e a maior fonte de cálcio absorvível à disposição do homem (SOUSA, RIBEIRO, 2005). Para Müller (2002), o leite é considerado o mais nobre dos alimentos, pois sua composição rica em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas, proporciona nutrientes e proteção imunológica ao neonato, e além de suas propriedades nutricionais, oferece elementos anticarcinogênicos, presentes na gordura, como o ácido linoléico conjugado, esfingomiéline, ácido butírico, β caroteno, vitaminas A e D.

Vários são os componentes do leite. O que se apresenta em maior proporção é a água, sendo os demais formados principalmente por gordura, proteínas e carboidratos, todos sintetizados na glândula mamária e encontrados em solução na água. Existem também pequenas quantidades de substâncias minerais, substâncias hidrossolúveis transferidas diretamente do plasma sanguíneo, proteínas específicas do sangue e traços de enzimas (TRONCO, 2003). Na Tabela 1 é apresentada a composição aproximada do leite.

Tabela 1 – Composição aproximada do leite (% em peso).

Água			87,0
Extrato seco total	Gordura		4,2
	Extrato seco desengordurado	proteínas.....3,3 caseína.....2,7 prot. do soro.....0,6 prot. da membrana do glóbulo de gord....0,04 lactose.....4,7 minerais.....0,65 ác. orgânicos.....0,18 compostos orgânicos minoritários.....0,14	8,8
			13,0

Fonte: SCHLIMME, BUCHHEIM (2002) (adaptado).

A água é o componente mais abundante, no qual se encontram em solução os demais compostos. A gordura do leite está formada, em sua maior proporção, por triglicerídeos (97-98%), pequenas quantidades de esteróis, ácidos graxos livres e fosfolípidos. Os glóbulos de gordura encontram-se protegidos por uma membrana de natureza protéica, na qual ficam associados fosfolípidos, proteínas e outras substâncias. As proteínas do leite são subdivididas em caseína (80%) e proteínas do soro (20%). A caseína é uma substância coloidal, complexa, associada ao cálcio e ao fósforo, podendo ser coagulada por ação de ácidos, coágulo e/ou álcool e é formada por várias submicelas α (α_{S1} , α_{S2}), β , γ e κ , mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas, apresentando um comportamento distinto frente ao cálcio. As proteínas do soro são formadas pelas frações: albumina do soro, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas e protease-peptonas. A lactose encontra-se totalmente em solução verdadeira na fase aquosa do leite. As substâncias minerais são designadas cinzas e são formadas pelo cálcio, que representa um papel muito importante para a saúde humana, fósforo, e quantidades pequenas de sódio, potássio, magnésio, flúor, iodo, enxofre, cobre, zinco, ferro, entre outras. O leite contém ainda diversas vitaminas, classificadas como lipossolúveis (A, D, E, e K) e hidrossolúveis (B e C) (TRONCO, 2003).

A composição do leite é característica para cada espécie e, portanto, diferente entre elas. Também varia dentro de uma mesma espécie de acordo com raça, idade, estágio de lactação, alimentação, manejo e estado sanitário dos animais (SCHLIMME, BUCHHEIM,

2002). E ainda sofre influência do ambiente, através da estação do ano (variações sazonais) e da temperatura ambiental (TRONCO, 2003). Porém, embora exista essa variação, as relações entre os diversos constituintes do leite são muito estáveis, podendo ser utilizadas para indicar se houve adulteração na sua composição (Blowey *apud* ANDRADE, 2005).

Por sua composição completa e balanceada, o leite é um substrato ideal para o desenvolvimento de diversos grupos de microrganismos. Os componentes do leite, incluindo proteína, gordura, lactose e outros constituintes menores, são considerados substratos passíveis de serem utilizados e degradados por estes microrganismos. Bactérias, leveduras, fungos, vírus e outros podem provocar significativas alterações no leite e mesmo sua contaminação, sendo o grupo das bactérias o com maior representatividade. Estas alterações podem ocorrer devido à produção de ácido (bactérias lácticas) e gás (coliformes), aumento da viscosidade do leite (*Alcaligenes viscolatis*, *Aerobacter aerogenes* e certos micrococos), proteólise (*Bacillus*), lipólise (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, leveduras do gênero *Candida*, fungos do gênero *Penicillium*), produção de sabores variados (a malte – bactérias lácticas, amargos – bactérias proteolíticas, de batata – *Pseudomonas graveolens*, a sujo – bactérias coliformes, a medicamento – *Aerobacter aerogenes*, a leveduras) e produção de cor (TRONCO, 2003). Além destas alterações, a proliferação dos microrganismos pode trazer prejuízos à saúde do consumidor e causar problemas no processamento industrial (VINHAL, 2001).

Os fatores higiene, tempo e temperatura são fundamentais na qualidade microbiológica do leite e determinam a contagem bacteriana. A taxa de multiplicação dos diferentes tipos de microrganismos está relacionada diretamente com a temperatura de armazenamento do leite (TRONCO, 2003). A população de coliformes, por exemplo, duplica a cada 20 a 30 minutos quando o leite é submetido à temperaturas de 25 a 40 °C, enquanto que mantido sob temperaturas de 2 a 5°C, reduz-se a possibilidade de multiplicação das bactérias capazes de transformar a lactose em ácido láctico (VINHAL, 2001). Segundo Kocián (*apud* LONGO, 2006), a temperatura de 40°C é ideal para a proliferação de microrganismos patogênicos no leite. Por estes motivos, é preciso cuidado no processamento do leite, procurando evitar a proliferação dos microrganismos e os problemas decorrentes dela.

As principais propriedades físico-químicas do leite são: pH, que varia de 6,4 a 6,9 (TRONCO, 2003); acidez, que varia de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico em 100mL; densidade relativa, que varia de 1.028 a 1.034 g/mL e índice crioscópico máximo de -0,512°C (BRASIL, 2002). Essas propriedades auxiliam na caracterização do leite e determinação da sua qualidade.

O índice crioscópico é definido como a temperatura em que o leite passa do estado líquido para o estado sólido (TRONCO, 2003). O ponto de congelamento do leite, assim como o de qualquer solução aquosa, está diretamente relacionado com a concentração dos constituintes solúveis na solução (MONTIPÓ, 1992). Por este motivo e por ser a mais constante das características do leite, é a propriedade físico-química mais eficiente na análise qualitativa do leite. O ponto de congelamento é determinado principalmente pela concentração dos componentes em solução como lactose, alguns minerais, certas proteínas e gases como o oxigênio, nitrogênio e dióxido de carbono, sendo que entre estes, os componentes de baixo peso molecular, como a lactose e os cloretos são os que o afetam em maior grau (Pinkerton, Peters *apud* MONTIPÓ, 1992).

3.2 Lactose

Como pode ser observado na Tabela 1, a lactose é o componente majoritário do extrato seco do leite, podendo variar de 4,5 a 5,2 g% conforme alimentação e intervalos de lactação. É também o principal carboidrato do leite de vaca (SCHLIMME, BUCHHEIM, 2002). Sua concentração é relativamente constante e está pouco sujeita à variações estacionais (MAHAUT *et al.*, 2004).

A lactose é um dissacarídeo constituído por um radical β -D-galactose e um radical D-glicose e é considerada um açúcar redutor, porque o grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, portanto, ela está livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2000). Na Figura 1 está representada a estrutura química da lactose.

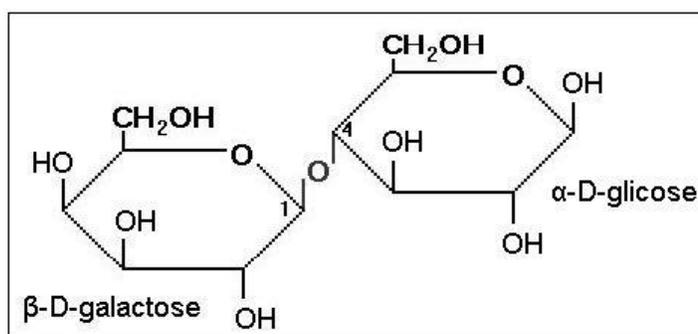


Figura 1 – Estrutura química da lactose.

Fonte: CAMPBELL (2000).

A lactose tem como características a baixa solubilidade em água (15 a 20%) e o baixo poder adoçante, quando comparada a outros açúcares (TOMÁS, 1998; TRONCO, 2003). Quando comparada com a sacarose, é cerca de dez vezes menos solúvel (Valsechi *apud* LONGO, 2006) e apresenta um poder edulcorante seis vezes inferior (MAHAUT *et al.*, 2004).

Faz parte, juntamente com as substâncias minerais, como fósforo, sódio e cloretos, das substâncias com atividade osmótica do leite. A retirada da lactose pode provocar uma redução de mais de 50% do ponto de congelamento (SCHLIMME, BUCHHEIM, 2002).

A molécula de lactose contém um número de sítios ativos que a tornam sensível a modificações enzimáticas e/ou químicas, sendo esta uma característica comum aos carboidratos (CARMINATTI, 2001).

Fisiologicamente, a lactose é uma substância energética e seus monossacarídeos entram na constituição de cerebrosídeos, abundantes na massa cerebral e mielina nervosa (Behmer, Eskin *apud* CARMINATTI, 2001). No organismo humano age como uma promotora na absorção e retenção de cálcio no intestino e na absorção de magnésio e manganês (MANAN, KARIM, KIT, 1999). Também prolonga a ação da vitamina D, em caso de redução da radiação solar, e ajuda na prevenção do raquitismo e da osteomalácia (Kocián *apud* LONGO, 2006). A utilização da lactose pela microflora intestinal resulta na produção de ácido láctico e na diminuição do pH, promovendo o desenvolvimento da microflora intestinal lactofílica desejável, inibindo o desenvolvimento de bactérias putrefativas e patogênicas (TRONCO, 2003).

3.2.1 Hidrólise da lactose

É uma reação necessária para a digestão da lactose. A lactose é hidrolisada pela enzima lactase, a nível de mucosa intestinal, em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose, carboidratos mais simples, que são melhor absorvidos pelo organismo (CAMPBELL, 2000; BEYER, 2002).

Na Figura 2 está representada a reação de hidrólise da lactose.

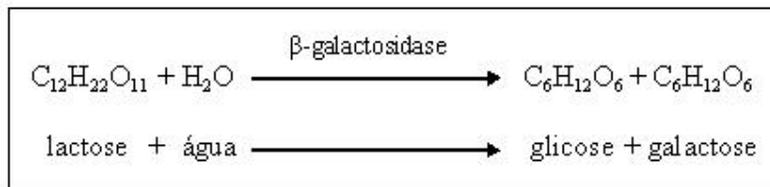


Figura 2 – Hidrólise da lactose.

Fonte: Goursaud *apud* LONGO (2006).

Segundo Schlimme e Buchheim (2002), a hidrólise da lactose é cada vez mais importante para seu uso alimentar, pois modifica a solubilidade da lactose, o dulçor, o poder redutor e a fermentabilidade e consegue-se, sobretudo, fazer com que seja digerível pelos consumidores intolerantes a esse carboidrato. Devido ao alto nível de lactose presente no leite, o consumo deste alimento fica restrito para as pessoas intolerantes e, por este motivo, a redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados é de grande importância nutricional e comercial (SILVA, CARDOSO, 2007).

É um processo promissor para a indústria de alimentos porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição (LONGO, 2006) ou com um teor reduzido desse carboidrato, para pessoas com intolerância à lactose, além de prevenir a cristalização da lactose na produção de sorvetes, de produtos fermentados como o iogurte, de leite condensado e doce de leite (CARMINATTI, 2001; SANTIAGO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2005).

A hidrólise ocasiona modificações físicas e químicas dos produtos, pois aumenta a solubilidade, o poder adoçante e a digestibilidade dos açúcares e a viscosidade, o corpo, a textura e o paladar dos produtos (VINHAL, 2001; Louserma *apud* ANDRADE, 2005).

Existem dois métodos utilizados para a hidrólise da lactose: o método ácido e o método enzimático. Na hidrólise ácida, a reação é muito rápida, mas envolve soluções diluídas de ácido fortes como sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura ($1,0 < \text{pH} < 2,0$; $100 < \text{temperatura} < 150^\circ\text{C}$), e por isto tem sua aplicação comercial na indústria alimentícia restrita, pois acarreta alterações no sabor e cor dos alimentos (LADERO, SANTOS, GARCÍA-OCHOA, 2000; SANTIAGO, 2002). Já a hidrólise enzimática, pode ser aplicada no leite sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as propriedades nutricionais da matéria-prima, aumentando seu dulçor (LADERO, SANTOS, GARCÍA-OCHOA, 2000). Por ser realizada sob condições operacionais consideravelmente mais brandas ($3,5 < \text{pH} < 8,0$; $5 < \text{temperatura} < 60^\circ\text{C}$), reduz não só a

possibilidade de alteração dos compostos sensíveis ao calor, como as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do meio sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis (Gekas, Lopez-Leiva; Bailey, Ollis *apud* ANDRADE, 2005).

Para a elaboração dos leites com lactose hidrolisada, considerados leites modificados, em escala industrial, usa-se a técnica de eliminação da lactose por ultrafiltração ou a hidrólise da lactose em resinas catalíticas por enzimas livres ou imobilizadas, em um reator enzimático de membrana (MAHAUT *et al.*, 2004). Segundo Silva e Cardoso (2007), o processo de hidrólise, na maioria das vezes, é realizado utilizando enzimas livres e estas deixam o reator juntamente com o produto, não sendo possível a sua reutilização.

Segundo Matioli *et al.* (1994), a hidrólise enzimática, através da enzima β -galactosidase, é um dos métodos mais interessantes para redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados.

As enzimas utilizadas podem ser de origem microbiana (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*) ou fúngica (*Aspergillus niger*, *Aspergillus orizae*) (MAHAUT *et al.*, 2004). A estabilidade e atividade da enzima depende da fonte de onde procede e por razões de segurança, a β -galactosidase é extraída geralmente das leveduras alimentares *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* (GACESA, HUBBLE, 1990).

O grau de hidrólise da lactose depende da dosagem da lactase no leite e das condições de processamento (VINHAL, 2001).

3.2.2 Intolerância à lactose

A intolerância aos alimentos é uma reação reproduzível, desagradável (adversa) a um alimento específico ou a um ingrediente alimentício que não oferece bases psicológicas e que ocorre sempre que o alimento é ingerido. Pode ocorrer devido a uma falha do processo digestivo, que depende da ação de enzimas capazes de degradar os alimentos, em virtude de deficiências enzimáticas (LESSOF, 1996).

A intolerância à lactose é a reação adversa a carboidrato mais comum e afeta pessoas de todas as faixas etárias. É causada por uma deficiência de lactase, a enzima que digere o açúcar do leite. A lactose que não é hidrolisada em galactose e glicose permanece no intestino e atua osmoticamente para atrair a água para o intestino. As bactérias colônicas fermentam a lactose não digerida, gerando ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono e gás hidrogênio. Pode resultar em inchaço, flatulência, cólicas e diarreia (BEYER, 2002). A severidade dos sintomas depende da quantidade ingerida e da quantidade de lactose que cada

pessoa pode tolerar (SUENAGA *et al.*, 2001). O método diagnóstico mais utilizado é simples, através da presença de hidrogênio no ar expirado, pois a fermentação da lactose origina esse gás, que é absorvido e posteriormente expulso na expiração (LESSOF, 1996).

Com exceção da população da Europa do Norte e Central e seus descendentes na América e na Austrália, 70 a 100% dos adultos do mundo são intolerantes à lactose. Na América do Sul, a prevalência de intolerância a esse carboidrato é de 65 a 75% (VRESE *et al.*, 2001). Segundo During *apud* Longo (2006), esta é uma das mais comuns desordens genéticas. E dados existentes indicam que a população tolerante tende a diminuir (OLIVEIRA, 2005).

Existem três tipos de intolerância à lactose, decorrentes de diferentes processos. A deficiência congênita de lactase, que é um defeito genético muito raro e manifesta-se nos recém-nascidos logo após a primeira ou segunda ingestão de leite, sendo uma condição permanente. Na intolerância ontogenética à lactose ou hipolactasia tipo adulto, as manifestações clínicas são menos intensas e mais tardias, e ocorre devido a uma tendência natural de diminuição da produção de lactase com o avançar da idade. A intolerância secundária à lactose é a mais comum e pode ocorrer em consequência de doenças que causam algum tipo de dano à mucosa intestinal, ou após todas as cirurgias no aparelho digestivo, ou também em prematuros em que uma imaturidade enzimática associada a um processo infeccioso pode levar à intolerância (SUENAGA *et al.*, 2001; FARIAS, FAGUNDES NETO, 2004; LONGO, 2006).

Quanto ao tratamento, no caso de intolerância congênita à lactose, existe a necessidade de seguimento de dieta isenta de lactose. Se a deficiência enzimática for adquirida, essa forma de se alimentar não é permanente, podendo-se retornar à dieta habitual após a resolução do problema. No caso de deficiência ontogenética, como existe apenas uma diminuição de atividade enzimática, não há a necessidade de excluir a lactose completamente da dieta, bastando haver uma redução da quantidade de leite e derivados de acordo com a tolerância individual (FARIAS, FAGUNDES NETO, 2004).

A maioria dos adultos intolerantes à lactose pode consumir uma pequena quantia da mesma (6 a 12g) sem sintomas principais, especialmente quando consumida com refeições ou na forma de iogurte com culturas ativas (BEYER, 2002). A enzima lactase e os derivados de leite tratados com ela estão disponíveis para pessoas que não digerem a lactose e possuem desconforto com a ingestão de leite (BEYER, 2002). Em vários estudos, a ingestão de leite com lactose hidrolisada tem reduzido os sintomas em pessoas intolerantes a esse carboidrato (VESA, MARTEAU, KORPELA, 2000). Essa seria a melhor alternativa para pessoas

intolerantes, inclusive porque não se deve deixar de ingerir leite e produtos lácteos, pois eles fazem parte de uma dieta equilibrada, sendo ricos em nutrientes como proteínas e cálcio, que são vitais para que o organismo seja forte e saudável (SPG, 2006). Segundo Moriwaki e Matioli (2000), a redução ou eliminação do leite e seus derivados da dieta de crianças intolerantes à lactose pode comprometer a absorção de proteína e riboflavina, além do cálcio.

3.3 Lactase

Lactase é o nome usualmente utilizado para denominar a enzima β -D-galactosidase galactohidrolase. É classificada como uma hidrolase e catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à β -D-galactose e α -D-glicose (CARMINATTI, 2001; ANDRADE, 2005; OLIVEIRA, 2005; LONGO, 2006). Essa enzima está presente em todos os filhotes de mamíferos desde o nascimento, estando muito diminuída nos adultos à exceção dos humanos que, dependendo principalmente da etnia, têm menor ou maior atividade da mesma. Ela está localizada em todo o intestino delgado e não sofre influência na quantidade e atividade com a ingestão de lactose e outros açúcares (FARIAS, NETO, 2004).

O uso da β -galactosidase para produzir quantidades pequenas de leite com baixo teor de lactose para alimentação de crianças e adultos foi feito durante anos em clínicas médicas. Mas o interesse comercial no produto acentuou-se nos anos sessenta, estimulado pela oportunidade de vender mais leite e pela necessidade de encontrar novas aplicações para o soro de queijo (MAHONEY, 1997).

A lactase pode ser empregada para elaboração de produtos lácteos com teor reduzido de lactose, minimizando problemas de arenosidade causada pela cristalização da lactose e formando açúcares de maior poder adoçante e de maior solubilidade (EVANGELISTA, 2001; ANDRADE, BRANDÃO, ALVIM, 2004).

A β -galactosidase apresenta diversas potencialidades de utilização, que se encontram sintetizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Aplicações biotecnológicas da enzima β -galactosidase

Produção de leite com teor reduzido de lactose
Obtenção de produtos derivados do leite com baixa concentração de lactose
Produção de iogurtes adoçados
Incorporação em medicamentos para combater a intolerância à lactose
Obtenção de concentrados para sorvetes com baixa concentração de lactose
Produção de xaropes alimentares
Tratamento enzimático na produção de queijo
Processamento da lactose contida no soro e permeado de soro

Fonte: OLIVEIRA, 2005.

A enzima lactase encontra-se espalhada na natureza e pode ser isolada a partir de vegetais (como pêssago, damasco, maçã e amêndoas), órgãos animais (como intestino, cérebro, testículos e placenta), bactérias, leveduras (enzima intracelular) e fungos (enzima extracelular), sendo que a grande vantagem dos microrganismo em relação aos vegetais é o fato de atingirem produtividades maiores (SANTIAGO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2005).

Destas várias fontes de lactase, nem todas são aceitas ou reconhecidas como seguras quando a enzima está sendo utilizada em processos alimentícios. Preparações enzimáticas a partir de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces sp. (lactis ou marxianus)* são consideradas seguras, porque já têm sido bastante utilizadas e submetidas a numerosos estudos (Gekas, López-Leiva *apud* CARMINATTI, 2001). Segundo a legislação brasileira, a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente de levedura *Kluyveromyces lactis* (BRASIL, 2003c).

De acordo com a fonte da enzima, as suas propriedades, a temperatura e o pH ótimo diferem (CARMINATTI, 2001; ANDRADE, 2005; OLIVEIRA, 2005).

A faixa de pH e a temperatura ótimas para a lactase variam de 3,0 a 7,3 e de 30 a 60°C, respectivamente, sendo que as melhores condições operacionais para a enzima recomendada pela legislação vai do pH 6,9 ao 7,3 a uma temperatura de 35°C (Segel *apud* ANDRADE, 2005).

3.4 Análise Sensorial

A análise sensorial é uma disciplina científica utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ABNT, 1993b).

As características sensoriais de um leite normal são: aspecto líquido, odor e sabor característicos, sem odores nem sabores estranhos, sendo o sabor ligeiramente adocicado, devido principalmente ao seu conteúdo de lactose e coloração branco-amarelada e opaca, devido à dispersão da luz pelas micelas de fosfocaseinato de cálcio e dos glóbulos de gordura (cor branca) e também ao caroteno e à riboflavina (cor amarelada) (VINHAL, 2001; BRASIL, 2002).

Os testes sensoriais, os quais utilizam os órgãos dos sentidos humanos como "instrumentos", devem ser incluídos como garantia de qualidade por tratarem-se de uma medida multidimensional integrada, que possui importantes vantagens, como por exemplo, determinar a aceitação de um produto por parte dos consumidores (CARDELLO, CARDELLO, 1998).

De fato, a importância de se avaliar os alimentos sensorialmente é de proporcionar ao consumidor prazer em consumir o produto, para que este seja aceito no mercado e, finalmente, se torne um hábito alimentar. Com isso, a avaliação sensorial se torna um suporte técnico tanto para a pesquisa quanto para a indústria e o marketing (LONGO, 2006).

Dentre os objetivos da avaliação sensorial está comparar produtos alimentícios a fim de detectar diferenças entre eles com base nos atributos sensoriais que os caracterizam. Para isso, existem diversos métodos que podem ser utilizados, e um deles é o teste triangular, que é um método sensorial discriminativo, onde se verifica se existe diferença entre duas amostras submetidas a tratamentos diferentes (SGS, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matéria-prima

Para a realização deste estudo, foi utilizado leite pasteurizado da marca UNI, cedido pela Usina Escola de Laticínios, pertencente à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Segundo a legislação (BRASIL, 2002), as amostras utilizadas enquadraram-se como leites semi-desnatados, pois os teores de gordura destas ficaram na faixa de 0,6 a 2,9g/100g de leite. Optou-se por utilizar leite com menor teor de gordura no experimento para que esta não interferisse sobre a reação de hidrólise, podendo minimizá-la. As amostras foram retiradas na Usina Escola e transportadas para o Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria para que fossem realizadas as análises.

4.1.2 Enzima Lactase

Foram utilizadas enzimas de duas marcas comerciais diferentes, que serão citadas ao longo da dissertação como enzimas 1 e 2. Os nomes das marcas foram omitidos para preservá-las e evitar qualquer tipo de constrangimento ou prejuízo pelos possíveis resultados encontrados. Estas enzimas eram provenientes de leveduras *Kluyveromyces lactis*, conforme especificação da legislação (BRASIL, 2003a), que são obtidas comercialmente através da fermentação de uma cepa selecionada e específica desta levedura. Segundo informações técnicas de uma das marcas, a enzima em questão pode atuar em uma ampla faixa de temperatura, que varia de 6°C a 40°C. As enzimas foram armazenadas durante todo o período do experimento em local refrigerado, visando a manutenção da sua viabilidade.

4.2 Métodos

4.2.1 Tratamentos

Foram utilizadas cinco temperaturas: 7,9°C; 12°C; 22°C; 32°C e 36,1°C; e cinco diferentes concentrações de enzima: 0,1g/l; 0,2g/l; 0,5g/l; 0,8g/l e 0,9g/l; combinadas entre si através da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Para determinar os valores de temperatura e concentrações de enzima, foi delimitado um valor para o ponto central e a partir deste valor, foram calculados os demais utilizando a Equação 2, que será apresentada e

melhor discutida no item 4.2.5, que trata do planejamento estatístico do experimento. Os leites foram colocados em frascos autoclaváveis, e a seguir foram colocados em banho ultratermostatizado, regulado na temperatura pré-estabelecida. Foram utilizados quatro frascos por tratamento, dois para o controle da crioscopia e para as análises físico-químicas de cada enzima e dois para as análises microbiológicas, que permaneceram fechados durante todo o tratamento. Após o leite atingir a temperatura desejada, foram adicionadas as enzimas. O acompanhamento da hidrólise da lactose foi feito através de análise de crioscopia, realizada em intervalos de 1 hora. Com esses valores, foi feita uma estimativa da porcentagem de hidrólise, utilizando-se a Equação 1, recomendada por uma das empresas fornecedoras da enzima (*apud* Longo, 2006).

$$\% \text{ de Hidrólise alcançada} = 350,877 \times (\text{Crioscopia final}) - \frac{(\text{Crioscopia inicial})}{0,00285} \quad (1)$$

O tratamento foi encerrado quando a crioscopia estabilizou, ou seja, não aumentou em medidas consecutivas. Após o fim dos tratamentos, o leite passou por um processo de pasteurização lenta, onde foi deixado a 63°C por 30 minutos (MAHAUT *et al.*, 2004). Este processo foi feito com o intuito de inativar a enzima e reduzir a carga microbiana presente devido ao manejo do leite e à adição da enzima. Vinhal (2001) comprovou que à temperaturas superiores a 40°C, a lactase apresenta baixa estabilidade térmica.

4.2.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas descritas abaixo foram realizadas no leite antes e após a hidrólise da lactose.

- Acidez total titulável: foi determinada por meio de titulação da amostra com solução Dornic (0,11 N), utilizando como indicador a fenolftaleína, segundo metodologia oficial (BRASIL, 2006);

- pH: foi determinado por medida direta com pHmetro digital, modelo DM 20μP, da marca Digimed, segundo metodologia oficial (BRASIL, 2006);

- Crioscopia: foi determinada por medida direta com crioscópio eletrônico (PEREIRA *et al.*, 2001), modelo MK 540, da marca ITR;

- Densidade a 15°C: foi determinada por medida direta através do equipamento de ultra-som Lactoscan 90, da Milkotronic Ltd.;

- Gordura: foi determinada por medida direta através do equipamento de ultra-som Lactoscan 90, da Milkotronic Ltd.;

- Extrato seco total (EST): foi determinado através da soma da gordura e do extrato seco desengordurado, medidos no equipamento Lactoscan 90, da Milkotronic Ltd.;

- Extrato seco desengordurado (ESD): foi determinado por medida direta através do equipamento de ultra-som Lactoscan 90, da Milkotronic Ltd.;

- Proteína: foi determinada por medida direta através do equipamento de ultra-som Lactoscan 90, da Milkotronic Ltd.;

- Glicose: foi determinada por meio de espectrofotômetro, modelo 600, da marca FEMTO, através de leitura da absorbância a 505 nm. Para a formação da coloração vermelha utilizada para a leitura da absorbância, foi usado o kit Glicose Monoreagente da empresa Bioclin e as amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos.

A lactose foi determinada antes da sua hidrólise, por medida direta através do equipamento de ultra-som Lactoscan 90, da Milkotronic Ltd. Para determinar a lactose das amostras após terem sido submetidas aos tratamentos e o grau de hidrólise da lactose, foi determinada a glicose, para então fazer-se a estequiometria da reação, considerando que para cada molécula de lactose degradada são formadas uma molécula de glicose e uma molécula de galactose.

A utilização do equipamento de ultra-som ao invés dos tradicionais métodos químicos justifica-se por vários motivos como: rapidez dos resultados, medição de vários parâmetros de uma só amostra em uma só operação, redução dos custos por análise, não utilização de reagentes, medidas automáticas, maior precisão e exatidão, medidas idênticas independente do operador, não é necessária uma instrução especial para o operador, amostra não precisa ser submetida a nenhum tratamento anterior à análise, maior segurança para o operador (LACTOSCAN, 2007).

4.2.3 Análise microbiológica

Foi realizada a contagem total de microorganismos do leite (UFC/mL), segundo as técnicas preconizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003b). Esta análise foi feita nas amostras antes e após elas terem sido submetidas aos tratamentos.

4.2.4 Análise sensorial

Os leites com teor reduzido de lactose foram submetidos a análises sensoriais de acordo com as normas descritas pela ABNT (1993). Foi realizado o teste triangular, para verificar se os julgadores perceberiam a diferença entre amostras com teores de lactose

diferentes, já que foram realizados vários tratamentos que originaram leites com teores de lactose muitas vezes semelhantes. Se essas diferenças fossem perceptíveis, seriam feitos o teste de comparação múltipla e o de preferência. A análise foi realizada com estudantes universitários e funcionários públicos de ambos os sexos e com idades variadas, instruídos para a participação, em cabines individualizadas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria.

Participaram 34 julgadores, avaliando a diferença global entre duas amostras de leite submetidas a tratamentos diferentes, de acordo com o teste triangular (ABNT, 1993b; DUTCOSKY, 1996). Metade comparou uma amostra submetida a um dos maiores percentuais de hidrólise (90,5%) com uma submetida a um dos menores (57,5%), enquanto a outra metade avaliou uma amostra que sofreu uma hidrólise intermediária (76%) com uma que sofreu o maior ou o menor percentual de hidrólise (90,5% ou 57,5%). Portanto, as amostras avaliadas apresentavam, aproximadamente, 0,45; 1,15 e 2,03 g/100g de lactose. Foram apresentadas simultaneamente três amostras de leite, com as posições casualizadas entre os julgadores, codificadas com algarismos de três dígitos, sendo que duas eram idênticas e uma diferente. As amostras foram servidas em recipientes plásticos juntamente a ficha de avaliação e com um copo de água mineral e bolachas de água e sal para limpeza do palato entre a avaliação das amostras (FERREIRA, 2000).

4.2.5 Planejamento estatístico

Para o planejamento do experimento quanto aos tratamentos foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (MSR). A MSR é a técnica de otimização mais usada em ciência de alimentos, provavelmente pela sua compreensão teórica, alta eficiência e simplicidade (ARTEAGA *et al.*, 1994).

A MSR envolve quatro passos básicos: seleção dos parâmetros do sistema (variáveis e seus níveis); formulação do delineamento experimental (o mais comum é o delineamento central composto rotacional – DCCR); encontrar o modelo (DCCR é adequado somente para modelos lineares e quadráticos – testes estatísticos avaliam a validade do modelo, incluindo a falta de ajuste e a análise de resíduo); e encontrar as soluções ótimas (se o modelo for estatisticamente válido, pode ser usado para prever o ponto ótimo do sistema) (ARTEAGA *et al.*, 1994).

O experimento foi conduzido conforme delineamento central composto rotacional (DCCR), com 2 variáveis independentes. Este delineamento para 2 variáveis contém um mínimo de $2^N + 2N + 1$ pontos ou ensaios, onde N é o número de variáveis. Os ensaios definidos por estes pontos compreendem: 2^N pontos para um modelo fatorial completo (combinam níveis +1 e -1); 2N pontos axiais ou estrela em cada eixo, com distância do centro igual à distância de cada vértice (um nível em α e os outros em zero) (valores mínimo e máximo), mais um ou mais pontos no centro do modelo (nível zero). O valor de α depende do número de pontos do modelo fatorial (F) e do número de fatores (N), sendo calculado pela equação: $\alpha = (F)^{1/N} = (2^N)^{1/N}$. Neste caso, com 2 variáveis: $(2^2)^{1/2} = \sqrt{4} = 1,414$.

A Figura 3 apresenta, numa forma gráfica, o DCCR para 2 fatores. Os DCCR são modelos otimizados para encontrar modelos quadráticos. O número de pontos centrais é suficiente para testar a validade do modelo quadrático encontrado, bem como para testar a falta de ajuste do modelo (ARTEAGA *et al.*, 1994).

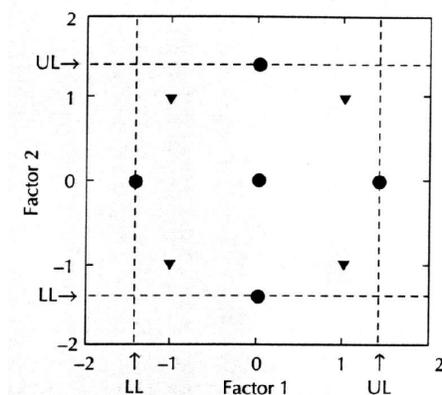


Figura 3 – Modelo central composto rotacional para 2 fatores

FONTE: ARTEAGA *et al.* (1994) (adaptado).

Neste trabalho, o número mínimo de ensaios seria 9 ($2^2 + 2.2 + 1$), sendo 4 fatoriais, 4 axiais e um central. Foram realizados 12 ensaios, sendo 4 repetições no ponto central. As duas variáveis independentes foram: temperatura da reação e concentração de enzima. As faixas de variação entre o limite inferior e o superior de cada variável foram determinadas seguindo-se indicações da literatura. Os níveis das variáveis têm seus valores mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Variáveis independentes e níveis de variação

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
$X_1 =$ temperatura da reação (°C)	7,9	12	22	32	36,1
$X_2 =$ concentração de enzima (g/l)	0,1	0,2	0,5	0,8	0,9

Os valores codificados e reais das duas variáveis utilizadas no delineamento estatístico dos ensaios são mostrados na Tabela 4.

Para a manutenção da equidistância entre os valores das 2 variáveis independentes, o programa SAS foi utilizado, neste planejamento, com os fatores ou variáveis independentes codificados, sendo as respostas apresentadas em valores reais. Para transformar valores codificados das variáveis independentes em valores reais, empregou-se a Equação 2.

$$x = \frac{X - Y}{q} \quad \text{onde:} \quad \begin{array}{l} x = \text{valor codificado da variável } X; \\ X = \text{valor real da variável}; \\ Y = \text{valor real da variável no ponto central}; \\ q = \text{intervalo de variação de } X. \end{array} \quad (2)$$

Tabela 4 – Delineamento experimental para as duas variáveis independentes

Tratamento Ensaio	Variáveis ajustadas		Variáveis reais	
	x_1	x_2	Temperatura da reação (°C)	Concentração de enzima (g/l)
1	-1	-1	12	0,2
2	-1	1	12	0,8
3	1	-1	32	0,2
4	1	1	32	0,8
5	0	0	22	0,5
6	0	0	22	0,5
7	1,414	0	36,1	0,5
8	-1,414	0	7,9	0,5
9	0	1,414	22	0,9
10	0	-1,414	22	0,1
11	0	0	22	0,5
12	0	0	22	0,5

x_1 = Temperatura da reação (°C) e x_2 = Concentração de enzima (g/l)

4.2.6 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados através do programa Statistic 7.0, utilizando o delineamento de blocos inteiramente casualizados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-químicas

Na Tabela 5 são apresentadas as médias dos 12 tratamentos para os parâmetros físico-químicos das matérias-primas e das amostras.

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos das matérias-primas e das amostras após a reação de hidrólise.

Parâmetro	Enzima (lactase)	Matéria-prima	Leite após hidrólise
Acidez (°D)	1	17,5 ^{a*}	17,8 ^{aA**}
	2	17,5 ^a	17,8 ^{aA}
pH	1	6,68 ^a	6,62 ^{bA}
	2	6,69 ^a	6,63 ^{bB}
Gordura (g/100g)	1	0,99 ^a	0,87 ^{bA}
	2	1,03 ^a	0,84 ^{bB}
Densidade (g/mL)	1	1032,96 ^a	1035,07 ^{bA}
	2	1032,93 ^a	1035,75 ^{bB}
EST (g/100g)	1	9,92 ^a	10,35 ^{bA}
	2	9,95 ^a	10,48 ^{bB}
ESD (g/100g)	1	8,93 ^a	9,47 ^{bA}
	2	8,92 ^a	9,64 ^{bB}
Proteína (g/100g)	1	3,42 ^a	3,62 ^{aA}
	2	3,42 ^a	3,69 ^{bB}
Crioscopia (°C)	1	-0,488 ^a	-0,652 ^{bA}
	2	-0,488 ^a	-0,703 ^{bB}
Lactose estimada (g/100g)	1	4,79 ^a	2,04 ^{bA}
	2	4,78 ^a	1,18 ^{bB}
Glicose (g/100g)	1	0,0 ^a	1,73 ^{bA}
	2	0,0 ^a	2,12 ^{bB}

Lactose encontrada	1	4,79 ^a	1,39 ^{b A}
(g/100g)	2	4,78 ^a	0,54 ^{b B}

* Médias na linha seguidas por uma mesma letra (minúscula) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

** Médias de um mesmo parâmetro na coluna seguidas por uma mesma letra (maiúscula) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Na Tabela 5 pode-se observar que a hidrólise da lactose elevou ligeiramente a acidez do leite, não apresentando, porém, diferença significativa entre a acidez das amostras antes e após a hidrólise, e nem com o uso das enzimas diferentes. Os leites submetidos à hidrólise com as 2 enzimas apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos (14-18°D) pela legislação vigente para leites pasteurizados (BRASIL, 2002).

Após as amostras terem sido submetidas aos tratamentos com as enzimas, o pH decresceu ligeiramente, diferindo estatisticamente, mas permaneceu na faixa de valor considerado normal, que varia de 6,4 a 6,9 (TRONCO, 2003). Houve também diferença significativa entre as médias do pH final das amostras com o uso das duas enzimas. Esse aumento da acidez e redução do pH ocorre devido à atividade dos microorganismos presentes no leite, principalmente às bactérias lácticas, que promovem a sua acidificação. Segundo Longo (2006), pela ação das bactérias lácticas, uma molécula de lactose dá origem a quatro moléculas de ácido láctico. Esta atividade é favorecida pelo longo período decorrido durante os tratamentos e/ou às temperaturas a que as amostras foram submetidas. O aumento da contagem de microorganismos foi verificado e será apresentado e melhor comentado ao longo da discussão.

As Figuras 4 e 5 apresentam os gráficos de superfície de resposta do pH das amostras após estas terem sido submetidas à reação de hidrólise, com o uso das enzimas 1 e 2, respectivamente. Neste tipo de gráfico podem-se visualizar os valores do parâmetro avaliado, com a utilização de diversas concentrações de enzima e temperaturas.

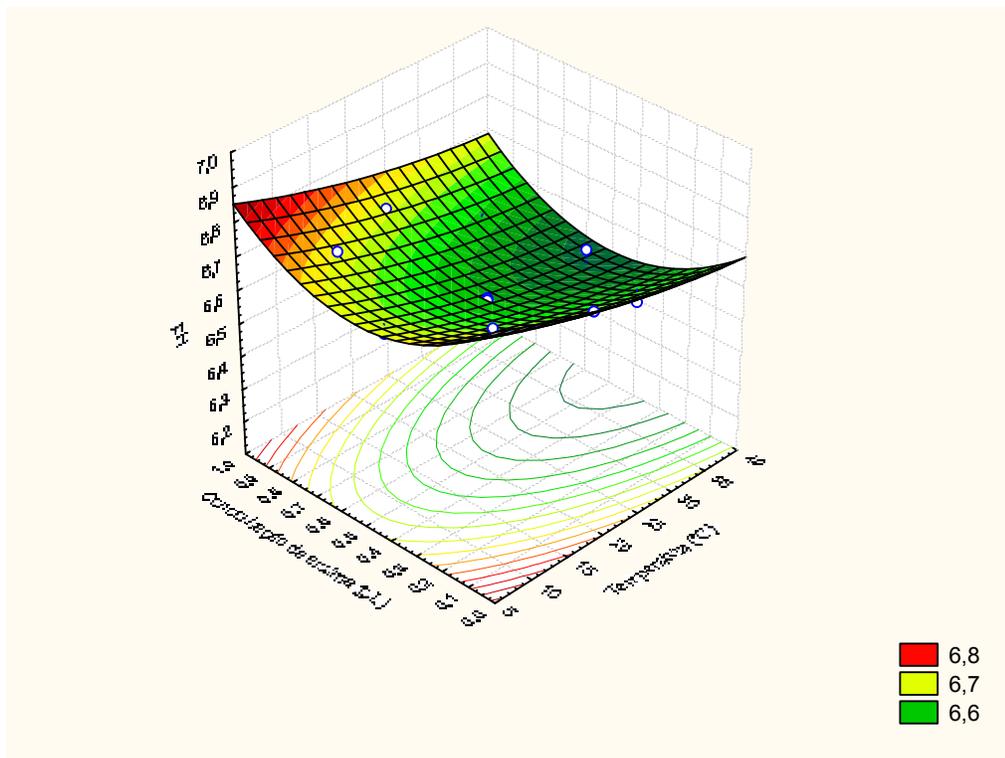


Figura 4 – pH do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.

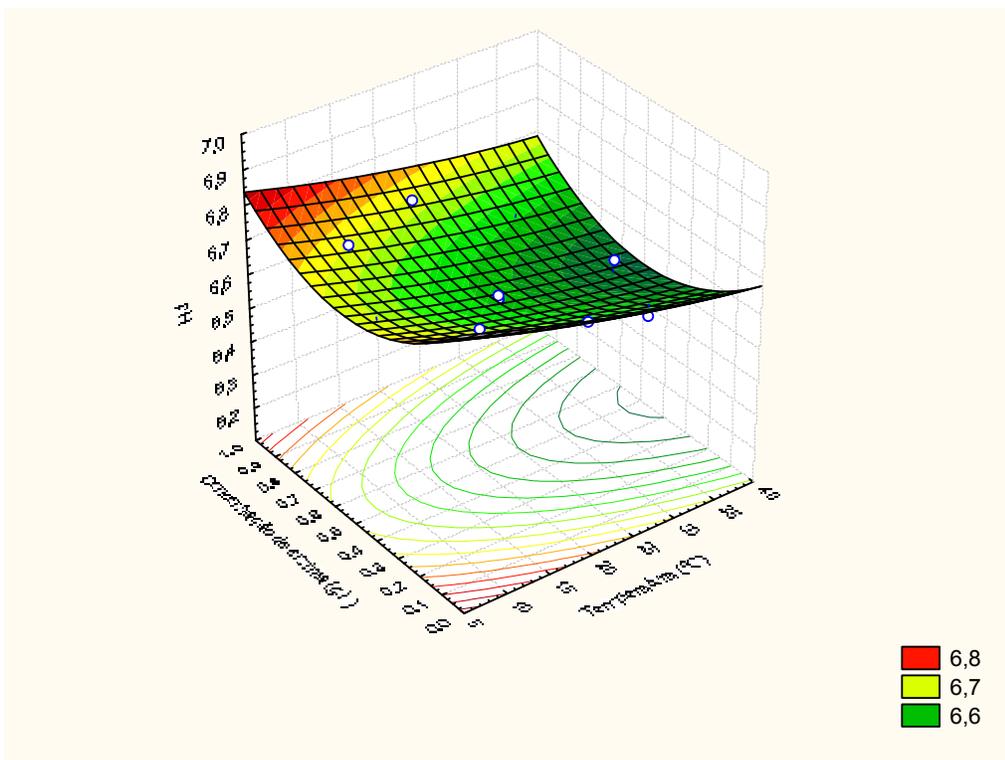


Figura 5 – pH do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.

Pode-se observar, através das Figuras 4 e 5, uma menor redução do pH das amostras a temperaturas inferiores e a concentrações menores ou maiores de enzima, enquanto observa-se uma maior redução, ou seja, um pH final inferior, a uma temperatura próxima a 40°C e a concentrações intermediárias de enzima (0,4 a 0,6 g/L).

A quantidade de gordura das amostras decresceu significativamente com os tratamentos, tanto com a enzima 1 quanto com a 2. Foi verificado que houve uma maior diminuição com o uso da enzima 2, a que mostrou-se mais eficiente na hidrólise da lactose. Não foi encontrada na literatura uma justificativa para esta redução. Sabe-se que na reação de hidrólise, para que ocorra a formação de glicose e galactose é necessário que a lactose reaja com a água, diminuindo, portanto, a quantidade de água livre no leite. Isto poderia ocasionar um ligeiro aumento do teor de gordura devido a maior concentração da solução e não o contrário. Foi o observado nos valores de extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD) e proteína das amostras, que aumentaram após a hidrólise, sendo que os maiores acréscimos foram verificados com a utilização da enzima 2, que provocou uma maior redução da lactose, e possivelmente uma maior utilização da água presente no leite, concentrando-o mais. Esta redução do teor de gordura pode ter sido ocasionada devido à própria reação de hidrólise ou a algum tipo de influência do princípio do equipamento utilizado sob a quantificação da gordura, o que poderia ser verificado através da avaliação da gordura de uma mesma amostra por meio de equipamento e método butirométrico (BRASIL, 2006).

A utilização da enzima lactase (β -galactosidase) ocasiona modificações físicas e químicas no leite (VINHAL, 2001), como o aumento da sua viscosidade. Isto pode ser percebido na Tabela 5 observando-se os valores de densidade que aumentaram consideravelmente e significativamente do ponto de vista estatístico nos tratamentos com o uso da enzima 1 e 2, com respectivos acréscimos de 2,11 e 2,82 g/mL. Sabe-se que a densidade de um corpo líquido é a relação existente entre a sua massa (expressa pelo peso) e volume, e que esta diminui com o aumento da quantidade de gordura, o que normalmente se dá com a elevação da proporção de proteína, lactose e sais minerais (TRONCO, 2003). No presente estudo, o que foi verificado após a reação de hidrólise foi uma redução do teor de gordura do leite, porém um aumento no teor de proteína e um aumento da densidade do leite. Para a redução do teor de lactose do leite, podemos relacionar o aumento de densidade com o de viscosidade, mas nem sempre esta relação é possível, como no caso do desnate, onde a redução do teor de gordura é acompanhada por um aumento de densidade, mas não por um aumento da viscosidade, e sim sua redução (TRONCO, 2003).

As Figuras 6 e 7 apresentam os valores de densidade conforme temperatura e concentração das enzimas 1 e 2. Ocorreu um maior aumento da densidade nas temperaturas de 10 a 30 °C e de 18 a 40 °C e nas concentrações de enzima de 0,9 a 1,0 g/L e de 0,82 a 1,0 g/L, com a utilização das enzimas 1 e 2, respectivamente. Como já citado, este aumento acompanhou a redução do teor de lactose.

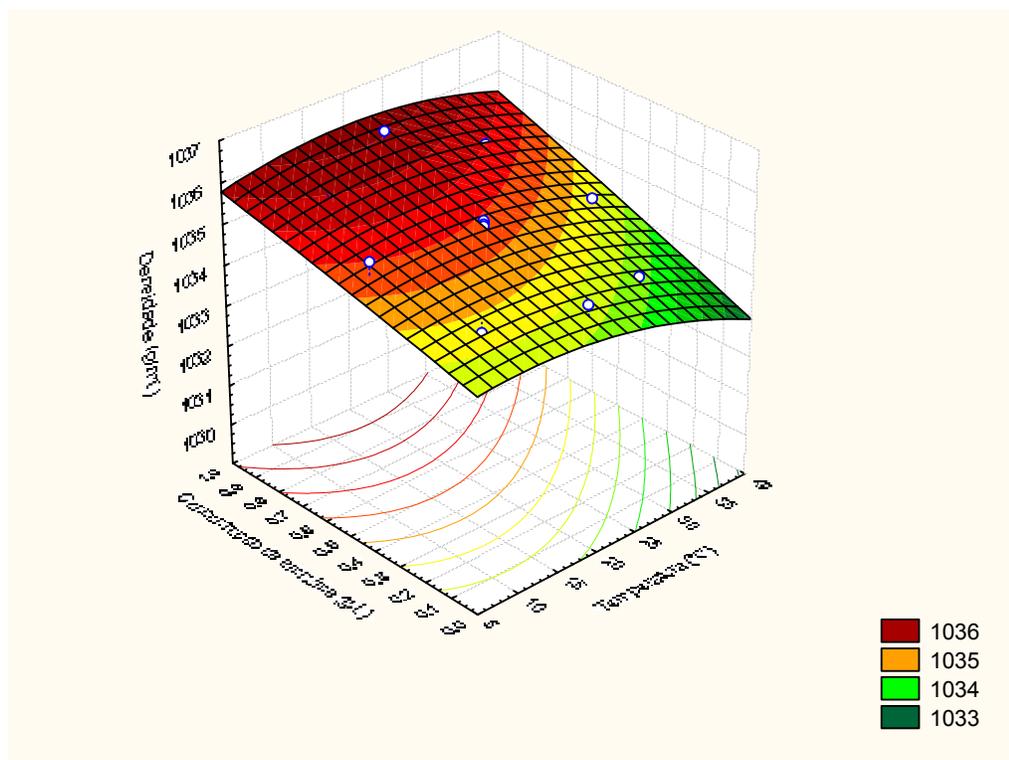


Figura 6 – Densidade do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase1.

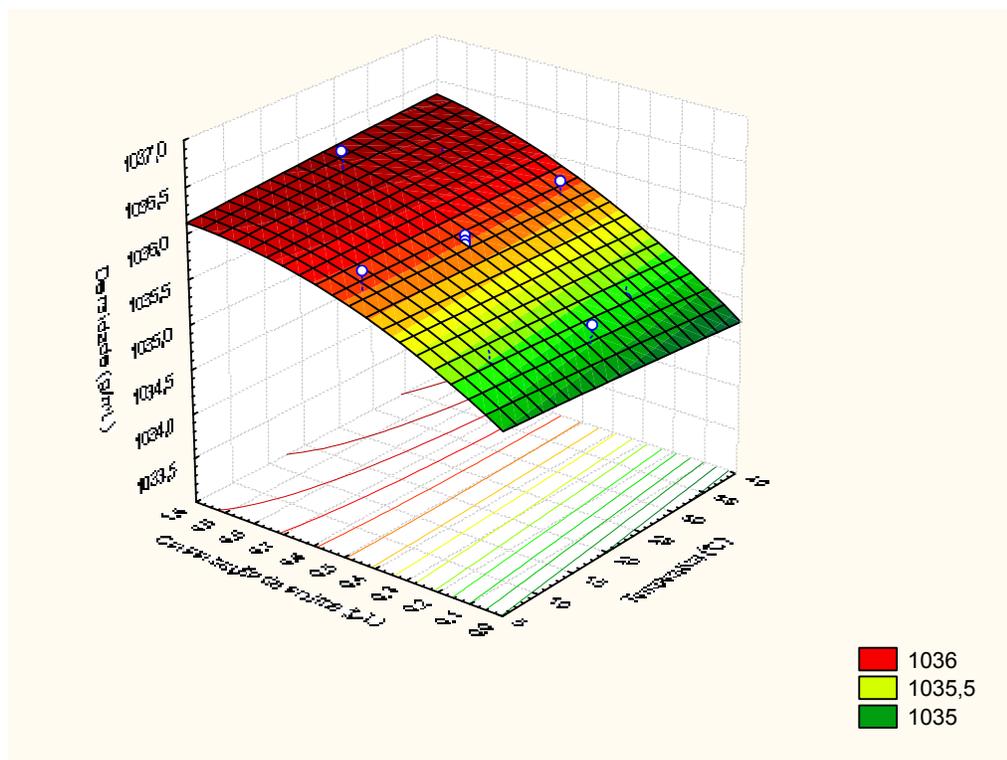


Figura 7 – Densidade do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase

2.

A enzima 2 apresentou uma maior eficiência, o que pode ser visualizado na Tabela 5 através dos valores de crioscopia, glicose e lactoses estimada e encontrada. Isto, segundo o fabricante, ocorre devido à baixa atividade de protease da solução, o que a torna mais pura quando comparada a outras lactases oferecidas no mercado. A crioscopia diminuiu 0,164°C com a enzima 1 e 0,215°C com a enzima 2. Esta redução deve-se ao fato de que com a hidrólise ocorre um aumento dos açúcares redutores do leite, que passa a apresentar, além da lactose, glicose e galactose resultantes da reação. Com isto aumenta a concentração dos constituintes solúveis na solução leite (MONTIPÓ, 1992), afastando cada vez mais o ponto de congelamento do ponto 0, que é o da água pura. Segundo Scrimme e Buchheim (2002), a retirada da lactose do leite pode provocar uma redução de mais de 50% do ponto de congelamento. No presente experimento, com a utilização da enzima 1 obteve-se uma redução de 33,6% do ponto de congelamento e com a enzima 2 de 44,1%.

As Figuras 8 e 9 apresentam os valores de crioscopia das amostras após a reação de hidrólise, conforme a temperatura e a concentração das enzimas 1 e 2.

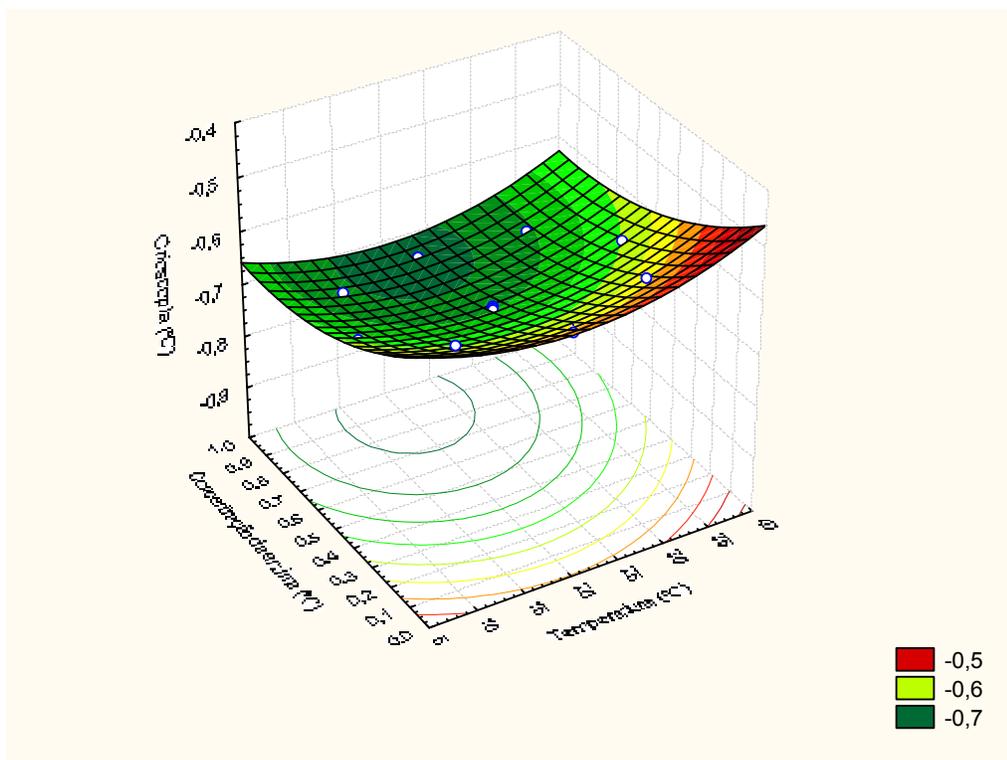


Figura 8 – Crioscopia do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase

1.

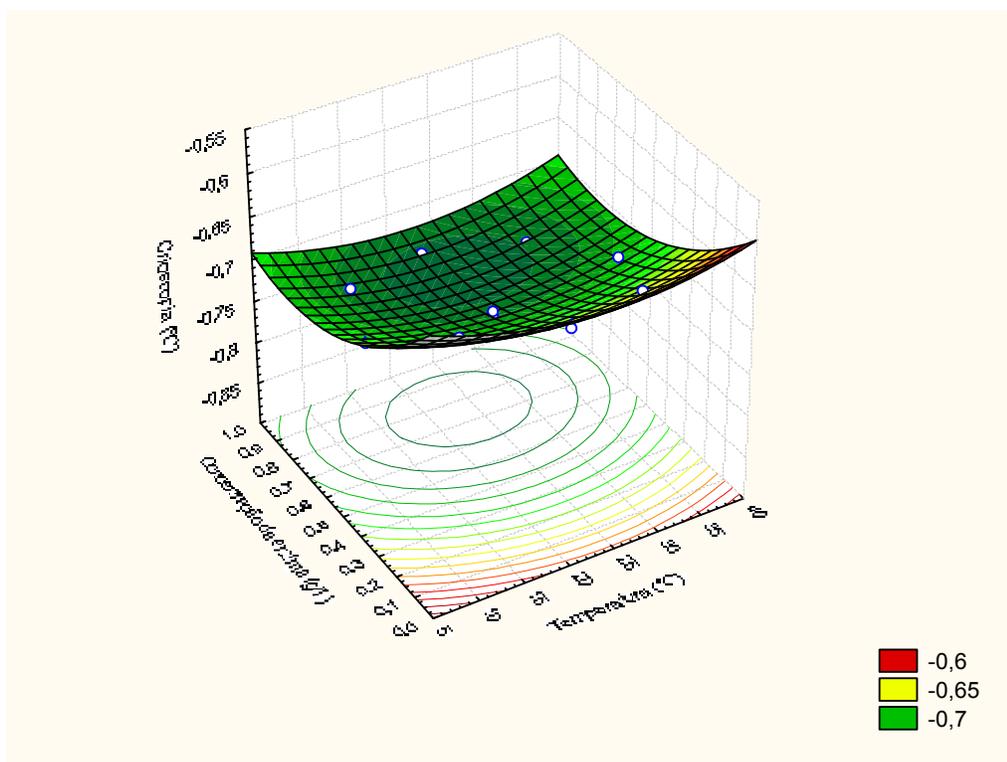


Figura 9 – Crioscopia do leite conforme temperatura e concentração da enzima lactase

2.

A maior redução da crioscopia (Figuras 8 e 9) deu-se, com o uso da enzima 1, na faixa de temperatura de 8 a 27°C e na concentração de enzima de 0,69 a 1,0 g/L e com o da enzima 2, na faixa de 16 a 31°C e na concentração de 0,6 a 0,9 g/L. Também se pode perceber um maior decréscimo no valor da crioscopia com o uso da enzima 2, quando comparado ao da enzima 1 e conforme já comentado anteriormente, quanto maior este decréscimo, maior é a redução do teor de lactose.

Com os valores encontrados de crioscopia, calculou-se através da Equação 1, recomendada por um dos fabricantes (*apud* LONGO, 2006), a hidrólise estimada, a qual a média dos tratamentos foi 57,2% com a utilização da enzima 1 e 75,4% com a enzima 2. A partir daí calculou-se a lactose estimada, que diferiu significativamente com a utilização das 2 enzimas e é apresentada nas Figuras 10 e 11.

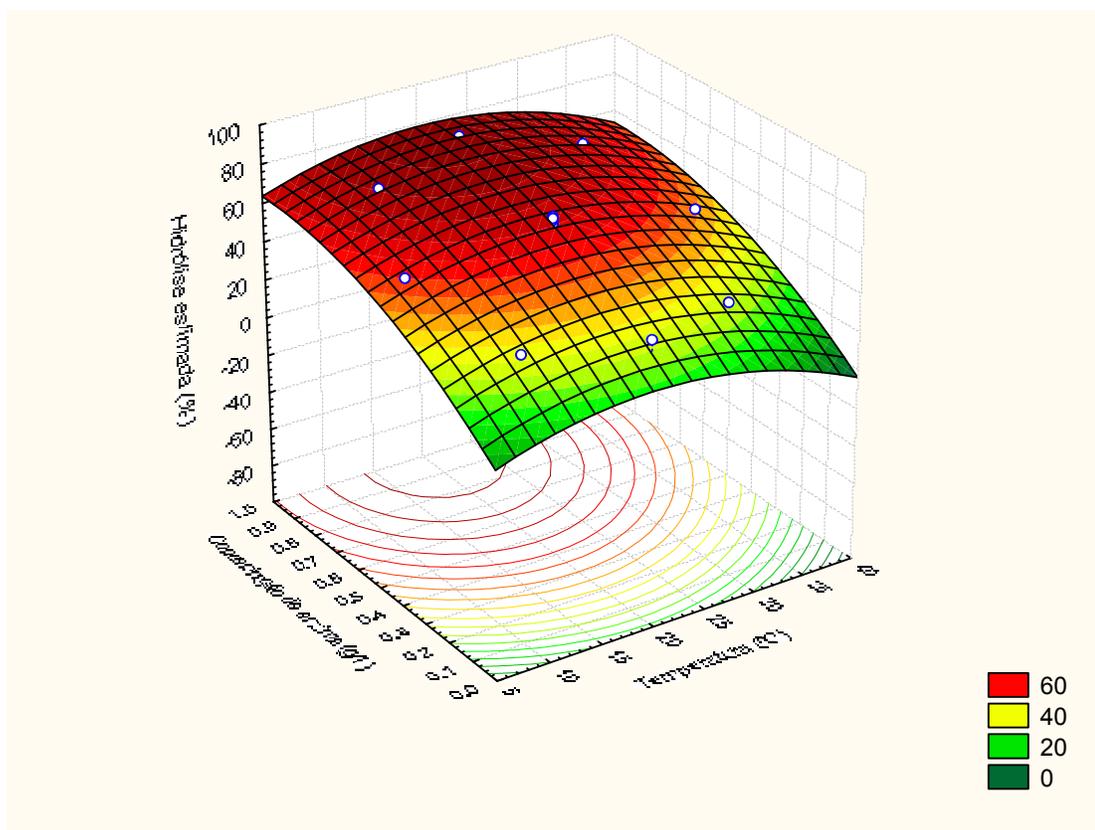


Figura 10 – Percentual de hidrólise estimada, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.

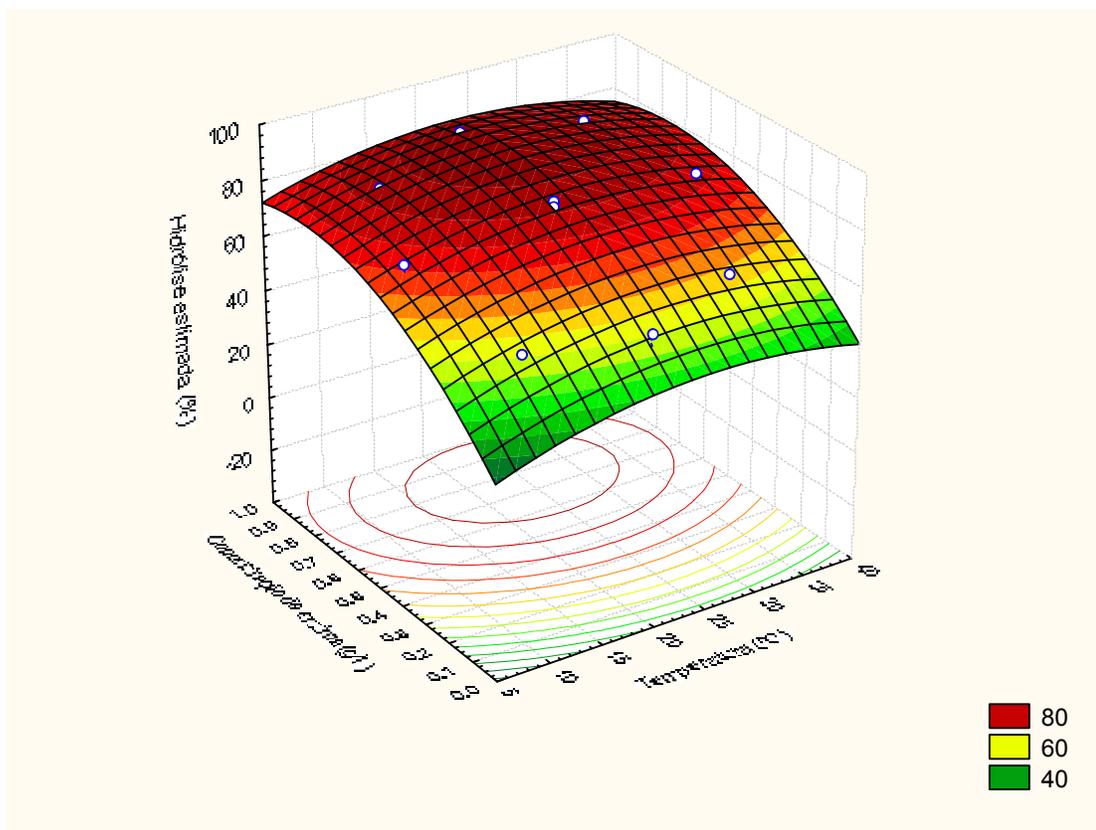


Figura 11 – Percentual de hidrólise estimada, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.

Através das Figuras 10 e 11, pode-se visualizar a porcentagem de hidrólise estimada conforme as temperaturas e concentrações de enzima utilizadas e observa-se um valor superior a média dos tratamentos, apresentada na Tabela 5. Isto ocorre, pois nestes gráficos há um cruzamento dos dados obtidos em cada tratamento, o que nos dá uma combinação entre mais valores de temperatura e concentrações de enzima. Percebe-se que um maior valor de hidrólise, próximo a 80%, foi alcançado nas faixas de temperatura de 14 a 27°C e de 15 a 29°C e nas concentrações de enzima de 0,79 a 1g/L e de 0,58 a 1,0 g/L, com o uso das enzimas 1 e 2, respectivamente. A hidrólise da lactose em glicose e galactose é cada vez mais importante para seu uso alimentar. Mediante a hidrólise da lactose modificam-se a sua solubilidade, seu dulçor, seu poder redutor e sua fermentabilidade, conseguindo-se, sobretudo, fazer com que ela seja digerível por consumidores intolerantes à lactose (SCHLIMME, BUCHHEIM, 2002).

A enzima 2 mostrou-se novamente mais eficaz, alcançando valores superiores de hidrólise da lactose, o que também pode ser verificado através das Figuras 12 e 13, que apresentam os valores de lactose final estimados através da crioscopia usando-se a Equação 1. O teor de lactose da matéria-prima foi 4,78 e 4,79 g/100g, valor superior ao encontrado por Longo (2006), de 4,11%, que cita que com este nível a ingestão do leite pode causar desconforto para pessoas com intolerância à lactose .

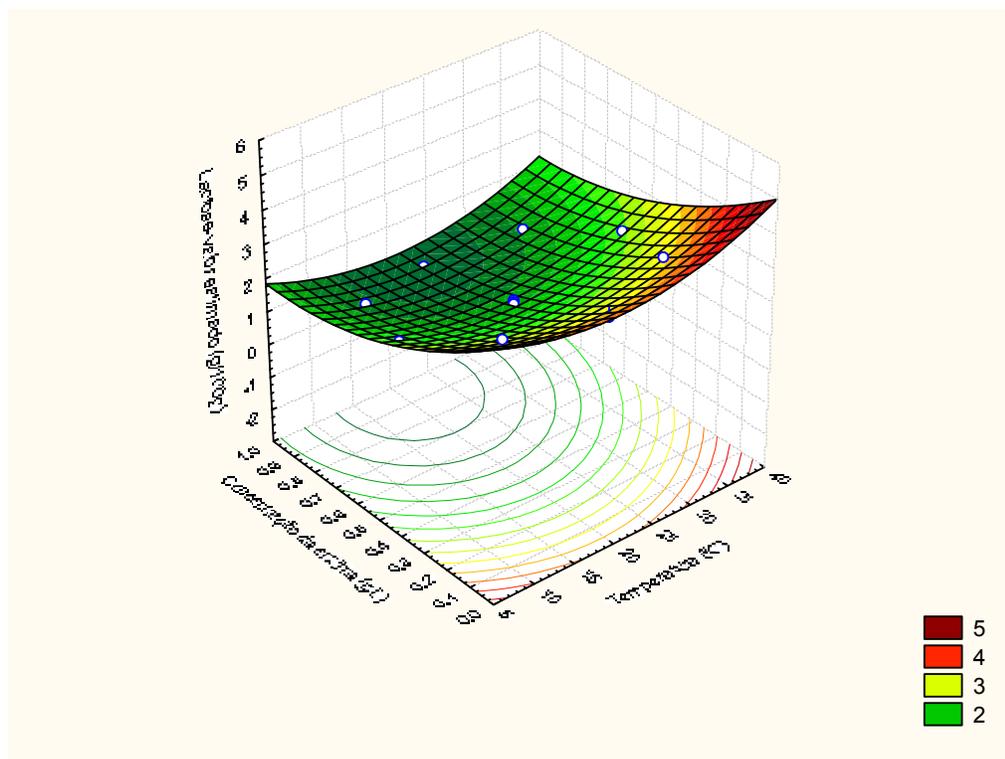


Figura 12 – Valor estimado de lactose final conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.

A Figura 12 mostra o valor estimado de lactose final com o uso da enzima 1, que foi inferior na faixa de temperatura de 13 a 28°C e com o uso de concentrações de enzima de 0,7 a 1,0 g/L.

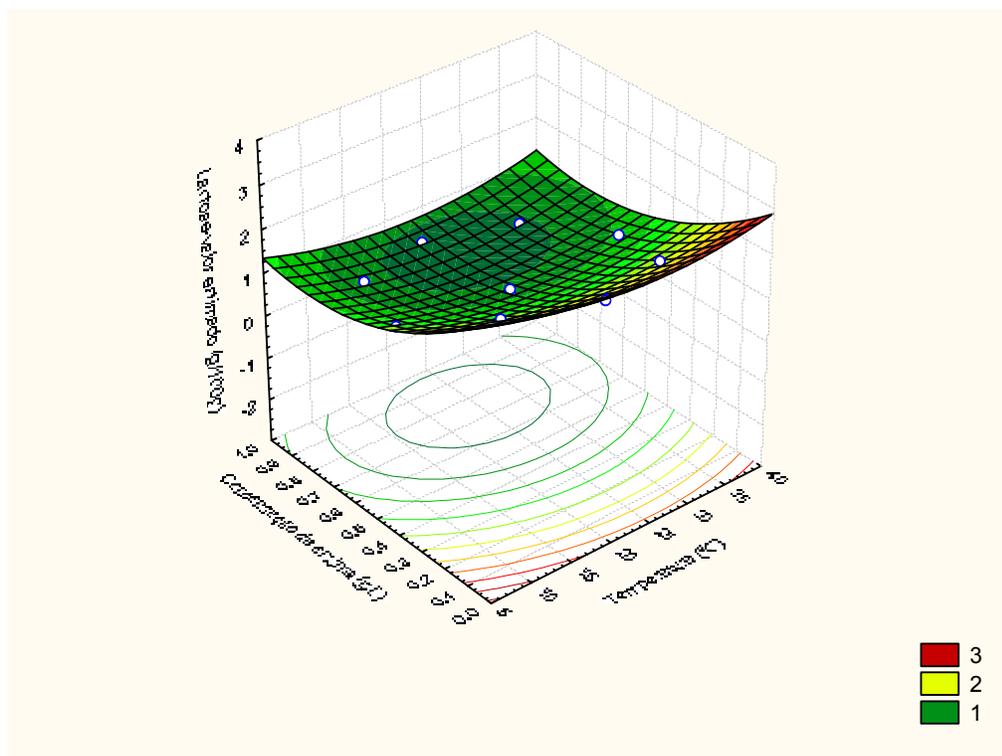


Figura 13 – Valor estimado de lactose final conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.

A Figura 13 mostra o valor estimado de lactose final com o uso da enzima 2, que foi inferior na faixa de temperatura 15 a 33 °C e com concentrações de enzima de 0,59 a 0,99 g/L. Observando-se as Figuras 12 e 13, pode-se perceber que os menores valores de lactose final estimados foram em temperaturas médias a elevadas e em concentrações elevadas de enzima.

A quantidade de lactose final encontrada foi inferior a que havia sido estimada e foi calculada através de estequiometria pela quantidade de glicose originada (por tratamento) a partir da reação de hidrólise da lactose. Obtiveram-se por este cálculo os valores de hidrólise por tratamento, e calculou-se a média, que foi de 72,3% com o uso da enzima 1 e de 88,6% com o uso da enzima 2. Portanto, os valores de lactose encontrados após a reação de hidrólise foram, respectivamente, 1,4 e 0,5 g/100g, com as enzimas 1 e 2. A faixa de variação dos teores de lactose do leite situa-se entre 4,5 e 5,2%, valor este influenciado pela alimentação e pelos intervalos de lactação (Kaufmann, Hagemeister *apud* SCHLIMME, BUCHHEIM, 2002). Este valor aumenta na fase colostrar e permanece no leite a um nível muito constante, ao redor de 4,7% (SCHLIMME, BUCHHEIM, 2002). Este foi o valor aproximado de lactose encontrado na matéria-prima utilizada no presente experimento, permitindo verificar-se a grande redução do teor de lactose através da hidrólise, de 3,4 e 4,3 g/100g, com a utilização

das enzimas 1 e 2, respectivamente. Estes valores foram calculados através das médias dos tratamentos, porém, observando-se os gráficos de superfície de resposta (Figuras 14, 15, 16 e 17) percebe-se que a determinadas temperaturas e concentrações de enzima, atingiu-se quase 100% de hidrólise da lactose. Segundo uma das empresas fornecedoras da enzima (*apud* LONGO, 2006), na produção de leite com teor reduzido de lactose é necessária a hidrólise na quantidade mínima de 90%. Já segundo Holsinger e Kligerman (1991), os sintomas da intolerância podem ser eliminados com uma hidrólise de 70%. Segundo Brasil (1998), alimentos para dietas com restrição a alguns mono e/ou dissacarídeos, especialmente formulados para atender às necessidades de portadores de intolerância à sua ingestão e/ou portadores de erros inatos do metabolismo de carboidratos, podem conter no máximo 0,5g do nutriente em referência por 100 g ou 100 mL do produto final a ser consumido. Portanto, o leite hidrolisado pela enzima 2 se enquadraria como um alimento pra fins especiais. Porém, a quantia de lactose que pode ser ingerida varia de acordo com a tolerância individual (FARIAS, FAGUNDES NETO, 2004), sendo que cada caso deve ser avaliado à parte.

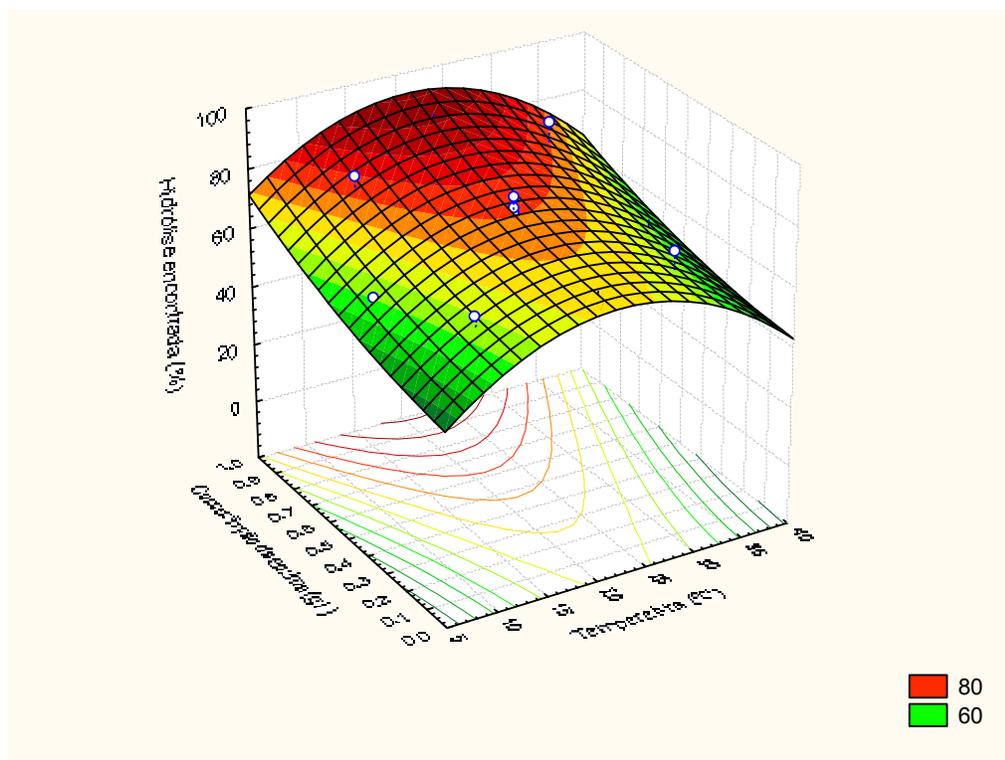


Figura 14 – Percentual de hidrólise encontrada, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.

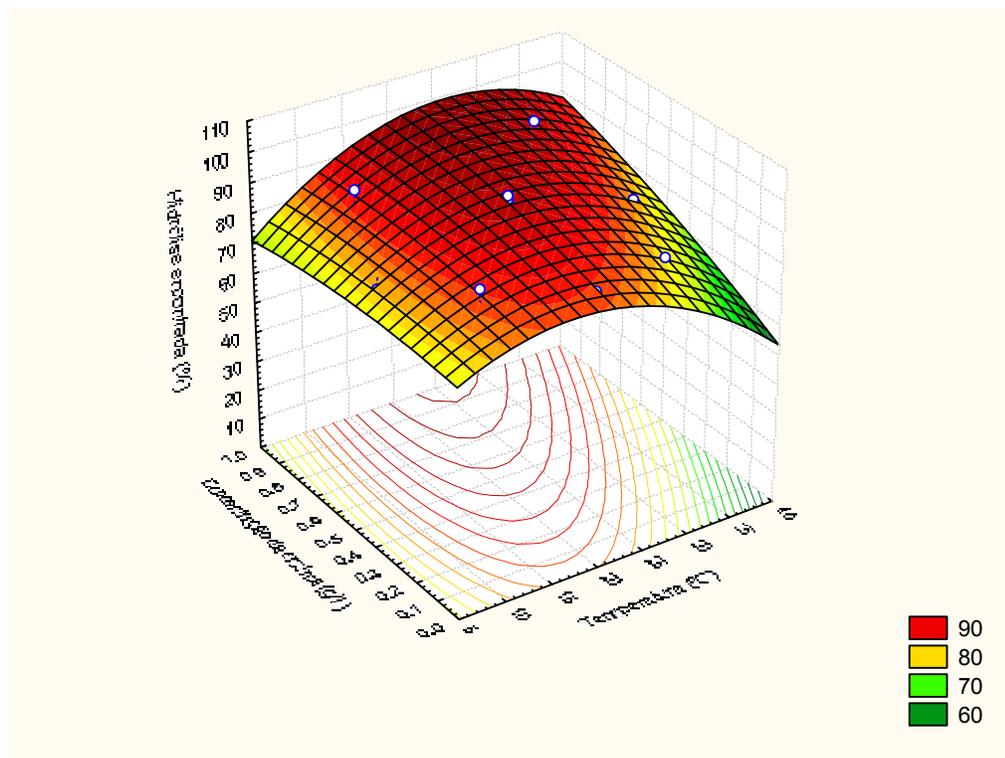


Figura 15 – Percentual de hidrólise encontrada, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.

As Figuras 14 e 15 mostram as porcentagens de hidrólise encontradas com o uso das enzimas 1 e 2, respectivamente. Pode-se perceber que com a utilização da enzima 2 foram alcançados valores superiores de hidrólise da lactose. Os maiores valores foram verificados com o uso de concentrações elevadas de enzima, próximo a 1,0 g/L para a enzima 1 e entre 0,9 e 1,0 g/L para enzima 2. As faixas de temperatura que colaboraram para uma maior porcentagem de hidrólise foram de 17 a 24 °C, com o uso da enzima 1 e de 23 a 30 °C, com o uso da enzima 2. Carminatti (2005), avaliando a hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando-se *Kluyveromyces lactis*, observou o maior grau de hidrólise, de aproximadamente 100 %, a uma temperatura de 30°C, pH 6 e concentração de enzima de 1250 mg/l.

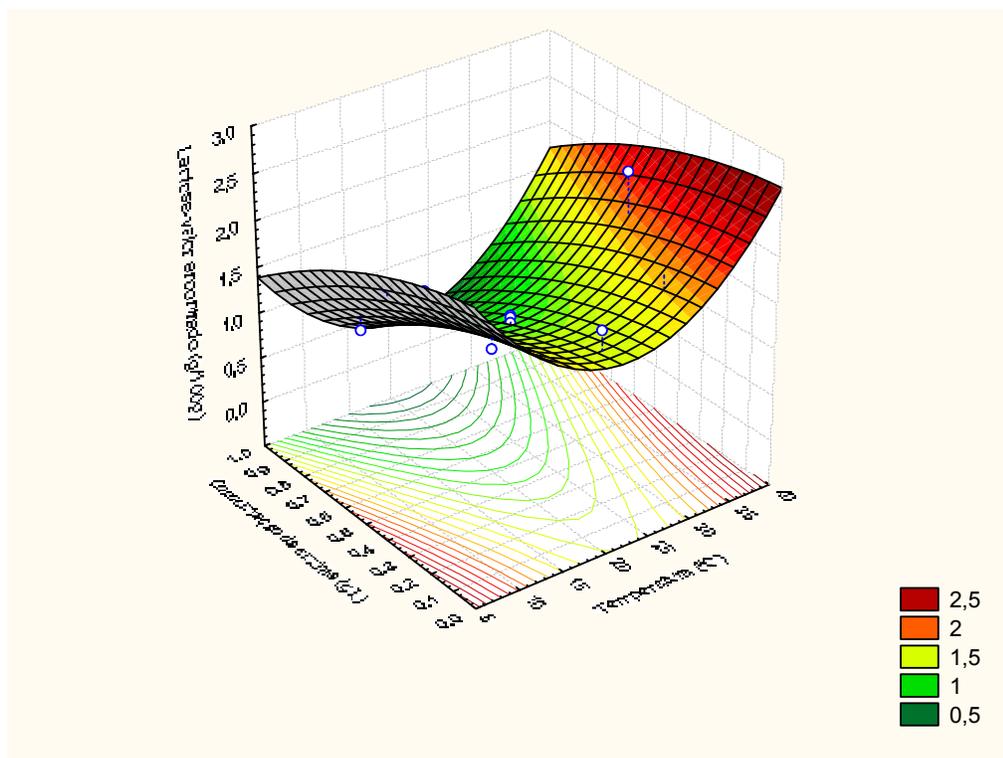


Figura 16 – Valor encontrado de lactose, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 1.

A Figura 16 apresenta o gráfico de superfície de resposta dos valores de lactose encontrados com a utilização da enzima 1. Percebe-se, observando-se o gráfico, e comparando-se os valores de lactose a uma mesma concentração de enzima, que os menores foram verificados em temperaturas intermediárias, enquanto os maiores, nos valores extremos, revelando um menor grau de hidrólise nestas temperaturas. Os menores valores de lactose final podem ser percebidos em temperaturas de 17 a 25 °C e em concentrações de enzima próximas a 1,0 g/L.

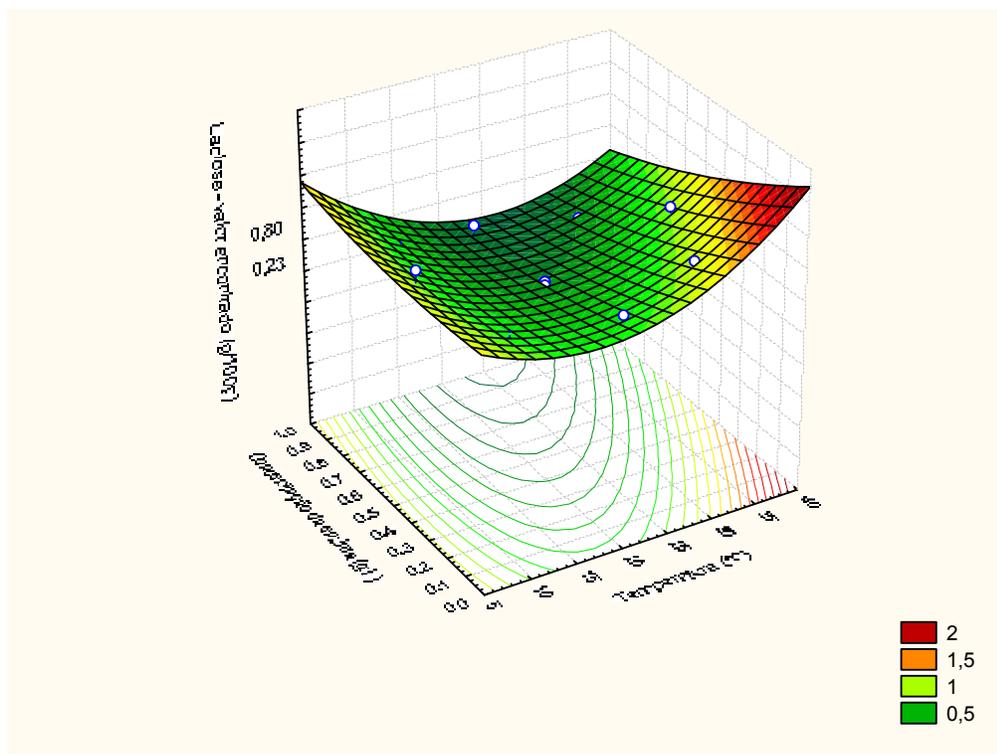


Figura 17 – Valor encontrado de lactose, conforme temperatura e concentração da enzima lactase 2.

A Figura 17 apresenta o gráfico de superfície de resposta dos valores de lactose encontrados com a utilização da enzima 2. Percebe-se, observando-se o gráfico, que em temperaturas elevadas verificaram-se as menores reduções dos níveis de lactose. Os menores valores de lactose final podem ser percebidos em temperaturas de 23 a 30 °C e em concentrações de enzima de 0,9 a 1,0 g/L.

Através dos gráficos de superfície de resposta apresentados foi possível analisar vários parâmetros que nos permitem verificar a eficiência da reação de hidrólise da lactose com o uso de diversas concentrações de enzima e temperaturas. Pôde-se perceber que a enzima apresentou uma boa atividade a temperaturas inferiores às preconizadas pela literatura, que seriam, segundo Segel *apud* Andrade (2005), de 35°C, segundo Carminatti (2001), de 30 a 40°C e segundo Longo (2006), de 40°C. Isto mostra que seria viável o uso de temperaturas inferiores, visando a não proliferação de microrganismos patogênicos no leite e possivelmente uma redução do teor de lactose sob temperaturas de refrigeração, o que seria interessante a nível industrial. Em alguns casos percebeu-se, porém, que uma maior hidrólise foi verificada com o uso de maiores concentrações de enzima, fato este que exigiria um estudo de viabilidade e custo x benefício na própria indústria, devido ao custo elevado da enzima

lactase. Segundo Foda e Lopez-Leiva *apud* Carminatti (2001), a enzima pode ser utilizada de três maneiras: em batelada, onde ela é perdida após a hidrólise, recuperada por membrana e imobilizada. Nos dois últimos métodos a enzima não é perdida, sendo estes os mais recomendáveis para o uso em maiores concentrações, visando um menor custo do processo.

A seguir serão apresentados, através das Figuras 18, 19, 20 e 21, os valores de lactose estimados a partir da crioscopia, ao longo de todo o período de duração da reação de hidrólise. Já na Tabela 6, serão apresentados os valores finais estimados de lactose. Pode-se perceber que estes valores variaram conforme a enzima utilizada (1 e 2), a concentração desta enzima (0,1; 0,2; 0,5; 0,8 e 0,9 g/L) e a temperatura utilizada durante a reação (7,9°C, 12°C, 22°C, 32°C e 36,1°C).

Tabela 6 – Quantidades de lactose final estimadas para cada temperatura, enzima e concentração utilizadas.

Temperatura (°C)	Concentração da enzima (g/L)	Enzima 1	Enzima 2
7,9	0,5	2,1 ^a *	1,2 ^a
12	0,2	3,0 ^b	2,1 ^b
	0,8	1,4 ^c	0,9 ^c
22	0,1	3,1 ^d	2,1 ^b
	0,5	1,7 ^e	0,9 ^c
	0,9	1,1 ^f	0,7 ^d
32	0,2	3,3 ^g	1,8 ^e
	0,8	1,6 ^h	0,7 ^d
36,1	0,5	2,4 ⁱ	1,1 ^f

* Médias na coluna seguidas por uma mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

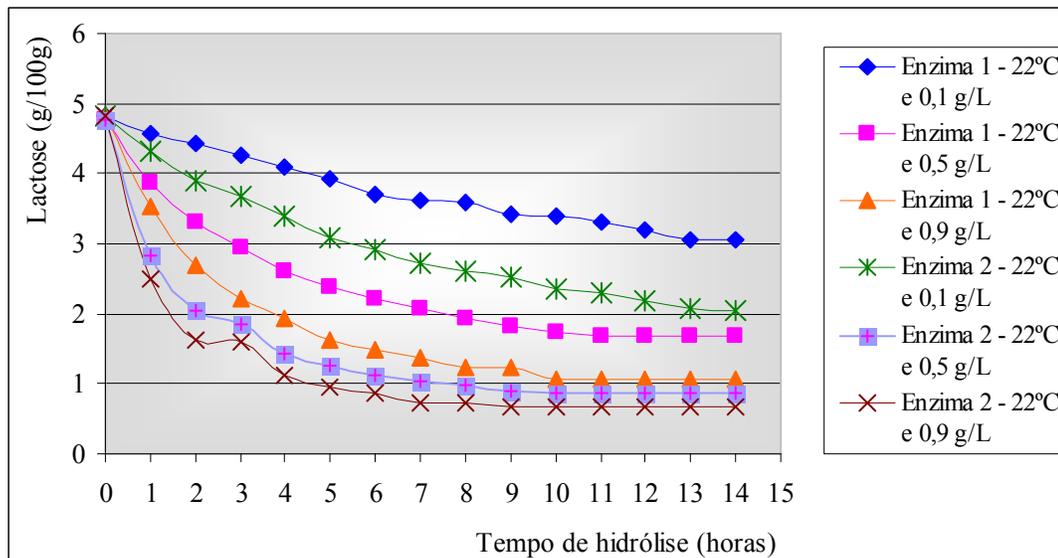


Figura 18 – Valor estimado de lactose durante a hidrólise, para as enzimas 1 e 2, na temperatura de 12 °C e nas concentrações de enzima de 0,2 e 0,8 g/L.

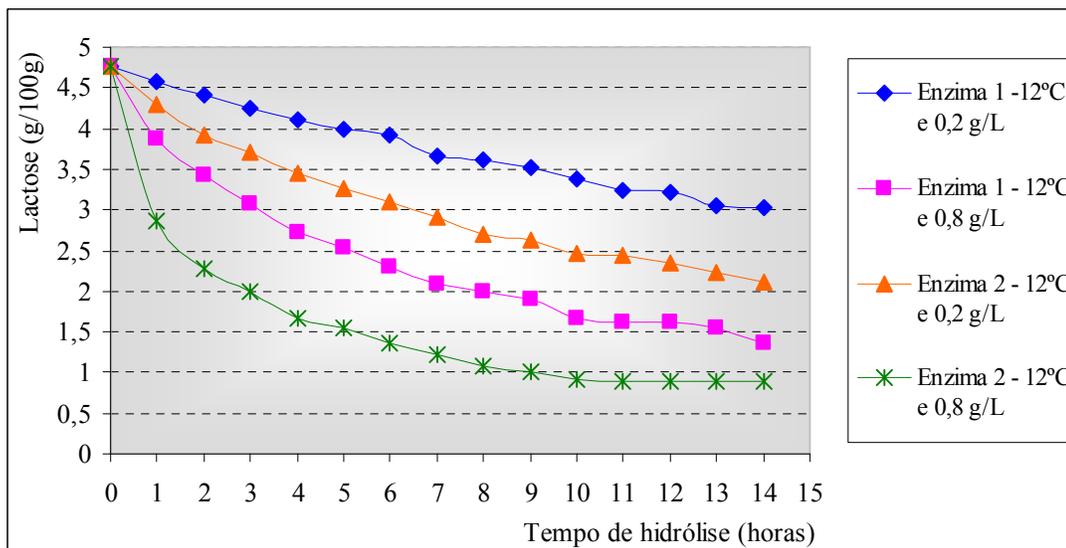


Figura 19 – Valor estimado de lactose durante a hidrólise, para as enzimas 1 e 2, na temperatura de 22 °C e nas concentrações de enzima de 0,1; 0,5 e 0,9 g/L.

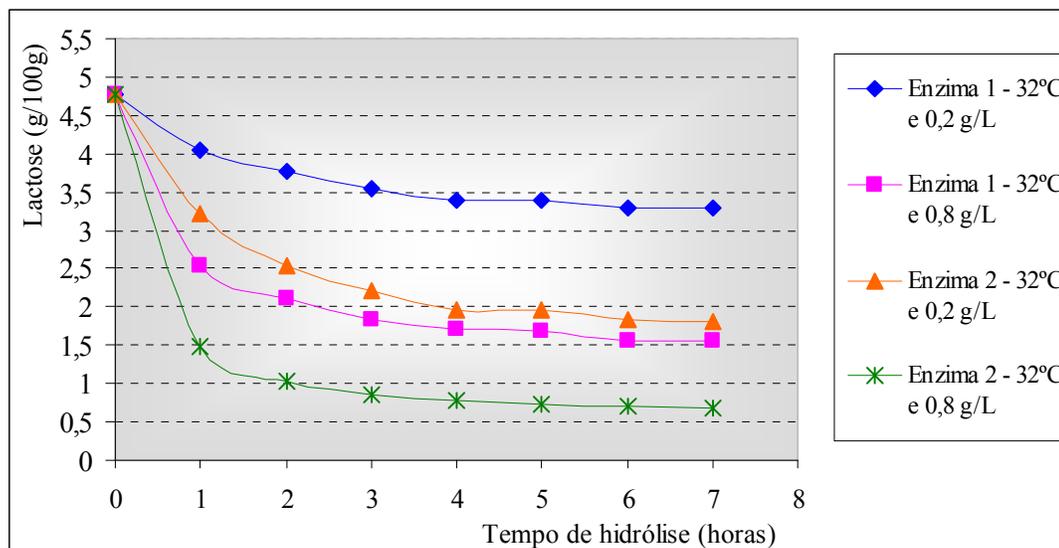


Figura 20 – Valor estimado de lactose durante a hidrólise, para as enzimas 1 e 2, na temperatura de 32 °C e nas concentrações de enzima de 0,2 e 0,8 g/L.

Observando-se as Figuras 18, 19, 20 e a Tabela 6, comparando-se as enzimas, pode-se perceber que, para as mesmas temperaturas, em uma mesma concentração, a enzima 2 revelou-se mais eficaz, pois provocou um maior decréscimo do teor de lactose das amostras quando comparada a enzima 1. Isto demonstra que existem diferenças entre a hidrólise com o uso das enzimas das duas diferentes empresas, apesar de elas serem provenientes do mesmo microrganismo, a levedura *Kluyveromyces lactis*.

Já comparando-se as concentrações de enzima, percebe-se que utilizando-se as 2 enzimas nas 3 temperaturas (12 °C, 22 °C e 32 °C), a menor concentração (0,1 e 0,2 g/L) provocou uma menor redução da lactose, o que já era esperado, e que segundo Carminatti (2001) ocorre devido a menor quantidade de sítios ativos disponíveis para ocorrer a hidrólise, diminuindo o grau de conversão da lactose em glicose e galactose.

Longo (2006) verificou uma maior hidrólise na segunda maior concentração de enzima testada no seu experimento, de 0,8 g/L, alcançando um valor de 88,07% de hidrólise em 4 horas de ensaio. Andrade (2005) avaliou, entre outros parâmetros, 2 concentrações de enzima, 0,2 e 0,4 g/L, porém para a fermentação de soro de leite, e verificou que a quantidade foi determinante na redução do tempo de fermentação e no aumento da produtividade, sendo a maior concentração a mais eficaz. Carminatti (2001) verificou que a concentração ótima de enzima se estabeleceu em 1250 mg/L, sendo que o grau de hidrólise manteve-se praticamente igual para a concentração de 2000 mg/L e reduziu-se acentuadamente para 400 mg/L.

As reações enzimáticas são fortemente dependentes de uma temperatura ótima. Esta temperatura ótima influencia diretamente a atividade da enzima, aumentando a velocidade da reação e, por consequência, a conversão do substrato em produtos. Temperaturas abaixo ou acima desta faixa inibem a atividade enzimática e, a temperaturas muito superiores, ocorre a inativação da enzima, devido a sua desnaturação. Por isto, o conhecimento da faixa de atividade ótima para cada enzima é fundamental (CARMINATTI, 2001).

Comparando-se as Figuras 18 e 20, nos quais foram utilizadas as mesmas concentrações de enzima (0,2 e 0,8 g/L), porém a temperaturas diferentes, e observando-se a Tabela 6, pode-se perceber o efeito da temperatura na redução do teor de lactose das amostras. Para ambas as enzimas e concentrações, a temperatura mais alta favoreceu uma redução maior da lactose, com exceção na utilização da enzima 1 a 0,8 g/L, que alcançou um teor de lactose final mais baixo a 12 °C. Também se pode perceber a diferença entre o tempo de hidrólise para alcançar os níveis mais baixos de lactose, que com a temperatura inferior ficou em torno de 14 horas e com a temperatura superior (32 °C), em torno de 7 horas.

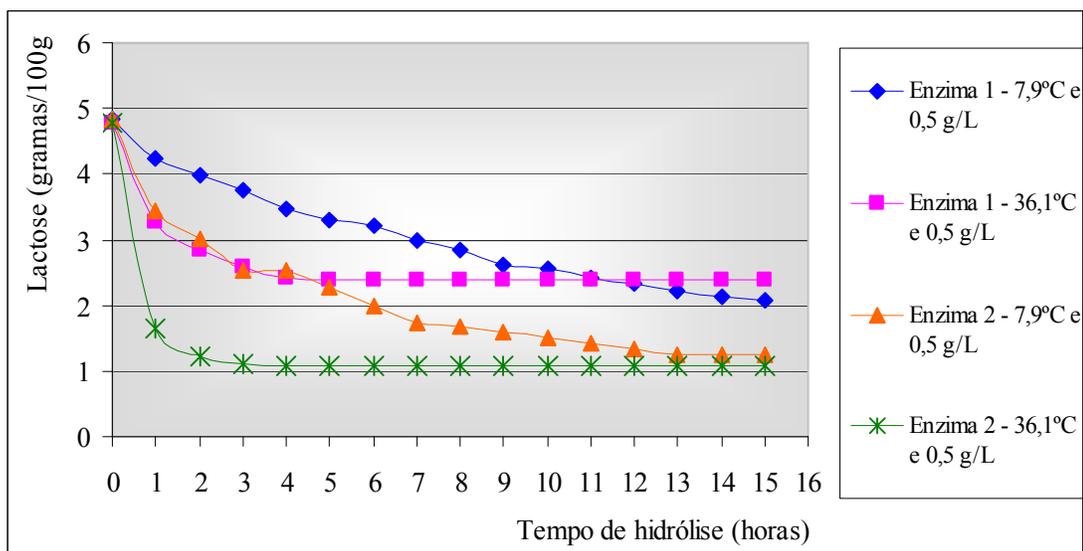


Figura 21 – Valor estimado de lactose durante a hidrólise, para as enzimas 1 e 2, nas temperaturas de 7,9 e 36,1 °C e na concentração de enzima de 0,5 g/L.

Também se pode perceber o efeito da temperatura visualizando-se a Figura 21, que apresenta os valores de lactose das amostras com o uso de ambas as enzimas a uma mesma concentração, porém submetidas às duas temperaturas extremas (7,9 °C e 36,1°C). A temperatura que provocou o maior grau de hidrólise foi a de 7,9°C para a enzima 1 e a de 36,1

°C para a enzima 2. Porém, os valores finais de lactose alcançados foram muito semelhantes, indicando a possibilidade de utilizar-se a menor temperatura.

Carminatti (2001) realizou ensaios a várias temperaturas (30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C) para determinar a faixa de temperatura ótima para a atuação da lactase. Observou que foi na faixa entre 30 °C e 40 °C que ocorreram as melhores conversões da lactose em glicose e galactose, obtendo-se valores próximos a 100% de hidrólise. Com o aumento da temperatura, a conversão da lactose reduziu sensivelmente, sendo que à 45°C a conversão máxima obtida foi de aproximadamente 70%, e a 50 °C foi de apenas 35%. Já Andrade (2005), optou por afixar a temperatura em 30 °C em todo o experimento, variando apenas outros parâmetros, como quantidade de enzima. Longo (2006) também optou por manter uma temperatura constante, porém de 40 °C.

Observando as Figuras 18, 19, 20 e 21, percebe-se que quanto maiores as temperaturas com o uso de uma mesma enzima a uma mesma concentração, maior é a redução da lactose na primeira hora de hidrólise. Isto também ocorre quanto maiores as concentrações da enzima, com o uso de uma mesma enzima a uma mesma temperatura. Isto também foi verificado por Carminatti (2001), que comenta que o grau de hidrólise obtém seu máximo em aproximadamente 60 minutos. Porém, ele observou que o grau permanecia constante no resto do ensaio, que teve duração de 4 horas, o que não foi observado no presente experimento, onde o grau de hidrólise continuou aumentando com o passar das horas, embora a uma menor taxa.

5.2 Análise microbiológica

Na Tabela 7 são apresentadas as médias dos valores de contagem total de microrganismos das matérias-primas e das amostras após serem submetidas à reação de hidrólise.

Tabela 7 – Contagem total da matéria-prima e das amostras após a reação de hidrólise.

Parâmetro	Enzima (lactase)	Matéria-prima	Leite após hidrólise
Contagem total	1	$6,67 \cdot 10^4$ ^a	$232 \cdot 10^4$ ^{a A}
(UFC/mL)	2	$5,33 \cdot 10^4$ ^a	$81,7 \cdot 10^4$ ^{a A}

* Médias na linha seguidas por uma mesma letra (minúscula) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

** Médias de um mesmo parâmetro na coluna seguidas por uma mesma letra (maiúscula) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Pode-se visualizar, através da Tabela 7, o aumento da média da contagem de microrganismos após a hidrólise, já comentado anteriormente, apesar de não ter sido considerado significativo estatisticamente. Pode-se perceber que a média de UFC/mL encontrada após a hidrólise ultrapassou o limite estabelecido pela legislação ($3 \cdot 10^5$), porém, na Tabela 8 são apresentados os valores da contagem total de microrganismos presentes por amostra de leite e então se percebe que com o uso da enzima 1, três tratamentos (1, 2 e 5) não excederam esse limite e com o uso da enzima 2, sete (1, 2, 5, 6, 8, 11 e 12). Essa diferença na contagem entre tratamentos iguais (mesma temperatura e concentração da enzima) com o uso de enzimas diferentes pode ser explicada pela maior eficiência demonstrada pela enzima 2, que alcançou valores superiores de hidrólise em tempos inferiores, reduzindo, portanto, a multiplicação dos microrganismos.

Tabela 8 – Contagem total de microrganismos presentes nas amostras e período por tratamento e enzima utilizada.

Tratamento	Temp. (°C)	Conc. enzima (g/L)	Com enzima 1		Com enzima 2	
			CT (UFC/mL)	Período (h)	CT (UFC/mL)	Período (h)
1	12	0,2	$5,05 \cdot 10^4$ ^a *	14	$8,32 \cdot 10^4$ ^a	14
2	12	0,8	$4,75 \cdot 10^4$ ^a	14	$4,67 \cdot 10^4$ ^a	11
3	32	0,2	$5,00 \cdot 10^6$ ^b	7	$4,77 \cdot 10^6$ ^b	7
4	32	0,8	$6,32 \cdot 10^5$ ^a	7	$4,75 \cdot 10^5$ ^a	7
5	22	0,5	$2,15 \cdot 10^5$ ^a	11	$2,62 \cdot 10^4$ ^a	10
6	22	0,5	$3,85 \cdot 10^5$ ^a	11	$3,37 \cdot 10^4$ ^a	10
7	36,1	0,5	$3,85 \cdot 10^6$ ^b	5	$1,77 \cdot 10^6$ ^c	5
8	7,9	0,5	$3,67 \cdot 10^5$ ^a	15	$2,47 \cdot 10^5$ ^a	14
9	22	0,9	$6,72 \cdot 10^5$ ^a	11	$5,22 \cdot 10^5$ ^a	9
10	22	0,1	$1,57 \cdot 10^7$ ^c	14	$1,77 \cdot 10^6$ ^c	14
11	22	0,5	$5,32 \cdot 10^5$ ^a	11	$2,80 \cdot 10^4$ ^a	10
12	22	0,5	$3,60 \cdot 10^5$ ^a	11	$2,15 \cdot 10^4$ ^a	10

* Médias na coluna seguidas por uma mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Os maiores valores de contagem total foram encontrados nas maiores temperaturas (22, 32 e 36,1°C) e com o uso de menores concentrações de enzimas (0,1; 0,2 e 0,5 g/L). Segundo Longo (2006), a temperatura ótima para a enzima seria de 40°C, porém, esta temperatura é ideal para proliferação de microrganismos patogênicos no leite, portanto, o tempo de reação não deve ultrapassar 4 horas, e no presente experimento, as amostras do tratamento 7 ficaram submetidas a uma temperatura de 36,1°C por um período de 5 horas, o que justifica o grande aumento nos valores de contagem total. Isto também pode ter justificado o aumento na contagem total no tratamento 3, onde as amostras ficaram submetidas a uma temperatura também elevada, de 32°C, por um período de 7 horas. Já no aumento do número de microrganismos das amostras submetidas ao tratamento 10, possivelmente houve influência da temperatura de 22°C, um pouco elevada, mas, principalmente, do longo período de tratamento, 14 horas. Isto pode ser confirmado visualizando-se o tratamento 8, onde as amostras ficaram submetidas ao tratamento por um período de 15/14 horas, porém a uma temperatura de 7,9°C, e a contagem total não aumentou significativamente em relação ao valor inicial.

5.3 Análise Sensorial

Foi feito um teste triangular, onde 34 julgadores avaliaram a diferença global entre duas amostras de leite submetidas a tratamentos diferentes, sendo que apenas 16 deles perceberam a diferença entre as amostras oferecidas. Destes 16 julgadores, 9 perceberam a diferença entre amostras com valores extremos de lactose e 7, entre amostras de um valor extremo com um intermediário. Em nível de 5% de significância, esses 34 julgadores deveriam ter feito 17 acertos (LYON, 1992), o que não ocorreu, optando-se então pela não realização dos testes de comparação múltipla e de preferência. A não percepção da diferença entre as amostras pelos julgadores provavelmente ocorreu devido às comparações terem sido feitas todas entre leites com teores de lactose reduzido, que embora diferentes, pois possuíam teores diferentes de lactose (aproximadamente 0,45; 1,15 e 2,03 g/100g), apresentavam semelhanças, como maior viscosidade e sabor mais doce. Longo (2006) avaliou sensorialmente iogurtes elaborados a partir de leites com baixo teor de lactose e verificou uma baixa percepção de acidez e um significativo aumento do sabor doce, o que ocasionou um alto índice de preferência (89,66%) destes iogurtes. Segundo Vinhal (2001) e Louserma *apud* Andrade (2005), a reação de hidrólise de fato ocasiona modificações físicas e químicas dos produtos, e entre elas pode-se citar o aumento da solubilidade, do poder adoçante e da digestibilidade dos açúcares e da viscosidade, do corpo, da textura e do paladar dos produtos.

Longo e Waszczynskyj (2005) também verificaram diferenças na comparação sensorial de leites UHT, na qual o leite com baixo teor de lactose apresentou textura significativamente mais espessa e sabor doce mais intenso que o leite com teor de lactose normal.

6 CONCLUSÕES

Com base no presente estudo, concluiu-se que, em relação às quantias de lactose durante a hidrólise, à uma mesma temperatura a menor concentração de enzima provocou uma menor redução da lactose. Já quando utilizadas as mesmas concentrações de enzima em diferentes temperaturas, não foi possível verificar um comportamento padrão, sendo que em alguns casos houve maior redução à temperaturas mais elevadas, enquanto que em outros, à temperaturas menos elevadas. Quanto maiores as temperaturas e as concentrações de enzima, mantendo-se o outro parâmetro constante (concentração e temperatura, respectivamente), e com o uso de uma mesma enzima, maior a redução da lactose na primeira hora de hidrólise.

A hidrólise da lactose estimada por fórmula, através da crioscopia atingida, alcançou valores aproximados de 80% e a hidrólise encontrada, calculada por meio de estequiometria, atingiu valores aproximados de 100%. Com isto, o teor de lactose foi reduzido de 4,79 g/100g para menos de 1g/100g. Esta redução possibilitaria a ingestão do leite por indivíduos intolerantes a este carboidrato. As maiores porcentagens de hidrólise e, conseqüentemente, os menores teores de lactose atingidos foram verificados em temperaturas de 15 a 30°C e com o uso de concentrações de enzima de 0,6 a 1,0 g/L.

Existe diferença entre a eficiência das enzimas fornecidas pelos dois fabricantes na hidrólise da lactose, embora as duas sejam provenientes de uma mesma fonte, a levedura *Kluyveromyces lactis*.

A adição da enzima lactase provocou modificações nas características e propriedades físico-químicas do leite, como redução do pH, da crioscopia, dos teores de gordura e de lactose e aumento da densidade, do extrato seco total (EST), do extrato seco desengordurado (ESD), dos teores de proteína e de glicose.

A média de UFC/ml encontrada após a hidrólise ultrapassou o limite estabelecido pela legislação, porém, nas contagens realizadas nas amostras de leite, com o uso da enzima 1, três tratamentos não excederam esse limite e com o uso da enzima 2, sete. Os maiores valores de contagem total foram encontrados nas maiores temperaturas (22, 32 e 36,1°C) e com o uso de menores concentrações de enzimas (0,1; 0,2 e 0,5 g/L).

As diferenças entre amostras de leite submetidas a tratamentos diferentes, ou seja, com teores de lactose diferentes, não foram sensorialmente percebidas através do teste triangular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTEAGA, G.E. et al. Systematic experimental designs for product formula optimization. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 5, n. 8, p. 243-254, aug. 1994.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12806**: Análise Sensorial dos Alimentos e Bebidas. Rio de Janeiro, 1993. 8p.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12995**: Teste triangular em análise dos alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1993b. 5p.

ANDRADE, V. T.; BRANDÃO, S. C. C.; ALVIM, T. C. Sorvete de doce de leite delactosado. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. Anais... **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 126-130, jul.-ago. 2004.

ANDRADE, A.C. de. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. 2005. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

BEYER, P.L. Terapia clínica nutricional para distúrbios do trato gastrointestinal baixo. In: MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. (Ed.). **Krause alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10^aed. São Paulo: Roca, 2002, p.643-670.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais**. Aprovado pela Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Brasília-DF, 1998.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Leite Tipo B, Leite Tipo C, Leite Pasteurizado e Leite Cru Refrigerado**. Aprovado pela Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Brasília-DF, 2002.

_____. Ministério da Saúde. **Utilização de enzimas na indústria de alimentos**. Aprovada pela Resolução RDC nº. 348, de 02 de dezembro de 2003. Brasília-DF, 2003a.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Aprovado pela Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Brasília-DF, 2003b.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos.** Aprovado pela Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Brasília-DF, 2006.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica.** Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 3a ed. 751p.

CARDELLO, H.M.A.B.; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangifera indica* L.) var. Haden, durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 211-217, mai.-jul. 1998.

CARMINATTI, C.A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis*.** 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**, 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 652p.

FARIAS, F.F.; FAGUNDES NETO, U. Intolerância aos carboidratos. **The Electronic Journal of Pediatric**, v. 8, n. 3, dec 2004. Disponível em: <http://www.e-gastroped.com.br/dec04/intolerancia.htm>. Acesso em: 27 fev. 2007.

FERREIRA, V. L. P. (Coord.). **Análise sensorial – Testes discriminativos e afetivos.** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 73-77, 2000.

GACESA, P.; HUBBLE, J. **Tecnologia de las enzimas.** Zaragoza: Acribia S.A., 1990. 206 p.

HOLSINGER, V. H.; KILGERMAN, K. H. Application of lactose in dairy foods and other foods containing lactose. **Food Technology**, v. 45, n. 1, p. 94-95, 1991.

LACTOSCAN. Ultrasonic Milk Analyzers. **Métodos químicos tradicionais**. Disponível em: < http://www.lactoscan.com/portugal/index_portugal.html>. Acesso em: 20 dez. 2007.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 583-592, 2000.

LESSOF, M.H. **Alergia e intolerancia a los alimentos**. Zaragoza: Acribia S.A., 1996. 218p.

LONGO, G.; WASZCZYNSKYJ, N. Avaliação sensorial de leite UHT com baixo teor de lactose. In: XXII CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2005, Juiz de Fora. **Anais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 77-80, jul.-ago. 2005.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LYON, D.H et al. **Guidelines for sensory analysis in food product development and quality control**. First Edition, Chapman & Hall, London, 1992.

MAHAUT, M. *et al.* **Productos lácteos industriales**. Zaragoza : Acribia, S.A., 2004. 177p.

MAHONEY, R. R. (1997). Lactose: enzymatic modification. In: FOX, P.F.(Ed.). **Advanced Dairy Chemistry**. Vol. 3: Lactose, water, salts and vitamins. London: Chapman & Hall, p. 77-125.

MANAN, D. M. A.; KARIM, A. A.; KIT, W. K. Lactose content of modified enzymetreated 'dadih'. **Food Chemistry**, n. 65, p. 439-443, 1999.

MATIOLI, G.; ENDO, A.S.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Beta-galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*: estabilidade operacional. In: 10º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 1994. **Anais...** 1994. p. 1308-1311.

MONTIPÓ, R.B. **Determinação do ponto de congelamento do leite bovino “in natura” da bacia leiteira de Santa Maria-RS**. 1992. 244f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1992.

MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. Influência de β -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose. **Arquivos de Ciência da Saúde da Unipar**, v. 4, n. 3, p. 283-290, set.-dez. 2000.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 29-30 de agosto de 2002, Toledo-PR. **Anais do II Sul- Leite**. Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. 212p. p. 206-217.

OLIVEIRA, C.C.M. de. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante – Desenvolvimento de um sistema de produção estável**. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2005.

ORNELLAS, L. H. **Técnica Dietética: seleção e preparo de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1995, 6^a ed. 320p.

PEREIRA, D.B.C. *et al.* **Físico-química do leite e derivados – Métodos Analíticos**. Juiz de Fora:EPAMIG, 2001, 2^a ed. 234p.

SANTIAGO, P.A. **Contribuição ao estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus***. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2002.

SANTIAGO, P.A. *et al.* Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p.567-572, out.-dez. 2004.

SCHLIMME, E.; BUCHHEIM, W. **La leche y sus componentes: Propriedades químicas y físicas**. Zaragoza: Acribia S.A., 2002. 121p.

SGS. SGS do Brasil. **Análise sensorial**. Disponível em: <http://www.br.sgs.com/pt_br/folheto_analise_sensorial-9.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2008.

SILVA, D.O.; CARDOSO, V.L. **Hidrólise da lactose do soro de queijo utilizando a enzima β -galactosidase**. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2004/exatas/hidrolise_da_lactose.PDF>. Acesso em: 26 fev. 2007.

SOUSA, G.D.B.de; RIBEIRO, E.J. **Influência da aeração na síntese de β -galactosidase por fermentação com *Kluyveromyces marxianus***. 2005. 27f. Relatório final (Faculdade de Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

SPG. Sociedade Portuguesa de Gastreterologia. **O que é? Intolerância ao leite**. Disponível em: <<http://www.spg.pt>>. Acesso em: 15 mar. 2007.

SUENAGA, C. I. *et al.* **Intolerância à lactose**. UNIFESP: Escola Paulista de Medicina. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/material/tis/currbio/trab2001/grupo1/intolerancia.htm>>. Acesso em: 26 fev. 2007.

TOMÁS, C.M. **Estudo da hidrólise da lactose por β -galactosidase na forma livre e imobilizada**. 1998. 69f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1998.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2003. 192 p.

VESA, T.H.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. Lactose intolerance. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. 90002, 165S-175S, 2000.

VINHAL, E.F. **Hidrólise da lactose no leite por β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis***. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

VRESE, M.de et al. Probiotics – compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, 421S-429s, 2001.