



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA  
FEDERAL DO PARANÁ**

**Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de  
Alimentos**

CATIUCIA GIRALDI

**APLICAÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE  
COM LACTOSE HIDROLISADA EM IOGURTE COM BAIXO TEOR DE  
LACTOSE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MEDIANEIRA

2014

CATIUCIA GIRALDI

**APLICAÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE  
COM LACTOSE HIDROLISADA EM IOGURTE COM BAIXO TEOR DE  
LACTOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) como requisito parcial para o título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lys Mary B. Cândido  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Claudia Rodrigues

MEDIANEIRA

2014

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado guiando e iluminando meus passos.

A professora Dra. Lys Mary Bileski Candido, pela orientação desta pesquisa e ensinamentos e a professora Dra. Angela Cláudia Rodrigues pelo incentivo e apoio prestados.

Aos meus pais, Aristeu e Noeli, e meus irmãos, Catia, Daiana e Thiago, pelo amor incondicional e pelo apoio.

Ao meu esposo Denilson, pelo amor, incentivo, companheirismo e suporte emocional.

A todos os colegas de turma, gostaria de estender meus agradecimentos pelo apoio prestado ao decorrer de toda a pesquisa.

Às empresas Frimesa Cooperativa Central e Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

GIRALDI, Catiucia. Aplicação de concentrado proteico de soro de leite com lactose hidrolisada em iogurte com baixo teor de lactose. 2014. 69 f. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2014.

O soro de leite é uma importante fonte de proteínas. Porém, no Brasil ainda há um grande número de laticínios que realizam o descarte deste subproduto da fabricação de queijos, gerando assim, desperdícios e um problema socioambiental. A busca por novas aplicações ao soro de leite pode aumentar o uso potencial deste subproduto como ingrediente lácteo em diversos alimentos. Este trabalho teve como objetivo a hidrólise da lactose do concentrado proteico de soro de leite (CPS) para aplicação como ingrediente lácteo em iogurte cremoso para intolerantes à lactose. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para investigar o efeito de dois parâmetros (tempo e concentração de enzima) na hidrólise da lactose do CPS e do leite para produção de iogurte com redução de lactose. A experimentação teve como objetivo definir as faixas ótimas de operação para as variáveis do processo, visando à maximização da hidrólise da lactose. As condições ótimas para a hidrólise da lactose foram: para o CPS, concentração de enzima 0,22% por 1680 minutos e para o leite, 0,13% de enzima por 120 minutos. Depois de hidrolisado, o CPS foi submetido à secagem por atomização e apresentou os valores de lactose, glicose, galactose e proteínas iguais a 2,98; 19,41; 15,89 e 36,7 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra, respectivamente; 5,00% de umidade e 8,06% de cinzas. Após a hidrólise, as amostras de leite foram fortificadas com diferentes concentrações de CPS e leite em pó desnatado (LPD) para produção de iogurte cremoso. A amostra controle e as amostras fortificadas com 2 e 4% de CPS apresentaram os menores valores de lactose: 0,05; 0,09 e 0,13 g. 100 g<sup>-1</sup> de iogurte, respectivamente. Foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas no CPS em pó e nas amostras de iogurtes, e ambos estavam dentro dos padrões da legislação vigente. A partir da pesquisa, verificou-se ser possível o uso potencial do CPS hidrolisado na produção de iogurte com baixo teor de lactose, beneficiando os intolerantes à lactose, à indústria e o meio ambiente.

**Palavras-chave:** Proteínas. Lactase. Alimentos para fins especiais.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
3.1 SORO DE LEITE .....	11
3.2 CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE .....	13
3.3 LACTOSE .....	15
3.4 HIDRÓLISE DA LACTOSE .....	16
3.5 INTOLERÂNCIA À LACTOSE .....	17
3.6 IOGURTE .....	19
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>21</b>
<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>28</b>
<b>ARTIGO 2</b> .....	<b>45</b>

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

TABELA 1 – NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO.....	34
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE.....	36
TABELA 3 – MATRIZ DOS ENSAIOS DO DCCR 2 <sup>2</sup> (COM VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DE PERCENTUAL DE HIDRÓLISE.....	37
TABELA 4 – EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO DCCR 2 <sup>2</sup> SOBRE O PERCENTUAL DE HIDRÓLISE.....	37
TABELA 5 – COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE.....	38
TABELA 6 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA DESCRIÇÃO DO MODELO QUADRÁTICO.....	38
TABELA 7 – VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE HIDRÓLISE.....	40
TABELA 8 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE APÓS SECAGEM.....	41

### ARTIGO 2

TABELA 1 – NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO.....	51
TABELA 2 – ADIÇÃO DE SUPLEMENTOS ÀS BASES DE LEITE E LEITE CONTROLE UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE IOGURTE INTEGRAL.....	52

TABELA 3 – MATRIZ DOS ENSAIOS DO DCCR 2 <sup>2</sup> (COM VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DE PERCENTUAL DE HIDRÓLISE.....	55
TABELA 4 – EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO DCCR 2 <sup>2</sup> SOBRE O PERCENTUAL DE HIDRÓLISE.....	55
TABELA 5 – COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE.....	56
TABELA 6 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA DESCRIÇÃO DO MODELO QUADRÁTICO.....	56
TABELA 7 – VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE HIDRÓLISE.....	57
TABELA 8 – CONTAGEM PADRÃO DE MESÓFILOS PARA MICRO-ORGANISMOS PRESENTES NOS TRATAMENTOS APÓS A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	58
TABELA 9 – CARACTERIZAÇÃO DOS INGREDIENTES LÁCTEOS UTILIZADOS NAS FORMULAÇÕES DOS IOGURTES.....	59
TABELA 10 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES DE IOGURTES E TEMPO DE FERMENTAÇÃO.....	59
TABELA 11 – TEORES DE CARBOIDRATOS PRESENTES NAS FORMULAÇÕES DE IOGURTES.....	61
TABELA 12 – COMPORTAMENTO DOS IOGURTES EM RELAÇÃO A VISCOSIDADE, SINÉRESE E CRA.....	63
TABELA 13 – PERFIL DE TEXTURA DAS AMOSTRAS DE IOGURTES.....	64
TABELA 14 – CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS VIÁVEIS.....	66

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

FIGURA 1 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVAS DE CONTORNO (B) PARA HIDRÓLISE (%), EM FUNÇÃO DO TEMPO (MIN) E DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA (%).....39

### ARTIGO 2

FIGURA 1 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVAS DE CONTORNO (B) PARA HIDRÓLISE (%), EM FUNÇÃO DO TEMPO (MIN) E DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA (%).....57

FIGURA 2 – CROMATOGRAMAS DAS FORMULAÇÕES DE IOGURTES: AMOSTRA CONTROLE (A); LPD1 (B); LPD2 (C); CPS1 (D); CPS2 (E) E LPD:CPS (F). FASE MÓVEL (1), LACTOSE (2), GLICOSE (3), GALACTOSE (4) E ÁCIDO LÁTICO (5).....62

## LISTA DE SIGLAS

ABIQ - Associação Brasileira de Queijos  
ALA - A-Lactoalbumina  
BLG - B-Lactoglobulina  
BSA - Albumina do Soro Bovino  
CPS - Concentrado proteico de soro de leite  
CPSLH - Concentrado proteico de soro de leite com lactose hidrolisada  
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio  
DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional  
DF - Diafiltração  
FAO - Food and Agriculture Organization  
GMP – Glicomacropéptido  
GOS - Galactooligossacarídeo  
IG's - Imunoglobulinas  
LPD - Leite em pó desnatado  
MRS - Metodologia de Superfície de Resposta  
NF - Nanofiltração  
PCA - *Plate Count Agar*  
SIF - Serviço de Inspeção Federal  
UF - Ultrafiltração  
UFC - Unidades Formadoras de Colônias

## 1 INTRODUÇÃO

A produção leiteira e a industrialização levam a um elevado consumo de água, deposição de resíduos de sanitização e de processamento. Um destes resíduos é o soro de leite. O soro de leite se descartado nos cursos de água provoca grandes efeitos poluentes. Quando o soro é descartado sem tratamento apresenta uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cerca de 30 a 50g de oxigênio por litro de soro de leite. Uma indústria com uma produção média de 10.000 litros de soro de leite por dia polui tanto quanto 5.000 habitantes (SMITHERS, 2008; TULLIO et al., 2007; CANDIDO; KRUGER, 2012).

Segundo a ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijos) a produção brasileira de queijos inspecionada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério de Agricultura é de aproximadamente 500 mil toneladas e dá origem a um volume estimado de 4,5 bilhões de litros de soro de leite. Este volume corresponde a cerca de 281.250 toneladas equivalentes de soro de leite em pó, sem retirada ou concentração de nenhum de seus nutrientes ou componentes (FARIAS, 2011).

Além do queijo, a caseína do leite tem sido obtida de forma isolada por suas propriedades funcionais biológicas como fonte de peptídeos bioativos (KRUGER; CANDIDO, 2009) e tecnológicas (CANDIDO; KRUGER, 2012), o que também tem como subproduto o soro. A perspectiva de mercado em expansão de produtos lácteos, geradores de soro de leite (queijos e caseínas), nos últimos anos, combinada com o aumento de custos do tratamento de efluentes, aumenta a necessidade do aproveitamento do soro de leite.

Este é um problema mundial. De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization) o queijo é um dos principais produtos da agroindústria. A União Européia domina esta produção e consumo, seguida dos Estados Unidos. A composição e tratamento dos efluentes gerados é objeto de trabalhos recentes (CARVALHO et al., 2013).

A conversão do soro de leite de resíduo para insumo pode ser considerada uma inovação tecnológica na cadeia de produção agroindustrial do leite. A tecnologia de separação por membranas vem sendo aplicada para a obtenção de concentrado proteico de soro de leite (CPS) com alto teor de proteínas (CANDIDO; KRUGER, 2012).

Segundo dados brasileiros, até 70% dos adultos no país têm algum sintoma após consumir leite de vaca ou derivados. Em países como Japão e alguns do continente africano, praticamente todos os habitantes com mais de 80 anos têm algum grau de intolerância (INTOLERÂNCIA..., 2012). Para essas pessoas, o consumo de leite e produtos lácteos pode causar dor abdominal, diarreia, flatulência, entre outros sintomas desagradáveis.

A exclusão de leite e derivados lácteos da dieta pode diminuir os sintomas gastrointestinais em indivíduos intolerantes à lactose, no entanto, as consequências da exclusão do leite para a saúde dependerão da possibilidade de ingestão apropriada de nutrientes essenciais como o cálcio, os quais para muitos indivíduos são fornecidos por meio dos produtos lácteos.

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo realizar a hidrólise da lactose do concentrado proteico de soro de leite, para aplicação em iogurte cremoso com baixo teor de lactose para intolerantes à lactose.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a hidrólise da lactose do concentrado proteico de soro de leite para aplicação em iogurte cremoso destinado ao consumo de pessoas intolerantes à lactose.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Promover a hidrólise da lactose do concentrado proteico de soro de leite através do uso da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*.
- ❖ Investigar o efeito de dois parâmetros (tempo e concentração de enzima) no processo de hidrólise enzimática da lactose do CPS e do leite pasteurizado utilizado na fabricação dos iogurtes.
- ❖ Caracterizar o CPS hidrolisado quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos.
- ❖ Avaliar o efeito da hidrólise da lactose do leite sobre o tempo de fermentação do iogurte.
- ❖ Avaliar o efeito da adição de leite em pó desnatado e concentrado proteico de soro de leite sobre o tempo de fermentação do iogurte.
- ❖ Caracterizar os iogurtes elaborados quanto aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e propriedades funcionais tecnológicas.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 SORO DE LEITE

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios que vem despertando o interesse de inúmeros pesquisadores em todo o mundo devido à sua potencialidade nutricional, funcional e econômica (ANTUNES; CAZETTO; BOLINI, 2004). Este subproduto obtido através do processamento do queijo, no qual 1 a 2 kg de queijo resulta na produção de 8 a 9 kg de soro, tem a caseína hidrolisada pela ação da renina, sendo o líquido remanescente chamado de soro doce. Pode também ser obtido por precipitação ácida no seu ponto isoelétrico sendo chamado de soro ácido. O soro do leite de vaca é um líquido que contém de 4 a 6 g de proteínas por litro (PELEGRINE; CHARRASQUEIRA, 2008; BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

As proteínas de soro de leite apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso, exceto pelos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) que não aparecem em excesso, mas atendem às recomendações para todas as idades. Apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004). Apresentam estrutura globular contendo algumas pontes dissulfeto, que conferem certo grau de estabilidade estrutural. A fração proteica do soro é constituída de  $\beta$ -lactoglobulina (BLG),  $\alpha$ -lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glicomacropéptido (GMP). Essas frações podem variar em tamanho, peso molecular e função, fornecendo às proteínas do soro características especiais (KINSELLA; WHITEHEAD, 1989; AIMUTIS, 2004).

A associação das proteínas do soro, induzida pelo calor (em especial a  $\beta$ -lactoglobulina), altera as propriedades da micela, aumentando sua estabilidade ao calor. A funcionalidade das proteínas do soro é muito sensível ao grau de desnaturação, por exemplo, se elas não estiverem sido desnaturadas pelo calor, serão bastante solúveis em pH ácido, uma característica que facilita sua incorporação a bebidas cartonadas. O grau de desnaturação também é extremamente importante e, por esse motivo, deve ser controlado com cuidado, para

a otimização do desempenho das proteínas do soro como substitutos de gordura (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

As diferentes proteínas presentes no soro apresentam funcionalidades distintas. A presença de uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto confere certo grau de estabilidade estrutural. Assim por exemplo a  $\beta$ -lactoglobulina que é a proteína presente em maior quantidade no soro de leite bovino, possui excelentes propriedades gelatinizantes. Assim como a albumina do soro bovino, a  $\alpha$ -lactalbumina tem a capacidade de formar espuma similar à clara do ovo. A lactoferrina e a lactoperoxidase apresentam propriedades bacteriostáticas (ANTUNES, 2003; HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

Segundo Sgarbieri (2004), foi demonstrado que concentrados de proteínas do soro de leite bovino, assim como várias de suas proteínas e peptídios, apresentam ação inibitória para diversos tipos de câncer, em modelos animais e em culturas de células cancerígenas. A atividade antimicrobiana e a antiviral têm sido demonstradas para as proteínas do soro de leite, tais como, lactoferrina, lactoperoxidase,  $\alpha$ -lactalbumina e as imunoglobulinas. As proteínas do soro de leite apresentam ainda, propriedades imunomoduladoras e podem ser aproveitadas com grande vantagem em produtos antimicrobianos (MARQUES et al., 2009).

De acordo com Newburg e Walker (2007) a digestão da lactoferrina produz a lactoferricina, um peptídeo derivado da porção terminal N da lactoferrina com potente atividade contra bactérias patogênicas Gram-positivas e negativas. Desta forma, tanto a lactoferrina quanto o produto da sua digestão apresentam atividade antimicrobiana.

### 3.2 CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE

Os concentrados obtidos pela ultrafiltração estão disponíveis em grande variedade de acordo com o conteúdo de proteínas. O baixo custo em relação ao leite em pó desnatado torna-o atrativo para uso em formulações, com o objetivo de modificar propriedades através de gelatinização, aumento de viscosidade, estabilização de emulsões ou espumas, entre outros, são produzidos por

ultrafiltração e secagem do soro e possuem entre 34 e 88% de proteínas ( ATRA, 2005; SODINI; MATTAS; TONG, 2006).

De acordo com Caldas (2007) a capacidade das proteínas do soro de leite quando em solução, de formar géis estáveis depois do aquecimento é uma importante propriedade funcional, que as diferencia da caseína por serem insensíveis à coagulação ácida assim como a ação da quimosina. O grau de desnaturação proteica, o conteúdo de lactose e a quantidade de lipídeos e minerais são fatores fundamentais na determinação da funcionalidade de um produto. Em geral a desnaturação das proteínas reduz a solubilidade, afetando de modo desfavorável às funções que exigem grande atividade de superfície, como a emulsificação e formação de espuma (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro de leite têm propriedades funcionais que conferem propriedades físicas benéficas quando utilizados como ingredientes em alimentos, principalmente devido à sua alta solubilidade, absorção de água, gelatinização e capacidade emulsificante (SGARBIERI, 1986). Sodini, Mattas e Tong (2006) observaram que o pH do soro e o tratamento térmico na fabricação de concentrados de proteína de soro de leite teve efeito significativo sobre as propriedades físicas dos iogurte fortificados no estudo.

As principais operações unitárias que podem estar envolvidas na produção de soro em pó e concentrado protéico de soro de leite são a separação por membranas, a evaporação a vácuo, a cristalização e a secagem em *spray dryer* (PERRONE, 2010). A adoção comercial da tecnologia de membranas, incluindo ultrafiltração (UF), diafiltração (DF), nanofiltração (NF) e troca iônica, tem resultado no desenvolvimento de diversos produtos com funcionalidades variadas e excelentes. O desempenho das membranas de ultra e nanofiltração pode ser caracterizado em termos de fluxo de permeado, retenção da membrana e rendimento, cujos parâmetros são determinados pela pressão, taxa de fluxo de reciclagem e da temperatura (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010; ATRA et al., 2005).

A UF permite uma variação na relação de concentração entre os vários componentes do soro. Devido à retenção seletiva, as proteínas soro de leite e a gordura são recuperadas comercialmente pela ultrafiltração (UF), porque estas moléculas, em virtude do seu tamanho, são retidas, enquanto a lactose e as cinzas são capazes de passar através da membrana para o permeado. Em seguida, a

corrente de retentado é alimentado em secadores de spray em pó para produzir concentrado protéico de soro de leite (CPS) (BOSCHI, 2006; YEE; WILEY; BAO, 2007). A ultra e a nanofiltração são processos de membranas para a separação e concentração de substâncias com um peso molecular entre  $10^3$  e  $10^6$  Dalton (Da) para ultrafiltração e entre 100 e 500 Da para nanofiltração. A ultrafiltração retém além das proteínas, parte da lactose, gordura, e as bactérias (ATRA, 2005; HUI et al., 2004).

Para aumentar a concentração dos sólidos totais e reduzir a atividade de água utiliza-se a evaporação, que consiste em concentrar os alimentos líquidos por ebulição (ORDOÑEZ et al., 2005). Quando submetido a baixa pressão (vácuo), tem-se uma redução no ponto de ebulição da água pura, o que minimiza energia para sua mudança de fase (BRENNAN, 1996). É possível desta forma que o soro seja concentrado a teores de sólidos lácteos entre 52% m/m e 60% m/m (SCHUCK et al., 2010).

Após a etapa de concentração submete-se o concentrado proteico de soro de leite à cristalização. As soluções de lactose podem se tornar extremamente supersaturadas antes que ocorra o fenômeno da cristalização (HOLSINGER, 1997). A cristalização do soro concentrado provoca a substituição de parte da lactose amorfa por lactose cristalina, transformando o soro em um produto não higroscópico (HYND, 1980). Após a cristalização, o retentado é alimentado em secadores de pulverização *spray dryer* para a produção do concentrado proteico de soro de leite em pó (YEE; WILEY; BAO, 2007). A secagem por atomização, pulverização ou *spray-drying* é um processo contínuo onde um líquido ou pasta, é transformado em produto seco, caracterizando-se pelo tempo de secagem relativamente curto. O processo consiste basicamente na atomização do líquido num compartimento que recebe fluxo de ar quente. A rápida evaporação da água permite manter baixa a temperatura das partículas de maneira que a alta temperatura do ar de secagem não afete demasiadamente o produto (MADEIRA, 2009).

### 3.3 LACTOSE

A lactose (4-O- $\beta$ -galactopiranosil-D-glucopiranosose,  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) é um dissacarídeo constituído por uma molécula de glicose ligada a uma molécula de

galactose (GANZLE; HAASE; JELEN, 2008). Segundo Carminatti (2001) a molécula de lactose contém um número de sítios ativos que a torna sensível a modificações enzimáticas e/ou químicas.

A lactose pode estar presente nos produtos lácteos, em duas formas cristalinas,  $\alpha$ -hidratada e  $\beta$ -anidra. O processo de secagem do soro de leite, do concentrado protéico de soro de leite implica na formação de lactose no estado amorfo, que é altamente higroscópica. Quando a secagem é realizada sem uma prévia cristalização, há uma grande tendência de agregação de partículas coloidais, o que se deve a presença de lactose em um estado vítreo ou amorfo (GANZLE; HAASE; JELEN, 2008; MASTERS, 2002).

As frações de alfa e beta lactose possuem solubilidades distintas e a mutarrotação é um fator importante na cristalização. A forma estrutural da  $\alpha$ -lactose pode ser convertida na forma estrutural beta por meio da mudança na posição da hidroxila e do hidrogênio no grupo redutor. Esta mudança na rotação na conformação espacial é denominada mutarrotação (PERRONE, 2010). Ocorre que a  $\alpha$ -lactose cuja rotação específica a 15 °C varia de + 89 °C no início a + 55 °C ao final, isto é, quando se alcança o equilíbrio com a forma  $\beta$ , cujo poder rotatório é mais baixo (+35 °C). No momento do equilíbrio, as proporções são de 62% de  $\beta$  e 35% de  $\alpha$ -lactose (ORDOÑEZ et al., 2005).

A utilização da lactose está relacionada com algumas das suas propriedades e depende de níveis baixos de doçura relativa, sua tendência à cristalização, sua capacidade de acentuar sabor, seus atributos nutricionais e sua capacidade de participar da reação de Maillard. Como ocorre com os polióis, a lactose estabiliza a estrutura da proteína em solução, por essa razão, tem sido usada, por exemplo, para reduzir a insolubilização da lipovitelina, durante a secagem a frio, bem como para preservar a atividade de enzimas como a quimosina, durante a secagem por atomização (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

### 3.4 HIDRÓLISE DA LACTOSE

Uma aplicação com alta tecnologia é a hidrólise enzimática da lactose, cuja importância econômica tem vindo a aumentar desde a década de 1960. Ao lado do

aspecto médico de intolerância à lactose, algumas vantagens tecnológicas muito importantes resultam a partir da hidrólise da lactose em glicose e galactose. Por exemplo, a solubilidade aumenta de 18 a 55% ( p / v ) a uma conversão de 80% e a doçura sobe até 70 % em relação à sacarose (NOVALIN; NEUHAUS; KULBE, 2005).

Há dois métodos para realização da hidrólise da lactose: hidrólise ácida e hidrólise enzimática. A hidrólise ácida da lactose não é favorável devido à formação de cor castanha na solução, incrustações de resinas de troca iônica usadas no processamento, problemas como desnaturação de proteínas que podem estar presentes na solução de lactose e produção de sub-produtos indesejáveis. A melhor alternativa é a utilização do método enzimático. A hidrólise enzimática da lactose de leite, leite desnatado e soro de leite é realizada com a adição da enzima  $\beta$ -galactosidase conhecida como lactase (AL-MUFTAH; ABU-REESH, 2005; SENER; KILIC; OZBEK, 2006).

As enzimas utilizadas podem ser de origem bacteriana (*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 (GACESA, HUBBLE, 1990).

A enzima galactosidase (lactase) está distribuída em micro-organismos, plantas e tecidos animais. Essa enzima catalisa a hidrólise da lactose 4-O- $\beta$ -galactopiranosil-D-glucopiranosose, originando duas moléculas, uma de glicose e a outra de galactose. A glicose é posteriormente utilizada como uma fonte de energia e a galactose se torna um componente de glicolípidos e glicoproteínas (ANSARI; HUSAIN, 2011; LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008).

As enzimas podem ser utilizadas na sua forma livre ou imobilizadas. Os processos contínuos com as enzimas imobilizadas podem ser realizados em diferentes tipos de reatores de membrana (AL-MUFTAH; ABU-REESH, 2005).

Devido ao fato de que poucas pessoas são intolerantes a baixas doses de lactose e como se pode fornecer leite com a lactose hidrolisada, ou lactase comercialmente disponível em forma líquida ou em tablete, a esses indivíduos, os produtos lácteos devem ser considerados como uma parte importante de uma dieta variada e equilibrada. (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

### 3.5 INTOLERÂNCIA À LACTOSE

A intolerância à lactose ocorre quando o corpo humano é incapaz de produzir a enzima lactase, necessária para quebrar a lactose em glicose e galactose, e posteriormente metabolização pelo organismo. Como resultado, a falta da enzima faz com que a lactose seja fermentada no intestino, onde pode produzir condições desagradáveis, tais como gás, distensão abdominal e diarreia (ADHIKARI; DOOLEY; CHAMBERS; BHUMIRATANA, 2010).

Cerca de 70% da população mundial tem hipolactasia, que muitas vezes não é diagnosticada (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008). A razão mais comum para a má digestão da lactose é um declínio da atividade da lactase com aumento da idade. Uma forma rara de hipolactasia, a ausência da enzima lactase, pode ocorrer ao nascimento. Os sintomas da intolerância variam de desconforto abdominal, flatulência e diarreia dependendo da dose de lactose, do tempo de trânsito e da adaptação das bactérias do colón (PAIGE, 2013; MATTAR; MAZO, 2010)

O termo intolerância à lactose (hipolactasia) refere-se à ocorrência destes sintomas quando a dose de lactose excede à capacidade digestiva de lactase intestinal ou em decorrência de uma alteração induzida por enfermidades intestinais subjacentes, (BROWN-ESTERS, 2012; MORENO et al., 2013, NATIONAL..., 2010). A hipolactasia ou deficiência de lactase existe em três formas distintas: congênita, primária e secundária. A forma congênita manifesta um erro inato no nascimento e que persiste ao longo da vida, sendo extremamente rara. A deficiência de lactase primária é a ausência de lactase, parcial ou total, que se manifesta na infância, em diferentes idades e em diferentes grupos raciais sendo a causa mais comum de intolerância, já a deficiência de lactase secundária é resultado de lesões no intestino delgado ou por alguma patologia e pode-se apresentar em qualquer idade, mas é mais comum na infância (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008; UNGER; SCRIMSHAW, 1981; HEYMAN, 2006).

Ocorre o aparecimento de sinais clínicos consistentemente seguindo algumas horas após a ingestão de leite ou de produtos contendo leite em quantidades usuais por pessoas com má absorção de lactose comprovada (UNGER; SCRIMSHAW, 1981). Qiao et al. (2011) observaram (na China) correlação negativa

entre consumo de leite, duração e frequência de consumo e severidade de intolerância a lactose e correlação positiva entre intolerância à lactose e quantidade de leite consumida, concluindo que a intolerância a lactose estaria relacionada ao comportamento de consumo de leite.

O diagnóstico é feito por teste de tolerância, empregando a lactose como desafio. O teste comum de intolerância à lactose é feito através da administração de uma dose muito alta, de um a dois gramas de lactose por quilo de peso corporal. A frequência relatada de intolerância é superestimada, em decorrência disso, a intolerância a um copo de leite de 240 mL costuma ser observada entre indivíduos classificados como intolerantes à lactose. Com a descoberta dos finlandeses do polimorfismo associado com a persistência da lactase, principalmente no norte da Europa, o exame genético passou a ser outra ferramenta diagnóstica mais confortável para o intolerante (GARZA, 1979 apud FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN 2010; MATTAR; MAZO, 2010).

Se dietas sem lactose são utilizadas no tratamento da intolerância à lactose, torna-se de fundamental importância que seja incluída nas dietas destes indivíduos uma boa fonte de cálcio e/ou suplementação de cálcio para atender os níveis de ingestão diária recomendada (HEYMAN, 2006).

Na infância o cálcio é necessário para a mineralização e crescimento ósseo adequado. A quantidade real de cálcio necessária depende, além da idade da criança, de taxas individuais de absorção e de outros fatores dietéticos. A ação da vitamina D promove uma adequada absorção intestinal de cálcio (BUZINARO; ALMEIDA; MAZETO, 2006).

### 3.6 IOGURTE

De acordo com Perdígón et al. (2002) o consumo de produtos lácteos contendo micro-organismos viáveis sob a forma de iogurte e outros leites fermentados tem aumentado ao longo das últimas décadas, devido o seu efeito benéfico sobre a saúde.

A Instrução Normativa do Ministério da Agricultura nº 46/07 (BRASIL, 2007), traz que, iogurte é o produto cuja fermentação se realiza com cultivos

protosimbóticos de *Streptococcus salivarius subs. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, os quais podem ser acompanhados, de forma complementar, de outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final.

O teor de lactose também pode ser reduzido em produtos lácteos através da fermentação láctica. No iogurte produzido tradicionalmente, em torno de 30% da lactose é convertida para ácido láctico (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

Em estudo realizado por Fuente et al. (2003) verificou-se que altas concentrações de minerais foram encontradas em iogurtes, confirmando-se ser fonte de nutrientes essenciais em comparação com o leite cru. De acordo com os mesmos autores, a diferença drástica na distribuição dos minerais (cálcio, fósforo, magnésio e zinco) em iogurtes, quando comparadas com as amostras de leite, mostrou que os elementos associados com a caseína foram redistribuídos durante a fabricação.

Segundo estudo realizado por Segarra et al. (2000), houve diferença no teor de alguns minerais em iogurtes adicionados de diferentes frutas, a presença de pedaços de frutas causou um aumento no teor de ferro, cobre e manganês.

Em termos de composição química, os iogurtes além de integrais podem ser desnatados ou parcialmente desnatados. A redução de sólidos de gordura no iogurte está associada com a perda de textura. Geralmente, quando a gordura é retirada tem-se a substituição por leite em pó desnatado, caseinato de sódio, ou concentrados de proteína de soro de leite (CPSs) (SANDOVAL-CASTILLA et al., 2003). A adição de ingredientes lácteos nos iogurtes, também combate problemas de sinérese, contribuindo com maior firmeza.

## REFERÊNCIAS

ADHIKARI, K., DOOLEY, L. M., CHAMBERS, E., BHUMIRATANA, N. Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n.1, p.113–118, 2010.

AIMUTIS, W. L. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 989-995, abr. 2004.

AL-MUFTAH, A.E., ABU-REESH, I.M. Effects of internal mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n.2, p.139–153, 2005.

ANSARI, S. A., HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* B galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n.2, p.351-359, jul. 2012.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo: Manole, 2003.

ANTUNES, A. E. C., CAZETTO, T. F., BOLINI, H. M. A. Iogurtes Desnatados Probióticos Adicionados de Concentrado Proteico do Soro de Leite: Perfil de Textura, Sinerése e análise sensorial. **Alimentos Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 107-114, 2004.

ANTUNES, A. E. C., MOTTA, E. M. P., ANTUNES, A. J. Perfil de textura e capacidade de retenção de água de géis ácidos de concentrado proteico de soro de leite. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n.1, p.183-189, dez. 2003.

ATRA, R., VATAI, G., BEKASSY-MOLNAR, E., BALINT, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n.3, p. 325–332, 2005.

BALDASSO, C., BARRO, T. C., TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n.3, p. 381- 386, 2011.

BOSCHI, J. R. **Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração**. 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de Out. 2007.

BRENNAN, J. G., BUTTERS, J. R., COWELL, N. D., LILLY, A. E. V. **Los operaciones de la ingenieria de los alimentos**. Zaragoza, Espanã: Acribia. 540 pp. 1996.

BROWN-ESTERS, O et al. Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. **International Dairy Journal**, v. 22, n.2, p. 98–103, 2012.

BUZINARO, E. F., ALMEIDA, R. N. A., MAZETO, G. M. F. S. Revisão: Biodisponibilidade do cálcio dietético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 5, p. 852-861, out. 2006.

CALDAS, M. C. S. **Aproveitamento de soro de leite na elaboração de pão de forma**. 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

CANDIDO, L. M.B., KRUGER, C. H. Proteínas do soro de leite bovino. composição, propriedades nutritivas e funcionais tecnológicas, aplicações **in: Inovação nos processos de obtenção, purificação e aplicação de componentes do leite bovino**. 1 ed. Sao Paulo: Atheneu, v.1, p. 121-156, 2012.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CARVALHO, F. et al. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445–446, n.4, p. 385–396, 2013.

FARIAS, O. A. C. **Soro de Leite em Pó: Brasil caminha para autossuficiência**. 2011. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/espaco-aberto>. Acesso em: 21 ago. 2012.

FENNEMA, O. R., DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FUENTE, M. A., MONTES, F., GUERRERO, G., JUAREZ, M. Analytical, nutritional and clinical methods total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yoghurts. **Food Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 573-578, abr. 2003.

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

GANZLE, M. G., HAASE, G., JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685-694, jul. 2008.

HARAGUCHI, F. K., ABREU, W. C. A., PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Nutrição**, v. 19, n. 4, p.479-488. jul. 2006.

HARJU, M., KALLIOINEN, H., TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p.104-109, 2012.

HEYMAN, M. B. Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents. **Pediatrics**, vol. 118, n. 3, p. 1279-1286. set. 2006.

HOLSINGER, V.H. Physicol and chemical properties of lactose. In: Fox, P.F. **Advanced dairy chemistry**. 2. ed. London: Chapman & Hall, v. 3, n.4, p. 1-38, 1997.

HUI, Y. H. et al., **Handbook of food and beverage fermentation technology**. p.909, New York, 2004.

HYND, J. Drying of whey. **Journal of The Society of Dairy Technology**, v. 33, n.2, p.52-55. Abr. 1980.

**Intolerância à lactose atinge 70% dos adultos**. Disponível em: <http://www.milknet.com.br/pg=noticia&id=20591&local>. Acesso em: 02 set. 2012.

LOMER, M. C., PARKES, G. C., SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice—myths and realities. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 93–103, jan. 2008.

KINSELLA, J. E., WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. **Advances in Foods and Nutrition Research**, v. 33, n. 4, p. 343-438, 1989.

KRUGER, C. H., CANDIDO, L. M. B. Caseínas, propriedades funcionais fisiológicas, aplicações in: **Inovação nos processos de obtenção, purificação de componentes do leite bovino**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2012, v.1, p. 105-119.

MADEIRA, A. N. **Otimização do processo de *spray drying* pelo uso de pré-desumidificadores no ar de entrada**. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade de Taubaté, São Paulo, 2009.

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

MARQUES, M. D., PEDROSA, C., PIERRUCCI, A. P. T. R., ESTEVES, A. C. Propriedades biológicas das proteínas do soro do leite bovino benéficas à Saúde humana. **Ceres Nutrição e Saúde**, v. 4, n. 2, p. 87-94. 2009.

MASTERS, K. **Spray drying in practices**. Denmark. Spray Dry Consult International, p.464, 2002.

MATTAR, R., MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p.230-236, 2010.

MORENO, A. S. et al. Malabsorption syndrome (II). Coeliac disease. Lactose intolerance. Bacterial overgrowth. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 3, p. 465–470, 2013.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. NIH Consensus Development Conference Statement on Lactose Intolerance and Health. **NIH Consensus and State-of-the-Science Statements**, v. 27, n. 1, p. 22–24, 2010.

NEWBURG, D. S., WALKER, W. A. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. **Pediatric Research**, v. 61, n. 1, p. 2-8, 2007.

NOVALIN, S., NEUHAUS, W., KULBE, K. D. A new innovative process to produce lactose-reduced skim milk. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 2, p.212–218, 2005.

ORDOÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos**. Componente dos alimentos e processos. vol. 1, São Paulo: Artmed, 2005.

PAIGE, D.M. Lactose Intolerance. **Encyclopedia of Human Nutrition**. 3 ed. p. 67–73, 2013.

PELEGRINE, D. H. G., CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Brazilian Journal Food Technology**, n. 21, p. 145-151, dez. 2008.

PERRONE, I. T. **Soro de leite: concentração, cristalização da lactose e secagem**. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

QIAO, R. et al. Milk Consumption and Lactose Intolerance in Adults. **Bone**, v. 21, n. 5, p. 473–477, 2007.

SANDOVAL-CASTILLA, O., LOBATO-CALLEROS, C., AGUIRRE-MANDUJANO, E., VERNON-CARBET, E. J. Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 2, p. 151-159, 2004.

SCHUCK, P., DOLIVET, A., MEJEAN, S., JEANTET, R. Relative humidity of outlet air: the key parameter to optimize moisture content and water activity of Dairy powders. **Dairy Science and Technology**, v.88, n. 1, p. 45 - 52, 2010.

SEGARRA, S. et al. Influence of the addition of fruit on the mineral content of yoghurts: nutritional assessment. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 85-89, out. 2000.

SENER, N., KILIC, D., OZBEK, A. B. A modelling study on milk lactose hydrolysis and b-galactosidase stability under sonication. **Process Biochemistry**, v.41, n. 7, p.1493–1500, 2006.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, Modificações**. Ed. Varela, São Paulo, 1996.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397-409, dez. 2004.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’ **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008.

SODINI, I., MATTAS, J., TONG, P. S. Influence of pH and heat treatment of whey on the functional properties of whey protein concentrates in yoghurt. **International Dairy Journal**, v 16, n. 2, p. 1464-1469, 2006.

TULLIO, L. T., KARKLE, E. N. L., CANDIDO, L. M. B. Review: Isolation and purification of milk whey glycomacropeptide. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.25, n. 1, p.121 - 132, 2007.

UNGER, M., SCRIMSHAW, N. Comparative tolerance of adults of differing ethnic backgrounds to lactose-free and lactose-containing dairy drink. **Nutrition Research**, vol. 1, n. 3, p. 227-233, 1981.

YEE, K. W.K., WILEY, D. E., BAO, J. Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: operability under constant operating conditions. **Journal of Membrane Science**, v. 290, n. 2, p. 125–137, mar. 2007.

## APRESENTAÇÃO

Essa dissertação é composta por dois artigos científicos.

### ARTIGO 1

Catiucia Giraldi; Angela Claudia Rodrigues; Lys Mary Bileski Cândido. Hidrólise da lactose do concentrado proteico de soro de leite por *B*-galactosidase de *Kluveromyces lactis*. Food Research International.

### ARTIGO 2

Catiucia Giraldi; Angela Claudia Rodrigues; Maurício Passos; Lys Mary Bileski Cândido. Efeitos da adição de concentrado proteico de soro de leite com teor reduzido de lactose nas propriedades funcionais do iogurte.

## ARTIGO 1

Hidrólise da lactose do concentrado proteico de soro de leite por *B-galactosidase* de *Kluyveromyces lactis*Catiucia Giraldi<sup>a</sup>, Angela C. Rodrigues<sup>b</sup>, Lys M. B. Cândido<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Pós-Graduanda do Programa de Tecnologia de Alimentos (PPGTA), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, av. Brasil, 4232, CEP 85884-000, Estado do Paraná, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, av. Brasil, 4232, CEP 85884-000, Estado do Paraná, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Av. Deputado Heitor Alencar Furtado, 4900, CEP 81280-340, Estado do Paraná, Brasil.

**RESUMO**

O soro de leite é uma importante fonte de proteínas. Porém, grande parte dos laticínios ainda descarta este subproduto da fabricação de queijos, gerando assim, desperdícios e um problema socioambiental. Este trabalho teve como objetivo a hidrólise da lactose do concentrado proteico de soro de leite (CPS) para aplicação como ingrediente lácteo em alimentos para intolerantes à lactose. A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada para investigar o efeito de dois parâmetros (tempo e concentração de enzima) no processo de hidrólise. Com base na análise da MSR as condições ótimas de operação do processo para atingir o máximo de percentual de hidrólise foram em concentração de enzima 0,22% por 1680 minutos a temperatura de 8 °C fixada. Depois de hidrolisado, o CPS foi submetido à secagem por atomização e apresentou valores de lactose, glicose, galactose e proteínas iguais a 2,98; 19,41; 15,89 e 36,7 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra, respectivamente; 5,00% de umidade e 8,06% de cinzas. Foram realizadas análises microbiológicas e o produto em pó foi considerado apto ao consumo. A hidrólise da lactose do CPS pode aumentar o uso potencial deste ingrediente lácteo em diversos alimentos para intolerantes à lactose, aumentando desta forma a possibilidade de uso de produtos a base de soro de leite.

**Palavras-chave:** Proteínas. Enzima. Temperatura. Atomização. Galactose. Ingrediente lácteo.

## 1. Introdução

O soro de leite é o maior subproduto da indústria de laticínios. Se descartado nos cursos de água provoca grandes efeitos poluentes. Quando o soro é descartado sem tratamento apresenta uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cerca de 30 a 50g de oxigênio por litro de soro de leite. Uma indústria com uma produção média de 10.000 litros de soro de leite por dia polui tanto quanto 5.000 habitantes (Smithers, 2008; Tullio, Karkle & Cândido, 2007; Cândido & Kruger, 2012).

O soro de leite é composto principalmente por proteína e lactose. Industrialmente, as proteínas do soro de leite podem ser recuperadas pelos sistemas de membranas. O retentado é alimentado em *spray dryer* para secagem e produção dos concentrados protéicos de soro de leite (CPS) com 35 a 80% de proteína. (Cuartes-Uribe, Alcaina-Miranda, Soriano-Costa & Bes-Piá, 2006; Yee, Wiley & Bao, 2007).

Ao longo dos últimos anos, os concentrados proteicos de soro de leite têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos como ingredientes nutricionais e funcionais. (Shee, Angers & Bazinet, 2007). As proteínas do soro de leite conferem propriedades físicas benéficas quando utilizados como ingredientes em alimentos, tais como, gelatinização, formação de espuma e capacidade emulsificante (Staszewski, Jagus & Pilosof, 2011). A capacidade de formar gel após o aquecimento, fornece textura desejável a diversos alimentos (Manoi & Rizvi, 2008). Além do valor biológico das proteínas do soro de leite ser superior ao da maioria das proteínas, o soro de leite tem um elevado teor de aminoácidos (Sinha, Radha, Prakash & Paul, 2007).

Os concentrados proteicos de soro de leite comerciais apresentam além da proteína, a lactose. A proporção de lactose presente na composição depende do processo utilizado na produção dos CPSs. A hidrólise da lactose deste produto possibilitaria o consumo de fórmulas elaboradas a partir deste ingrediente por pessoas intolerantes à lactose. Estima-se que mais de 70% da população mundial sofre de intolerância à lactose, o que varia entre raça e idade. Uma porcentagem bastante elevada das populações africana e asiática produz menos  $\beta$ -galactosidase intestinal (lactase) que europeus ou norte-americanos, conseqüentemente, a má digestão da lactose é encontrada com mais frequência em populações africanas e

asiáticas do que em outras populações (Messia, Candigliota & Marconi, 2007; Fennema, Damodaran & Parkin, 2010).

A hidrólise da lactose em leite e produtos lácteos para reduzir seu teor de lactose pode aumentar o uso potencial destes produtos (Panesar, 2008). O mecanismo de hidrólise enzimática da lactose por  $\beta$ -galactosidase pode ser aplicado a diferentes substratos (soluções de lactose, soro de leite e leite desnatado) (Jurado, Camacho, Luzón & Vicaria, 2002).

Devido à demanda de produtos lácteos livres ou com teor reduzido de lactose, como alternativa de consumo à população intolerante à lactose, o concentrado proteico de soro de leite industrial foi submetido a hidrólise enzimática com a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* com posterior secagem por atomização.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

A hidrólise do concentrado proteico de soro de leite (CPS) foi realizada com a enzima comercialmente denominada como lactase Maxilact LX 5000 (DSM Globalfood) proveniente de *Kluyveromyces lactis*. O concentrado proteico de soro de leite foi cedido pela empresa Sooro (Localizada em Marechal C. Rondon/PR, Brasil). O produto foi coletado ao final da etapa de ultrafiltração. Posteriormente, foi realizada a pasteurização lenta a 70°C por 15 minutos, e em seguida o produto foi submetido a análises físico-químicas.

### 2.2. Métodos analíticos

O valor de pH foi mensurado por leitura direta em potenciômetro digital (pHmeter HANNA), previamente calibrado. A acidez, gordura, umidade e cinzas foram determinadas conforme Métodos Oficiais de Análises (2006). A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Kjeldahl com fator de conversão 6,38 de acordo com os procedimentos e normas descritos pela AOAC (1996). Para a determinação da lactose inicial do CPS foi utilizada a metodologia de Folin & Wu (1920), com leitura da absorbância em 520 nm usando espectrofotômetro UV-Vis

modelo Lambda XLS HP9 2FX (Perkin-Elmer, Califórnia, Estados Unidos) e conversão da lactose por curva padrão previamente estabelecida.

#### 2.2.1. Determinação de glicose

A determinação da glicose inicial da amostra de CPS e da glicose final dos onze ensaios do delineamento foi mensurada por método colorimétrico GOD – PAP, (Glicose monoreagente - catálogo K082 Bioclin, Brasil), com leitura da absorbância em 505 nm usando espectrofotômetro UV-Vis modelo Lambda XLS HP9 2FX (Perkin-Elmer, Califórnia, Estados Unidos) e conversão da glicose por curva padrão previamente estabelecida. As amostras foram analisadas em triplicata. Foi considerada para efeito do cálculo de hidrólise a estequiometria da reação, na qual, para cada molécula de lactose degradada é formada uma molécula glicose e uma molécula de galactose.

#### 2.3. Condições cromatográficas para quantificação dos açúcares do CPS em pó

As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo à Líquido de Ultra Alta Eficiência (UHPLC) com detector de Índice de Refração (UHPLC-IR) (Dionex Corporation, UltiMate 3000, bomba quartenária, Sunnyvale, Software Chromeleon, EUA). A separação foi realizada a 35 °C com coluna Supelcosil LC-NH2, (25 cm x 4.6 mm, 5 µm), usando como fase móvel água-acetonitrila (65/35, v/v) para lactose e para glicose e galactose (73/27, v/v). A taxa de fluxo foi de 1,5 mL·min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 20 µL. O tempo de retenção foi de 4,2 minutos para lactose, 5,03 minutos para glicose e 5,53 minutos para galactose. Os picos foram identificados por comparação com o tempo de retenção com padrões de açúcares. A quantificação foi realizada através do método do padrão externo. As curvas de calibração para cada açúcar foram preparadas em cinco níveis, a partir de 10 a 18 mg·mL<sup>-1</sup> para a lactose, glicose e galactose, todos dissolvidos em água ultra pura.

#### 2.4. Preparo das amostras

Para determinação dos açúcares por método colorimétrico e por cromatografia líquida, foi realizada a desproteíntização das amostras de acordo com

Essig & Kleyn (1983), com algumas adaptações. Para a análise do CPS inicial foram utilizados 2 mL de amostra, para as onze amostras do delineamento foi utilizado 1 mL e para a amostra de CPS em pó foram pesados 3g. Após, foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL, adicionados 50 mL de água ultra pura, 2 mL da solução de ferrocianeto de potássio 15% e 2 mL da solução de sulfato de zinco 30%, agitado e deixado em repouso por 5 minutos, após completou-se o volume com água ultra pura. Em seguida as amostras foram filtradas com papel filtro. A amostra de CPS em pó foi ainda filtrada através de filtro de seringa de *nylon* de 0,45  $\mu\text{m}$  antes da análise cromatográfica.

## 2.5. Otimização do processo de hidrólise enzimática

Para o estudo da hidrólise da lactose foi empregado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para investigar o efeito de duas variáveis independentes sobre a resposta percentual de hidrólise. O delineamento foi composto por onze ensaios, com três repetições no ponto central e quatro pontos axiais ( $2^2$ ) (Tabela 3). As variáveis independentes concentração de enzima ( $x_1$ ) e tempo ( $x_2$ ) foram analisadas em cinco níveis de variação, e a única variável dependente (resposta) a ser analisada foi o percentual de hidrólise. Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento estão apresentados na Tabela 1. Os ensaios foram conduzidos em frascos estéreis, que foram dispostos em incubadora rotatória modelo SL 221 (Solab, Piracicaba, São Paulo), mantidos à temperatura de 8 °C a fim de simular as condições industriais reais e evitar possíveis contaminações microbianas, com agitação de 70 rpm. Os frascos continham 40 g de concentrado proteico de soro de leite, aos quais foi adicionada a enzima lactase em concentrações definidas no planejamento experimental.

**Tabela 1.** Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento

Variáveis/ Níveis	Concentração Enzima (%)	Tempo (min)
-1,41	0,02	104
-1	0,08	300
0	0,22	780
+1	0,36	1260
+1,41	0,41	1468

Ao término de cada tratamento conforme o tempo definido no planejamento estatístico, as amostras foram imediatamente imersas em água fervente por cinco minutos para inativação da enzima de acordo com Ruiz-Matute et al. (2012). As amostras foram armazenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da formação de glicose.

#### 2.5.1. Secagem do hidrolisado por atomização

Após definidas as condições ótimas no delineamento, um volume de 0,8 L de CPS hidrolisado foi submetido à secagem, em equipamento *spray dryer* (LM MSD 1.0 LABMAQ, Brasil), resultando em 200 g de produto em pó. As temperaturas do ar de entrada e do ar de saída foram fixadas em  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  respectivamente, com pressão controlada entre 2 a 4 Bar. O pó foi coletado através de coletor tipo ciclone e armazenado em recipientes secos e fechados.

#### 2.6. Análises microbiológicas

Ao final de todos os ensaios do delineamento experimental, foram realizadas análises de contagem de micro-organismos psicrotróficos em triplicata. Foram realizadas análises de contagem de micro-organismos psicrotróficos e contagem padrão de mesófilos no CPS hidrolisado em pó. Para contagem de bactérias psicrotróficas, as placas foram incubadas em PCA (*Plate Count Agar*) aerobicamente a  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 dias (Apha, 1992). As bactérias mesófilas foram incubadas em PCA a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 h para posterior contagem de acordo com Métodos Oficiais de Análise (2003). Para as populações de bactérias é apresentada a média de três repetições, convertidas em  $\log\text{ UFC mL}^{-1}$  (Unidades formadoras de colônias).

#### 2.7. Análise Estatística

Os resultados obtidos no delineamento experimental foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa STATISTICA versão 7.0 (Statsoft, 2007). Os valores médios foram comparados pelo teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização do concentrado proteico de soro de leite antes da hidrólise enzimática

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas do CPS são demonstrados na Tabela 2. Após a etapa de ultrafiltração o CPS apresentou para lactose e glicose 12,7 e 0,06 g. 100 mL<sup>-1</sup> de amostra, respectivamente.

**Tabela 2.** Composição do concentrado proteico de soro de leite

Análises	Resultados*
Lactose (g. 100 mL <sup>-1</sup> )	12,70 ± 0,19
Glicose (g. 100 mL <sup>-1</sup> )	0,06 ± 0,12
pH	6,20 ± 0,05
Acidez (g ácido láctico)	5,40 ± 0,15
Gordura (g. 100 mL <sup>-1</sup> )	0,92 ± 0,03
Proteína (g. 100 mL <sup>-1</sup> )	9,46 ± 0,20

\*Os resultados representam a média de três determinações e o desvio padrão.

Nota-se que o valor de pH 6,20 está abaixo da faixa ideal de atuação da enzima, que se encontra entre 6,9 – 7,3 (Jurado, Camacho, Luzón & Vicaria, 2002). No entanto, a baixa atividade da enzima é verificada em pH por volta de 5,5, devido principalmente, ao fato de que o ponto isoelétrico (*pI*) da enzima é 5,42 (Zhou & Chen, 2001).

#### 3.2. Delineamento experimental e otimização do processo de hidrólise

O percentual de hidrólise dos onze ensaios é apresentado na Tabela 3. Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA). De acordo com Rodrigues & lemma (2009), há uma grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem enzimas e micro-organismos, portanto, foram considerados significativos os tratamentos com *p* – valores menores que 10% (*p* < 0,10).

**Tabela 3.** Matriz dos ensaios do DCCR 2<sup>2</sup> (com valores reais e codificados) com as respostas de percentual de hidrólise.

Ensaio	x <sub>1</sub> <sup>a</sup>	x <sub>2</sub> <sup>b</sup>	Hidrólise (%) <sup>c</sup>
1	-1 (0,08)	-1 (300)	26,61 ± 0,52
2	+1 (0,36)	-1 (300)	72,65 ± 0,61
3	-1 (0,08)	+1 (1260)	55,00 ± 1,00
4	+1 (0,36)	+1 (1260)	82,07 ± 1,09
5	-1,41 (0,02)	0 (780)	17,69 ± 1,00
6	+1,41 (0,41)	0 (780)	82,25 ± 0,57
7	0 (0,22)	-1,41 (104)	41,46 ± 0,56
8	0 (0,22)	+1,41 (1468)	81,10 ± 0,51
9	0 (0,22)	0 (780)	74,19 ± 3,05
10	0 (0,22)	0 (780)	74,36 ± 1,50
11	0 (0,22)	0 (780)	74,02 ± 0,50

<sup>a</sup> = Concentração de enzima (%); <sup>b</sup> = tempo de hidrólise (min)

<sup>c</sup> = Hidrólise ± erro padrão: os resultados representam a média de três determinações.

Os efeitos estimados para cada variável, assim como a interação entre eles, foram determinados com o auxílio do *software* STATISTICA versão 7.0. Os resultados estão listados na Tabela 4. É possível verificar que todos os fatores apresentaram efeitos estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 90%.

**Tabela 4.** Efeito dos fatores estudados no DCCR 2<sup>2</sup> sobre o percentual de hidrólise

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(5)	p – valor
Média	73,98	2,48	29,76	0,0000 <sup>a</sup>
x <sub>1</sub> (L)	41,43	3,05	13,59	0,0000 <sup>a</sup>
x <sub>1</sub> (Q)	-22,44	3,64	-6,17	0,0016 <sup>a</sup>
x <sub>2</sub> (L)	23,92	3,05	7,84	0,0005 <sup>a</sup>
x <sub>2</sub> (Q)	-11,37	3,64	-3,13	0,0260 <sup>a</sup>
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	-10,50	4,30	-2,44	0,0587 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Fatores significantes ( $p < 0,10$ ) L - termos lineares Q - termos quadráticos

De acordo com as estimativas dos coeficientes de regressão apresentados na Tabela 5, a variável mais relevante no processo de hidrólise foi a concentração de enzima. No entanto, a hidrólise também foi influenciada pelos efeitos linear e quadrático da variável tempo. O efeito do aumento do tempo sobre a resposta foi atenuado quando a reação foi realizada nas concentrações de enzima mais elevadas 0,22%; 0,36% e 0,41%.

A relação tempo e concentração de enzima nos níveis superiores estudados proporciona um aumento no percentual de hidrólise o qual pode ser confirmado pelo gráfico de superfície de resposta (Fig.1).

**Tabela 5.** Coeficientes de regressão para a resposta porcentagem de hidrólise.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(5)	p – valor
Média	73,98	2,48	29,76	0,0000 <sup>a</sup>
x <sub>1</sub> (L)	20,71	1,52	13,58	0,0000 <sup>a</sup>
x <sub>1</sub> (Q)	-11,22	1,82	-6,16	0,0016 <sup>a</sup>
x <sub>2</sub> (L)	11,96	1,52	7,84	0,0005 <sup>a</sup>
x <sub>2</sub> (Q)	-5,68	1,81	-3,12	0,0260 <sup>a</sup>
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	-5,25	2,15	-2,43	0,0587 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Fatores significantes ( $p < 0,10$ ) L - termos lineares Q - termos quadráticos.

A Tabela 6 apresenta os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para a variável percentual de hidrólise. Verifica-se que o modelo pode ser usado para fins preditivos, uma vez que o mesmo apresentou uma percentual de variância explicada ( $R^2$ ) de 98%. O teste  $F$  também mostra que o valor de  $F_{\text{calculado}} = 116,84$  é maior que o valor de  $F_{\text{tabelado}} = 2,522$  com 90% de confiança, mostrando que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais.

A equação 1 representa o modelo para o percentual de hidrólise em função das variáveis estudadas:

$$\text{Hidrólise (\%)} = 73,98 + 20,71x_1 - 11,22x_1^2 + 11,96x_2 - 5,68x_2^2 - 5,25x_1x_2 \quad (1)$$

onde,

x<sub>1</sub> = concentração de enzima (%)

x<sub>2</sub> = tempo (min)

**Tabela 6.** Análise de variância (ANOVA) para descrição do modelo quadrático

Fonte de variação	SQ <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	QM <sup>c</sup>	F <sub>calculado</sub>	p-valor
Regressão	5415,48	5	1083,09	116,84	1,5504E-08
Resíduos	92,69	10	9,27		
Total	5508,18	15			

% variação explicada ( $R^2$ ) = 98  $F_{0,10;5;10} = 2,52$

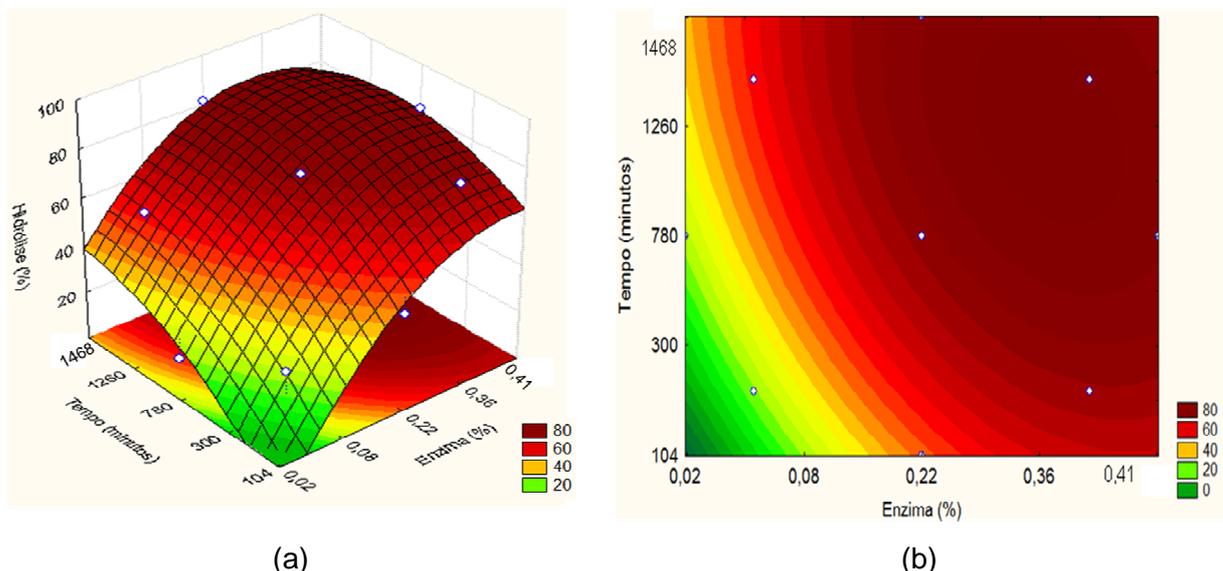
<sup>a</sup> Soma de quadrados. <sup>b</sup> Graus de liberdade. <sup>c</sup> Quadrados médios.

Considerando que, o modelo quadrático foi validado para a resposta percentual de hidrólise, o mesmo foi usado para gerar a superfície de resposta.

Observa-se através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno (Fig. 1), que há uma região ótima para o maior percentual de hidrólise na faixa de

combinações de concentração de enzima entre 0,22 – 0,41% e tempo de 780 – 1468 minutos.

Rodrigues e lemma (2009) enfatizam que a indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas concentrações das variáveis estudadas ao redor dos valores ótimos, mantendo-se ainda, o processo na condição otimizada. No entanto, os autores sugerem a realização de ensaios, nas condições definidas após a análise da superfície de resposta para validação experimental da resposta prevista pelo modelo proposto.



**Fig. 1.** Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para hidrólise (%), em função do tempo (min) e da concentração de enzima (%).

O critério para escolha da melhor condição na região otimizada foi a máxima porcentagem de hidrólise com a menor concentração de enzima, devido ao alto custo da enzima  $\beta$ -galactosidase. Um processo eficiente e economicamente viável para a hidrólise da lactose depende fortemente da produção e do custo da enzima em combinação com uma cinética favorável e propriedades de estabilidade (Hatzinikolaou et al., 2005). A melhor condição definida para validação experimental foi com o tempo de 1468 minutos e concentração de enzima 0,22%, essas condições promoveram 81,10% de hidrólise.

Um baixo nível de crescimento de micro-organismos psicrotróficos foi verificado em 100% das amostras analisadas após a inativação da enzima pelo

tratamento térmico, com resultados inferiores a 10 UFC mL<sup>-1</sup>. A adoção de boas práticas de fabricação associadas à refrigeração torna possível o processo de hidrólise em temperaturas de refrigeração.

### 3.3. Validação Experimental

Os resultados da otimização foram confirmados pela realização dos experimentos na melhor condição definida, com valores de  $\pm 0,5\%$  desvio padrão. A variável concentração de enzima foi fixada em 0,22% e outros tempos de hidrólise ainda foram estudados, conforme Tabela 7.

**Tabela 7.** Validação experimental para a variável tempo em função da concentração de enzima

Ensaio	Tempo (min)	Hidrólise (%)
1	1320	79,39 <sup>c</sup>
2	1468	80,89 <sup>bc</sup>
3	1560	82,82 <sup>b</sup>
4	1680	86,26 <sup>a</sup>

Médias acompanhadas de letras iguais na mesma coluna, não diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

O máximo de hidrólise da lactose (86%) foi observado após 1680 minutos. A ausência de uma acentuada melhora na hidrólise da lactose com o aumento do tempo de incubação pode ser atribuído à inibição pelos produtos formados. A galactose, um dos produtos finais da hidrólise da lactose, é um forte inibidor competitivo da enzima  $\beta$ -galactosidase, o efeito inibidor é acentuado principalmente em altas concentrações de galactose (Ansari & Husain, 2010; Freitas et al., 2012; Klein et al., 2013; Fischer, Guidini, Santana & Resende, 2013). A velocidade da reação enzimática diminui significativamente na presença de galactose tanto para a enzima  $\beta$ -galactosidase livre como para a enzima imobilizada (Neri et al., 2009). A enzima tem afinidade semelhante tanto para o substrato (lactose) como para o produto (galactose) porque ambos os compostos são capazes de ocupar o sítio ativo da enzima, com igual probabilidade (Jurado, Camacho, Luzón & Vicaria, 2002).

A temperatura exerce forte influência no processo de hidrólise. Para enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* a temperatura ótima de atuação é em torno de 37 °C (Jurado, Camacho, Luzón & Vicaria, 2002). No entanto, industrialmente é uma vantagem utilizar a enzima a baixas temperaturas, já que produtos lácteos

como o leite geralmente são mantidos a esta temperatura para obter melhores condições assépticas (Santos, Ladero & Garcia-Ochoa, 1998).

A fim de simular as condições industriais e reduzir a possibilidade de contaminação microbiana Klein et al. (2013) realizaram a hidrólise da lactose em soro de leite com a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada a temperatura de 7 °C e pH 7,0, o grau de hidrólise da lactose obtido foi de 72%. Neste estudo, foi verificado uma porcentagem de hidrólise de 86% em CPS com a enzima livre em temperatura de 8 °C e pH 6,20.

Conforme verificado na Fig. 1, a hidrólise da lactose em temperatura de refrigeração, alcançou resultados satisfatórios nos maiores tempos de hidrólise estudados. Efeitos similares foram observados por Santos, Ladero & Ochoa (1998), os autores observaram durante a hidrólise da lactose que quando a enzima *Kluyveromyces fragilis* era utilizada em temperatura de 40 °C, um tempo menor de hidrólise era necessário, se comparado a hidrólise realizada a 5 °C. No entanto, os autores verificaram que a enzima mantém uma atividade significativa, mesmo a temperaturas tão baixas quanto 5 °C.

#### 3.4. Caracterização do concentrado proteico de soro de leite hidrolisado em pó

As condições que promoveram o máximo de percentual de hidrólise (tempo 1680 minutos, concentração de enzima 0,22% e temperatura 8 °C) foram aplicadas à hidrólise do CPS, que posteriormente foi submetido à secagem. A composição do produto após secagem está apresentada na Tabela 8.

**Tabela 8:** Análises físico-químicas do concentrado proteico de soro de leite após secagem.

Análises	Resultados*
Lactose (g. 100 g <sup>-1</sup> )	2,98 ± 0,02
Glicose (g. 100 g <sup>-1</sup> )	19,41 ± 0,01
Galactose (g. 100 g <sup>-1</sup> )	15,89 ± 1,10
Proteína (g. 100 g <sup>-1</sup> )	36,70 ± 2,31
Umidade (%)	5,00 ± 0,03
Cinzas (%)	8,06 ± 0,01
Gordura (g. 100 g <sup>-1</sup> )	2,50 ± 0,00

\*Média e desvio padrão.

Os resultados corroboram com os valores encontrados por Sodini, Montella & Tong (2005). Estes autores, ao analisarem alguns CPS comerciais, encontraram

para gordura valores entre 2,1 – 3,7 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra, para cinzas, aproximadamente 7,0 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra e proteína entre 35,0 – 37,6 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra. Quanto menor o teor de proteínas no CPS maior o teor de lactose no produto, conforme confirmado no estudo realizado por Ramos et al. (2012). Para lactose, Sodini, Montella & Tong (2005) encontraram nos CPS comerciais 52,9 – 55,8 g. 100g<sup>-1</sup> de amostra, calculado por diferença.

O concentrado proteico de soro de leite com lactose hidrolisada (CPSLH) em pó apresentou o total de carboidratos de 38,28 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra, e o conteúdo de galactose mais baixo que o de glicose. É possível que, durante a hidrólise da lactose do CPS tenha ocorrido a formação de galactooligosacarídeos. De acordo com Gosling et al. (2010), na presença de alta concentração de lactose a enzima pode produzir galactooligosacarídeos (GOS). A formação de GOS em leites desnatados comerciais foi verificada por Rodrigues-Colinas et al. (2014), a formação ocorreu tanto na temperatura de refrigeração estudada (4 °C), como na temperatura de 40 °C, a produção foi de 4,8 e 7,0 g. L<sup>-1</sup>, respectivamente. A hidrólise da lactose, seguida da secagem por atomização possibilitou a produção de CPS em pó com apenas 2,98 g de lactose por 100 g de CPS.

As análises de contagem de psicrotóxicos apresentaram resultados inferiores a 10 UFC. mL<sup>-1</sup>. A média das triplicatas realizadas para a contagem padrão de mesófilos apresentou 1,68 ± 0,14 log UFC. mL<sup>-1</sup>. De acordo com as análises microbiológicas o produto pode ser considerado apto ao consumo.

Em decorrência da alta higroscopicidade da lactose, industrialmente é necessário realizar a etapa de cristalização da lactose, antes da etapa de secagem do CPS por atomização. Com a hidrólise da lactose foi possível eliminar a etapa de cristalização, sendo possível submeter o produto diretamente ao processo de atomização, obtendo um produto em pó com características similares aos produtos comerciais.

#### **4. CONCLUSÕES**

As condições para alcançar o máximo de hidrólise da lactose do CPS foram: concentração de enzima 0,22% e tempo 1680 minutos, na temperatura fixada de 8°C. O estudo mostrou que o processo de hidrólise realizado a baixas temperaturas requer um tempo maior de hidrólise. Com a hidrólise da lactose, é possível reduzir a

etapa de cristalização que industrialmente antecede o processo de secagem por atomização do CPS. A hidrólise da lactose pode aumentar o uso potencial deste produto como ingrediente lácteo em diversos alimentos destinados a pessoas com intolerância à lactose, aumentando desta forma a possibilidade de uso de produtos à base de soro de leite, contribuindo para redução do descarte de soro de leite no meio ambiente. É recomendável a aplicação de técnicas como a diafiltração antes do processo de hidrólise para redução de 100% da lactose do produto.

## 5. REFERÊNCIAS

Ansari, S. A., & Husain, Q. (2010). Lactose hydrolysis by galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode. *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6, 68–74.

AOAC (1996). *Official methods of analysis*. Arlington, VA: Kenneth Hilrich.

APHA (1992). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (3<sup>a</sup> ed.). Washington, DC: American Public Health Association.

Bernal, V. & Jelen, P. (1985). Lactose Hydrolysis by *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -D Galactosidase in Skim Milk, Whey, Permeate and Model Systems. *Canadian Institute of Food Science Technology*, 18, 97-99.

Cândido, L. M. B., & Kruger, C. H. (2012). Proteínas do Soro de leite Bovino. Composição, propriedades nutritivas e funcionais tecnológicas, aplicações In: *Inovação nos processos de obtenção, purificação e aplicação de componentes do leite bovino*. (1<sup>a</sup> ed.). São Paulo: Atheneu, pp.121-156.

Cuartas-Uribe, B., Alcaina-Miranda, M. I., Soriano-Costa, E., & Bes-Piá, A. (2006). Comparison of two nanofiltration membranes NF200 and Ds-5 DL to demineralize whey. *Desalination*, 199, 43- 45.

Essig, A. M. & Kleyn, D. H. (1983). Determination of lactose in milk: Comparison of methods. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 66, 1514-1516.

Fennema, R. O., Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. (4<sup>a</sup> ed.). Porto Alegre: Artmed.

Fischer, J., Guidini, C. Z., Santana, L. N. S., & Resende, M. M. (2013). Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85–86, 178–186.

- Folin, O., & Wu, H. A. (1920). Simplified and improved method for the determination of sugar. *Journal Biological Chemistry*, 41, 367-374.
- Freitas, F. F., Marquez, L. D. S., Ribeiro, G. P., Brandão, G. C., Cardoso, V. L. & Ribeiro, E. J. (2012). Optimization of the immobilization process of  $\beta$ -galactosidase by combined entrapment – cross – linking and the kinetics of lactose hydrolysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29, 15-24.
- Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E. & Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121, 307 - 318.
- Hatzinikolaou, D. G., Katsifas, F., Mamma, D., Karagouni, A. D., Christakopoulos, P., & Kekos, D. (2005). Modeling of the simultaneous hydrolysis–ultrafiltration of whey permeate by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 24, 161–172.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., & Vicaria, J. M. (2002). A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by  $\beta$ -galactosidase galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 300–309.
- Klein, M. P., Fallavena, L. P., Schöffner, J. N., Ayub, M. A. Z., Rodrigues, R. C., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2013). High stability of immobilized  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, 95, 465– 470.
- Manoi, K., & Rizvi, S. S. H. (2008). Rheological characterizations of texturized whey protein concentrate-based powders produced by reactive supercritical fluid extrusion. *Food Research International*, 41, 786–796.
- Messia, M. C., Candigliota, T., & Marconi, E. (2007). Assessment of quality and technological characterization of lactose-hydrolyzed milk. *Food Chemistry*, 104, 910–917.
- Métodos Oficiais de Análises (2003). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, Brasil.
- Métodos Oficiais de Análises (2006). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, Brasil.
- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Costa, R. S., Rocha, F. C. A. P., Ferreira, E. M. F. C., Torres, D. P. M., Rodrigues, L. R. M., Carvalho, J. L. B., & Teixeira, J. A. (2009) Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*, 115, 92–99.
- Panesar, P. S. (2008). Application of response surface methodology in the permeabilization of yeast cells for lactose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 91–96.

Ramos, O. L., Pereira, J. O., Silva, S. I., Amorim, M. M., Fernandes, J. A., Lopes-da-Silva, Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2012). Effect of composition of commercial whey protein preparations upon gelation at various pH values. *Food Research International*, 48, 681-689.

Rodrigues, M. I., & Iemma, A. F. (2009). *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. (2<sup>a</sup> ed.). Campinas: editora Casa do Pão.

Rodriguez-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A. O., Plou, F. J. (2014) Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. *Food Chemistry*, 145, 388–394.

Ruiz-Matute, A. I., Corzo-Martínez, M., Montilla, A., Olano, A., Copovi, P., & Corzo, N. (2012). Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28, 164–169.

Santos, A., Ladero, M., & García-Ochoa, F. (1998). Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microbiology Technology*, 22, 558–567.

Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., & Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, 101, 1484–1491.

Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, 18, 695–704.

Sodini, I., Montella, J., & Tong, P. S. (2005). Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. *Food Agriculture*, 85, 853–859.

Staszewski, M. V., Jagus, R. J., & Pilosof, A. M. R. (2011). Influence of green tea polyphenols on the colloidal stability and gelation of wpc. *Food Hydrocolloids*, 25, 1077–1084.

STATSOFT, INC. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. (2007). Tulsa, OK: StatSoft Inc.

Tullio, L. T., Karkle, E. N. L., & Cândido, L. M. B. (2007). Review: Isolation and Purification of Milk Whey Glycomacropeptide. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 25, 121–132.

Zhou, Q. Z. K., & Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9, 33–40.

Yee, K. W. K., Wiley, D. E., & Bao, J. (2007). Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: Operability under constant operating conditions. *Journal of Membrane Science*, 290, 125-137.

## ARTIGO 2

Efeitos da adição de concentrado proteico de soro de leite com teor reduzido de lactose nas propriedades funcionais de iogurte

Catiucia Giraldi<sup>a</sup>, Angela Claudia Rodrigues<sup>b</sup>, Maurício Passos<sup>c</sup>, Lys Mary Bileski Cândido<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Pós-Graduanda do Programa de Tecnologia de Alimentos (PPGTA), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná do Paraná, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de farmácia, Universidade Federal do Paraná

<sup>d</sup> Departamento de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil.

**RESUMO:** A hidrólise da lactose do leite associada ao processo de fermentação torna possível a produção de iogurte com reduzido teor de lactose. Neste estudo, foi aplicada a Metodologia de Superfície de Resposta, por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional com onze ensaios, três repetições no ponto central e quatro pontos axiais ( $2^2$ ), com o objetivo de encontrar a melhor condição para hidrólise da lactose do leite. Com base na análise da Superfície de Resposta, a região ótima para alcançar o máximo de hidrólise foi nas concentrações de enzima entre 0,10 – 0,13% por 120 – 205 minutos, com percentual de hidrólise satisfatório em torno de 88 a 94% a temperatura de 38 °C. Foram desenvolvidas seis formulações de iogurtes, adicionadas com concentrado proteico de soro de leite com lactose hidrolisada (CPSLH) e leite em pó desnatado (LPD). Os iogurtes foram submetidos a análises físico-químicas e microbiológicas, capacidade de retenção de água, sinérese, viscosidade, perfil de textura e quantificação de açúcares. A adição de CPSLH possibilitou a produção de iogurte natural integral com teor reduzido de lactose, aumentou a capacidade de retenção de água (CRA) e diminuiu a sinérese. A utilização do concentrado proteico de soro de leite (CPS) contribui para o aspecto nutricional e funcional tecnológico do produto, confere economia ao processo produtivo e redução de impactos ambientais causados pelo descarte do soro de leite.

**Palavras-chave:** Leite em pó desnatado. Proteínas. Hidrólise.

## 1. Introdução

Os iogurtes produzidos através da fermentação láctica do leite alcançaram considerável importância econômica e são consumidos como alimentos saudáveis em todo o mundo. A indústria de lácteos vem se fortalecendo na busca para produzir produtos de valor agregado, ampliando o portfólio de produtos para atingir públicos diferenciados, e que necessitam de produtos especiais. Nessa categoria, têm-se os alimentos para intolerantes à lactose.

Na indústria de laticínios a enzima  $\beta$ -galactosidase tem potencial importância, pois promove a hidrólise da lactose, em glicose e galactose. A lactose é um dissacarídeo encontrado no leite, geralmente em concentrações em torno de 5% (GANZLE; HAASE; JELEN, 2008). O teor de lactose também pode ser reduzido em produtos lácteos através da fermentação láctica. No iogurte produzido tradicionalmente, em torno de 30% da lactose é convertida para ácido láctico (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

A hidrólise do leite associada ao processo de fermentação pode tornar possível a produção de iogurte com reduzido teor de lactose. Além do sabor, as características de aparência, consistência e textura são importantes critérios de aceitação pelo consumidor.

Tradicionalmente, o leite em pó desnatado (LPD) é utilizado para enriquecer o leite antes da fermentação, porém, o aumento da qualidade e disponibilidade de outros ingredientes lácteos, como concentrados proteicos de soro de leite (CPS), pode fornecer uma alternativa de baixo custo. (SODINI; MONTELLA; TONG, 2005).

Este trabalho teve como objetivo aplicar a metodologia de superfície de resposta ao processo de hidrólise da lactose do leite, buscando encontrar a melhor condição de hidrólise, para posterior produção de iogurte com teor reduzido de lactose adicionado de CPS com lactose hidrolisada em comparação ao iogurte adicionado com LPD.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

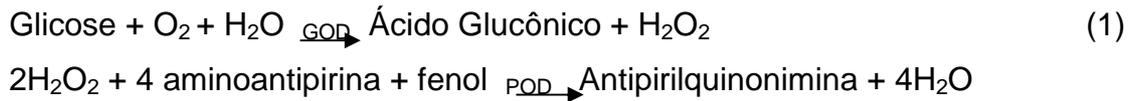
A hidrólise do leite pasteurizado foi realizada com a enzima comercialmente denominada como lactase Maxilact LX 5000 (DSM Globalfood) proveniente de *Kluyveromyces lactis*. Utilizou-se o leite em pó desnatado da marca Aurora (Cooperativa Central Aurora Alimentos). O concentrado proteico de soro de leite foi hidrolisado e submetido à secagem por atomização na UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) Campus Medianeira. O leite pasteurizado integral foi adquirido no comércio local.

### 2.2 Métodos analíticos

O valor de pH foi mensurado por leitura direta em potenciômetro digital (pHmeter HANNA), previamente calibrado. A acidez foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1mol/L (BRASIL, 2006). A gordura, umidade e cinzas foram determinadas conforme metodologia descrita na Instrução Normativa nº 68/06 (BRASIL, 2006). A determinação da proteína bruta foi realizada pelo método de Kjeldahl com fator de conversão 6,38 (AOAC, 1996). O grau Brix foi medido através de refratômetro. Para a determinação do teor de lactose inicial do leite foi utilizada a metodologia de Folin Wu (1920), com leitura da absorbância em 520 nm usando espectrofotômetro UV-Vis modelo Lambda XLS HP9 2FX (Perkin-Elmer, Califórnia, Estados Unidos) e conversão da lactose por curva padrão previamente estabelecida.

#### 2.2.1 Determinação da glicose

A determinação da glicose inicial da amostra de leite pasteurizado e da glicose final dos onze ensaios do delineamento foi mensurada por método colorimétrico GOD – PAP, (Glicose monoreagente - catálogo K082 Bioclin, Brasil). A glicose é oxidada enzimaticamente pela Glicose Oxidase (GOD) de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio, em presença da peroxidase (POD) reage com a 4 - aminoantipirina e fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose. A leitura da absorbância foi efetuada em 505 nm usando UV-Vis espectrofotômetro modelo Lambda XLS HP9 2FX (Perkin-Elmer, Califórnia, Estados Unidos) e a conversão em glicose por curva padrão previamente estabelecida. As amostras foram analisadas em triplicata. Foi considerada para efeito do cálculo de hidrólise a estequiometria da reação, na qual, para cada molécula de lactose degradada é formada uma molécula glicose e uma molécula de galactose.

## 2.3 Condições cromatográficas

### 2.3.1 Condições cromatográficas para análises dos iogurtes

Foram realizadas análises cromatográficas para quantificação dos açúcares: lactose, glicose e galactose e ácido láctico nas amostras de iogurtes em Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com detector de Índice de Refração (Varian, bomba Pro Star, com amostrador automático modelo 410). A separação foi realizada a 40 °C com coluna Hipler-H (300mm x 6,5 mm), usando como fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8mM. A taxa de fluxo foi de 0,4 mL. min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 20 µL. Os tempos de retenção para lactose, glicose, galactose e ácido láctico foram de 9; 10; 11 e 14 minutos, respectivamente. As análises foram realizadas em duplicata.

### 2.3.2 Condições cromatográficas para análises do CPSLH e LPD

As análises cromatográficas para quantificação dos açúcares, foram realizadas em Cromatógrafo à Líquido de Ultra Alta Eficiência (UHPLC) acoplado de Índice de Refração (UHPLC-IR) (Dionex Corporation, UltiMate 3000, bomba quartenária, Sunnyvale, Software Chromeleon, EUA). A separação foi realizada a 35°C com coluna Supelcosil LC-NH<sub>2</sub>, (25 cm x 4.6 mm, 5 µm), usando como fase

móvel água-acetonitrila (65/35, v/v) para lactose e para glicose e galactose(73/27, v/v). A taxa de fluxo foi de 1,5 mL. min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 20 µL. O tempo de retenção foi de 4,2 minutos para lactose, 5,03 minutos para glicose e 5,53 minutos para galactose. Os picos foram identificados por comparação com o tempo de retenção com padrões de açúcares. A quantificação foi realizada através do método do padrão externo. As análises foram realizadas em duplicata.

#### 2.4. Preparo das amostras

Para determinação dos açúcares pelo método colorimétrico e por cromatografia líquida, foi realizada a desproteinização das amostras de acordo com Essig & Kleyn (1983), com adaptações. Foram utilizados 4 mL do leite pasteurizado; 2 mL dos onze ensaios do delineamento; 3g do CPSLH e do LPD em pó e 1 mL de cada amostra de iogurte. As amostras foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, em seguida adicionou-se 50 mL de água ultra pura, 2 mL da solução de ferrocianeto de potássio 15% e 2 mL da solução de sulfato de zinco 30%, agitado e deixado em repouso por 5 minutos, após completou-se o volume com água ultra pura. Em seguida as amostras foram filtradas com papel filtro. As amostras de CPSLH e de LPD foram ainda filtradas, através de filtro de seringa de *nylon* de 0,45 µm para posterior injeção no cromatógrafo.

#### 2.5 Otimização do processo de hidrólise enzimática

Para a hidrólise, foi empregado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para investigar o efeito de duas variáveis independentes sobre o percentual de hidrólise. O delineamento foi composto por onze ensaios, com três repetições no ponto central e quatro pontos axiais (2<sup>2</sup>) (Tabela 2). As variáveis independentes concentração de enzima ( $x_1$ ) e tempo ( $x_2$ ) foram analisadas em cinco níveis de variação, e a única variável dependente (resposta) a ser analisada foi o percentual de hidrólise. Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento estão apresentados na Tabela 1.

Os ensaios foram conduzidos em frascos estéreis, que foram dispostos em incubadora rotatória modelo SL 221 (Solab, Piracicaba, São Paulo), mantidos à

temperatura de 38 °C com agitação de 70 rpm. Os frascos continham 40 mL de leite, aos quais foi adicionada a enzima lactase nas concentrações definidas no planejamento estatístico.

**Tabela 1:** Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento

Variáveis/ Níveis	Concentração Enzima (%)	Tempo (min)
-1,41	0,07	35
-1	0,08	60
0	0,10	120
+1	0,12	180
+1,41	0,13	205

Ao término de cada tratamento conforme o tempo definido no planejamento estatístico, as amostras foram imediatamente imersas em água fervente por cinco minutos para inativação da enzima (RUIZ-MATUTE et al., 2012). As amostras foram armazenadas a -18 °C para posterior análise.

## 2.6 Fermentação do iogurte

Após definida as condições ótimas no delineamento, foram hidrolisados 6 L de leite para produção dos iogurtes integrais. O leite foi suplementado com os ingredientes lácteos, leite em pó desnatado e concentrado proteico de soro de leite “isolados” ou em “par”, conforme Tabela 2. A cultura láctea utilizada foi a Yomix 499 (*Streptococcus salivarius subs. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) da CRH HANSEN. O leite foi aquecido a 85 °C por 10 minutos e resfriado a 40 °C através de banho de água e gelo. Inoculou-se 1 g de cultura láctea para cada 1 L de leite utilizado nas formulações. As amostras foram incubadas a temperatura de 40 °C até o pH atingir 4,5 a 4,6, em seguida resfriadas e mantidas a 24h por 4 °C, para posterior avaliação quanto à determinação da capacidade de retenção de água, sinérese e viscosidade.

**Tabela 2:** Adição de suplementos às bases de leite e leite controle utilizados para produção de iogurte integral.

Base leite	Suplementação (%)	
	LPD	CPSLH
Controle	-	-
LPD1	2	-
LPD2	4	-
CPSLH1	-	2
CPSLH2	-	4
LPD:CPSLH	1	1

LPD = Leite em pó desnatado; CPSLH = Concentrado proteico de soro de leite lactose hidrolisada.

## 2.7 Sinérese das amostras de iogurte

Para medir a sinérese foi utilizado o método descrito por Riener et al. (2010), com adaptações. Foram pesados 30 g de cada amostra de iogurte (A), espalhados uniformemente em papel filtro Whatman nº1, os quais foram colocados em funis e estes colocados no topo de cilindros graduados. Os conjuntos foram colocados em temperatura de 4 °C durante 5 horas. O soro expelido (S) foi recolhido e registrado. As análises foram realizadas em triplicata. A sinérese foi calculada usando a equação 1 que segue:

$$\text{Sinérese (\%)} = (S / A) * 100\% \quad (1)$$

## 2.8 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada de acordo com procedimento adaptado de Guzman-Gonzalez et al. (1999). Uma amostra com 20g de iogurte natural (IN) foi centrifugada por 10 minutos a 487 x g a 20 °C. O soro expelido (SE) foi removido e pesado. As análises foram realizadas em triplicata. A CRA foi definida conforme equação 2:

$$\text{CRA (\%)} = 100 (IN - SE) / IN \quad (2)$$

## 2.9 Viscosidade

A viscosidade foi determinada à temperatura de 10 °C utilizando viscosímetro Brookfield modelo RVT, com sensor de cisalhamento quatro e velocidade 20 rpm. As

análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram registrados em centipoise (BRASEQ, 2000).

## 2.10 Análise do perfil de textura

As amostras de iogurtes foram colocadas em recipientes plásticos e mantidas em geladeira por 2h para recuperação da estrutura e estabilização da temperatura 10 °C, conforme Sandoval-Castilla et al. (2004), com algumas adaptações. As características de textura dos iogurtes foram obtidas através de texturômetro TA.TX Plus (Stable Micro Systems Ltda. Extralab Brasil). Os experimentos foram realizados por meio de testes de compressão: um probe de 35 milímetros diâmetro foi usado para medir o perfil textural das amostras (distância: 15 mm, velocidade de ensaio: 5 mm s<sup>-1</sup>). Na análise do perfil de textura três características de interesse para este estudo foram utilizadas, firmeza, adesividade e elasticidade. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

## 2.11 Análises microbiológicas

### 2.11.1 Contagem de bactérias lácticas

A contagem das bactérias lácticas totais foi realizada após 48 horas de produção. Foram pesadas 25 ± 0,2g da amostra e adicionado 225 mL da solução de água peptonada 0,1%, em seguida feitas as diluições apropriadas. Subsequentemente, *Streptococcus thermophilus* foi plaqueado em agar M17 e incubado em aerobiose 43 ± 1 °C por três dias (CHR HANSEN, 2002a), e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* foi plaqueado em agar MRS e incubado em anaerobiose 37 ± 1 °C por três dias (CHR HANSEN, 2002b). A enumeração da contagem microbiana foi realizada em placas contendo 30-300 colônias. Para as populações de bactérias são apresentadas a média de três repetições, convertidas em log UFC g<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas em triplicata.

2.11.2 Contagem padrão de mesófilos no leite após a hidrólise, coliformes totais, coliformes termotolerantes e análise de bolores e leveduras no iogurte.

Para avaliação de mesófilos, as amostras foram incubadas em ágar PCA a 37 °C por 48 h para posterior contagem (BRASIL, 2003). Para a análise de bolores e leveduras, as amostras depois de diluídas foram transferidas em placas contendo o ágar dicloran base com rosa bengala (DBRC), incubadas por  $37 \pm 1$  °C por cinco dias, para posterior contagem (NF ISO 21527-1, 2008). Para coliformes totais e termotolerantes as diluições das amostras foram inoculadas em ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA), para contagem das colônias suspeitas de coliformes totais foi realizada a inoculação em ágar caldo verde brilhante bile 2% lactose, com posterior incubação a  $36 \pm 1$  °C. Para coliformes termotolerantes, a confirmação foi feita em caldo EC com posterior incubação em temperatura de  $45 \pm 0,2$  °C (BRASIL, 2003). As análises foram realizadas em triplicata e foi realizado a soma das contagens.

## 2.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos no delineamento experimental foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa STATISTICA versão 7.0 (STATSOFT, 2007). Os valores médios foram comparados pelo teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Delineamento experimental e otimização do processo de hidrólise

A resposta expressa em valores médios de três repetições, dos onze ensaios é apresentada na Tabela 3. Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA).

**Tabela 3:** Matriz dos ensaios do DCCR 2<sup>2</sup> (com valores reais e codificados) com as respostas de percentual de hidrólise.

Ensaio	x <sub>1</sub> <sup>a</sup>	x <sub>2</sub> <sup>b</sup>	Hidrólise (%) <sup>c</sup>
1	-1 (0,08)	-1 (60)	73,92 ± 0,20
2	+1 (0,12)	-1 (60)	79,70 ± 0,61
3	-1 (0,08)	+1 (180)	81,41 ± 1,00
4	+1 (0,12)	+1 (180)	91,09 ± 0,13
5	- 1,41 (0,07)	0 (120)	85,15 ± 1,00
6	+ 1,41 (0,13)	0 (120)	94,17 ± 0,07
7	0 (0,10)	-1,41 (35)	69,37 ± 0,12
8	0 (0,10)	+1,41 (205)	90,89 ± 0,09
9	0 (0,10)	0 (120)	88,01 ± 0,10
10	0 (0,10)	0 (120)	89,40 ± 0,08
11	0 (0,10)	0 (120)	89,63 ± 0,10

<sup>a</sup>Concentração de enzima (%); <sup>b</sup>= tempo de hidrólise (minutos)

<sup>c</sup>Hidrólise ± erro padrão: os resultados representam a média de três determinações.

Os efeitos estimados para cada variável, assim como a interação entre eles, foram determinados com o auxílio do *software* STATISTICA versão 7.0. Os resultados estão listados na Tabela 4. De acordo com a análise dos efeitos, o percentual de enzima no nível quadrático e a interação entre as duas variáveis não apresentaram efeitos estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 4:** Efeito dos fatores estudados no DCCR 2<sup>2</sup> sobre o percentual de hidrólise

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t(5)	p – valor
Média	89,02	1,69	52,58	0,0000 <sup>a</sup>
x <sub>1</sub> (L)	7,32	2,08	3,52	0,0168 <sup>a</sup>
x <sub>1</sub> (Q)	-1,17	2,48	-0,47	0,6566
x <sub>2</sub> (L)	12,59	2,07	6,06	0,0017 <sup>a</sup>
x <sub>2</sub> (Q)	-10,75	2,48	-4,34	0,0074 <sup>a</sup>
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	-1,44	2,93	-0,49	0,6434

<sup>a</sup>Fatores significantes ( $p < 0,05$ ) L - termos lineares Q - termos quadráticos

O efeito de cada variável pode ser observado pela magnitude e significância, associado com o respectivo coeficiente no modelo ajustado para a resposta. Os coeficientes de regressão (Tabela 5), mostraram que as duas variáveis contribuem para aumentar o percentual de hidrólise. No entanto, a variável mais relevante no processo de hidrólise foi o tempo de hidrólise, com efeito dos fatores linear e quadrático significativos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5:** Coeficientes de regressão para a resposta percentagem de hidrólise

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(5)	p – valor
Média	88,47	1,09	81,19	0,0000 <sup>a</sup>
x <sub>1</sub> (L)	3,65	0,92	3,98	0,0052 <sup>a</sup>
x <sub>2</sub> (L)	6,29	0,92	6,86	0,0000 <sup>a</sup>
x <sub>2</sub> (Q)	-5,20	1,05	-4,97	0,0016 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Fatores significantes ( $p < 0,05$ ) L - termos lineares Q - termos quadráticos

A Tabela 6 apresenta os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para a variável percentual de hidrólise. Verifica-se que o modelo pode ser usado para fins preditivos, uma vez que o mesmo apresentou um percentual de variância explicada ( $R^2$ ) de 92%. O teste  $F$  também mostra que o valor de  $F_{\text{calculado}} = 17,904$  é maior que o valor de  $F_{\text{tabelado}} = 2,414$  com 95% de confiança, mostrando que o modelo ajusta-se bem aos dados experimentais.

Analisando os coeficientes de regressão e ignorando os fatores não significativos ( $p < 0,05$ ), obtém-se o modelo para o percentual de hidrólise em função das variáveis estudadas.

$$\text{Hidrólise (\%)} = 88,47 + 3,65x_1 + 6,29x_2 - 5,20x_2^2 \quad (2)$$

onde,

$X_1$  = concentração de enzima (%)

$X_2$  = tempo (minutos)

**Tabela 6:** Análise de variância (ANOVA) para descrição do modelo quadrático

Fonte de variação	SQ <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	QM <sup>c</sup>	$F_{\text{calculado}}$	p-valor
Regressão	589,15	7	84,16	17,90	6,616E-05
Resíduos	47,01	10	4,70		
Total	636,16	17			

% variância explicada ( $R^2$ ) = 92       $F_{0,10;7;10} = 2,41$

<sup>a</sup>Soma de quadrados. <sup>b</sup> Graus de liberdade. <sup>c</sup> Quadrados médios.

Considerando que o modelo quadrático foi validado para a resposta percentual de hidrólise, o mesmo foi usado para gerar a superfície de resposta e as curvas de contorno apresentados na Figura 1. A análise da superfície de resposta e das curvas de contorno reforça a influência significativa que o tempo tem sobre a hidrólise. Os parâmetros indicam uma região ótima nas condições de 0,10 – 0,13% de concentração de enzima e na faixa de 120 – 205 minutos, com percentual de hidrólise satisfatório em torno de 88 a 94%. Bernal e Jelen (1985), ao estudarem a

hidrólise da lactose em leite desnatado com a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, nas condições de temperatura 38 °C, concentração de enzima 1g. L<sup>-1</sup>, pH 6,8, por 60 minutos obtiveram cerca de 50% de hidrólise. Enquanto que, Erich, Anzmann e Fischer (2012) ao hidrolisarem leite desnatado com a enzima  $\beta$ -galactosidase *Kluyveromyces lactis*, por 24 h a 8 °C encontraram após a hidrólise, quantidade menor que 100 mg. L<sup>-1</sup> de lactose.

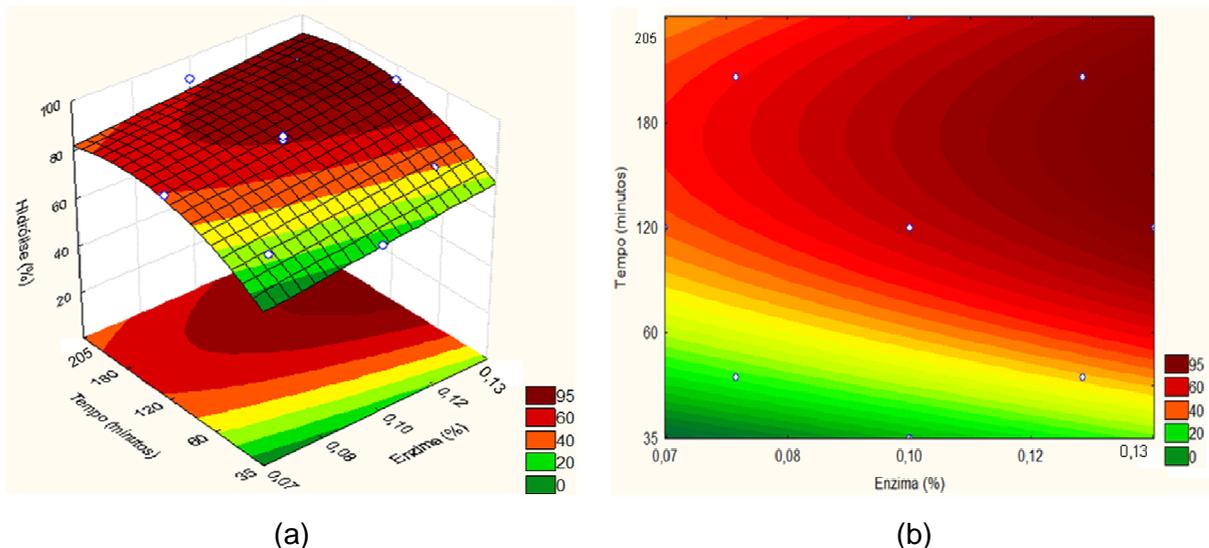


Fig.1. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para hidrólise (%) em função do tempo (min) e da concentração de enzima (%).

O critério para escolha da melhor condição na região otimizada foi a máxima porcentagem de hidrólise com o menor tempo, devido à temperatura ideal de crescimento de micro-organismos mesofílicos patogênicos.

### 3.2 Validação Experimental

Os resultados da otimização foram confirmados pela realização dos experimentos em triplicata na condição definida como ótima, com 120 minutos e 0,13% de enzima.

Tabela 7: Validação experimental em função do tempo de hidrólise

Ensaio	Tempo (minutos)	Hidrólise (%)
6	120	94 ± 0,47

O resultado representa a média de três determinações e o desvio padrão.

Conforme apresentado anteriormente na Tabela 2, o teor de glicose inicial do leite ( $0,01 \text{ g. } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), quase insignificante, corresponde à quantidade geralmente encontrada no leite. Com a hidrólise enzimática o teor de glicose aumentou para  $2,35 \text{ g. } 100 \text{ mL}^{-1}$  de leite, representando 94% de hidrólise, considerando a reação estequiométrica que ocorre na hidrólise da lactose. Messia, Candigliota e Marconi (2007) ao estudarem a hidrólise da lactose com enzima  $\beta$ -galactosidase em leite com lactose inicial de  $4,8 \text{ g. } 100 \text{ mL}^{-1}$ , encontraram após a reação de hidrólise valor de glicose igual a  $2,3 \text{ g. } 100 \text{ mL}^{-1}$  de leite.

### 3.3 Análises Microbiológicas

Para investigar o efeito do crescimento microbiológico associado ao tempo de hidrólise e a temperatura, foram realizadas análises de contagem padrão de mesófilos ao término de todos os ensaios. Nas análises de contagem padrão de mesófilos da matéria-prima inicial, os resultados foram inferiores a  $10 \text{ UFC mL}^{-1}$ . Na Tabela 8 são apresentadas as médias dos valores de contagem de micro-organismos dos tratamentos, após a hidrólise.

**Tabela 8:** Contagem padrão de mesófilos para micro-organismos presentes nos tratamentos após a hidrólise enzimática.

Ensaio	Enzima (%)	Tempo (minutos)	(log UFC mL <sup>-1</sup> )
1	0,08	60	$2,00 \pm 0,00^d$
2	0,12	60	$2,00 \pm 0,00^d$
3	0,08	180	$4,60 \pm 0,02^b$
4	0,12	180	$4,54 \pm 0,05^b$
5	0,07	120	$2,00 \pm 0,00^d$
6	0,13	120	$2,30 \pm 0,17^c$
7	0,10	35	$2,00 \pm 0,00^d$
8	0,10	205	$4,92 \pm 0,03^a$
9	0,10	120	$2,25 \pm 0,24^{cd}$
10	0,10	120	$2,00 \pm 0,00^d$
11	0,10	120	$2,10 \pm 0,00^{cd}$

\* Os valores são dados como médias das triplicatas: médias na coluna seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de *tukey* ( $p < 0,05$ ).

Os tratamentos realizados nos maiores tempos de hidrólise (180 e 205 minutos), apresentaram os maiores resultados nas contagens de mesófilos. Verifica-se que estas condições atreladas à temperatura de  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  estudada propiciam a proliferação de micro-organismos deteriorante no leite, portanto, a reação nas condições estudadas não deve ultrapassar 120 minutos. Essa condição também foi verificada por Trevisan (2008), ao trabalhar com temperaturas de  $22$ ,  $32$  e  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ . O

autor concluiu que o crescimento de micro-organismos era proporcional ao aumento do tempo de hidrólise nas temperaturas estudadas.

### 3.4 Caracterização dos ingredientes lácteos

A caracterização dos ingredientes lácteos utilizados na fabricação dos iogurtes (leite em pó desnatado, concentrado proteico de soro de leite com lactose hidrolisada e leite pasteurizado) é apresentada na Tabela 9.

**Tabela 9:** Caracterização dos ingredientes lácteos utilizados nas formulações de iogurtes

Produtos	Lactose	Glicose	Galactose	Proteína	Gordura	Cinzas
LPD (g. 100 g <sup>-1</sup> )	50,0 ± 2,36	0,10 ± 0,04	ND	35,4 ± 0,05	0,05 ± 0,00	4,03 ± 0,05
Leite(g. 100 mL <sup>-1</sup> )	5,00 ± 0,08	0,01 ± 0,00	ND	3,07 ± 0,01	3,11 ± 0,03	0,71 ± 0,12
CPSLH(g. 100g <sup>-1</sup> )	2,98 ± 0,02	19,41± 0,01	15,89± 1,10	36,7± 2,31	2,50 ± 0,00	8,06 ± 0,01

Os resultados representam à média e o desvio padrão das amostras. ND = Não Detectado.

### 3.5 Composição química das amostras de iogurtes

Após definida a melhor condição de hidrólise, foram produzidas as amostras de iogurtes. O tempo de fermentação e a composição química da amostra controle e das bases de leite experimentais, adicionadas com CPSLH e LPD em diferentes proporções separadas ou em mistura são mostrados na Tabela 10.

**Tabela 10:** Composição química das formulações de iogurtes e tempo de fermentação

Propriedades	Controle	LPD1	LPD2	CPSLH1	CPSLH2	CPSLH:LPD
Fermentação (h:mim)	04:16	04:30	04:50	04:55	04:58	04:52
Ph	4,51 <sup>d</sup>	4,60 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>	4,57 <sup>b</sup>	4,59 <sup>a</sup>	4,54 <sup>c</sup>
Acidez (g. ácido láctico)	0,89 <sup>a</sup>	0,85 <sup>cd</sup>	0,84 <sup>d</sup>	0,87 <sup>bc</sup>	0,86 <sup>cd</sup>	0,88 <sup>ab</sup>
Proteína (g. 100 g <sup>-1</sup> )	2,9 <sup>c</sup>	3,6 <sup>b</sup>	4,2 <sup>a</sup>	3,7 <sup>b</sup>	4,4 <sup>a</sup>	3,7 <sup>b</sup>
Sólidos solúveis °Brix	7,33 <sup>c</sup>	9,00 <sup>b</sup>	10,67 <sup>a</sup>	9,00 <sup>b</sup>	10,67 <sup>a</sup>	9,33 <sup>b</sup>
Sólidos totais (g. 100 g <sup>-1</sup> )	11,01 <sup>c</sup>	12,55 <sup>b</sup>	14,33 <sup>a</sup>	12,66 <sup>b</sup>	14,55 <sup>a</sup>	12,83 <sup>b</sup>
Gordura (g. 100 g <sup>-1</sup> )	3,20 <sup>a</sup>	3,20 <sup>a</sup>	3,20 <sup>a</sup>	3,30 <sup>a</sup>	3,30 <sup>a</sup>	3,30 <sup>a</sup>
Umidade	88,98 <sup>a</sup>	87,44 <sup>b</sup>	85,66 <sup>c</sup>	87,33 <sup>b</sup>	85,44 <sup>c</sup>	87,16 <sup>b</sup>
Cinzas (g. 100 g <sup>-1</sup> )	0,79 <sup>a</sup>	0,75 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>	0,79 <sup>a</sup>	0,91 <sup>a</sup>	0,87 <sup>a</sup>

\* Os valores são dados como médias das triplicatas: letras diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

Em média os teores de proteínas, sólidos totais e sólidos solúveis variaram entre 2,9 a 4,4 g. 100 g<sup>-1</sup>, 11,01 a 14,55 g. 100 g<sup>-1</sup> e 7,3 a 10,67 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra, respectivamente, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ). A razão entre a adição de proteínas e o aumento do teor de sólidos totais é verificado nas amostras. Ao aumentar o teor de sólidos totais, baixos índices de sinérese podem

ser observados, e conseqüentemente a textura do iogurte melhora a caracterização sensorial e instrumental medidas do produto, mesmo se o teor total de sólidos é aumentada pela adição de agentes de estabilização de sacarose ou outros (MARAFON et al., 2011).

Em média, o teor de umidade variou entre 85,44 a 88,98 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra e apresentou diferença significativa em ( $p < 0,05$ ). O teor de umidade está atrelado à quantidade de sólidos totais, pois quanto maior, menor o teor de umidade. Nenhuma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi observada na quantidade de gordura das amostras que variou de 3,2 a 3,3 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra, e no valor de cinzas que variou de 0,75 a 0,99 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra.

O tempo necessário para atingir um pH de 4,6 é tipicamente usado como uma indicação de tempo de fermentação na fabricação de iogurte (TAMIME; ROBINSON, 1999). O pH final das amostras variou entre 4,51 a 4,60 com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). As amostras contendo LPD seguidas das amostras adicionadas de CPS, apresentaram uma redução mais lenta de pH durante a fermentação se comparadas com a amostra controle. Este comportamento durante a fermentação pode ser explicado pela influência da força iônica mais elevada quando o LPD e o CPS estão presentes. De acordo com González-Martínez et al. (2002), a alta concentração de íons contribui para diminuir a atividade dos fermentos lácteos e conseqüentemente diminui a concentração de ácido láctico. Puvanenthiran, Willians e Ausgustin (2002) em seus estudos, observaram que os componentes proteicos das misturas são um fator determinante da duração do tempo de fermentação dos iogurtes, os autores observaram ainda que, o aumento do tempo para atingir o pH 4,6 também refletiu em um aumento no tempo para o início da gelificação. Assim como o pH, a acidez apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e variou de 0,84 a 0,89 g de ácido láctico.

O tempo de fermentação do iogurte pode ser reduzido com a hidrólise da lactose. A quebra da lactose e conseqüentemente formação de glicose e galactose, facilita o processo de redução da glicose em ácido láctico pelas bactérias fermentadoras. O'leary e Woychik (1976) em seus estudos, observaram diferenças na taxa de declínio de pH durante a fermentação da amostra controle e de amostras com leite hidrolisado, a utilização dos carboidratos em leite hidrolisado pela cultura láctica, produziu ácido láctico mais rapidamente, e a taxa de declínio do pH foi mais rápida do que na amostra controle.

### 3.5.1 Teor de carboidratos nos iogurtes

A quantidade de carboidratos (lactose, glicose e galactose) presente nas amostras de iogurtes é apresentada na Tabela 11. A amostra controle apresentou o menor valor para lactose  $0,05\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de amostra, seguida das amostras CPSLH1; CPSLH2 e CPSLH:LPD que apresentaram  $0,09\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ;  $0,13\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  e  $0,34\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de amostra, respectivamente.

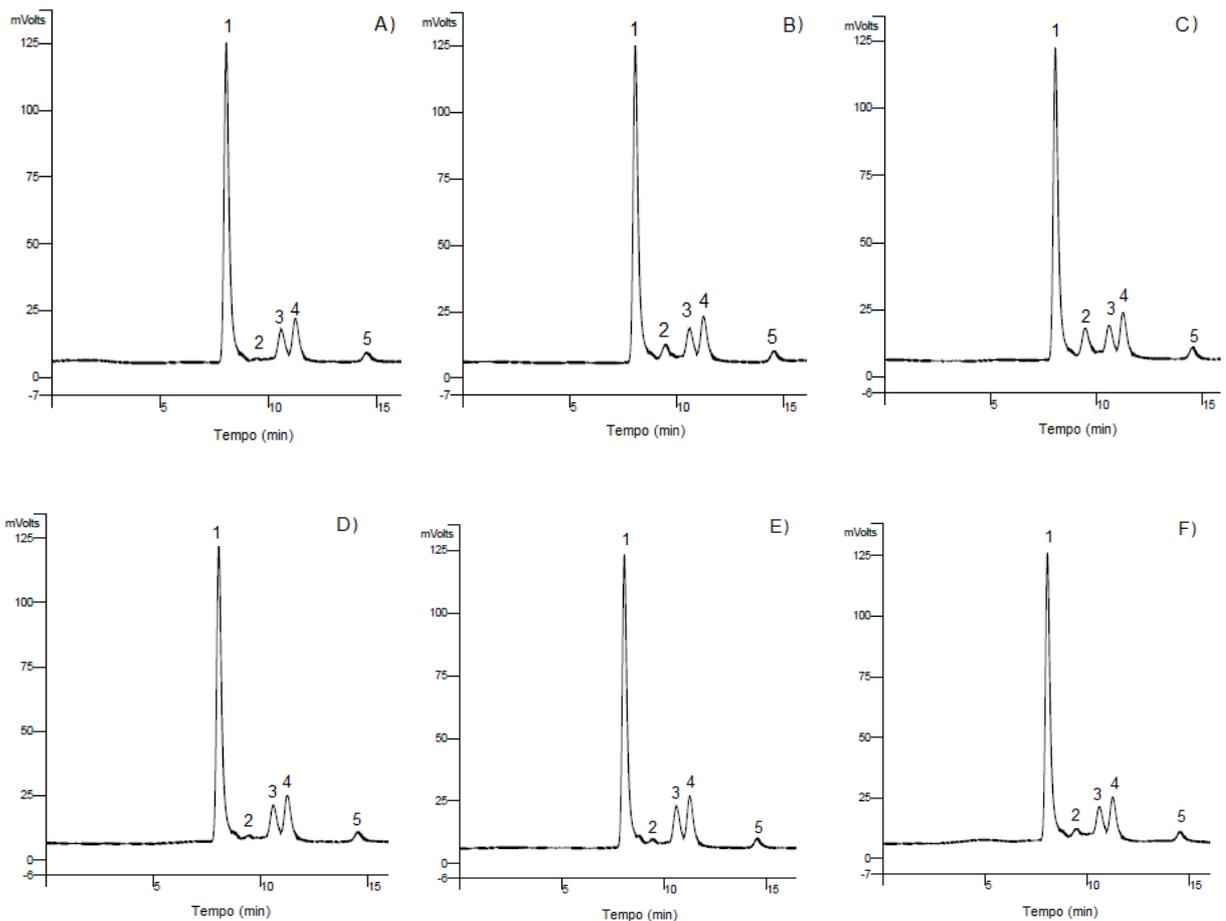
**Tabela 11:** Teores de carboidratos presente nas formulações de iogurtes

Componente (g. $100\text{g}^{-1}$ )	Controle	LPD1	LPD2	CPSLH1	CPSLH2	CPSLH:LPD
Lactose	$0,05 \pm 0,00^a$	$0,60 \pm 0,00^b$	$1,25 \pm 0,00^c$	$0,09 \pm 0,00^d$	$0,13 \pm 0,00^e$	$0,34 \pm 0,00^f$
Glicose	$1,35 \pm 0,07^a$	$1,21 \pm 0,04^b$	$1,19 \pm 0,00^b$	$1,62 \pm 0,00^c$	$1,88 \pm 0,00^d$	$1,31 \pm 0,01^{ab}$
Galactose	$2,09 \pm 0,05^a$	$2,02 \pm 0,09^a$	$2,06 \pm 0,01^a$	$2,40 \pm 0,02^b$	$2,63 \pm 0,01^c$	$2,12 \pm 0,01^a$

\* Os valores são dados como médias das duplicatas: letras diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

De acordo com a legislação brasileira, o produto para ser considerado um alimento para dietas com restrição à lactose, deve apresentar valor de lactose de no máximo  $0,5\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de amostra (ANVISA, 1998). As amostras adicionadas com LPD apresentaram valores de lactose acima do permitido pela legislação.

A maior redução de lactose verificada nas amostras adicionadas com CPSLH, comparada com as amostras fortificadas com LPD, se deve ao fato da aplicação de concentrado proteico de soro de leite com teor reduzido de lactose. Os cromatogramas das seis formulações são apresentadas na Fig 2. A galactose foi o açúcar predominante encontrado em todas as formulações de iogurtes. Esta observação foi relacionada ao fato das bactérias lácticas terem maior afinidade pela glicose. Durante a fermentação, glicose e galactose são formados a partir da lactose e após utilizada toda a glicose disponível, os *Streptococcus thermophilus* podem fermentar a galactose pela via de Leloir (STULOVA et al., 2013; ORDOÑEZ et al., 2005).



**Fig. 2:** Cromatogramas das formulações de iogurtes: amostra controle (A); LPD1 (B); LPD2 (C); CPSLH1 (D); CPS2LH (E) e LPD:CPSLH (F). Fase móvel (1), lactose (2), glicose (3), galactose (4) e ácido láctico (5).

A lactose, representada pelo pico 2, indica que o processo de hidrólise do leite e a fermentação reduziram a lactose aos menores níveis de açúcares encontrados. A presença de ácido láctico formado durante o processo de fermentação do iogurte, é apresentada pelo pico 5. Além de ácido láctico, os *Streptococcus thermophilus* produzem ácido fórmico a partir da degradação da lactose. A liberação de ácido fórmico estimula o crescimento de *Lactobacillus bulgaricus* (LAIÑO et al., 2013).

### 3.6 Viscosidade, sinérese e capacidade de retenção de água

A viscosidade, sinérese e a capacidade de retenção de água estão apresentadas na Tabela 12.

**Tabela 12:** Comportamento dos iogurtes em relação a viscosidade, sinérese e CRA

Propriedades	Controle	LPD1	LPD2	CPSLH1	CPSLH2	CPSLH:LPD
Viscosidade (cp)	1700±0,00 <sup>d</sup>	4600±0,00 <sup>b</sup>	5500± 5,00 <sup>a</sup>	3900±0,00 <sup>c</sup>	3600±5,00 <sup>c</sup>	4900±7,00 <sup>b</sup>
Sinérese (%)	49,05±0,35 <sup>a</sup>	37,30±2,12 <sup>b</sup>	33,95±0,07 <sup>b</sup>	34,95±0,78 <sup>b</sup>	27,60±1,98 <sup>c</sup>	37,25±2,33 <sup>b</sup>
CRA (%)	75,60±0,00 <sup>e</sup>	86,35±0,94 <sup>d</sup>	93,55±0,20 <sup>bc</sup>	94,70±0,68 <sup>ab</sup>	96,10±0,02 <sup>a</sup>	92,00±0,56 <sup>c</sup>

\* Letras diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

A viscosidade geralmente é uma propriedade muito importante para o controle de qualidade, em particular para os produtos em que se espera uma maior consistência em relação aos atributos aparência e sensação na boca. Em nosso estudo, foi observado efeito significativo para a viscosidade dos iogurtes enriquecidos com os diferentes ingredientes lácteos. A viscosidade das amostras variou entre 1700 a 5500 cp com diferença significativa em ( $p < 0,05$ ). A amostra controle apresentou a menor viscosidade, como previsto, devido ao menor teor de sólidos totais (proteínas lácteas), que contribui para o aumento da viscosidade. A amostra com adição de 4% de LPD (proteína final 4,2 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra) obteve o melhor resultado para a viscosidade (5500 cp).

Os resultados são diferentes dos relatados por outros autores. Remeuf et al. (2003) obtiveram maior viscosidade em iogurtes adicionados com CPS, do que com LPD (com níveis de proteína 4,4 e 4,5 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra, respectivamente). Guinee et al. (1995) encontraram viscosidades semelhantes para iogurtes produzidos com CPS e LPD (níveis de proteína aproximados 7,5 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra). Segundo Puvanenthiran et al. (2002), essa discrepância entre os resultados da literatura poderia estar relacionada às variações na produção do CPS, que influenciam fortemente nas funcionalidades deste produto. Sodini, Mattas e Tong (2006), ao estudarem as influências do pH e do tratamento térmico do soro de leite utilizado para produção de CPS, verificaram que, um pH mais alto e um tratamento térmico mais brando durante o processamento do soro de leite parecia ser mais favorável para produção de CPS com propriedades funcionais para aplicação em iogurte. Remeuf et al. (2003) verificaram ainda que, a viscosidade dos iogurtes foi maior quando as amostras foram adicionadas com misturas de caseinatos e CPS, do que quando utilizado somente CPS, sugerindo um efeito sinérgico da caseína e proteínas do soro na viscosidade do iogurte.

A CRA é uma importante característica no produto. Quanto maior o resultado, melhor é a estabilidade da coalhada (SRISUVOR et al., 2013). A capacidade de retenção de água (CRA) dos iogurtes adicionados com o CPSLH e com o LPD foram

maiores do que para a amostra controle, com efeito mais acentuado nos iogurtes adicionados de CPSLH. A capacidade de retenção de água variou entre 86,35 a 96,10% para os iogurtes enriquecidos, em comparação com 75,60% para o iogurte controle. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Sodini, Montella e Tong (2005), os autores estudaram o efeito de cinco CPSs comerciais (com teor de proteína nominal 34,0 g. 100g<sup>-1</sup> de amostra) na adição de iogurtes em comparação com a amostra controle adicionada com LPD (todos os leites foram padronizados com teor de proteína 4,5 g. 100g<sup>-1</sup> de amostra), a CRA de todos os iogurtes adicionados com os CPSs foi maior do que para a amostra controle.

Em contraste com a CRA, a sinérese é um defeito importante. Parâmetros como sólidos totais, conteúdo de proteínas, aumento da temperatura de fermentação, homogeneização, acidez do iogurte e a atividade de bactérias lácticas, geralmente influenciam na estabilidade da coalhada (TAMIME; ROBINSON, 1999). De acordo com Lucey e Singh (1998), a sinérese está relacionada com a instabilidade da rede de gel e a sua fraca capacidade para reter toda a fase do soro. A adição de LPD e CPSLH não apenas aumenta o valor nutricional, como pode reduzir a sinérese e eliminar a necessidade de utilização de outros estabilizadores de iogurte. Em ambas as amostras, os níveis de sólidos em pó adicionados diminuíram a sinérese dos iogurtes. Os resultados mensurados para sinérese indicam uma variação entre 27,60 e 49,05%. O melhor desempenho na CRA foi observado na amostra com adição de 4% de CPSLH. A redução significativa da sinérese com adição de ingredientes de proteínas de soro de leite também foi observada por Matumoto-Pintro et al. (2011).

### 3.7 Perfil de textura das amostras de iogurte

O perfil de textura dos diferentes iogurtes avaliados está apresentado na Tabela 13.

**Tabela 13:** Perfil de textura das amostras de iogurtes

Análise	Controle	LPD1	LPD2	CPSLH1	CPSLH2	LPD:CPSLH
Firmeza (N)	0,03 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>
Adesividade (N.s)	0,04 ± 0,00 <sup>e</sup>	0,45 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,53 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,51 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,04 <sup>a</sup>
Elasticidade	0,99 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,03 <sup>a</sup>

\* Letras diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

Foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros de firmeza e adesividade entre os iogurtes produzidos a partir de base de leite fortificado com diferentes ingredientes lácteos, em diferentes concentrações. A adição dos iogurtes com LPD e CPS mostrou um aumento na firmeza dos iogurtes, sendo observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ). A maior firmeza observada na amostra de iogurte suplementada com a mistura de 2% de LPD:CPSLH, e com menor teor de proteínas (3,7 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra), se comparada as amostras adicionadas com 4% de LDP e com 4% de CPSLH (proteína: 4,2 g. 100 g<sup>-1</sup> vs. 4,4 g. 100 g<sup>-1</sup> de amostra), pode ser devida à maior proporção de proteínas do soro de leite/caseína, o que tem sido demonstrado como crucial para a firmeza do iogurte (TAMIME et al., 1984). A proteína de soro de leite desnaturada, resultante do aquecimento do leite interage com a  $\kappa$ -caseína, reveste as micelas, e aumenta a reticulação do gel (MOTTAR et al., 1989). Contudo, o tratamento térmico aplicado à base de leite contendo CPS tem extrema importância nas propriedades reológicas dos iogurtes (REMEUF et al., 2003). O melhor resultado para adesividade, também foi observado para a amostra adicionadas com a mistura de 2% de LPD:CPSLH.

Os parâmetros de elasticidade não sofreram influência da adição com CPSLH e LPD, não foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de iogurtes. A elasticidade variou de 0,90 a 0,99. No entanto, vale ressaltar que, parâmetros do processamento do soro de leite podem influenciar nas propriedades funcionais do CPS. Sodini, Mattas e Tong (2006) sugerem que a temperatura mais branda no processamento do soro de leite utilizado na produção de CPS proporciona maior elasticidade ao iogurte.

### 3.8 Análises microbiológicas das formulações de iogurtes

Os resultados para as análises de bolores e leveduras, coliformes totais e termotolerantes foram inferiores a 10 UFC g<sup>-1</sup> em todas as amostras de iogurtes. De acordo com Moreira et al. (1999) a seleção de matérias-primas de boa qualidade, o cumprimento das medidas higiênico-sanitárias, durante a produção do iogurte, assim como na estocagem, faz com que seja possível oferecer ao consumidor um produto compatível com a legislação brasileira, quer no âmbito industrial, quer no comércio varejista.

### 3.9 Contagem de bactérias lácticas viáveis

A contagem das bactérias lácticas nos iogurtes adicionados de LPD e CPSLH e na amostra controle está apresentada na Tabela 14.

**Tabela 14:** Contagem de bactérias lácticas viáveis

Amostras	Bactérias lácticas (log UFC g <sup>-1</sup> )
Controle	9,75 ± 0,19 <sup>a</sup>
LPD1	10,20 ± 0,07 <sup>a</sup>
LPD2	9,61 ± 0,57 <sup>a</sup>
CPSLH1	9,32 ± 0,57 <sup>a</sup>
CPSLH2	9,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
LPD/CPSLH	9,72 ± 0,63 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Médias das triplicatas não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

A contagem variou entre  $9,00 \pm 0,00$  log UFC g<sup>-1</sup> (amostra adicionada com 4% de CPSLH) e  $10,20 \pm 0,07$  log UFC g<sup>-1</sup> (amostra adicionada com 2% de LPD) e não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). As contagens estão de acordo com as exigências da legislação brasileira para iogurtes.

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram através da metodologia de superfície de resposta que a melhor condição para hidrólise do leite, a fim de produzir iogurte com reduzido teor de lactose foi com 0,13% de enzima por 120 minutos a temperatura de 38 °C. Essas condições promoveram a redução de 94% da lactose do leite. A conversão da lactose em glicose e galactose facilita o processo de redução da glicose em ácido láctico pelas bactérias fermentadoras do leite, reduzindo o tempo de fermentação.

A adição do CPS em pó com lactose hidrolisada conferiu boa funcionalidade aos iogurtes, com maior capacidade de retenção de água, redução da sinérese e bom desempenho nas avaliações de perfil de textura. Finalmente, pode-se afirmar que o CPS com lactose hidrolisada pode ser empregado com êxito em formulações de iogurtes para dar consistência cremosa ao produto, e para a produção de iogurte com baixo teor de lactose, como alternativa de consumo as pessoas intolerantes à lactose, contribuindo para o aspecto nutricional e funcional do produto. Conferindo ainda, economia ao processo produtivo e redução de impactos ambientais causados

pelo descarte do soro de leite. As diferenças observadas nos parâmetros de textura devem ser confirmadas por estudos futuros de perfis sensoriais e ensaios industriais.

## 5. REFERENCIAS

ANVISA. Ministério da Saúde. Portaria nº 29. Regulamento Técnico Referente a Alimentos para Fins Especiais. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de mar. 1998

AOAC. Official methods of analysis of AOAC. 1996. Arlington, VA: Kenneth Hilrich.

BERNAL, V., JELEN, P. Lactose hydrolysis by *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -D Galactosidase in skim milk, whey, permeate and model systems. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.18, n. 1, p.97-99. 1985.

BRASEQ. **Manual de instruções de operações: viscosímetro analógico brookfield**. Janirú, SP, 2000. p. 11.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos Para Controle de Leite e Produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 abr. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2006.

CHR HANSEN. Method for counting *Streptococcus thermophilus* in youghurt- F-7. **Technical Bulletin**. Denmark: Chr Hansen, 2002a.

CHR HANSEN. Method for counting *Lactobacillus bulgaricus* in youghurt- F-8. **Technical Bulletin**. Denmark: Chr Hansen, 2002b.

ESSIG, A. M. KLEYN, D. H. Determination of lactose in milk: Comparison of methods. Association of Official Analytical Chemists, v. 66, n.1, 1514-1516, 1983.

ERICH, S., ANZMANN, T., FISCHER, L. Quantification of lactose using ion-pair RP-HPLC during enzymatic lactose hydrolysis of skim milk. **Food Chemistry**, v.135, n. 4, p.2393-2396, 2012.

FOLIN, O., WU, H. A. Simplified and improved method for the determination of sugar. **Journal Biological Chemistry**. v. 41, 367-374. 1920.

GANZLE, M. G., HAASE, G., JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685-694, jul. 2008.

GUINEE, T. P., MULLINS, C. G., REVILLE, W. J., COTTER, M. P. Physical properties of stirred-curd unsweetened yoghurts stabilized with different dairy ingredients. **Milchwissenschaft**, v.50, n. 1, p.196-200, 1995.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., BECERRA, M., CHÁFER, M., ALBORS, A., CAROT, J. M., CHIRALT, A. Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 2, p.334–340, 2002.

GUZMAN-GONZALES, M., MORAIS, F., RAMOS, M., AMIGO, L. Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n.2, p.1117–1122. 1999.

HARJU, M., KALLIOINEN, H., TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 1, p.104-109, 2012.

LAIÑO, J. E., DEL VALLE, M. J., GIORI, G. S., LEBLANC, J. G. J. Development of a high folate concentration yogurt naturally bio-enriched using selected lactic acid bacteria. **Food Science and Technology**, v. 54, n.3, p.1 – 5, 2013.

LUCEY, J. A., SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Research International**, v. 30, n.7, p. 529 – 542, 1998.

MARAFON, A. P., SUMI, A., ALCÂNTARA, M. R., TAMINE, A. Y., OLIVEIRA, M. N. Optimization of the rheological properties of probiotic yoghurts supplemented with milk proteins. **Food Science and Technology**, v. 44, n.2, p. 511- 519, 2011.

MATUMOTO-PINTRO, P.T., RABIEY, L., ROBITAILLE, G., BRITTEN, M. Use of modified whey protein in yoghurt formulations. **International Dairy Journal**, v. 21, n.1, p. 21- 26, 2011.

MESSIA, M. C., CANDIGLIOTA, T., MARCONI, E. Assessment of quality and technological characterization of lactose-hydrolyzed Milk. **Food Chemistry**, v.104, n.3, p.910–917, 2007.

MOREIRA, S. R., SCHWAN, R. F., CARVALHO, E. P., FERREIRA, C. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em lavras – MG. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.1, Jan./Apr. 1999.

MOTTAR, J., BASSIER, A., JONIAU, M., BAERT, J. Effect of heat induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. **Journal Dairy Science**, v. 72, n. 9, p. 2247–2256, 1989.

NF ISO 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. p. 9, 2008.

O'LEARY, V. S., WOYCHIK, J. H. Utilization of lactose, glucose, and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 32, n.1, p. 89-94, 1976.

ORDOÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos**. Componentes dos alimentos e processos. vol. 1, São Paulo: Artmed, 2005.

PUVANENTHIRAN, A.; R.P.W. WILLIAMS, R. P. W.; AUGUSTIN, M. A. Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 4, p. 383-391, 2002.

REMEUF, F. S.; MOHAMMED, I.; SODINI. TISSIER, J. P. Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. **International Dairy Journal**, v.13, n. 9, p. 773-782, 2003.

RIENER, J.; NOCI, F.; CRONIN, D. A.; MORGAN, D. J.; LYING, J. G. A comparison of selected quality characteristics of yoghurts prepared from thermosonicated and conventionally heated milks. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1008 – 1113, 2010.

RUIZ-MATUTE, A. I.; CORZO-MARTÍNEZ, M.; MONTILLA, A.;OLANO, A.; COPOVI, P.; CORZO, N. Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, n. 2, 164–169, 2012.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; CALLEROS-LOBATO, C.; AGUIRRE-MANDUJANO, E.; VERNON-CARTER, E. J. Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. **International Dairy Journal**, v.14, n.1, p.151 – 159, 2004.

SODINI, I.; MONTELLA, J.; TONG, P. S. Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. **Food Agriculture**, v.85, n.2, p.853–859, 2005.

SODINI, I., MATTAS, J., TONG, P. S. Influence of pH and heat treatment of whey on the functional properties of whey protein concentrates in yoghurt. **International Dairy Journal**, v.16, n. 4, p.1464-1469, 2006.

SRISUVOR, N., CHINPRAHAST, N., PRAKITCHAIWATTANA, C., SUSHIMAROS, S. Effects of inulin and polydextrose on physicochemical and sensory properties of low-fat set yoghurt with probiotic-cultured banana purée. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 30 – 36, 2013.

STATSOFT, INC. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft Inc, 2007.

STULOVA, I., KABANOVA, N., KRISCIUNAITE, T., TAIVOSALO, A., LAHT, TIU-MAIE, VILU, R. Fermentation of reconstituted milk by *Streptococcus thermophilus*: Effect of irradiation on skim milk powder. **International Dairy Journal**, v.31, p.139 – 149, 2013.

TAMIME, A. Y., KALAB, M., DAVIES, G. Microstructure of set-style yoghurt manufacture from cow`s milk fortified by various methods. **Food Microstructure**, v.3, n. 2, p. 83-92, 1984.

TAMIME, A. Y., ROBINSON, R. K. **Yoghurt: science and technology**. 2 ed. Cambridge, UK. Woodhead Publishing Ltda. 1999.

TREVISAN, A. P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado**. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.