



# ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE EM LEITE PASTEURIZADO COM B-GALACTOSIDASES: *KLUYVEROMYCES LACTIS* E *BACILLUS LICHENIFORMES*.

J. M. Martins<sup>1</sup>, J. R. D. Finzer<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Uberaba, Faculdade de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade de Uberaba, Faculdade de Engenharia Química

E-mail para contato: jussarammartins@live.com

**RESUMO** – Este estudo teve por objetivo estudar a hidrólise da lactose em leite pasteurizado utilizando as enzimas derivadas de *Kluyveromyces lactis* e *Bacillus licheniformes*. A hidrólise foi realizada a diferentes temperaturas (10°C; 34°C; 40°C e 55°C), acompanhada por crioscopia até estabilização. Foram realizadas análise sensorial, físico-químicas e microbiológicas antes e após a hidrólise da lactose e análises pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite antes da pasteurização. A adição das enzimas provocou alterações nas propriedades físico-químicas do leite, diminuindo acidez, pH, crioscopia, teores de gordura e lactose; aumentando densidade, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD) e proteína. A hidrólise da lactose possibilitou redução do teor de lactose para 1% (m/m). A enzima derivada de *Bacillus licheniformes* apresentou maior eficiência.

Palavras-chave: hidrólise da lactose, *Kluyveromyces lactis*, *Bacillus licheniformes*.

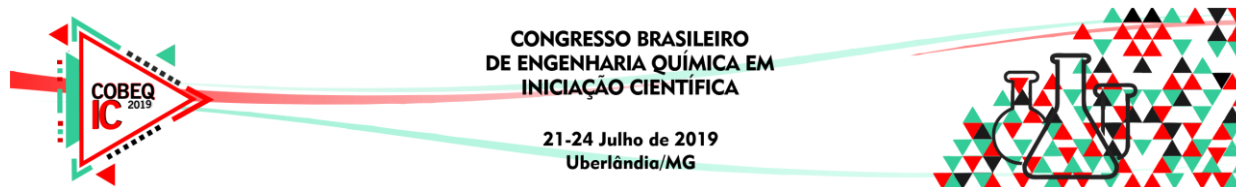
## 1. INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais interessantes para a redução do teor de lactose no leite e seus derivados. Nele a enzima  $\beta$ -galactosidase, na forma livre ou na forma imobilizada, hidrolisa a ligação  $\beta$  (1-4) da molécula de lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose, (GEKAS E LOPEZ LEIVA, 1985).

Geralmente a quantidade de enzima a ser utilizada no processo é indicada pelo fornecedor. A temperatura ótima de ação da lactase é de 40 °C, esta temperatura também é ideal para o desenvolvimento de microrganismos no leite. Portanto, o tempo do processo nesta temperatura deve ser de no máximo 4 horas (LADERO et al., 2000; PROZYN, 2010).

Assim sendo e tendo em vista as informações relatadas, o objetivo desse trabalho foi avaliar a hidrólise enzimática da lactose em leite pasteurizado, empregando duas B-galactosidases comerciais sob a influência de temperatura e concentração.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS



Para a realização deste estudo, foi utilizado leite cru cedido por produtor rural da cidade de Patrocínio - MG, que foi transportado para o Laboratório de Nutrição Animal da Faculdades Associadas de Uberaba - FAZU, onde a pasteurização.

As análises físico-químicas foram realizadas no leite antes e após hidrólise da lactose. Acidez total titulável foi determinada por meio de titulação com solução Dornic (0,11 N), (MAPA, 2013). A acidez titulável pode variar de 0,14 a 0,18 Dornic (°D); (MAPA, 2011). O pH foi determinado por medida direta com pHmetro digital, modelo PM 608. A gordura foi determinada com Ekomilk M. Extrato seco total (EST) no Ekomilk M. Índice Crioscópico foi determinado com ultrassom Ekomilk M, modelo Milkana KAM 98-2A da marca Cap Lab. A Densidade, proteína e lactose foram determinadas por lactodensímetro e Ekomilk M.

Análise de Escore de Autenticidade (EA) é uma exclusividade da ESALQ/USP e é válido em amostras de leite cru. Tem como objetivo de identificar possíveis adulterações no leite. O EA foi determinado antes da pasteurização na Clínica do Leite - ESALQ/USP. Os resíduos de antibiótico (ATB) no leite podem causar reações de hipersensibilidade, foi determinado na Clínica do Leite.

Os leites foram submetidos antes e após a etapa de hidrólise as seguintes análises sensoriais: Aspecto e Cor: líquido branco, ou ligeiramente amarelado, homogêneo e sem partículas/substâncias estranhas; Sabor e Odor: ausência de sabores/odores estranhos.

Foram utilizadas duas enzimas *β-galactosidases* derivadas de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact® LGi 5000) e *Bacillus licheniformes* (Lactlow L). A hidrólise da lactose foi realizada adicionando-se 0,24 g da enzima *β-galactosidase* em alíquotas de 300 mL de leite pasteurizado (CAMPOS, et al.), totalizando quatro amostras. Cada uma delas foi incubada em uma das temperaturas: 10°C, 34°C, 40 °C e 55°C.

O acompanhamento da hidrólise da lactose foi feito através de análise de crioscopia, em intervalos de 1 hora. Foi feita uma estimativa da porcentagem de hidrólise, utilizando-se a Equação 1, recomendada por empresa fornecedora da enzima (LONGO, 2006).

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

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Análises feitas pela RBQL

As análises realizadas no leite cru antes da etapa de pasteurização apresentaram resultados de Escore de Autenticidade (EA) de 2,12 (normal <5) e Resíduo de antibiótico (ATB) negativo, não existindo presença de antibiótico.

#### 3.2. Análises microbiológicas

Na Tabela 1, são descritos os resultados obtidos.



Tabela 1 – Resultado das análises microbiológicas

Parâmetro	Enzima	Matéria-prima	Leite após a hidrólise
Contagem de células somáticas (CCS) (x1000 células/mL)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	345.00	512.00 407.00
Contagem bacteriana total (CBT) (x1000 UFC/mL)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	80.00	106.00 96.00

Em 2014 foi publicada pelo MAPA a IN-62 onde os limites de CCS e CBT, são de 100 mil UFC/mL para CBT e 400 mil céls/mL para CCS. Nota-se que com a utilização da enzima derivada de *Bacillus licheniformes*, os resultados ficaram ligeiramente fora dos parâmetros. Essa enzima apresenta temperatura ótima a 40°C. Segundo Longo (2006) 40°C, é a temperatura ideal para proliferação de microrganismos patogênicos no leite, e o tempo de reação não deve ultrapassar 4 horas, e no experimento, as amostras ficaram submetidas a temperatura de 34 e 40°C por 6 horas, o que explica o aumento de contagem total.

### 3.3. Análises sensoriais

Tabela 1 – Resultado das análises sensoriais.

Parâmetro	Matéria-prima	Leite após a hidrólise
Aspecto	Líquido branco	Líquido branco
Cor	Normal	Normal
Sabor	Ausência	Ausência
Odor	Ausência	Ausência

### 3.4. Análises físico-químicas

Na Tabela 2, são descritos os resultados obtidos das análises microbiológicas que foram realizadas antes e após a etapa de hidrólise no leite.

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos das matérias-primas e das amostras após a reação de hidrólise.

Parâmetro	Enzima (lactase)	Matéria-prima	Leite após a hidrólise
Acidez (°D)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	16	17 16.8

pH	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	6.66	6.61 6.63
Gordura (%m/m)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	4.17	3.36 3.96
Densidade (g/mL)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	1031.00	1043.00 1037.80
EST (%m/m)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	12.78	15.11 13.45
ESD (%m/m)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	8.61	11.75 9.49
Proteína (%m/m)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	3.35	3.43 4.09
Crioscopia (°C)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	-0,488	-0.685 -0.570
Lactose (%m/m)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	4.37	1.11 1.20
ST (%m/m)	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	12.78	14.1 13.6

Após a hidrólise observou-se uma ligeira elevação da acidez do leite com a utilização das duas enzimas diferentes, mesmo assim os leites permaneceram dentro dos padrões estabelecidos pelo MAPA para leites pasteurizados. O pH das amostras submetidas a hidrólise também apresentaram redução, mas se mantiveram dentro dos parâmetros estabelecidos. Esse aumento da acidez e redução do pH ocorre devido à atividade dos microrganismos presentes no leite, principalmente às bactérias lácticas, que promovem acidificação (TREVISAN, 2008).

Verificou-se a diminuição da gordura onde ela foi maior com o uso da enzima derivada de *Bacillus licheniformes*. Não se encontrou na literatura, justificativa para a redução da gordura. Obteve-se um aumento da densidade das amostras após a etapa de hidrólise. A

utilização da enzima lactase ( $\beta$ -galactosidase) ocasiona modificações físicas e químicas no leite (TREVISAN, 2008).

Obteve-se redução no índice crioscópico de 0,197 utilizando a enzima derivada de *Bacillus licheniformes* e de 0,82 utilizando a enzima derivada de *Kluyveromyces lactis*. Esta redução deve-se ao fato de que com a hidrólise ocorre um aumento dos açúcares redutores do leite, que passa a apresentar, além da lactose, glicose e galactose resultantes da reação. Com isto aumenta a concentração dos constituintes solúveis na solução leite (TREVISAN, 2008).

### 3.5. Hidrólise enzimática da lactose

As amostras foram submetidas à etapa de hidrólise onde houve acompanhamento da hidrólise da lactose que foi feito através de análise de crioscopia, realizada em intervalos de 1 hora. Com os valores encontrados de crioscopia, calculou-se através da Equação 1, recomendada por um dos fabricantes, a hidrólise estimada, a qual a média dos tratamentos foi 70% com enzima *Bacillus licheniformes* e 29% com a utilização da enzima *Kluyveromyces lactis*. A partir daí calculou-se a lactose estimada como podemos ver nas Figuras 1 e 2.

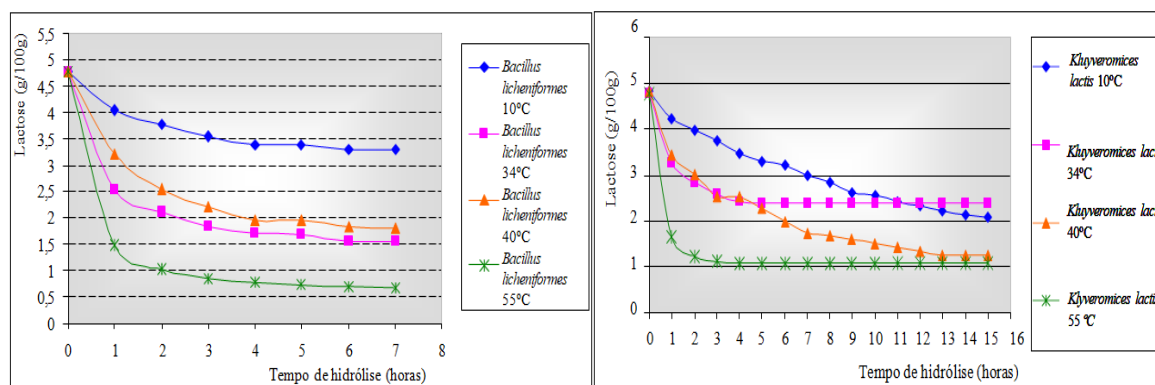


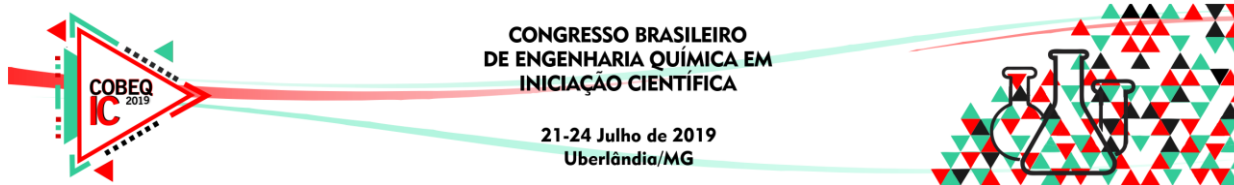
Figura 1e 2. Curvas de hidrólise *Bacillus licheniformes* e *Kluyveromyces lactis*.

Nota-se, na Figura 1, que as curvas de hidrólise foram diferentes nas amostras incubadas a 10°C, 34°C, 40 °C e 55°C, mas todas atingiram o grau de hidrólise com aproximadamente 3 horas de incubação. Além disso, segundo a marca Lactlow apresenta maior faixa de pH de atuação de 4,2 a 9,0, o que torna a enzima ideal para produtos lácteos de maior acidez.

Nota-se, na Figura 2, que as curvas de hidrólise foram semelhantes nas amostras incubadas a 10 e 34 °C. Na temperatura de 40°C houve uma melhor eficiência de hidrólise da lactose nos tempos 3,5 e 4 horas de incubação, explicado pelo fato que a temperatura ótima de ação da enzima derivada de *Kluyveromyces lactis* proporciona maior atividade a 40°C.

## 4. CONCLUSÕES

Conclui-se com o estudo realizado que a aplicação das enzimas derivadas de *Bacillus licheniformes* e enzima derivada de *Kluyveromyces lactis*, alteraram propriedades físico-



químicas no leite após a etapa de hidrólise. Obteve-se diminuição da acidez, pH, crioscopia, teores de gordura e lactose e aumento na densidade, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), e teores de proteína.

Obteve-se parâmetros de escore de autenticidade (EU), resíduos de antibióticos (ATB) e análise sensoriais dentro do especificado pela legislação. O CCS e CBT afeta diretamente o valor industrial do leite e características de qualidade sensorial (sabor), e essa característica não sofreu alteração após a hidrólise do leite.

Ambas as enzimas apresentaram eficiência na redução do teor de lactose, sendo mais significativo o resultado onde foi do *Bacillus licheniformes*.

Observou-se também que a velocidade de hidrólise na temperatura de 10°C foi menor, que comparada às outras temperaturas que próximas da temperatura ideal das enzimas.

Obteve-se teores de lactose de 70% para a enzima derivada de *Bacillus licheniformes* e 29% para enzima de *Kluyveromyces lactis*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. *Hydrolysis of lactose: A literature review*. Process Biochemistry, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 2-12, 1985.
- CAMPOS TCAS, D'ALMEIDA WK, et al. UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde. 2009; 11(4):51-4
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIAOCHOA, F. *Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis**. Enzyme and Microbial Technology, v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). *Determinação de acidez titulável em leite fluido*. Código: MET POA/10/01/01, Páginas 4. Emissão: 22/04/2013.
- TREVISAN, A. P. *Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado*. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.