



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite

Alessandra Bosso

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E
ESTABILIDADE TÉRMICA DA β -GALACTOSIDASE DE
KLUYVEROMYCES LACTIS E *ASPERGILLUS ORYZAE***

Londrina

2012

Alessandra Bosso

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E
ESTABILIDADE TÉRMICA DA β -GALACTOSIDASE DE
KLUYVEROMYCES LACTIS E *ASPERGILLUS ORYZAE***

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite

Orientador: Prof. Dr Hélio Hiroshi Suguimoto

LONDRINA

2012

ALESSANDRA BOSSO

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E
ESTABILIDADE TÉRMICA DA β -GALACTOSIDASE DE
KLUYVEROMYCES LACTIS E *ASPERGILLUS ORYZAE***

Dissertação aprovada, apresentada à UNOPAR - Universidade Norte do Paraná, no Mestrado Acadêmico de Ciência e Tecnologia do Leite, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite, com nota final igual a _____, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto
Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Raul Jorge Hernan Castro-Gómez
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dra. Cínthia Hoch Batista de Souza
Universidade Norte do Paraná

Londrina, 13 de dezembro de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio e Jacira pelo incentivo e amor incondicional.

Agradecimentos

As minhas queridas irmãs Andréia e Adriana pelo carinho.

Meu orientador Prof. Dr Hélio S. Suguimoto que confiou a mim este trabalho.

Ao meu amigo de todas as horas José Renato que dividiu comigo as angústias, as alegrias e os frutos deste trabalho.

A Flávia Clochet que dedicou seu tempo na revisão deste trabalho, pois sua ajuda foi fundamental para conclusão dessa dissertação.

A amiga Isamélia Ballan, pelas palavras de incentivo a mim proferidas nos momentos de dúvidas e cansaço.

A todos meus amigos pela paciência, cada um de vocês foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Eu não sou tão forte como eu previa, nem tão fraca como eu temia. Não tenho o passo rápido como eu gostaria, nem paraliso como poderia. Aprendi a me equilibrar nos extremos. Se não tenho o direito de escolher todos os acontecimentos, me posiciono de acordo com os fatos. No final o que me move não é forte o suficiente para me derrubar, mas é intenso o bastante para me fazer ir além.

Fernanda Gaona

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Química da Lactose.....18

Artigo 1

Figura 1- Porcentagem de hidrólise da lactose pelas enzimas de *K. lactis* e *A. oryzae* em diferentes temperaturas e pH 5,0 (A); 6,0 (B); 6,5 (C) e 7,0 (D).....31

Figura 2 - Velocidade de hidrólise da lactose (primeiros 15 minutos de reação) dos leites integral e desnatado com enzima de *K. lactis* e *A. oryzae*, em diferentes temperaturas.....34

Figura 3 - Porcentagem de hidrólise da lactose pelas enzimas de *K. lactis* (A) e de *A. oryzae* (B) em diferentes temperaturas, indicando a perda de atividade enzimática ao longo do tempo de reação. *Para a enzima de *K. lactis* a 40°C não foi possível traçar a linha de tendência, pois não houve correlação linear.....35

Artigo 2

Figura 1- Porcentagem de hidrólise da lactose em simulação intestinal (pH 7,4), com enzima de *K. lactis* (A) e *A. oryzae* (B), em diferentes temperaturas, durante 60 minutos. Médias seguidas pela mesma Letra, entre os tratamentos, não diferem significativamente ($P>0,05$) entre si pelo teste de Tukey.....48

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 - Condições experimentais para avaliar a estabilidade térmica das enzimas de *K. lactis* e *A. oryzae*.....29

Tabela 2– Porcentagem média (\pm D.P.) de hidrólise da lactose por enzimas de *K. lactis* e de *A. oryzae* em leite integral e leite desnatado, em diferentes temperaturas.....33

Tabela 3 - Porcentagem média (\pm D.P.) de hidrólise da lactose pela enzima de *K. lactis* em função do tempo de exposição ao tratamento térmico.....36

Tabela 4 - Porcentagem média (\pm D.P.) de hidrólise da lactose pela enzima de *A. oryzae* em função do tempo de exposição ao tratamento térmico.....37

Artigo 2

Tabela 1– Porcentagem média (\pm D.P.) de hidrólise da lactose pelas enzimas de *K. lactis* e *A. oryzae* em diferentes concentrações e temperaturas, em simulação ao sistema gastrintestinal humano (pH 7,4)49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Possíveis fontes de obtenção de β -galactosidase.....	24
--	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1	LEITE.....	16
3.2	LACTOSE.....	17
3.3	HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	19
3.4	INTOLERÂNCIA À LACTOSE.....	20
3.5	ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS.....	22
3.6	ENZIMA B-GALACTOSIDASE.....	22
4.	ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	25
5.	ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	42
6.	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54

RESUMO

A lactose é o principal carboidrato do leite bovino, cuja hidrólise pela β -galactosidase, produz glicose e galactose. Indivíduos podem ser intolerantes à lactose, devido à inabilidade de digeri-la pela deficiência ou ausência desta enzima intestinal. Uma alternativa para amenizar o problema dos intolerantes é a ingestão de produtos isentos de lactose. Devido à elevada prevalência desta condição na população mundial, tem sido crescente o interesse comercial pelo leite e derivados com teor reduzido de lactose, obtidos a partir da hidrólise enzimática. Porém, a ação enzimática pode ser afetada por vários fatores como: temperatura, pH, cofatores e inibidores. Além disso, a fonte de obtenção da enzima é um fator relevante. Por isso, é importante conhecer a atividade de enzimas provenientes de diferentes fontes. Neste trabalho avaliou-se a atividade das enzimas β -galactosidase comercial de origem de levedura *K. lactis*, na forma líquida e de fungo filamentoso *A. oryzae*, na forma liofilizada. Foram comparadas diferentes concentrações da enzima de *K. lactis* (0,7; 1,0 e 1,5 mL/L) e de *A. oryzae* (0,7; 1,0 e 1,5g/L), diferentes pH (5,0; 6,0; 6,5; 7,0) e temperaturas (30; 35; 40; 55°C). Também se determinou a atividade das enzimas em condições que simularam o sistema gástrico-intestinal humano. Para a enzima de *K. lactis* as reações em pH 7,0 e na temperatura de 40°C apresentaram a melhor taxa de hidrólise da lactose (97,9%), porém não apresentou atividade em pH 5,0 e na temperatura de 55°C. Para a enzima de *A. oryzae* as melhores taxas de hidrólise foram observadas em pH 5,0, sendo que, nas temperaturas de 30; 35; 40 e 55°C a porcentagem de hidrólise foi de 42,9; 46,8; 52,1 e 67,4%, respectivamente. A *K. lactis* apresentou taxas de hidrólise da lactose significativamente maiores, comparada a *A. oryzae*. Quando comparada a atividade das enzimas no leite integral e desnatado, verificou-se que a hidrólise da lactose no leite integral foi superior a hidrólise no leite desnatado, em todas as temperaturas avaliadas (30; 35; 40 e 55°C). Na estabilidade térmica verificou-se que a enzima de *A. oryzae* teve menor redução na sua atividade quando comparada a *K. lactis*, mesmo em temperaturas mais altas (60°C). Em condições que simularam o sistema gástrico humano, nenhuma das enzimas apresentou atividade. No sistema que simulou a condição intestinal verificou-se que o aumento da concentração de enzima ocasionou o aumento das taxas de hidrólise. Nessa condição, a enzima de *K. lactis* apresentou melhores taxas de hidrólise do que *A. oryzae*.

Palavras-chave: Hidrólise, gastrintestinal, lactose, β -galactosidase, temperatura, pH.

ABSTRACT

Lactose is the main carbohydrate in milk cattle, whose hydrolysis by β -galactosidase produces glucose and galactose. Individuals may be lactose intolerant, due to the inability to digest it, because of the deficiency or absence of intestinal enzyme. An alternative to alleviate the problem of intolerance is the ingestion of lactose-free products. Due to the high prevalence of this condition in the world population, the interest in commercial milk and dairy products, with reduced content of lactose, obtained from enzymatic hydrolysis has been increasing. However, enzymatic activity can be affected by many factors such as, temperature, pH, cofactors and inhibitors. Furthermore, the source for obtaining the enzyme is an important factor. Therefore it is important to know the activity of enzymes from different sources. In this study we evaluated the activity of β -galactosidase enzymes from commercial source of *K. lactis* yeast (liquid), and *A. oryzae* filamentous fungus (lyophilized). Were compared different concentrations of enzymes extracted from *K. lactis* (0.7, 1.0 and 1.5 ml / L), and *A.oryzae* (0.7, 1.0 and 1.5 g / L), different pH (5.0, 6.0, 6.5, 7.0), and temperatures (30, 35, 40, 55°C). Also, was determined the activity of enzymes, under conditions of simulated the human gastrointestinal system. *K. lactis* enzyme showed higher hydrolysis (97.9%), at pH 7.0 and 40°C, but showed no activity at pH 5.0 and 55°C. *A. oryzae* enzyme showed better hydrolysis rates at pH 5.0, and at temperatures of 30, 35, 40, and 55°C. The percentage of hydrolysis was 42.9, 46.8; 52.1, and 67.4%, respectively. The *K. lactis* enzyme showed significantly higher rates of lactose hydrolysis than *A. oryzae*. When compared the effect of enzymes in whole-milk and skim-milk, we observed superior hydrolysis of lactose in whole-milk at all temperatures (30, 35, 40, and 55°C). *A. oryzae* enzyme was more thermally stable than *K. lactis* enzyme, even in higher temperatures (60°C). In simulation to human gastric system, both enzymes showed no activity. In simulation to human intestinal system, the concentration of enzyme resulted in increase of hydrolysis. Under this condition, the *K. lactis* enzyme showed better rates of hydrolysis than *A. oryzae*.

Keywords: Hydrolysis, gastrointestinal, lactose, β -galactosidase, temperature, pH.

1. INTRODUÇÃO

O leite é utilizado na alimentação/nutrição humana desde o início da civilização. Desde o nascimento do indivíduo, o leite apresenta-se quase indissociável da sua alimentação. A riqueza nutricional do leite distribui-se de diferentes formas pelos seus derivados. Pela sua composição, versatilidade e prazer que proporciona, o leite pode ser comparado a um alimento próximo da perfeição.

Os benefícios do leite são muitos, como fonte de cálcio, um mineral fundamental para boa formação dos ossos e dentes. Possui vitaminas, proteínas, potássio, aminoácidos e fósforo, que são indispensáveis para o desenvolvimento de todos os indivíduos. É o alimento que fornece naturalmente maior quantidade de lactose. Por isso, pessoas com deficiência da enzima β -galactosidase, também chamada de lactase, responsável pela hidrólise da lactose, podem ter sintomas de intolerância após o consumo deste carboidrato.

A lactose é o principal açúcar do leite, é um dissacarídeo composto por dois monossacarídeos: a glicose e a galactose, e é um componente exclusivo do leite, sendo responsável pela melhor absorção do cálcio e fósforo, reduzindo a necessidade de ingestão de vitamina D, além disso, contribuiu para a firmeza da musculatura infantil. Todavia muitas pessoas não podem fazer uso dessa fonte alimentar por sofrerem de uma patologia diagnosticada como intolerância à lactose.

A intolerância à lactose é geralmente uma condição permanente, mas também, pode ser a consequência temporária de uma infecção ou outra agressão à mucosa intestinal. Afeta uma grande parcela da população mundial e sua manifestação sintomática se dá por desconforto abdominal, cólicas, náuseas, diarreia e inchaços, sobretudo após a ingestão de laticínios. Os sintomas variam de acordo com a quantidade de lactose ingerida e também do tipo de alimento, além do grau de deficiência da β -galactosidase.

O diagnóstico da intolerância à lactose pode ser realizado através de

exames de pH fecal, teste de hidrogênio expirado, teste oral de tolerância à lactose, biópsia intestinal e exame genético. Como principal forma de tratamento recomenda-se o consumo de leite com baixo teor de lactose, comprimidos ou cápsulas de β -galactosidase e dieta, com redução ou eliminação da ingestão de lactose nos casos mais graves.

A hidrólise da lactose, que é a quebra desse dissacarídeo em dois monossacarídeos (glicose e galactose), pode ser realizada de duas formas, a hidrólise ácida que requer temperaturas mais altas (50°C -100°C) e pH ácido (1,5 -5,0), formando subprodutos indesejáveis como alteração de cor e sabor dos alimentos. A hidrólise enzimática que ocorre em condições mais brandas (temperaturas de 20°C – 40°C e pH próximo do neutro), sofre influência de diversos fatores como, temperatura, pH, concentrações de produtos e substratos que podem inibir a atividade da enzima.

A β -galactosidase de uso industrial e farmacêutico é produzida a partir de fungos filamentosos e leveduriformes. As condições ótimas de concentração, temperatura e pH para sua aplicação diferem de acordo com a fonte.

No uso industrial a enzima hidrolisa a lactose, é possível obter alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para os consumidores intolerantes à lactose, além disso, previne a cristalização em produtos lácteos.

Portanto, devido à importância da enzima β -galactosidase na indústria alimentícia, industrial e farmacêutica, o objetivo geral deste trabalho foi estudar a atividade desta enzima obtida de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae* na hidrólise da lactose sobre diferentes condições de concentração, temperatura e pH. A atividade em condições que simularam o sistema gastrointestinal também foi avaliada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

1 Comparar a atividade da enzima β -galactosidase produzida pela levedura *K. lactis* e pelo fungo filamentoso *A. oryzae* na hidrólise da lactose em diferentes condições.

2.2 Objetivos específicos

2 Avaliar o efeito da concentração, temperatura e valor de pH na atividade da enzima β -galactosidase, obtida de *K. lactis* e de *A. oryzae*, na hidrólise da lactose P.A., no leite integral e desnatado.

3 Verificar a estabilidade das enzimas β -galactosidase provenientes de *K. lactis* e *A. oryzae*, em diferentes temperaturas.

4 Verificar a atividade da enzima β -galactosidase de *K. lactis* e de *A. oryzae*, na hidrólise da lactose, em simulação as condições do sistema gastrintestinal humano.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leite

O leite é um dos alimentos que possui valor nutritivo para o ser humano (SOROA, 1980; PINTADO; GOMES; MALCATA, 2008). É um produto importante para todos os povos por ser de alto valor nutritivo, fornecendo nutrientes em quantidades consideráveis (VALSECHI, 2001). Desde os primórdios da civilização, o leite tem sido utilizado na alimentação humana como fonte de proteína, gordura, energia e outros constituintes essenciais (TRONCO, 2003). Sob o ponto de vista legal é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2002).

O leite, obtido em circunstâncias naturais, é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto ligeiramente adocicado (BEHMER, 1991). Apresenta-se como uma emulsão líquida em que a fase contínua formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura (SGARBIERI, 2005). É secretado pelas glândulas mamárias e é um alimento indispensável aos mamíferos nos primeiros meses de vida, enquanto não podem digerir outras substâncias necessárias à sua subsistência, além de ser a maior fonte de cálcio absorvível à disposição do homem (BEHMER, 1979; SOUZA; RIBEIRO, 2005).

Pode ser utilizado na forma *in natura*, e também servir como matéria-prima para a produção de diversos outros produtos, como queijos, iogurtes e manteiga (RENTERO, 1993).

O leite produzido pelo animal varia quanto ao volume e em relação aos diversos componentes. As variações quanto à composição do leite dependem dos fatores: espécie, raça, individualidade animal, intervalo entre ordenhas, variação durante a ordenha, diferenças entre os quartos, período de lactação, influência das estações, alimentação, temperatura, doenças, idade do animal e condições climáticas (ANTUNES; PACHECO, 2006; BEHMER, 1984; GONZÁLEZ, 2001).

Por ser considerado um alimento completo em nutrientes, facilmente assimiláveis, torna-se um excelente alimento para o funcionamento do organismo humano, protege o trato gastrointestinal e regulariza os processos de obtenção de energia, além de ser benéfico para pessoas de todas as idades, sendo a melhor fonte natural de cálcio, oferecendo também, proteína de alta qualidade e disponibilidade (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). O consumo constante de leite colabora com a formação e a manutenção da estrutura dos ossos, evitando doenças como a osteoporose, o câncer e a obesidade (CARVALHO, 2000; FONSECA; SANTOS, 2000).

O alto valor nutritivo do leite estimulou a produção de leite de ruminantes como um dos ramos mais importantes da produção animal desde a domesticação (DEBELJAK et al., 2000). Sendo o leite de vaca, o mais importante do ponto de vista comercial e industrial (SGARBIERI, 2005).

O leite bovino contém em média 87,1% de água, 4,0% de gordura, 3,3% de proteína, 4,6% de lactose e 0,7% de cinzas (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Sua composição é um importante parâmetro de sua qualidade. Sua variação é acompanhada da alteração das características sensoriais (cor, gosto, aroma, textura), nutricionais e tecnológicas, ou seja, a alteração da composição do leite afeta sua capacidade de ser transformado em produtos lácteos seguros e que mantenham suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais durante a vida de prateleira.

A lactose é um dissacarídeo produzido somente pelas glândulas mamárias dos mamíferos (SUAVEZ; SAVAIANO, 1997).

3.2 Lactose

A lactose é um dissacarídeo constituído por um radical β -D-galactose e outro de D-glicose, considerada um açúcar redutor, porque o grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, portanto, ela está livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2002; SANTOS, 2011). Na figura 1 está representada a estrutura química da lactose.

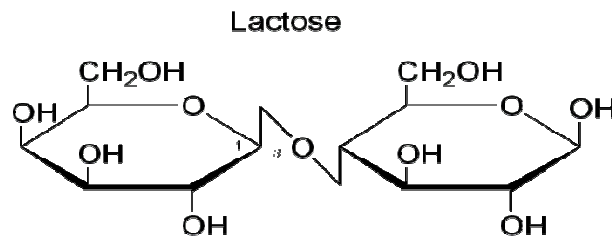


Figura 1: Estrutura Química da Lactose.

Fonte: CAMPBELL (2002).

É o principal carboidrato do leite e outros produtos lácteos, formado nas glândulas mamárias a partir da glicose do sangue. É o componente majoritário do extrato seco do leite de vaca, aproximadamente 40 a 50%, e no soro de leite em torno de 70 a 80% (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008). É a fonte mais importante de energia durante o primeiro ano de vida de um ser humano, fornecendo quase metade da necessidade energética total em crianças (INSUMOS, 2010).

A lactose tem como características a baixa solubilidade em água (15 a 20%) e o baixo poder adoçante, quando comparada a outros açúcares (TRONCO, 2003). Quando comparada com a sacarose, é cerca de dez vezes menos solúvel e apresenta um poder edulcorante seis vezes inferior (MAHAUT et al., 2004). A título de comparação do poder de doçura relativa, a frutose tem o índice 130, a sacarose 100 (padrão), a glicose 75, a galactose 32 e a lactose apenas 17 (GOURSAUD, 1985). A baixa solubilidade pode causar cristalização e, conseqüentemente, problemas tecnológicos durante o processamento de alguns produtos lácteos (VALSECHI, 2001).

No organismo humano, a lactose age como promotora na absorção e retenção de cálcio no intestino e absorção de magnésio e manganês (MANAN; KARIN; KIT, 1999). Também prolonga a ação da vitamina D, em caso de redução de radiação solar, e ajuda na prevenção do raquitismo e da osteomalácia (KOCIÁN, 1988). A utilização da lactose pela microbiota intestinal resulta na produção de ácido láctico e na diminuição do pH, promovendo o desenvolvimento da microbiota intestinal desejável inibindo o desenvolvimento de bactérias putrefativas e patogênicas (TRONCO, 2003).

Uma das desvantagens da lactose é a de não ser facilmente digerida por uma parte da população. No intestino humano, a lactose é hidrolisada pela enzima β -galactosidase ou lactase, sendo absorvida como glicose e galactose. Esses monossacarídeos serão absorvidos através do transporte ativo dependendo do sódio e mediados por transportador (ALLIET; LEBENTHAL, 1989). Porém, esta enzima não é produzida por algumas pessoas ou é produzida em uma concentração menor, de modo que a ingestão de lactose pode levar a fermentação da mesma, gerando distensões abdominais, desconfortos e, em alguns casos, diarreia (BÒDALO et al., 1991; ZADOW, 1994).

Segundo Silva e Cardoso (2007) a redução de teor de lactose no leite e seus derivados são de grande importância nutricional e comercial, já que o consumo desses alimentos beneficiaria as pessoas com intolerância à lactose.

3.3 Hidrólise da Lactose

A absorção da lactose primeiramente requer a ação da enzima β -galactosidase, por meio da reação de hidrólise em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose, carboidratos simples, que são absorvidos pelo organismo (CAMPBELL, 2000; ORDONEZ, 2005)

Existem dois métodos utilizados para a hidrólise da lactose: o método ácido e o método enzimático. A hidrólise ácida caracteriza-se por envolver soluções diluídas de ácidos fortes, como ácido sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura. Devido a estas características, a hidrólise ácida tem sua aplicação restrita, pois pode ocorrer desnaturação das proteínas do leite e formação de cor e odor inaceitáveis pelo consumidor (SANTIAGO, 2002).

Já o método enzimático de hidrólise de lactose emprega a enzima β -galactosidase, a qual hidrolisa o referido dissacarídeo em seus monossacarídeos constituintes. A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as propriedades nutricionais da matéria-prima (SANTOS; LADERO; GARCÍA-OCHOA, 1998).

A hidrólise da lactose sofre influência da temperatura, pH, tempo de reação e concentração da enzima (EVANGELISTA, 1998). Em princípio, a reação de hidrólise da lactose forma uma mistura isomolecular de glicose e galactose (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985).

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

É um processo promissor para a indústria de alimentos porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição (LONGO, 2006) ou com um teor reduzido deste carboidrato, importante para pessoas com intolerância à lactose. Também evita a cristalização da lactose na produção de sorvetes, de produtos como leite condensado e doce de leite, além de facilitar o corte e aumentar a cremosidade dos produtos (CARMINATTI, 2001; JURADO et al., 2002; OLIVEIRA, 2005; ZADOW, 1993) proporcionando melhoria nas características tecnológicas.

A hidrólise da lactose tem aplicação em três grandes áreas: leite, como um produto pré-digerido para indivíduos intolerantes à lactose; leite destinado à produção de derivados, tais como queijos e iogurtes; utilização do soro e xaropes de soro hidrolisado para a produção de adoçantes (LONGO, 2006; OLIVEIRA, 2005; SANTIAGO et. al., 2004).

3.4 Intolerância à Lactose

A intolerância à lactose é a incapacidade de digerir lactose, resultado da deficiência ou ausência da enzima intestinal chamada β -galactosidase (TÉO, 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a intolerância aos alimentos é uma reação reproduzível, desagradável (adversa) que pode ocorrer devido a uma falha do processo digestivo, que depende da ação de enzimas capazes de degradar os alimentos, em virtude de deficiências enzimáticas.

Em indivíduos intolerantes, a lactose ingerida permanece no intestino

delgado sem sofrer hidrólise, provocando um fluxo de água extracelular para o interior do duodeno e jejuno, bem como para o estômago, em razão da diferença da pressão osmótica (JOHNSON et al.,1993). A lactose não absorvida é fermentada pela microbiota do cólon, resultando em ácidos orgânicos, gases e o aumento do peristaltismo dos músculos do intestino, com manifestações de flatulência, fluxo intestinal anormal, cólicas abdominais e diarréias com fezes aquosas (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

A severidade dos sintomas depende da quantidade ingerida e da quantidade de lactose que cada pessoa pode tolerar (MATTAR; MAZO, 2010). Para caracterizar indivíduos com incapacidade parcial ou total de digerir o principal açúcar presente no leite, diversas terminologias são empregadas: intolerante à lactose; lactase não persistentes; paciente com má absorção de lactose; paciente com hipolactasia/alactasia do tipo adulto; paciente com deficiência parcial ou total de lactase (ANTUNES; PACHECO, 2006).

Existem três tipos de intolerância à lactose, decorrentes de diferentes processos. A deficiência congênita de lactase, que é um defeito genético muito raro e manifesta-se nos recém-nascidos logo após a primeira ou segunda ingestão do leite, sendo uma condição permanente (MATTAR; MAZO, 2010; SHUKLA, 1997). Na intolerância ontogênica à lactose ou hipolactasia tipo adulto, as manifestações clínicas são menos intensas e mais tardias, e ocorre devido a uma tendência natural de diminuição da produção de lactase com o avançar da idade (DUMOND et al., 2006). A intolerância secundária à lactose é a mais comum e pode ocorrer em consequência de doenças que causam algum tipo de dano à mucosa intestinal, ou após cirurgias no aparelho digestivo, ou também em prematuros em que uma imaturidade enzimática associada a um processo infeccioso pode levar à intolerância (FARIAS; FAGUNDES NETO, 2004; LONGO, 2006).

Quanto ao tratamento, no caso de intolerância congênita à lactose, existe a necessidade de seguimento de dieta isenta de lactose. Se a deficiência enzimática for adquirida, essa forma de se alimentar não é permanente, podendo-se retornar à dieta habitual após a resolução do problema. No caso de deficiência ontogênica, como existe apenas uma diminuição de atividade enzimática, não há a

necessidade de excluir a lactose completamente da dieta, bastando haver uma redução da quantidade de leite e derivados de acordo com a tolerância individual (BEYER, 2002).

Uma das grandes preocupações com a diminuição da lactose na alimentação é a garantia do fornecimento de quantidade apropriada de proteínas, cálcio, riboflavina e vitamina D, que tem no leite e em seus derivados sua maior fonte (UGGIONI; FAGUNDES, 2006).

3.5 Alternativas tecnológicas

O leite com lactose reduzida, ou baixo teor de lactose, é indicado aos intolerantes à lactose, para que possa usufruir dos outros nutrientes presentes no leite, sem os inconvenientes que a lactose costuma causar (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, et. al., 2010). Curiosamente o leite com lactose reduzida não tem sido preferido apenas por aqueles que possuem intolerância à lactose (MARIOTTI et al., 2008). A enzima lactase e leites tratados com ela estão disponíveis para pessoas que não digerem a lactose e possuem desconforto com a ingestão de leite (BEYER, 2002). A ingestão de leites com lactose hidrolisada tem reduzido os sintomas em pessoas intolerantes a esse carboidrato (BATISTA, 2008).

A ingestão oral da β -galactosidase por pessoas intolerantes à lactose é uma forma de aplicação desta enzima, visando à remoção da lactose do leite e seus derivados (MORIWAKI; MATIOLI, 2000). O método utilizado é a hidrólise enzimática pela adição de β -galactosidase microbiana. A lactose pode ser hidrolisada antes ou após o tratamento térmico. No Brasil o leite com baixo teor de lactose é encontrado no mercado na forma de leite longa vida (INSUMOS, 2010).

Muitos países possuem uma gama de produtos com baixo teor de lactose, porém no Brasil, este mercado ainda é pouco explorado. Com exceção do leite UHT e o leite pasteurizado, o mercado brasileiro ainda não dispõe de derivados lácteos com baixo teor de lactose voltados a essa clientela (INSUMOS, 2010).

3.6 Enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase pertence ao grupo das enzimas conversoras de sacarídeos da família das hidrolases e é responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose [GalB1-4GIC] dando origem a uma mistura isomolecular de glicose e galactose (SANTIAGO et al., 2004).

Esta enzima está localizada na borda do epitélio intestinal dos mamíferos. A atividade da lactase é aumentada em humanos na fase final da gestação e permanece elevada até cerca de três anos de idade, período após o qual começa a declinar sua atividade fisiológica, ocorrendo na fase adulta uma hipolactasia ou deficiência de lactose (ARANGO et al., 2006; SILVA, 2007).

A β -galactosidase é uma importante enzima utilizada industrialmente na hidrólise da lactose do leite e soro de queijo para diversas aplicações. A importância desta enzima foi reforçada pela sua atividade de galactosiltransferase, que é responsável pela síntese de transgalactosilados oligossacarídeos (GOS) que podem ser adicionados aos alimentos tornando-os funcionais, trazendo diversos efeitos benéficos sobre os consumidores (CRUZ et al., 1999).

A enzima β -galactosidase pode ser isolada a partir de plantas (por exemplo, pêssegos e amêndoas); órgãos de animais (como intestino, cérebro); bactérias, leveduras (enzima intracelular) e fungos filamentosos (enzima extracelular) (Quadro 1).

A grande vantagem dos microrganismos relativamente às plantas é o fato de atingirem maiores produtividades, sendo a β -galactosidase de origem fúngica a mais utilizada em aplicações tecnológicas (OLIVEIRA, 2005).

Das várias fontes de β -galactosidase, nem todas são aceitas ou reconhecidas como seguras quando a enzima está sendo utilizada em processos alimentícios (CARMINATTI, 2001).

Quadro 1. Possíveis fontes de obtenção de β -galactosidase

Plantas	Pêssego Amêndoa Algumas espécies de rosas
Organismos animais	Intestino Cérebro e tecido da pele
Leveduras	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i> <i>Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis</i> <i>Cândida pseudotropicalis</i>
Bactérias	<i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Streptococcus lactis</i>
Fungos	<i>Aspegillus oryzae</i> <i>Aspegillus niger</i>

Fonte: adaptado de Santiago (2004).

A legislação brasileira especifica por meio da Resolução nº 205/2009, que a enzima β -galactosidase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candica pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces sp.* (BRASIL, 2009). Tais espécies são classificadas como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério para aplicação alimentícia. Tipicamente a β -galactosidase catalisa a hidrólise de lactose e arabinoses, sendo capaz ainda de catalisar a síntese de certos oligossacarídeos (RICHAMOND; GRAY; STINE, 1981).

De acordo com a origem a β -galactosidase pode apresentar diferentes propriedades com potenciais variados de aplicação tecnológica, gerando diferentes produtos, como: leite com teor reduzido de lactose, medicamentos para combater a intolerância à lactose, produção de xaropes alimentares, além de produtos derivados do leite com baixa concentração de lactose (OLIVEIRA, 2005).

As propriedades das diferentes β -galactosidasas dependem de sua

origem. Em geral β -galactosidases de fungo filamentoso possuem pH ótimo de atuação numa faixa ácida (2,5-4,5) enquanto para β -galactosidases de origem de leveduras e bactérias o pH ótimo está numa faixa mais neutra (6,0–7,0 e 6,5–7,5) respectivamente. As diferentes condições de pH ótimo permitem a seleção da lactase dependendo da sua aplicação. Desta forma, a lactase de origem de fungo filamentoso torna-se mais adequada para hidrólise de soro ácido, já as de origem de leveduras e bactérias são mais apropriadas para o soro doce e do leite (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985; PANESAR, et. al., 2006).

4. ARTIGO CIENTÍFICO 1

Capacidade de hidrólise e estabilidade térmica da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*

BOSSO, A.¹; SUGUIMOTO, H. H.^{2*}

¹ Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite. Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).
Email: alessandrabosso@yahoo.com.br

² Doutor em Ciência de Alimentos. Docente do Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). *Autor correspondente. Email: heliohs@unopar.br

Capacidade de Hidrólise e Estabilidade Térmica da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*. BOSSO, A.; SUGUIMOTO, H. H.

RESUMO

As β -galactosidases são responsáveis por hidrolisar a lactose em glicose e galactose. Esta enzima é produzida por fungos filamentosos, bactérias, leveduras, plantas e animais. As características específicas, como pH e temperatura de reação, tempo de hidrólise, concentração entre outros, estão relacionadas à sua fonte de extração. Neste trabalho avaliou-se a atividade de duas β -galactosidases comerciais, uma de origem de levedura *K. lactis*, na forma líquida e outro de fungo filamentoso *A. oryzae*, liofilizada. Como substratos foram utilizados lactose PA e leite integral e desnatado. Foram avaliadas as concentrações de 0,7; 1,0 e 1,5 mL/L das enzimas de *K. lactis* e de *A. oryzae* em pH 5,0; 6,0; 6,5 e 7,0 e, nas temperaturas de 30; 35; 40 e 55°C. Para a enzima de *K. lactis* as reações em pH 7,0 e a 40°C apresentaram a melhor taxa de hidrólise (97,9%), porém não apresentou atividade em pH 5,0 e na temperatura de 55°C. Para a enzima de *A. oryzae* as melhores taxas de hidrólise foram observadas em pH 5,0, sendo que, nas temperaturas de 30; 35; 40 e 55°C a porcentagem de hidrólise foi de 42,9; 46,8; 52,1 e 67,4%, respectivamente. De modo geral, *K. lactis* apresentou taxas de hidrólise da lactose significativamente maiores, comparada a *A. oryzae*. Avaliou-se também o efeito da temperatura e da concentração da enzima β -galactosidase de *K. lactis* e *A. oryzae* na hidrólise da lactose do leite integral e desnatado. Para ambas as enzimas a hidrólise da lactose no leite integral foi superior a hidrólise no leite desnatado, em todas as temperaturas avaliadas (30; 35; 40 e 55°C). Em outro experimento, avaliou-se a estabilidade térmica das enzimas de *K. lactis* em diferentes temperaturas (30, 35 e 40°C), em tampão pH 6,0 e, da enzima de *A. oryzae* em tampão pH 5,0, nas temperaturas de 50, 55 e 60°C, durante 300 minutos de reação. A enzima de *K. lactis* mantida a 30 e 35°C teve queda na velocidade de hidrólise da lactose de 0,12 e 0,18%/min., respectivamente. A 40°C a enzima manteve apenas 5,2% de atividade ao final do tratamento e uma velocidade média de 1,45%/min. A enzima de *A. oryzae* nas temperaturas de 50 e 55°C teve uma queda de velocidade de hidrólise de apenas 0,06 e 0,04%/min., respectivamente e, quando mantida a 60°C a perda de atividade foi de 0,17%/min. Portanto, conhecendo-se as particularidades das enzimas β -galactosidase de *K. lactis* e *A. oryzae* é possível utilizá-las de maneira mais eficiente em diversos processos e formulações de produtos, controlando-se a concentração da enzima, a temperatura e o pH.

Palavras-chave: Hidrólise, lactose, pH, temperatura.

1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento de alto valor biológico, nutricional e energético, recomendado para todas as faixas etárias e, indispensável aos recém-nascidos e crianças nos primeiros anos de vida (BORGES et al., 2000; FERREIRA, 1977).

O composto sólido em maior quantidade no leite é a lactose (CARMINATTI, 2001; HOBMAN, 1984). No intestino humano a lactose é hidrolisada pela enzima β -galactosidase, sendo absorvida como glicose e galactose (BÓDALO et al., 1991; ZADOW, 1984). Em pessoas intolerantes a este dissacarídeo, a hidrólise prévia da lactose alivia os sintomas gastrintestinais (MANAN; KARIN; KIT, 1999; McSWEENEY; FOX, 2009). A lactose pode ser hidrolisada por método ácido (JELEN, 1983; GOURSAUD, 1985) e por meio enzimático, através da ação da enzima β -galactosidase. A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite, sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as propriedades nutricionais (SANTOS; LADERO; GARCÍA-OCHOA, 1998; VITOLO, 2001).

Deste modo, a importância comercial da β -galactosidase está na sua aplicação na indústria de laticínios, obtendo alimentos com baixos teores de lactose, ideal para consumidores que são intolerantes a esse dissacarídeo (HAIDER; HUSAIN, 2008; JURADO et al., 2002; KARDEL; FURTADO; NETO, 1995; MAHONEY, 1997; PIVARNIK; SENEGAL; RAND, 1995).

Entretanto, alguns fatores como temperatura, pH, pressão, concentração de reagente e presença de íons metálicos (EVANGELISTA, 1998; CARMINATTI, 2001), podem influenciar a atividade da enzima β -galactosidase. Além disso, dependendo da fonte de extração (vegetal, animal ou de microrganismos), a β -galactosidase pode apresentar diferentes propriedades, com potenciais variados de aplicação tecnológica (OLIVEIRA, 2005).

Segundo Ozbek, Sener e Apar (2006), as enzimas extraídas de fungos filamentosos apresentam maior atividade em pH ácido, já as de leveduras apresentam melhores condições de operação em pH neutro, além de temperaturas mais brandas. Assim, é importante conhecer as melhores condições de atividade dessas enzimas

extraídas de diferentes microrganismos, visando aplicações comerciais mais eficazes, principalmente nas indústrias de lácteos e fármacos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento da enzima β -galactosidase produzida pela levedura, *Kluyveromyces lactis* e pelo fungo filamentosos, *Aspergillus oryzae*, na hidrólise da lactose, em diferentes condições de concentração enzimática, temperatura e pH.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Enzimas

As enzimas utilizadas nas reações de hidrólise foram a β -galactosidase comercial, de origem microbiana nas formas líquida e liofilizada.

A enzima líquida MAXILACT® LX5000 Sedim Cedex (França), conforme informação do fabricante foi obtida da levedura *Kluyveromyces lactis*. A enzima liofilizada Bio-Cat INC. (EUA) segundo o fabricante, foi obtida do fungo *Aspergillus oryzae*. Ambas com atividade de 5000 ALU (Atividade de lactase).

2.2 Efeito do pH, temperatura e concentração das enzimas β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*, na hidrólise da lactose.

As reações de hidrólise foram realizadas utilizando 100 mL de lactose P.A. (Synth, Diadema, Brasil) diluída na concentração de 5% (m/v), em tampão fosfato de potássio monobásico (enzima de *K. lactis*) e tampão acetato de sódio (enzima de *A. oryzae*).

Foram testadas as variáveis: pH, temperatura de hidrólise e concentração de enzima. Para as duas enzimas os seguintes níveis foram avaliados: A) pH: 5,0; 6,0; 6,5; e 7,0; B) temperatura: 30; 35; 40 e 55°C; C) concentração de enzima: 0,7; 1,0 e 1,5 mL/L e 0,7; 1,0 e 1,5 g/L, para as enzimas *K. lactis* (líquida) e *A. oryzae* (liofilizada), respectivamente.

2.3 Efeito da temperatura e concentração das enzimas β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae* na hidrólise da lactose do leite integral e desnatado.

Foram utilizados volumes de 100 mL de leite UHT integral e desnatado (Cativa, Londrina, Brasil) Foram testadas a temperatura de hidrólise e a concentração de enzima. Os níveis utilizados foram: A) temperatura: 30; 35; 40 e 55°C; B) concentração: 0,7; 1,0 e 1,5 mL/L de enzima de *K. lactis* (líquida) e 0.7; 1,0 e 1,5 g/L de enzima *A. oryzae* (liofilizada).

2.4 Estabilidade das enzimas de levedura *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae* em diferentes temperaturas.

A partir do experimento realizado no item 2.2 foram definidos o pH, a temperatura e a concentração enzimática adequadas para cada enzima.

Para avaliar a estabilidade térmica, as enzimas de *K. lactis* e de *A. oryzae* foram colocadas individualmente, em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade com 100 mL de solução tampão. Os frascos foram distribuídos em três banhos, nas condições descritas na Tabela 1.

A cada trinta minutos, durante 300 minutos, um frasco foi retirado de cada temperatura, adicionados 5% de lactose P.A. e levados a um banho à temperatura ótima de cada enzima, para hidrólise da lactose, por 15 minutos, período em que a velocidade de hidrólise é linear.

Tabela 1. Condições experimentais para avaliar a estabilidade térmica das enzimas de *K. lactis* e *A. oryzae*.

	<i>K. lactis</i>	<i>A. oryzae</i>
Solução tampão	Fosfato de potássio	Acetato de sódio
Conc. de enzima	1,5 mL/L	1,5 g/L
pH	6,0	5,0
Temperatura	30, 35, 40 °C	50, 55, 60 °C

2.5 Determinações analíticas

Para a determinação do grau de hidrólise, 2 mL de amostra foram coletados do procedimento descrito no item 2.4 e colocados em banho de água fervente por 5 minutos e em seguida em banho de gelo por 3 minutos, para inativação da enzima. Na amostra foi determinada a concentração de glicose liberada pela hidrólise da lactose. Para o cálculo da porcentagem de hidrólise foi utilizada a concentração de lactose inicial e a concentração de glicose liberada. A velocidade de hidrólise foi calculada a partir da regressão linear da curva de hidrólise enzimática.

A determinação de glicose foi realizada pelo método de glicose oxidase utilizando-se o kit Glicose PP (Analisa, Belo Horizonte, Brasil). A determinação do teor de lactose no leite seguiu o método de Fenol-Sulfúrico, adaptada de Dubóis et al. (1956).

2.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo software STATISTICA 10.0 (STATSOFT, 2007). As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do pH, temperatura e concentração das enzimas β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*, na hidrólise da lactose PA.

Verificou-se que a atividade ótima das enzimas comerciais β -galactosidase de *K. lactis* e de *A. oryzae* ocorreu em condições reacionais diferentes. Com o aumento da concentração das enzimas as taxas de hidrólise foram crescentes. Portanto, considerou-se nas discussões seguintes apenas as concentrações de 1,5 mL/L e 1,5 g/L para as enzimas de *K. lactis* e de *A. oryzae*, respectivamente.

Nas temperaturas de 30; 35 e 40°C e nos pH 6,0; 6,5 e 7,0, observou-se que a enzima de *K. lactis* apresentou taxas de hidrólise da lactose significativamente maiores ($P < 0,05$), comparada à enzima de *A. oryzae*. Entretanto, em pH 5,0 a enzima de *K. lactis* não apresentou atividade em nenhuma das temperaturas, mostrando-se

muito sensível a pHs baixos (Fig. 1A). Em pH 7,0 e na temperatura de 40°C a enzima de *K. lactis* obteve a melhor taxa de hidrólise (97,9%) (Fig. 1D). De modo geral, *K. lactis* mostrou-se inativada na temperatura de 55°C nos pHs 6,0; 6,5 e 7,0, observando-se total inativação da enzima em pH 5 em todas as temperaturas testadas (30°C; 35°C; 40°C e 55°C).

Para a enzima de *A. oryzae* as melhores taxas de hidrólise foram observadas em pH 5,0. Nas temperaturas de 30; 35; 40 e 55°C observou-se porcentagem de hidrólise de 42,9; 46,8; 52,1 e 67,4%, respectivamente (Fig. 1A). Perfis semelhantes de hidrólise foram observados em pH 6,0 e 6,5, porém com porcentagens de hidrólise menores (Figs. 1 B e C). Em pH 7,0 a enzima de *A. oryzae* apresentou as menores taxas de hidrólise (máximo 20%) (Fig. 1D).

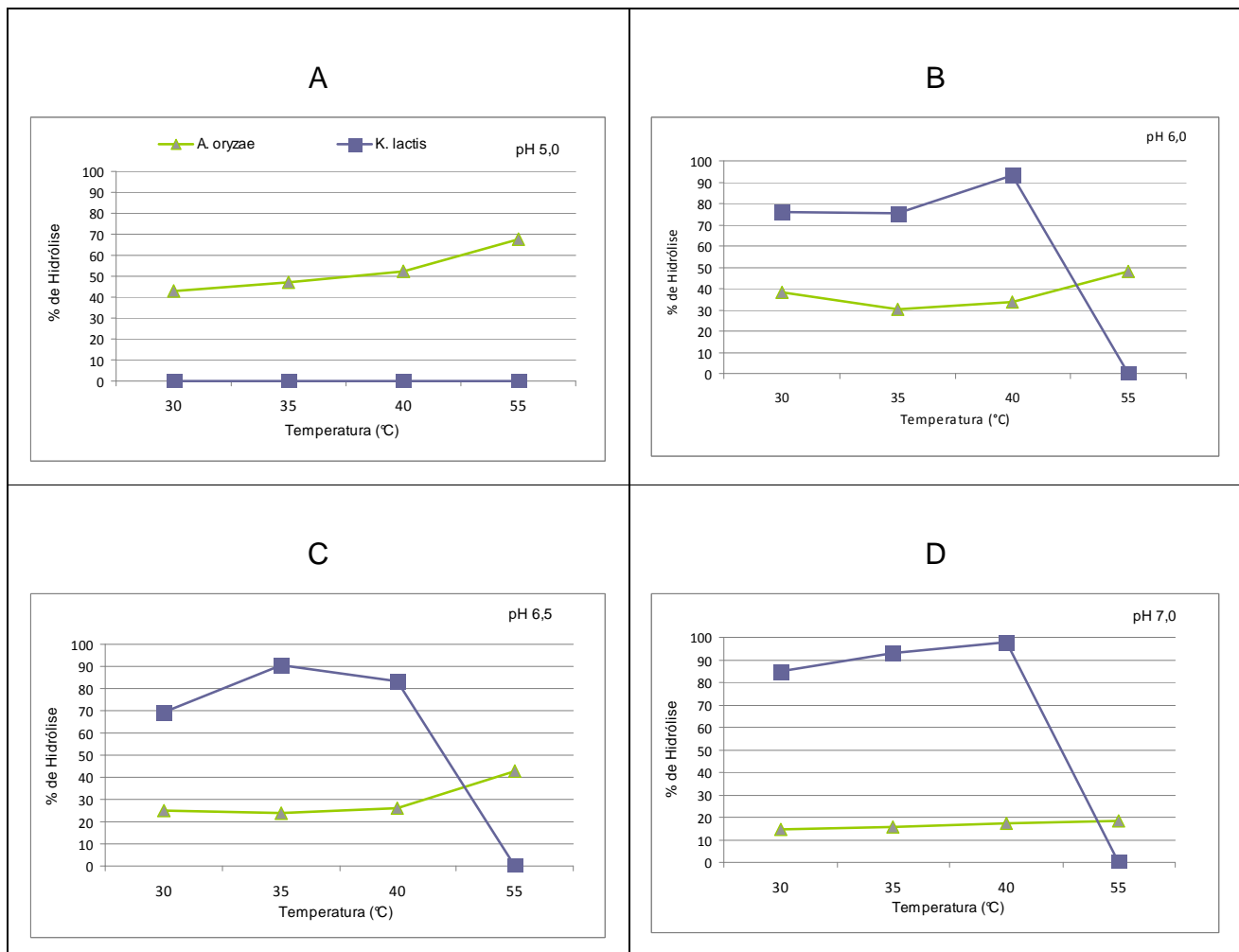


Figura 1. Porcentagem de hidrólise da lactose nos 15 primeiros minutos de reação pelas enzimas de *K. lactis* e *A. oryzae* em diferentes temperaturas e pH 5,0 (A); 6,0 (B); 6,5 (C) e 7,0 (D).

A maior velocidade de reação de hidrólise nos primeiros 15 minutos, da enzima de *K. lactis* ocorreu em pH 6,0 à 40°C, com uma velocidade de 4,54 $\%.\text{min}^{-1}$. A menor velocidade, 2,30 $\%.\text{min}^{-1}$ de hidrólise foi observada neste mesmo pH, porém na temperatura de 35°C.

Trindade, Rego e Burkert (2004), observaram taxas de hidrólise mais altas na temperatura de 40°C e pH 6,6, pela enzima *K. lactis* de forma livre, condições próximas ao obtido neste experimento.

Para a enzima de *A. oryzae* verificou-se que não houve diferença na velocidade e hidrólise final, sendo observada a maior velocidade em pH 5,0 à 55°C (2,20 $\%.\text{min}^{-1}$ de hidrólise). Guidini et al. (2010) obtiveram resultado semelhante ao avaliar a atividade de β -galactosidase imobilizada de *A. oryzae*.

A reação de hidrólise da lactose por enzimas de *A. oryzae*, obtidas comercialmente, Ribeiro, Freitas e Ribeiro, (2005) observaram máxima atividade enzimática em pH na faixa de 4,5 a 4,8, com redução drástica fora desta faixa, embora a enzima tenha se mantido em pH na faixa de 3,0 a 6,0. Em relação à temperatura, os mesmos autores observaram que a maior atividade enzimática ocorreu a 55°C e que, a partir desta temperatura, inicia-se uma inativação térmica gradual com completa perda da atividade a 70°C.

3.2 Efeito da temperatura e da concentração de enzima β -galactosidase comercial, originadas de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*, na hidrólise da lactose do leite integral e desnatado.

Observou-se que a hidrólise da lactose no leite integral foi superior a hidrólise no leite desnatado, utilizando-se tanto a enzima de *K. lactis* quanto a de *A. oryzae*.

Para a enzima de *K. lactis* observou-se diferença significativa ($P < 0,05$), entre os dois tipos de leite. Nas temperaturas de 35 e 40°C ocorreu 100% de hidrólise da lactose do leite integral. No leite desnatado observou-se 92,49% de hidrólise, na temperatura de 40°C (Tabela 2). Em estudo semelhante, Campos et al.

(2009) obtiveram 90% de hidrólise no leite integral, após um período de 5 horas de reação, em temperaturas de 30 e 40°C.

De modo geral, para a enzima de *A. oryzae* observou-se baixa porcentagem de hidrólise da lactose, com taxa máxima de 41,34% de hidrólise no leite integral, na temperatura de 55°C e 32,7% no leite desnatado, nesta mesma temperatura (Tabela 2). A baixa taxa de hidrólise da enzima de *A. oryzae* em ambos os leites ocorreu devido ao pH estar em torno de 6,5. Como demonstrado, a atividade da enzima extraída de *A. oryzae* é otimizada em pH 5,0 e reduzida em pH acima de 6,0. Guidini et al. (2011) avaliando β -galactosidade de *A. oryzae* nas formas livre e imobilizada com glutaraldeído, observaram que na forma livre a enzima apresentou diminuição de 56,42% na sua atividade residual em pH de 1,0 a 5,0 e, de 13,46% em pH de 5,0 a 8,0. Para a enzima imobilizada, observou-se maior estabilidade em praticamente todos os pHs avaliada (1,0 a 8,0), indicando que o processo de imobilização usado é eficiente para manter a estabilidade enzimática.

Tabela 2. Porcentagem média (\pm D.P.) de hidrólise da lactose por enzimas de *K. lactis* e de *A. oryzae* em leite integral e leite desnatado, em diferentes temperaturas

Temperatura	Hidrólise (%)*			
	Leite Integral		Leite Desnatado	
	<i>K. lactis</i>	<i>A.oryzae</i>	<i>K. lactis</i>	<i>A.oryzae</i>
30 °C	86,42 \pm 1,029 ^{cA}	28,89 \pm 0,674 ^{cC}	78,85 \pm 0,998 ^{cB}	16,28 \pm 0,496 ^{dD}
35 °C	100,0 \pm 1,666 ^{aA}	26,99 \pm 0,190 ^{dC}	86,43 \pm 1,001 ^{bB}	19,14 \pm 0,421 ^{cD}
40 °C	100,0 \pm 0,425 ^{bA}	32,91 \pm 0,577 ^{bC}	92,49 \pm 0,669 ^{aB}	21,12 \pm 0,257 ^{bD}
55 °C	40,61 \pm 0,220 ^{dB}	41,34 \pm 0,421 ^{aA}	18,60 \pm 0,060 ^{dD}	32,70 \pm 0,651 ^{aC}

* Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na mesma linha e minúsculas na mesma coluna não diferem significativamente entre si, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

A velocidade de hidrólise nos primeiros 15 minutos de reação da enzima de *K. lactis* foi de 4,29%.min⁻¹ de hidrólise no leite integral, na temperatura de 40°C. No leite desnatado, nesta temperatura, a maior velocidade foi de 3,28%.min⁻¹. Utilizando-se a enzima de *A. oryzae* as maiores velocidades de hidrólise foram obtidas

na temperatura de 55°C, com $1,72\% \text{min}^{-1}$ e $1,08\% \text{min}^{-1}$ no leite integral e desnatado, respectivamente (Figura 2).

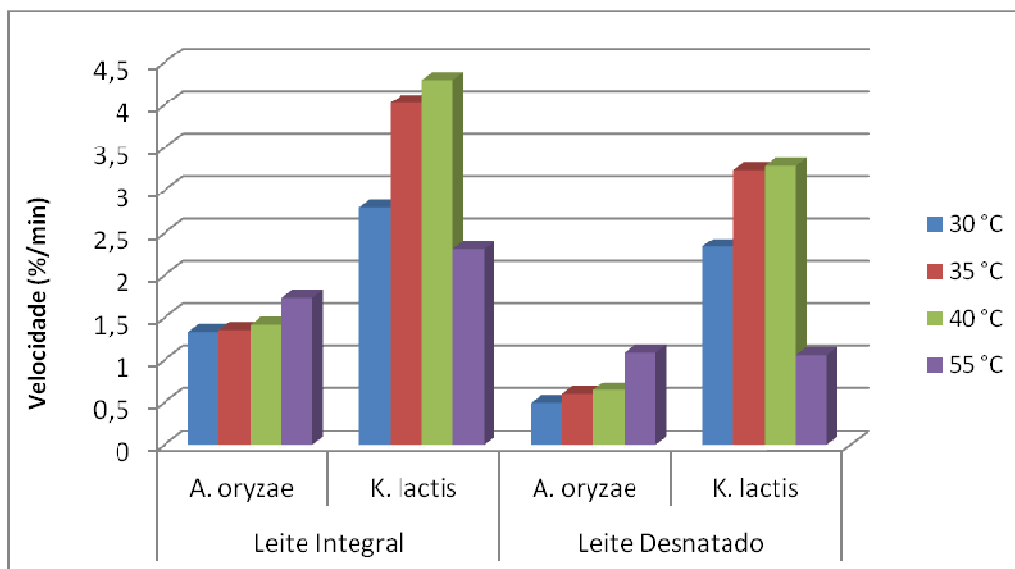


Figura 2. Velocidade de hidrólise da lactose (primeiros 15 minutos de reação) dos leites integral e desnatado com enzima de *K. lactis* e *A. oryzae*, em diferentes temperaturas.

3.3. Estabilidade das enzimas de levedura *Kluyveromyces lactis* e fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* em diferentes temperaturas.

O aumento da velocidade de inativação da enzima β -galactosidase de *K. lactis* foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura, principalmente a partir de 40°C. A enzima de *A. oryzae*, mostrou-se mais resistente ao aumento da temperatura, reforçando os resultados obtidos nos testes anteriores.

Para a enzima de *K. lactis* foi observada uma correlação linear negativa, entre o tempo de reação e a porcentagem de hidrólise da lactose, apenas nas temperaturas de 30 e 35°C. Para a enzima de *A. oryzae* observou-se forte correlação negativa nas três temperaturas avaliadas (Figura 3 A e B).

Verificou-se que a enzima de *K. lactis* mantida a 30° C apresentou uma velocidade de perda de atividade de $0,12\% \cdot \text{min}^{-1}$ e ao final dos 300 minutos de tratamento térmico, a atividade foi de 46,2%. Quando mantidas a 35°C a velocidade de inativação foi de $0,18\% \cdot \text{min}^{-1}$, restando ao final dos 300 minutos, uma atividade de

35,4%. A 40°C a enzima foi quase que totalmente inativada (94,8%), nos 60 primeiros minutos de armazenamento, com velocidade de inativação de $1,45\%.\text{min}^{-1}$.

Em todas as temperaturas avaliadas ocorreu perda significativa ($P < 0,05$) da atividade da enzima *K. lactis* nos primeiros 60 minutos de armazenamento (Figura 3 A).

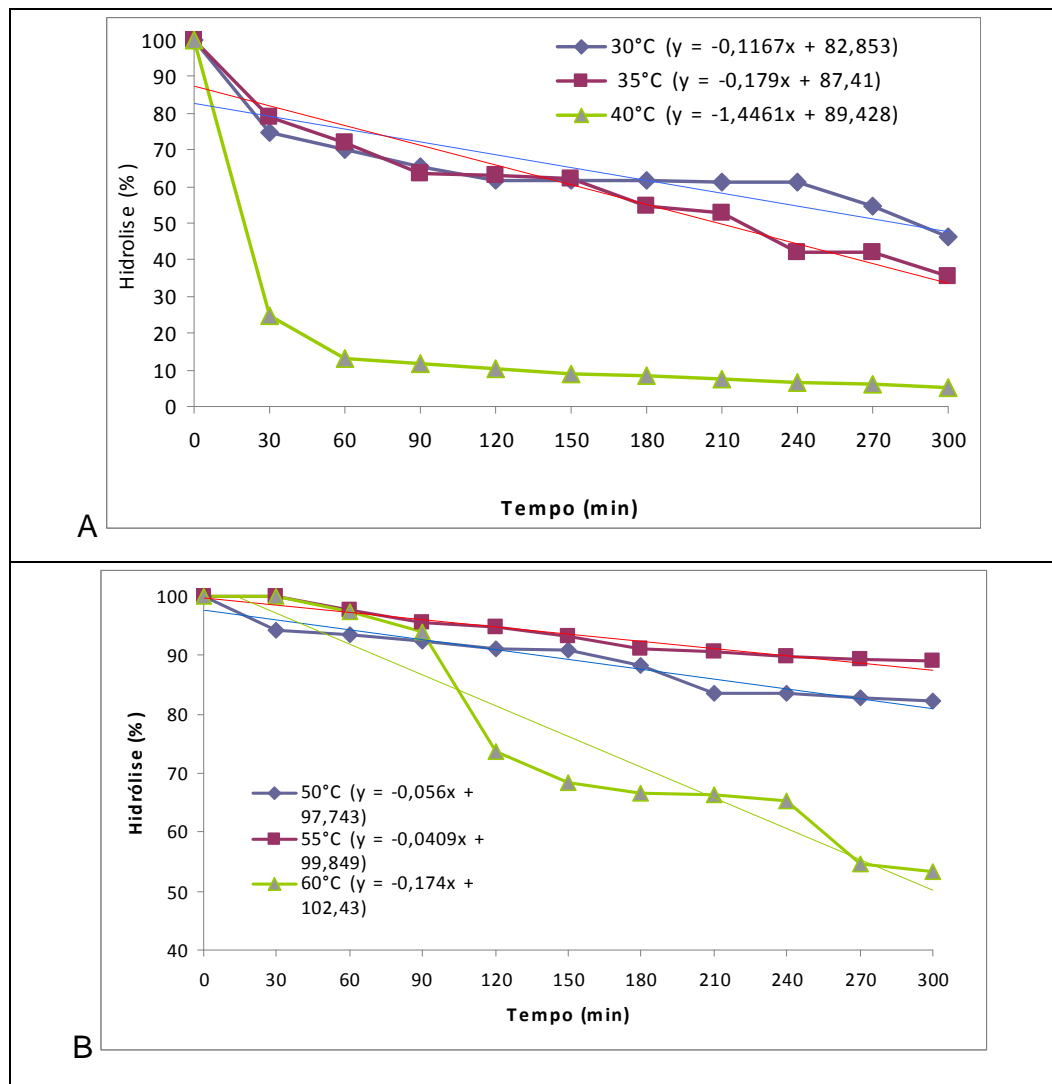


Figura 3. Porcentagem de hidrólise da lactose pelas enzimas de *K. lactis* (A) e de *A. oryzae* (B) mantidas em diferentes temperaturas, indicando a perda de atividade enzimática ao longo do tempo de armazenamento. *Para a enzima de *K. lactis* a 40° não houve correlação linear.

Para a enzima de *A. oryzae*, a redução da atividade ao longo do tempo de armazenamento ocorreu com menor intensidade quando comparada à enzima de *K. lactis*. Observou-se que mantida à 50°C houve redução de 17,7% na atividade, após os

300 minutos, o que equivale a uma velocidade de inativação de $0,06 \text{ \%} \cdot \text{min}^{-1}$. A 55°C a redução da atividade foi de 11,1% na velocidade de inativação de $0,04\% \cdot \text{min}^{-1}$. Quando a enzima foi mantida a 60°C , observou-se 25% de redução da atividade, após 90 minutos de armazenamento, com velocidade de inativação de $0,17\% \cdot \text{min}^{-1}$ (Figura 3 B).

Estatisticamente verificou-se redução significativa na atividade da enzima de *K. lactis* mantida a 30°C até 120 minutos de 68,47% para 42,37%. Já entre 120 e 240 minutos não houve perda significativa de atividade enzimática, com variação de 42,37% para 41,98% (Tabela 3). Na temperatura de 35°C houve redução da atividade enzimática até os 180 minutos de 68,47% para 37,42%, entre 180 a 300 minutos a redução da atividade da enzima *K. lactis* foi menos significativa de 37,42% para 24,22%.. Entretanto a maior redução da atividade da enzima foi observada a 40°C , no intervalo de 0 a 90 minutos de armazenamento, com redução de 68,47% para 7,91%, (Tabela 3). Outros estudos comprovam que o aumento da temperatura causa perda de atividade da enzima de *K. lactis* (CAVILLE-LEFEBVRE; COMBES, 1998; QUINN; CHEN, 2001).

Tabela 3. Porcentagem média (\pm D.P.) de hidrólise da lactose pela enzima de *K. lactis* em função do tempo de exposição ao tratamento térmico.

Tempo (minutos)	30°C	35°C	40°C
0	68,476 \pm 0,621 ^{a*}	68,476 \pm 0,621 ^a	68,476 \pm 0,621 ^a
30	51,304 \pm 1,243 ^b	54,061 \pm 1,422 ^b	17,058 \pm 0,264 ^b
60	47,938 \pm 0,298 ^c	49,259 \pm 0,257 ^c	9,058 \pm 0,387 ^c
90	45,306 \pm 1,234 ^d	43,472 \pm 0,128 ^d	7,915 \pm 0,146 ^d
120	42,372 \pm 0,298 ^e	43,129 \pm 1,047 ^d	7,026 \pm 0,073 ^e
150	42,286 \pm 0,197 ^e	42,443 \pm 0,771 ^d	6,137 \pm 0,073 ^f
180	42,200 \pm 0,224 ^e	37,427 \pm 0,385 ^e	5,798 \pm 0,146 ^f
210	42,027 \pm 0,325 ^e	36,312 \pm 1,479 ^e	4,994 \pm 0,146 ^g
240	41,984 \pm 0,523 ^e	28,681 \pm 0,680 ^f	4,571 \pm 0,219 ^{gh}
270	37,324 \pm 1,608 ^f	28,681 \pm 0,000 ^f	4,021 \pm 0,073 ^{hi}
300	31,671 \pm 0,197 ^g	24,222 \pm 0,267 ^g	3,555 \pm 0,127 ⁱ

* Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Na enzima de *A. oryzae*, mantidas a 50°C e 55°C observou-se pouca, mas significativa variação na estabilidade da enzima durante os 300 minutos de armazenamento. A 60°C não se observou redução significativa na atividade no intervalo de 0 e 90 minutos, mas no intervalo de 90 a 270 minutos a perda de atividade enzimática foi significativa com redução de 31,4% para 18,2% (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem média (\pm D.P.) de hidrólise da lactose pela enzima de *A. oryzae* em função do tempo de exposição ao tratamento térmico.

Tempo (minutos)	50°C	55°C	60°C
0	32,991 \pm 0,125 ^{a*}	32,991 \pm 0,125 ^{bcd}	32,991 \pm 0,125 ^a
30	30,730 \pm 0,683 ^b	34,888 \pm 0,708 ^a	33,470 \pm 1,267 ^a
60	30,808 \pm 0,136 ^b	34,073 \pm 0,642 ^{ab}	32,625 \pm 0,445 ^a
90	30,4539 \pm 0,361 ^b	33,3022 \pm 0,000 ^{abc}	31,4421 \pm 0,507 ^a
120	30,0988 \pm 0,180 ^b	33,0879 \pm 0,196 ^{abcd}	24,6804 \pm 0,407 ^b
150	30,0199 \pm 1,411 ^b	32,5307 \pm 1,157 ^{bcde}	22,8632 \pm 1,107 ^{bc}
180	29,1521 \pm 0,180 ^{bc}	31,7593 \pm 1,004 ^{cde}	22,3138 \pm 0,760 ^c
210	27,5347 \pm 1,093 ^{cd}	31,5878 \pm 0,775 ^{cde}	22,2293 \pm 0,263 ^c
240	27,5347 \pm 0,136 ^{cd}	31,3735 \pm 0,257 ^{cde}	21,8489 \pm 1,198 ^c
270	27,3375 \pm 0,313 ^d	31,1592 \pm 0,519 ^e	18,2567 \pm 0,380 ^d
300	27,1402 \pm 0,246 ^d	31,0306 \pm 0,148 ^e	17,8341 \pm 0,319 ^d

* Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente ($P > 0,05$) entre si pelo teste de Tukey

Vários autores (ATHÈS; MEHMETOGLU, 1997; DHAKED; ALAN; SINGH, 2005; ZHOU; CHEN, 2001) afirmam que o aumento da temperatura influencia diretamente na atividade da enzima, ou seja, quanto maior a temperatura a que a enzima é submetida mais rapidamente à mesma será inativada. Entretanto, neste estudo a enzima de *A. oryzae* mostrou-se bastante estável ao aumento de temperatura de 60°C, mesmo após 5 horas, diferindo dos resultados obtidos por Haider e Husain (2008), que observaram que após 6 horas a 60°C a enzima de *A. oryzae* perdeu cerca de 60% de sua atividade.

Em testes adicionais avaliou-se a estabilidade térmica das enzimas de *K. lactis* e de *A. oryzae* nas temperaturas de 70 e 80°C, observando-se atividade enzimática nula para ambas. Por esta razão, os dados não foram incluídos nos resultados.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo constatou-se uma diferença significativa entre a atividade das enzimas extraídas da levedura *K. lactis* e fungo filamentoso *A. oryzae* na hidrólise da lactose. As variações de pH, temperatura e concentração da enzima afetaram consideravelmente a hidrólise da lactose.

A enzima de *K. lactis* possui maior atividade a 40°C e em pH 7,0, enquanto que, a enzima de *A. oryzae* atua melhor em temperatura de 55°C e pH 5,0 quanto testadas em substrato de lactose P.A.

A atividade da enzima na hidrólise da lactose do leite integral é superior à atividade no leite desnatado, tanto para *K. lactis* quanto para *A. oryzae*. A enzima de *A. oryzae* obteve menor porcentagem de hidrólise nesse substrato devido ao pH do leite diferir do pH ótimo de atividade desta enzima. Entretanto, na avaliação da estabilidade térmica observou-se que a enzima de *A. oryzae* possui maior resistência à temperatura, quando comparada à *K. lactis*.

Conhecendo-se estas características das enzimas β -galactosidase de *K. lactis* e *A. oryzae* é possível utilizá-las de maneira mais eficiente em diversos processos industriais e formulações de produtos, bem como nas indicações para consumo direto pelos indivíduos com intolerância à lactose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATHÈS, S.; MEHMETOGLU, U. A new method for immobilization of β -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. **Process Biochemistry**, vol. 32, n. 5, p. 433–436, 1997.

BÓDALO, A.; GÓMEZ, E.; GÓMEZ, J. L.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M. F.; DÍAZ, F. A. Comparison of Different Methods of β -Galactosidase Immobilization. **Process. Biochemistry**, v. 26, n. 6, p.349–353. 1991.

BORGES, P. F. Z.; SGARBIERI, V. C.; JACOBUCCI, H. B; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V.L.S.; Produção piloto de proteínas de soro de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, n. 1, p.1-8, 2000.

CAMPOS, T. C. A. S.; D'ALMEIDA, W. K.; ALEGRO, L. C. A.; ROIG, S. M.; SUGUIMOTO, H. H. Utilização da β -galactosidase na hidrólise da lactose do leite em baixa temperatura. **Unopar científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 11, n. 4, p. 51-54, 2009.

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

CAVAILLE-LEFEBVRE, D., COMBES, D., Irreversible high pressure inactivation of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: comparison with thermal inactivation. **J. Biotechnol.** p. 85-93. 1998.

DHAKED, R. K.; ALAN, S. I.; SINGH, L., Characterization of β -galactosidase from an Antarctic bacillus sp. **Biotechnology Division, Defense Research and Development Establishment.** Índia, n. 2, p. 474. 2004.

DUBÓIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; RIBER, B. A.; SMITH, H. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** v. 28 p. 350-56, 1956.

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

FERREIRA, C. L. L. F. Valor nutritivo e bioterapêutico de leites fermentados. In: LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado.** Campinas: ITAL, 1997, cap. 1, p. 1-7.

GOURSAUD, J. O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas. In: LUQUET, F. M. **O leite: do úbere à fábrica de laticínios.** Portugal: Publicações Europa-America Ltda, 1985, v. 1, cap. 1, p. 31-56.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 137-143, 2010.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; RESENDE, M. M. de; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. β -galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized in an ion exchange resin combining the ionic-binding and crosslinking methods: Kinetics and stability during the hydrolysis of lactose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** v. 71, p. 139–145. 2011.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 72-80, 2007.

HAIDER, T., HUSAIN, Q. Hydrolysis of Milk/whey Lactose by β -galactosidase: A Comparative Study of Stirred Batch Process and Packed Bed Reactor Prepared with Calcium Alginate Entrapped Enzyme. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, p. 576 – 580. 2008.

HOBMAN, P. G. Review of Process and Products for Utilization of Lactose in Deproteinized Milk Serum. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2630-2653. 1984.

JELEN, P. Reprocessing of whey and other dairy wastes for use as food ingredients. **Food Technology**, v. 37, n. 2, p. 81-84. 1983.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A New Kinetic Model Proposed for Enzymatic Hydrolysis of Lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 300-309, 2002.

KARDEL, G.; FURTADO, M. M.; NETO, J. P. M. L. Lactase na indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 50, n. 294, p. 15-17, 1995.

MAHONEY, R. R. Lactose: Enzymatic modification. In: Lactose, water, salts and vitamins. **Advanced Dairy Chemistry**, v. 3, p. 77-125, 1997.

MANAN, D.M.; KARIN, A.A.; KIT, W.K. Lactose Content of modified enzyme- treated “dadih”. **Food Chemistry**, v.65, n.4, p.439-443. 1999.

McSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. Advanced dairy chemistry: lactose, water, salts and minor constituents. v. 3, 3 ed. New York: Springer, 2009.

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

OZBEK, B.; SENNER, N.; APAR, D. K. A modelling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1493–1500. 2006.

PIVARNIK, L. F.; SENEGAL, A. G.; RAND, A. G. Hydrolytic and transgalactosyl activities of commercial β -galactosidase (lactase) in food processing. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 38, p. 33-41, 1995.

QUINN, Z. K. Z.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 33-40, 2001.

RIBEIRO, G. P.; FREITAS, F. F.; RIBEIRO, E. J. Estudo da cinética da Reação de Hidrólise de Lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, v. 6. 2005. Campinas – SP. **Anais**. 2005.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 7, p. 558–567. 1998.

STATSOFT, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 10.0. Disponível em: www.satsoft.com.

TRINDADE, R. A.; REGO, T. V.; BURKERT C. A. V., Influência da Temperatura na Hidrólise da Lactose do Soro de Queijo por B-Galactosidase de *Kluyveromyces Lactis* (Lactozym® 6500I) Livre e Imobilizada. Universidade Federal do Rio Grande, Escola e Química e Alimentos, Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, 2004.

VITOLLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E. (Coord.). Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001, v. 4, cap. 14, p. 387-420.

ZADOW, J. G. Lactose – Properties and Uses. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p.2654–2679. 1984.

ZHOU, Q. Z. K., CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Bioch Eng J**. v. 9, p.33-40. 2001.

5 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Determinação da atividade da enzima comercial β -galactosidase de levedura *Kluyveromices lactis* e de fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, em simulação do sistema gastrintestinal humano.

BOSSO, A.¹; SUGUIMOTO, H. H.².

¹ Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). Email: alessandrabosso@yahoo.com.br

² Doutor em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Docente do Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). Email: heliohs@unopar.br

Determinação da atividade da enzima comercial β -galactosidase de levedura *Kluyveromyces lactis* e de fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, nas condições encontradas no sistema gastrointestinal humano. BOSSO, A.; SUGUIMOTO, H. H.

RESUMO

A intolerância à lactose é uma síndrome clínica caracterizada pela incapacidade de hidrolisar a lactose em glicose e galactose. Muitos indivíduos sofrem com os sintomas dessa patologia e necessitam da ingestão de β -galactosidase em formas farmacêuticas variadas, como as cápsulas por exemplo. Neste trabalho determinou-se a capacidade de hidrólise da enzima β -galactosidase de levedura *Kluyveromyces lactis* e de fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* em simulação gastrintestinal nas temperaturas ótimas de cada enzimas 40°C e 55°C, respectivamente e em temperatura corpórea de 37°C. Quando as enzimas foram submetidas à simulação estomacal em pH 2 verificou-se que ambas foram inativadas, não apresentando atividade residual na hidrólise da lactose. Na simulação da condição intestinal, em pH 7,4, observou-se que tanto a enzima de *K. lactis* quando de *A. oryzae* hidrolisaram a lactose, sendo maior a 40 e 55°C do que a 37° C. A enzima de *K. lactis* nas concentrações de 1,5; 3,0 e 5,0 mL/L apresentou hidrólise de 76,63%, 88,91% e 94,80% a 40°C e, 55,99%, 80,91% e 81,53%, a 37°C, respectivamente. A atividade da enzima de *A. oryzae* 55°C foi de 7,11%, 16,18% e 21,29% e a 37°C foi de apenas 8,4%, 11,85% e de 16,43% nas concentrações de 1,5; 3,0 e 5,0 g/L respectivamente. Conclui-se que a enzima de *K. lactis* tem maior eficiência na hidrólise da lactose do que a de *A. oryzae*, em simulação gastrintestinal. Verificou-se também a necessidade de um revestimento entérico em cápsulas de β -galactosidase para que as mesmas passem íntegras pelo estômago e desintegrem-se no intestino delgado liberando a enzima para promover a hidrólise da lactose.

Palavra-chave: β -galactosidase, hidrólise, lactose, simulação gastrintestinal.

1 INTRODUÇÃO

Na dieta normal dos seres humanos é comum a presença de diversos carboidratos, dentre eles a lactose presente no leite e seus derivados. Os monossacarídeos, produtos da digestão da lactose, são absorvidos quase que totalmente pelo intestino delgado (ALLIET; LEBENTHAL, 1989). Porém, a digestão deste carboidrato depende da atividade da enzima β -galactosidase ou lactase, presente no intestino.

Estudos apontam que cerca de 75% da população mundial apresenta condição de deficiência de lactase no organismo, causando a esses indivíduos a intolerância à lactose, considerada uma das mais comuns desordens genéticas humanas (DURING et al., 1998; TÉO, 2002; UGGIONI; FAGUNDES, 2006; FERNANDES; CABRAL, 2006).

A intolerância à lactose é uma síndrome clínica caracterizada pela incapacidade de hidrolisar a lactose em seus monossacarídeos, glicose e galactose (TÉO, 2002). A ocorrência de uma variação ontogenética determina maior prevalência de deficiência da lactase em certos grupos étnicos, principalmente negros e amarelos (SABRA, 1994). No Brasil cerca de 58 milhões de pessoas apresentam alguma dificuldade em digerir a lactose pela deficiência da enzima β -galactosidase no intestino (CUNHA et al., 2007).

Os sintomas mais comuns da deficiência de lactase são diarreia, flatulência, distensão abdominal e desnutrição. A manifestação clínica característica é a diarreia aquosa explosiva, mas podem ser encontrados sintomas como dor abdominal (WHITE; HANDLER; SMITH, 1976; KALLEN, 1990; VONK et al., 2003). O tratamento da intolerância à lactose consiste na retirada deste açúcar da dieta ou na ingestão oral de β -galactosidase, sempre que o indivíduo portador de intolerância consumir este açúcar (PEREIRA-FILHO; FURLAN, 2004).

Ansel, Popovich e Allen (2000) afirmam que o intestino delgado é uma das principais vias de absorção para os fármacos devido ao pH adequado e à grande

área de superfície de absorção disponível no seu interior, que se estende desde o piloro na base do estômago até a junção com o intestino grosso no ceco.

Fármacos que necessitam ser absorvidos no intestino, obrigatoriamente precisam passar intactos pelo estômago, portanto devem ser tolerantes ao pH ácido dessa região (pH 1,0- 3,0) esses valores podem variar de acordo com a saúde e alimentação de cada indivíduo (ROCIO et al., 2012). Deste modo, o revestimento gastro-resistente é uma técnica que vem sendo utilizada na preparação de formas farmacêuticas (FERREIRA, 2006). Esta técnica permite que as enzimas resistam à ação do suco gástrico, sem alteração de sua atividade, devendo, porém, desagregar-se rapidamente no suco intestinal (SANTOS; GUTERRES; BERGOLD, 2007).

O uso de enzimas digestivas suplementares tem sido muitas vezes objeto de controvérsia quanto à sua eficácia, pois várias enzimas estão sendo comercializadas, porém nem todas têm se mostrado eficazes em resistir ao ambiente estomacal (MAMADOU et al., 2005). Como a digestão da lactose ocorre no intestino, a enzima ingerida deverá agir nesta região do organismo humano. Portanto, é importante elucidar o comportamento de atividade da β -galactosidase no intestino, para que seu uso como fármaco seja eficiente.

Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o nível de atividade da enzima β -galactosidase, quando submetida a condições simuladas do sistema gastrointestinal humano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As enzimas utilizadas nas reações de hidrólise foram a β -galactosidase comercial, de origem microbiana nas formas líquida e liofilizada.

A enzima líquida MAXILACT[®] LX5000 Sedim Cedex – França foi, segundo o fabricante, obtida da levedura *Kluyveromyces lactis*. A enzima liofilizada Bio-Cat INC./ EUA foi, conforme o fabricante, obtida do fungo *Aspergillus oryzae*. Ambas com atividade de 5000 ALU (Atividade de lactase).

Foram realizados dois testes, avaliando-se a atividade das enzimas β -galactosidade de *K. lactis* e de *A. oryzae* em condições similares ao estômago e intestino (Teste 1) e apenas as condições do intestino (Teste 2). Foram avaliadas três concentrações de enzima 1,5, 3,0 e 5,0 mL/L ou g/L.

Na primeira etapa do teste 1, as enzimas foram adicionadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 10 mL de solução com HCl 0,08 molar e 0,2% de NaCl (pH 2,0) que simulou a enzima no estômago com por um período de 15 minutos, tempo aproximado para a desintegração de comprimidos e cápsulas no estômago.

Na segunda etapa foi adicionado ao mesmo frasco 90 mL de uma solução em pH 7,4, que simulou o pH do cólon preparado com fosfato de potássio monobásico 0,05 molar e sais biliares 0,6%. Ambas foram preparadas segundo Rao, Shiwarnarain e Maharaj (1989) e Thantsha et al. (2008), com modificações. Em seguida foram adicionados 5% de lactose P.A. (percentual do carboidrato presente no leite) à solução acima descrita.

As soluções foram levadas ao banho por 60 minutos, a 40°C, temperatura ótima da enzima, para a enzima de levedura *K. lactis*, 55°C, temperatura ótima da enzima, para a enzima de *A. oryzae* e, à 37°C, para simular a temperatura média corporal, para ambas as enzimas.

O teste 2 foi realizado simulando somente as condições do cólon, pH 7,4. Portanto, o procedimento experimental foi o mesmo adotado na segunda etapa do teste 1. Os experimentos foram realizados de forma estática. Em cada teste foram utilizadas duas repetições, com avaliação em triplicata.

Como a simulação gastrointestinal foi realizada em duas etapas, cabe ressaltar que o simulado dos fluídos gástrico e intestinal, embora semelhantes no pH, não reproduzem exatamente os mesmos observados no sistema humano, considerando as variações graduais observadas no sistema natural.

Para a determinação do grau de hidrólise foram coletadas amostra de 2 mL, colocado em banho de água fervente por 5 minutos e em seguida em banho de gelo por 3 minutos para interrupção da reação de hidrólise. Em seguida foi determinada

a concentração de glicose pelo método de glicose oxidase utilizando-se o kit Glicose PP do laboratório ANALISA.

Para o cálculo da porcentagem de hidrólise foi utilizada a concentração de lactose inicial e a concentração de glicose liberada.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo software STATISTICA 10.0 (STATSOFT, 2007). As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na simulação da passagem das enzimas de *K. lactis* e *A. oryzae* pelo estômago, com pH 2,0 verificou-se que ambas as enzimas foram completamente inativadas, não apresentando atividade residual na hidrólise da lactose. Embora vários autores afirmarem que a enzima de *A. oryzae* atua em sua condição ótima de pH ácido (GEKAS; LOPES-LEIVA, 1985; HOLSINGER; KLIGERMAN, 1991; ROBINSON, 1991; VITOLLO, 2001) no presente estudo observou-se que esta enzima não resiste ao pH estomacal. Além disso, estudo semelhante demonstrou que algumas enzimas digestivas podem ter sua atividade reduzida ao passar pelo fluído gástrico, porém com inativação reversível, ou seja, podem recuperar a atividade ao chegar ao intestino (MAMADOU et al., 2005). Entretanto, essa característica não foi observada para as enzimas de *K. lactis* e de *A. oryzae* nas condições avaliadas no presente estudo.

Quando simulada a condição intestinal (pH 7,4), observou-se que tanto a enzima de *K. lactis* quanto de *A. oryzae* apresentaram melhores taxas de hidrólise nas suas temperaturas ótimas de atividade, 40°C e 55°C, respectivamente, comparadas a temperatura média corporal humana (37°C), embora para todas as condições avaliadas, tenha sido observado melhor desempenho para a enzima de *K. lactis* (Figs. 1 A e B)

A enzima de *K. lactis* a 37°C e nas concentrações de 1,5; 3,0 e 5,0 mL, apresentou hidrólise da lactose de 55,99%, 80,91% e 81,53%, respectivamente. Na

temperatura de 40°C, os resultados de hidrólise obtidos foram de 76,63%, 88,91% e 94,80%, nas concentrações de 1,5; 3,0 e 5,0 mL/L respectivamente (Fig. 1A).

A atividade da enzima de *A. oryzae* a 37°C apresentou porcentagem de hidrólise de 8,4%, 11,85% e de 16,43% nas concentrações de 1,5; 3,0 e 5,0 g/L respectivamente. Na temperatura de 55°C a hidrólise observada foi de 7,11%, 16,18% e 21,29% nas concentrações de 1,5; 3,0 e 5,0 g/L, respectivamente (Fig. 1B).

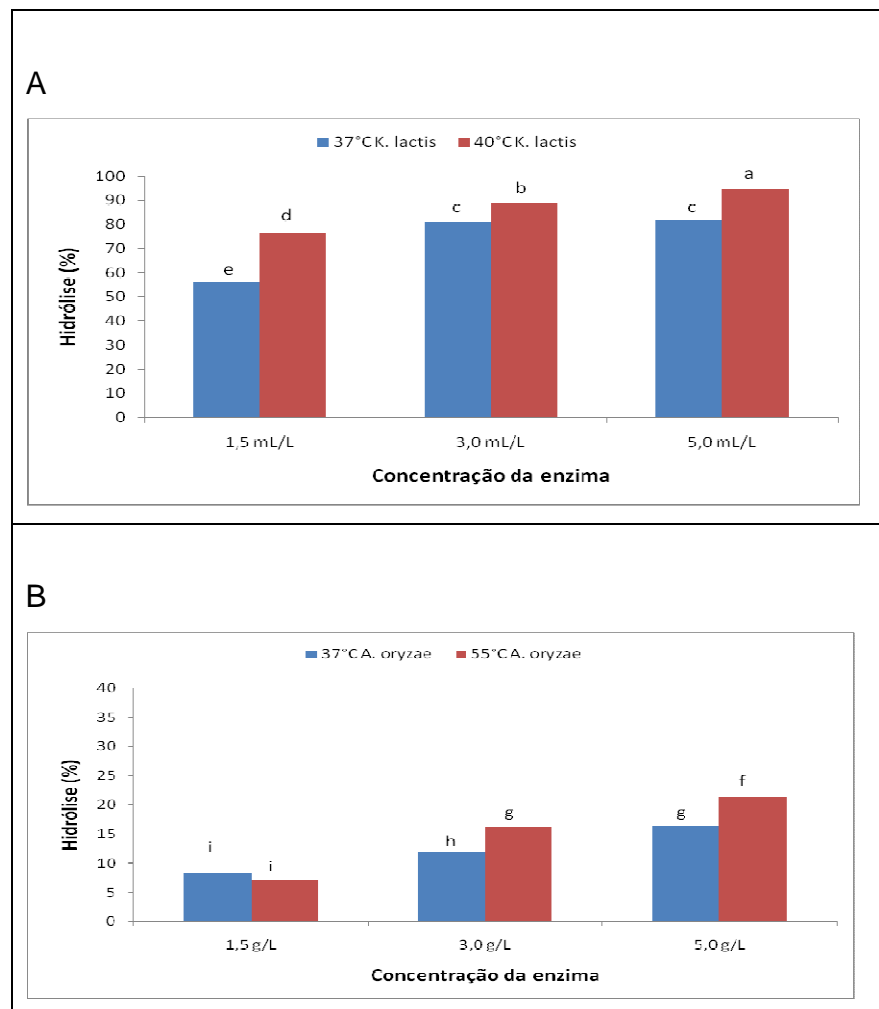


Figura 1- Porcentagem de hidrólise da lactose em simulação intestinal (pH 7,4), com enzima de *K. lactis* (A) e *A. oryzae* (B), em diferentes temperaturas, durante 60 minutos. Médias seguidas pela mesma letra, entre os tratamentos, não diferem significativamente ($P > 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Para a enzima de *K. lactis*, observou-se que a 40°C a hidrólise foi superior em todas as concentrações enzimáticas avaliadas. Os resultados demonstram que ao alterar a temperatura de 37°C para 40°C há diferença significativa ($P > 0,05$) da atividade enzimática. Observou-se uma redução de 27,6% em sua atividade, na concentração de 1,5mL/L e de 11% nas concentrações de 3,0 e 5,0 mL/L.

Para a enzima de *A. oryzae*, observou-se 27% de redução de sua atividade, nas concentrações de 3,0 e 5,0 g/L quando comparados os resultados obtidos à 37°C com sua temperatura ótima (55°C).

Portanto, os resultados demonstram que as duas enzimas de microrganismos diferentes, quando submetidas às mesmas condições de pH e temperatura, apresentaram comportamentos diferentes, destacando-se o desempenho superior apresentado pela enzima de *K. lactis*.

Na simulação gastrintestinal não foi observada diferença significativa na atividade enzimática para a enzima *K. lactis* nas concentrações de 3 e 5 g/L na temperatura de 37°C. Porém, a 40°C observou-se diferença significativa entre todas as concentrações enzimáticas avaliadas (Tabela 1).

Para a enzima *A. oryzae* observou-se variação significativa nos resultados obtidos em todas as concentrações e temperaturas avaliadas. Não foi observada diferença significativa quando se comparou a atividade enzimática na concentração de 1,5 g/L, entre as duas temperaturas avaliadas (37 e 55°C) (Tabela 1).

Tabela 1- Porcentagem média (\pm D.P.) de hidrólise da lactose pelas enzimas de *K. lactis* e *A. oryzae* em diferentes concentrações e temperaturas, em simulação ao sistema gastrintestinal humano (pH 7,4).

Enzima / Temperatura	Hidrólise (%)*		
	1,5 (g/L ou mL/L)	3,0 (g/L ou mL/L)	5,0 (g/L ou mL/L)
<i>A. oryzae</i> / 37°C	8,403 \pm 0,259 ⁱ	11,856 \pm 0,450 ^h	16,432 \pm 0,259 ^g
<i>K. lactis</i> / 37°C	55,995 \pm 0,401 ^e	80,914 \pm 0,314 ^c	81,538 \pm 0,190 ^c
<i>K. lactis</i> / 40°C	76,635 \pm 1,087 ^d	88,917 \pm 0,596 ^b	94,806 \pm 0,317 ^a
<i>A. oryzae</i> / 55°C	7,1140 \pm 0,147 ⁱ	16,187 \pm 0,448 ^g	21,299 \pm 0,448 ^f

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, entre os tratamentos, não diferem significativamente ($P > 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Semelhante ao observado no presente estudo, Solomons e Barillas (1986), comparando a atividade da β -galactosidase de fontes diferentes na hidrólise *in vivo* da lactose no leite, verificaram menor eficácia da enzima de fungo filamentoso *A. niger* comparada a β -galactosidase de *K. lactis*. No mesmo estudo os autores observaram que aumentando em quatro vezes a concentração da enzima de *K. lactis* diretamente no leite, houve total hidrólise da lactose. Já a enzima *A. niger* de fonte de fungo filamentoso, não demonstrou efeito quando sua dose foi aumentada.

Kwak (2001) simulando o sistema intestinal (pH 7-8) com a enzima β -galactosidase de *K. lactis* microencapsulada, observaram porcentagens de hidrólise de 68,8% e 60,8% respectivamente, após 60 minutos de teste. No presente estudo, uma taxa próxima a este valor (56%) foi a menor obtida para *K. lactis*, na temperatura de 37°C e na menor concentração enzimática avaliada, mesmo sem encapsulação.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nenhuma das enzimas apresentou atividade no sistema que simula a condição gástrica. No sistema que simula a condição intestinal verificou-se que o aumento da concentração de enzima ocasionou o aumento das taxas de hidrólise. Nessa condição a enzima de *K. lactis* apresentou maiores taxas de hidrólise tanto na sua temperatura ótima (40°C), quanto na temperatura corporal humano (37°C), 94,81% e 81,54%, respectivamente. A enzima de *A. oryzae* atingiu no máximo 21,29% de hidrólise à 55°C.

Deste modo, devido a inativação total observada para as duas enzimas submetidas às condições do sistema gástrico, verificou-se a importância do uso de um revestimento entérico em cápsulas de β -galactosidase. Pois, se ingerida sem uma proteção a desintegração da enzima ocorrerá no estômago, perdendo sua capacidade de hidrolisar a lactose. Com a realização da proteção entérica as cápsulas passam íntegras pela região estomacal, liberando a enzima β -galactosidase somente no

intestino delgado, minimizando assim, os efeitos colaterais de indivíduos intolerantes à lactose.

Atualmente, a quase totalidade das enzimas β -galactosidasas disponíveis comercialmente para usos farmacêuticos são de origem de fungo filamentosos. O presente trabalho demonstrou que a hidrólise da lactose realizada pela enzima de fungo filamentosos *A. oryzae* foi menos eficaz quando comparada e enzima de levedura *K. lactis*, que atingiu porcentagens de hidrólise mais expressivas, na maioria das condições avaliadas.

Portanto, levando-se em conta a superioridade apresentada pela enzima de *K. lactis* na hidrólise da lactose, esses resultados devem servir de base para a realização de futuros estudos, que visem à elaboração de formas farmacêuticas contendo β -galactosidase.

REFERÊNCIAS

- ALLIET, K. N.; LEBENTHAL, E. Lactase deficiency, lactase malabsorption and lactase intolerance. In: LEBENTHAL, E. **Text book of gastroenterology and nutrition in infancy**. New York: Raven Press Ltd., 1989.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. - **Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 568p. 2000.
- CUNHA, L. R.; SOARES, N. F. F.; ASSIS, F. C. C.; MELO, N. R.; PEREIRA, A. F. e SILVA C. B. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 23-26, 2007.
- DURING, M. J.; XU, R.; YOUNG, D.; KAPLITT, M. G.; SHERWIN, R. S. LEONE, P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. **Nature Medicine**, v. 4, p.1131-1135, 1998.
- FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S. Biotransformation. In: **Basic Biotechnology**. 3 ed. Cambridge: University Press, 2006.
- FERREIRA, A. O.; Desenvolvimento magistral de cápsulas gelatinosas duras de liberação entérica, Rio de Janeiro: UFRJ/FF, 2006.
- GEKAS, V.; LÓPEZ–LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 2–12, 1985.
- HOLSINGER, V. H.; KLIGERMAN, A. E. Applications of lactase in dairy foods and other foods containing lactose. **Food Technology**, v. 45, p. 92-95, 1991.
- KALLEN, A. W. C. **Clínicas Pediátricas da América do Norte**. Rio de Janeiro. Interlivros Ltd, 1990.
- KWAK, H. M., **Microencapsulation Of β -galactosidase With Fatty Acid Esters**. Journal Dairy Science. v. 84, p. 1576-1582. 2001.
- MAMADOU, M.; MARR, S.; PAYDON, K.; MEDHEKTAR, R. **Stability and Activity of Supplemental Digestive Enzymes in a Simulated Gastric Fluid Environment**. Presented at the Scripps Conference in San Diego, Jan 7-9, 2005. Disponível em: www.transformationenzymes.com acessado em 24/11/2012.
- PEREIRA-FILHO, D.; FURLAN, S. A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do Laboratório Dona Francisca (SC). **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 5, n. 1, p. 24-30, 2004.

RAO, A. V.; SHIWNARAIN, N.; MAHARAJ, L. Survival of microencapsulate *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. **Can. Inst. Of Food Science and Tech. J.** v. 22, p. 345-349, 1989.

ROBINSON D. S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.

ROCIO, K. H.; OLIVEIRA, B. A. de M.; MOREIRA, M. L.; SILVA, T. D. Manipulação e validação de revestimento gastrorresistente de cápsulas contendo ácido acetilsalicílico. **Farmácia & Ciência**, v.3, p46-54, 2012.

SABRA, A. **Diarréia Aguda e Crônica em Pediatria**. 4. ed. Rio de Janeiro. Cultura Médica, 1994, 680 p.

SANTOS, L.; GUTERRES, S. S.; BERGOLD, A. M. **Preparação e Avaliação de Cápsulas Gastro-Resistentes de Diclofenaco de Sódio**, Porto Alegre, UFRGS, 2007.

SOLOMONS, N. W., BARILLAS, C., The cut-off criterion for a positive hydrogen breath test in children: a reappraisal. **J. Pediatric Gastroenterol Nutr.** v. 5, p.920. 1986.

STATSOFT, Inc. (2007). **STATISTICA** (data analysis software system), version 10.0. Disponível em: www.satsoft.com.

TÉO, C.R.P. A intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 6, n. 3, p. 135-140. 2002.

THANTSHA, M. S.; CLOETE, T. E.; MOOLMAN, F. S.; LABUSCHAGNE, P. W. Supercritical carbon dioxide interpolymers improve survival of *B. longum* Bb-46 in simulated gastrointestinal fluids. **Int. J. of Food Microbiology**, v. 129, p. 88-92, 2008.

UGGIONI, P. L.; FAGUNDES, R.L.M. Tratamento dietético da intolerância à lactose infantil: teor de lactose em alimentos. **Higiene de Alimentos**, São Paulo, v. 21, n. 40 p. 24-29, 2006.

VITOLLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E. (Coord.). **Biotechnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001, v. 4, cap. 14, p. 387-420.

VONK, R.J.; PRIEBE, M. KOETSE, H.A.; STELLAARD, F.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; ANTOINE, J.M.; ZHONG, Y.; HUANG, C.Y. Lactose intolerance: analysis of underlying factors. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, n.1, p. 70-75, 2003.

WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E. **Princípios de bioquímica**, 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976.

5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo pode concluir-se que:

- A enzima β -galactosidase de *K. lactis* possui como condições ótimas para sua atividade uma temperatura de 40°C e pH 7,0 e a enzima de *A. oryzae* uma temperatura de 55°C e pH 5,0.
- Nos testes de hidrólise da lactose a enzima de *K. lactis* se mostrou mais eficiente quando comparada à enzima de *A. oryzae*, com hidrólise de 97,9% e 67,4%, respectivamente.
- Na hidrólise do leite integral e desnatado, as melhores taxas de hidrólise e velocidade de hidrólise da lactose foram obtidas pela enzima extraída da levedura *K. lactis* possivelmente, favorecida pelo pH do leite (cerca de 6,5), próximo do pH ótimo de atividade desta enzima.
- A enzima de *A. oryzae* possui maior resistência à temperatura quando comparada à enzima de *K. lactis*.
- As enzimas de *K. lactis* e de *A. oryzae* foram totalmente inativadas nas condições que simularam o sistema gástrico humano.
- A inativação de ambas as enzimas foi causada pelo pH estomacal extremamente ácido. Possivelmente, para manter a estabilidade das enzimas de *K. lactis* e *A. oryzae* no estômago é necessário o uso de uma proteção da enzima (revestimento) ao suco gástrico.
- Nas condições que simularam o sistema intestinal, verificou-se que o aumento das taxas de hidrólise foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de enzima.
- A enzima de *K. lactis* apresentou melhores taxas de hidrólise tanto na sua temperatura ótima quanto na temperatura corporal, 94,81% e 81,54%, respectivamente.

- A enzima de *A. oryzae* atingiu no máximo 21,29% de hidrólise à 55°C.
- A enzima de *K. lactis* mostrou melhor atividade nas condições do sistema intestinal do que *A. oryzae*, devendo seu uso ser recomendado.

REFERÊNCIAS

ALLIET, K. N.; LEBENTHAL, E. Lactose deficiency, lactose malabsorption and lactose intolerance. In: LEBENTHAL, E. (ed). **Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy**. New York: Raven Press Ltd. p. 460-468, 1989.

ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos: Mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Varela, 2009. 457p.

ARANGO, L. A. A.; AYALA, E. C.; MUÑOZ, Y.; MESSING, B. Deficiencia de lactasa, intolerancia a la lactosa y pico de masa ósea en adultos jóvenes colombianos, **Revista Colombiana de Reumatología**, v.13, n.4, p.271-286, 2006.

BATISTA, A. L. **Lactose intolerance: possibility of ingesting fermented dairy products**. *Milch-wissenschaft*, v. 63, n. 4, p. 364-367, 2008.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 13 ed. São Paulo: Ed. Nobel, 1984. 320 p.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite**. 15 ed. São Paulo: Ed. Nobel, 1991. 320 p.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise**, 9 ed. São Paulo: Ed. Nobel, 1979. 32 p.

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

BÓDALO, A.; GÓMEZ, E.; GÓMEZ, J. L.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M. F.; DÍAZ, F. A. **Comparison of Different Methods of β -Galactosidase Immobilization**. *Process Biochemistry*, v. 26, n. 6, p.349–353. 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretoria colegiada. Resolução RDC Nº 26. Enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano, conforme a sua origem - enzimas de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, 26 maio 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Secretaria de Vigilância Sanitária. Nova legislação comentada de produtos lácteos. Brasília: DF, 2002. 327 p.

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

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

CARVALHO, M. P. **Manipulando a composição do leite: proteína**. In: I Curso on-line sobre a qualidade do leite. Milkpoint. p.15. 2000.

CRUZ, R, D'ARCADIA CRUZ, V., BELOTE, J. G., OLIVEIRA, K. M. D. C.; SANTOS, O. L. H. A. E. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Braz Bioresour Technol** .v. 2, p.165. 1999.

DEBELJAK, M.; *SUSNIK*, S.; MILOSEVI-BERIC, T.; MEDRANO, J. F.; DOVC, P. Gene Technology and Milk Production. **Food technol. biotechnol.** v. 38, p. 83–89. 2000.

DUMOND, P.; MORISSET, M.; SERGEANT, P.; KANNY, G. Allergie alimentaire au lait de vache ou intolerance au lactose. **Journal de pédiatrie et de puériculture**, v. 19, n. 7, p. 256-260, 2006.

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

FARIAS, F.F.; FAGUNDES NETO, U. Intolerância aos carboidratos. **The Electronic Journal of Pediatric**, v. 8, n. 3, 2004. Disponível em: <http://www.e-gastroped.com.br/dec04/intolerancia.htm>. Acesso em: 21 ago. 2011.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**: Lemos, 175, p. 2000.

GÄNZLE, G.M.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and valueadded derivatives. **International Dairy Journal Elsevier**. Canadá, v. 18. p. 685-694. 2008.

GEKAS, V.; LÓPEZ–LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**,v. 20, p. 2–12, 1985.

GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of chesse whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375-384, 2010.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação**. In: USO DO LEITE PARA MONITORAR A NUTRIÇÃO E O METABOLISMO DE VACAS LEITEIRAS, Passo Fundo. Anais... Porto Alegre. p. 5-21, 2001.

GOURSAUD, J. O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas. In: LUQUET, F. M. **O leite: do úbere à fábrica de laticínios**. Portugal: Publicações Europa-America Ltda, 1985, v. 1, cap. 1, p. 31-56.

INSUMOS. **Intolerância à lactose e produtos lácteos com baixo teor de lactose**. São Paulo: Editora Insumos. Disponível em: <www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/143.pdf>. Acesso em abril/2010.

JOHNSON, A. O.; SEMENYA, J. G.; BUCHOWSKI, M. S.; ENWONWU, C. O.; SCRIMSHAW, N. S. Correlation of lactose maldigestion lactose intolerance, and milk intolerance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 399-401, 1993.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A New Kinetic Model Proposed for Enzymatic Hydrolysis of Lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300-309, 2002.

KOCIÁN, J. Lactose intolerance – minireview. **International Journal Biochemistry**, v. 20, n. 1, p.1-5, 1988.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995, 838p.

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

MAHAUT, M.; JEANTET, R.; BRULÉ, G.; SCHUCK, P. **Productos lácteos industriales**. Zaragoza: Acribia, S.A., p. 177, 2004.

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

MANAN, D. M. A.; KARIN, A. A.; KIT, W. K. Lactose Content of Modified Enzyme-treated “dadih”. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 439-443. 1999.

MARIOTTI, M. P.; YAMANAKA, H.; ARAUJO, A. R.; TREVISAN, H. C. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1233-1240, 2008.

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

OLIVEIRA, C. C. M. de. **Produção de B-galactosidase por levedura recombinante Desenvolvimento de um sistema de produção estável**. 2005.100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade do Minho, Braga, 2005.

ORDONEZ, J.A. Alimentos de Origem Animal. In: **Tecnologia de Alimentos**, v.2, p. 13-125, 2005.

PANESAR, P. S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; KUMAR, H. Microbial production, immobilization and applications of β -D- galactosidase. **J. Chen Tech Biotech**, 81, p. 530-543, 2006.

PINTADO, M. E., GOMES, A. M. & MALCATA, F. X. (2008). Lacticínios funcionais – Uma revisão sucinta., nº 7, pág. 8-10, 2008.

RENTERO, N. Em defesa do leite. **Revista Balde Branco**, São Paulo, out. 1993.

RICHAMOND, M. L., GRAY, J. I.; STINE, C. M. Beta-Galactosidase- Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 9, p.1759-1771. 1981.

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

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 367- 572, 2004.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 558-567, 1998.

SANTOS, W. O. **Participação de β -galactosidase em sistemas aquosos bifásicos constituídos por polietileno glicol e poliácrlato de sódio**. 2011. 78fl. Mestrado em Engenharia de Alimentos. Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga: Bahia, 2011.

SGARBIERI V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Braslian Journal of Food Technology**, v. 8, n.1, p. 43-56, 2005.

SHUKLA, T. P. **β -Galactosidase techonology: a solution to the lactose problem**. **Critical Reviews in Food Technology**, v. 1, p. 325-356. 1985.

SILVA, D. O.; CARDOSO, V. L. **Hidrólise da lactose do soro de queijo utilizando a enzima β -galactosidase.** 2007. Disponível em: <http://www.prop.ufu.br/revistaeletronica/edição2004/exatas/hidrólise_da_lactose.PDF>. Acesso em 20 de mar. de 2012.

SILVA, S. V. da.; **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico.**2007. 107p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.

SOROA, J. M. **Indústrias lácteas**, 5 ed. Lisboa: Litexa, 376p.1980.

SOUZA, G. D. B. de; RIBEIRO. E. J. **Influência da aeração na síntese de β -Galactosidase por fermentação de *Kluyveromyces marxianus*.**2005.27f.Relatório final (Faculdade de Engenharia Química)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia,2005.

SUAREZ, F.L.; SAVAIANO, D.A. Diet, genetics, and lactose intolerance. **Food Technology**, v. 51, n. 3, p. 74-76, 1997.

TÉO, C. R. P. A intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 6, n. 3, p. 135-140, 2002.

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

UGGIONI, P.L.; FAGUNDES, R.L.M. Tratamento dietético da intolerância à lactose infantil: teor de lactose em alimentos. **Higiene de Alimentos**, São Paulo, v. 21, n. 40, p. 24- 29, 2006.

VALSECHI, O. **Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados.** Araras – SP: UFSCar, Centro de Ciências Agrárias, 2001. 36p.

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

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology.** 2 ed, Boca Raton: CRC Press. 2006.

ZADOW, J. G. **Economic considerations related to the production of lactose by-Products.** IDF BULLETIN, London, v. 289, n. 10, 1993.

ZADOW, J. G. Lactose – Properties and Uses. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2654–2679. 1984.

