



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE**

ISADORA FRANCO CARDOZO CARNEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE FILME PROTEICO REUTILIZÁVEL
PARA HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE**

ISADORA FRANCO CARDOZO CARNEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE FILME PROTEICO REUTILIZÁVEL
PARA HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia
do Leite.

Orientadora: Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro

Londrina
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de catalogação-na-publicação
Universidade Norte do Paraná
Biblioteca Central
Setor de Tratamento da Informação

C287d Carneiro, Isadora Franco Cardozo
Desenvolvimento de filme proteico reutilizável para hidrólise de lactose em leite /
Isadora Franco Cardoso Carneiro. Londrina: [s.n], 2015.
42f.

Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite – Fabricação de Derivados.
Universidade Norte do Paraná.
Orientadora: Prof^a Dr^a. Lina Casale Aragon Alegro

1- Tecnologia do leite- dissertação de mestrado – UNOPAR 2- Intolerância 3- β -
galactosidase 4- Reutilização 5- Imobilização I- Alegro, Lina Casalae Aragon, orient. II-
Universidade Norte do Paraná.

CDU 637.1

ISADORA FRANCO CARDOZO CARNEIRO

DESENVOLVIMENTO DE FILME PROTEICO REUTILIZÁVEL PARA HIDRÓLISE
DE LACTOSE EM LEITE

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, área e concentração em Ciência e Tecnologia do Leite, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro
UNOPAR

Prof. Dra. Cíntia Hoch Batista de Souza
UNOPAR

Prof. Dra. Ana Paula Pavão Battaglini
ADAPAR

Londrina, 16 de março de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais Eliton e Ligia e meu irmão Henrique. Esta conquista é nossa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Grande Arquiteto do Universo e Nossa Senhora Aparecida. Sem Eles eu nada seria. Toda força, fé e coragem que tive vieram Deles. Muito obrigada, meu Deus e minha Mãe, por essa conquista.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Lina Casale Aragon Alegro, por todo apoio, compreensão, e encorajamento que me deu no decorrer do mestrado.

Às minhas companheiras de laboratório Robéria Lima Devidé e Evelyn Marssola, muito obrigada por me ajudarem nos experimentos. Se cheguei onde estou foi somente com a ajuda de vocês.

Aos professores Caio Aragon, Cíntia Hoch, Aline Stipp e Elsa Santana por me ajudarem sempre que precisei.

Às minhas amigas de mestrado Marisa, Evelyn, Bárbara, Ana Cristina e Ana Amélia. Não podia ter tido uma turma melhor de mestrado que vocês. Muito obrigada por tudo.

Às técnicas de laboratório Flávia, Geyci e Vera por todo apoio que me concederam no decorrer destes dois anos.

À minha amiga Nicole Stadtlober. Sem você, isto não seria possível.

À CAPES pelo apoio financeiro.



Carlos Ruas (Um Sábado Qualquer)

CARNEIRO, Isadora Franco Cardozo. **Desenvolvimento de um filme proteico reutilizável para hidrólise de lactose em leite**. 2015. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados), Universidade Norte do Paraná, Londrina.

RESUMO

A intolerância à lactose ocorre quando um indivíduo apresenta dificuldade para absorver a lactose, e apresenta sintomas típicos como diarreia, inchaço abdominal e flatulência. É uma doença relativamente comum no Brasil e, atualmente, as soluções para a diminuição dos sintomas tem sido a ingestão de produtos lácteos sem lactose, a ingestão de alguns produtos lácteos fermentados, cujo teor de lactose é parcialmente convertido em ácido lático pelas bactérias, ou, ainda, a utilização da enzima lactase em pílulas ou pastilhas. Porém, o acesso a estes produtos nem sempre é possível, e o custo benefício parece não ser satisfatório. Neste contexto, pretendeu-se desenvolver um filme proteico contendo lactase, que pudesse ser adquirido uma única vez e utilizado durante certo período de tempo para hidrolisar a lactose do leite. Para isso, os filmes foram elaborados a partir de isolado proteico de soro de leite e glicerol e adicionados da enzima, que ficou imobilizada nestes compostos. Filmes sem adição de enzima foram utilizados como controle. Os filmes foram avaliados quanto à solubilidade, propriedades mecânicas e capacidade de hidrólise. Os dados foram avaliados através de ANOVA e teste de Tukey, no nível de 5% de significância. Os filmes desenvolvidos neste trabalho, contendo a enzima β -galactosidase, apresentaram boas propriedades mecânicas. Porém, em relação à solubilidade, serão necessários novos testes a fim de se reduzi-la. A capacidade de hidrólise dos filmes foi adequada apenas durante duas utilizações, e somente nas temperaturas de 4°C, 10°C e 25°C, havendo necessidade de mais pesquisas, avaliando-se maneiras de se adicionar uma quantidade maior de enzima ao filme ou, até mesmo, a realização de outros tipos de imobilização da enzima, que pode ter sido perdida durante as utilizações, justificando a redução da hidrólise durante o tempo.

Palavras-chave: Intolerância. β -galactosidase. Reutilização. Imobilização.

CARNEIRO, Isadora Franco Cardozo. **Development of a reusable protein film for lactose hydrolysis in milk.** 2015. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados), Universidade Norte do Paraná, Londrina.

ABSTRACT

Lactose intolerance occurs when an individual presents difficulty to absorb lactose, associated to typical symptoms such as diarrhea, bloating and flatulence. It is a sickness relatively common in Brazil and, nowadays, the solutions to minimizing the symptoms have been the ingestion of dairy products without lactose, fermented dairy products which the lactose is partially converted in lactic acid by the bacteria or, yet, the using of the enzyme lactase in capsules. However, the access to these products is not always possible, and cost benefit may not be satisfactory. In this context, it intended to develop a milk protein film containing β -galactosidase, that could be acquired once and be used for a certain amount of time to hydrolyze the milk's lactose. For that, the films were developed from whey isolate and glycerol, and added the enzyme, that was immobilized in it. Films without the enzyme were used as the control group. The films were evaluated to its solubility, tensile properties and hydrolyses capacity. The data was evaluated through ANOVA and Tukey test, to the level of 5% of significance. The films developed in this work that contained the enzyme β -galactosidase presented good tensile properties. However, regarding the solubility, new tests will need to be done to reduce it. The hydrolyses capacity was adequate only during two utilizations, and only in the temperatures of 4°C, 10°C e 25°C, having the need of more research, evaluating ways of adding more enzyme to the film, or even immobilizing the enzyme in some other way, that could be lost during its utilizations, justifying the reduction of the hydrolyses during time.

Palavras-chave: Intolerance. β -galatosidase. Reuse. Immobilization.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	LACTOSE	11
2.2	INTOLERÂNCIA À LACTOSE	12
2.3	LACTASE	15
2.4	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	16
2.5	FILMES À BASE DE PROTEÍNA DO SORO DO LEITE	17
3	OBJETIVO	19
4.	ARTIGO	20
5	CONCLUSÕES	38
6	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A lactose, principal carboidrato do leite, é o constituinte predominante e menos variável da matéria seca deste alimento (FOX; McSWEENEY, 1998). É um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose ligada a uma de galactose, e está presente no leite de todos os mamíferos, em concentração que varia entre 2 a 10%. Permanece em concentração média de 4,8% no leite de vaca (MACCIOTTA, 2012).

A má absorção da lactose, consequência da hipolactasia, pode ser congênita ou adquirida (SILVEIRA; PRETTO, 2002). Quando acompanhada de sintomas típicos como diarreia, inchaço abdominal e flatulência, é denominada intolerância à lactose. Nem todos os pacientes apresentam estes sintomas, isso devido a tipos de polimorfismos diferentes (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

A epidemiologia da hipolactasia é sempre estudada com base em dois métodos chaves: testes genéticos que buscam os polimorfismos e o teste de hidrogênio expirado, produto da fermentação da lactose não hidrolisada por bactérias. A prevalência da hipolactasia primária do adulto é diversificada no mundo, sendo aproximadamente de 5% no nordeste da Europa, próximo ao Mar do Norte, com a menor de todas localizada na Dinamarca (4%), na Suécia (1% a 7%) e na Grã-Bretanha (5%). A prevalência da hipolactasia acentua-se na direção do centro-sul da Europa e aproxima-se dos 100% na Ásia e Oriente Médio. Na África, a prevalência nas populações com tradição de pastoreio é muito menor (12% no grupo étnico Beja, no Sudão), se comparada às populações predominantemente de agricultores (74% no grupo étnico Sandawe, na Tanzânia) (BROWN-ESTERS; MC NAMARA; SAVAIANO, 2012; TISHKOFF et al., 2007).

Atualmente, a fim de minimizar os sintomas provocados pela intolerância à lactose, são indicadas a ingestão de produtos lácteos não fermentados com pouca ou nenhuma lactose, a ingestão de produtos lácteos fermentados, cujo teor de lactose é parcialmente convertido em ácido láctico pelas bactérias, ou, ainda, a utilização da enzima lactase em pílulas ou pastilhas, para adição ao leite ou para ingestão das mesmas antes do consumo de produtos lácteos.

Todavia, nem sempre se tem acesso a produtos com baixo teor ou livre de lactose ou à enzima em pílulas ou pastilhas, e quando estes são encontrados, o custo pode ser bastante dispendioso. Neste aspecto, há a necessidade de criar um

sistema reutilizável contendo lactase, que possa ser adquirido uma única vez e utilizado durante algum tempo para hidrolisar a lactose do leite.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 LACTOSE

A lactose tem um papel importante na síntese do leite, pois é o principal fator osmótico nesse alimento. Em função da estreita relação entre síntese de lactose e quantidade de água drenada para o leite, o conteúdo de lactose é o componente do leite que tem menos variação, tendo sua concentração aproximada variando entre 2% e 10% nos diferentes tipos de leite. O teor de lactose no leite bovino varia em torno de 4,4% e 5,2%, com média de 4,8%. Este carboidrato, o principal do leite, é composto por dois monossacarídeos, uma molécula de D-glicose e uma de β -D-galactose (FOX; McSWEENEY, 1998).

É sintetizada na célula mamária, a partir de duas moléculas de glicose, absorvidas do sangue. Uma molécula de glicose é convertida através de epimerização em galactose pela via de Leloir. A galactose, então, é fosforilada e condensada com uma segunda molécula de glicose por meio de ação de uma única enzima de dois componentes: a lactose sintetase. O grupo no carbono anomérico da porção glicose, por não estar envolvido na ligação glicosídica, fica livre para reagir com agentes oxidantes, sendo a lactose considerada, assim, um açúcar redutor (FOX, 2009).

No leite, a lactose existe em duas formas isoméricas, denominadas α - e β -lactose. A estrutura molecular da α e β difere na orientação de um hidrogênio e de um grupamento hidroxila no carbono 1 da glicose. Ambas as formas mudam entre si continuamente. Este fenômeno é chamado de mutarrotação. A velocidade de mutarrotação é determinada por fatores tais quais temperatura, concentração e acidez da solução. Soluções de lactose buscam arduamente um estado de equilíbrio entre as formas. Em temperatura ambiente, o equilíbrio resulta na proporção 40%-60% para α - e β -lactose, respectivamente. O fato de que existem duas formas de lactose, que diferem na estrutura molecular, tem consequência importante nas várias propriedades da lactose como comportamento de cristalização, morfologia do cristal e solubilidade. A solubilidade de α -lactose é de 70g/L, comparado com 500g/L da β -lactose. A α -lactose é cristalizada como cristal monohidratado, enquanto a β -lactose é como cristal anidro. A forma comercial de lactose é a α -lactose por ser mais termo dependente,

cristaliza a $< 93,5^{\circ}\text{C}$, que a β -lactose, que cristaliza a temperaturas maiores que $93,5^{\circ}\text{C}$ (FOX, 2009).

Na indústria alimentícia, é utilizada frequentemente como ingrediente em vários alimentos, tais como doces, confeitados, pães, recheios, etc., devido às suas propriedades funcionais: a lactose fornece cor e é um agente texturizante. A lactose tem a capacidade de fornecer cor aos alimentos através da reação de *Maillard*. Quando utilizada em produtos assados, a lactose promove essa reação, o que melhora a coloração da crosta. Em altas temperaturas, a lactose carameliza e contribui para o sabor e cor dos alimentos (NARANJO et al., 2013). É um agente texturizante, assim como todos os carboidratos, pelo fato de ser solúvel em água. A lactose, em si, é menos solúvel se comparada com a sacarose ou dextrose, mas por possuir poder adoçante inferior ao da sacarose, a lactose pode ser utilizada na formulação de alimentos sem ofuscar o sabor natural de outros componentes (HOURIGAN et al., 2012; POMERANZ, 2012).

Fisiologicamente, a lactose é uma substância energética que ao ser ingerida por humanos, é quebrada pela lactase presente no nosso organismo (TEMESGEN; RATTA, 2015). No intestino, promove a absorção do cálcio, provavelmente pelo aumento inespecífico da pressão osmótica, um efeito comum a muitos açúcares e outros carboidratos (FOX; McSWEENEY, 1998).

Uma das desvantagens da lactose é não ser facilmente digerida por parte da população humana que tem problemas em consumir leite e seus derivados, por serem intolerantes a lactose, ou apresentarem um quadro de má absorção desse carboidrato (TEMESGEN; RATTA, 2015).

1.2 INTOLERÂNCIA À LACTOSE

A diminuição da capacidade de hidrolisar a lactose é denominada de má absorção da lactose ou lactase não persistente, que é consequência da hipolactasia. A hipolactasia é a redução do funcionamento da enzima lactase na mucosa do intestino delgado (RANCIARO et al., 2014). A má absorção da lactose, quando acompanhada de sintomas típicos como diarreia, inchaço abdominal e flatulência, é denominada intolerância à lactose (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

A hipolactasia pode ser congênita ou adquirida (SILVEIRA; PRETTO,

2002), sendo, esta última, classificada em primária ou secundária. A mais comum é a hipolactasia primária, que consiste na tendência natural do organismo de diminuir a produção de lactase com o avançar da idade; a secundária, transitória, ocorre devido a quadros persistentes de diarreia, que provocam a morte das células produtoras de lactose da mucosa intestinal, principalmente em crianças. Na hipolactasia congênita, o indivíduo nasce sem capacidade para produzir lactase, e permanece assim durante toda a vida (SEQUEIRA et al., 2014).

Quando a lactose não é hidrolisada, esta não é absorvida no intestino delgado, deslocando-se agilmente para o cólon. Então, a microbiota existente converte a lactose em ácidos graxos de cadeia curta, gás carbônico e hidrogênio. Os ácidos graxos são absorvidos pela mucosa do cólon, para consumo energético. Os gases, após absorção intestinal, são expelidos pelo pulmão, auxiliando como instrumento diagnóstico (WANG et al., 2014). Esta fermentação da lactose pelas bactérias leva ao aumento do fluxo intestinal e da pressão dentro do cólon, podendo ocasionar dor, flatulência e a sensação de inchaço abdominal. Além disso, a acidificação do interior do cólon (resultante do metabolismo microbiano) e o acréscimo da carga osmótica no íleo e cólon, decorrente da lactose não absorvida, acarretam uma grande secreção de eletrólitos e fluidos, além do aumento do trânsito intestinal, o que resulta em diarreia (ROBAYO-TORRES; QUEZADA-CALVILLO; NICHOLS, 2006; LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008; FOX; McSWEENEY, 1998).

O gene da lactase é um gene autossomal recessivo (FRIEDRICH et al., 2014). Um estudo realizado com grandes famílias na Finlândia (ENATTAH et al., 2002), utilizando testes genéticos, revelou que as diferenças entre indivíduos na atividade da lactase eram em decorrência de polimorfismo genéticos. Os autores afirmaram que adultos que tem baixa capacidade de digerir a lactose são homozigotos para o alelo autossomal recessivo que causa o declínio da atividade da lactase pós desmame, enquanto que os indivíduos que tem alta capacidade de digestão, são ou heterozigotos ou homozigotos para o alelo dominante. A epidemiologia do polimorfismo varia de acordo com a região.

Mattar e colaboradores (2009) realizaram um estudo com 567 indivíduos brasileiros de diferentes etnias e pesquisaram a frequência do polimorfismo LCT -13910C>T, que está intimamente ligado a hipolactasia adulta. Entre brancos (226) e mulatos (37), a prevalência foi de 57%, entre os negros (40) foi de 80%. Já entre os japoneses a prevalência do polimorfismo foi de 100%. Almon e

coautores (2007) pesquisaram a prevalência do polimorfismo LCT -13910C>T em conjuntos de diferentes idades e etnias na região central da Suécia. A prevalência global em crianças foi de 14%, maior do que o esperado. Entre caucasianos, a prevalência foi maior em crianças do que em idosos (9% versus 6,8%). A prevalência do polimorfismo, portanto, aumentou e isto pode ser devido à imigração de ambos os grupos não-caucasianos e caucasianos.

Ambos os estudos corroboram com o de Brown-Esters, Mc Namara e Savaiano (2012), que afirma que populações ligadas ao pastoreio têm mais possibilidades de apresentarem o polimorfismo da lactase persistente, do que as populações ligadas a agricultura, que apresentam, geralmente, o polimorfismo ligado à lactase não persistente. Independente do polimorfismo, o tratamento da patologia é o mesmo para todos indivíduos.

Uma das principais maneiras de se tratar a intolerância à lactose é a redução da quantidade de lactose que o indivíduo ingere, evitando-se a ingestão de leite e derivados. Porém, a exclusão total e definitiva da lactose na dieta deve ser evitada, uma vez que pode acarretar prejuízo nutricional de cálcio, fósforo e vitaminas, podendo prejudicar o crescimento e o desenvolvimento ósseos, promovendo diminuição da densidade mineral óssea e possíveis fraturas (Di STEFANO et al., 2002).

Outra maneira de minimizar os efeitos causados pela intolerância à lactose é a ingestão de produtos lácteos nos quais a lactose original foi hidrolisada ou teve sua quantidade reduzida (MATTAR; MAZO, 2010; SAVAIANO, 2014). São utilizados três métodos para reduzir ou eliminar a lactose do leite e seus derivados: Tratamento do leite com a β -galactosidase (método de hidrólise utilizado desde meados de 1970); redução de lactose por técnicas de tecnologia de membrana (por microfiltração, ultrafiltração ou uma combinação dos dois); redução da lactose do leite por métodos cromatográficos (usa resinas carregadas para separar as proteínas e outros íons carregados no leite da lactose) (REHMAN, 2009).

A hidrólise deste carboidrato por ação da β -galactosidase tem sido um processo promissor para a indústria de alimentos, uma vez que possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem esse carboidrato em suas composições. O método de utilização de β -galactosidase é hoje o mais comum combinado com condições brandas, tanto de temperatura, como pH (TEMESGEN; RATTA, 2015). A desvantagem desta opção é que não se encontra leite com lactose hidrolisada com

facilidade, em todos os mercados e padarias.

A terapia de reposição enzimática com lactase exógena é outra estratégia para a deficiência primária de lactose, na qual preparados comerciais de lactase (na forma líquida, cápsulas ou tabletes) são adicionados a alimentos ou ingeridos juntamente com refeições que contenham lactose. Apesar de serem capazes de reduzir os sintomas da intolerância, estes produtos não hidrolisam completamente a lactose da dieta, apresentando resultados variáveis em cada indivíduo (LEVITT; WILT; SHAUKAT, 2013; SHAUKAT et al., 2010).

1.3 LACTASE

A lactase ou β -galactosidase é uma enzima classificada como hidrolase (EC 3.2.1.23), e também é uma das mais importantes enzimas na indústria de laticínios devido a sua capacidade de hidrolisar a lactose em glicose e galactose (RAM, 2011). Atua na ligação beta do carbono 1 da galactose e o carbono 4 da glicose (HURLEY, 2009). A lactase tem vários substratos como a própria lactose, lactosilceramidas, gangliosídeos e algumas glicoproteínas (NOLLET, 2012).

A enzima β -galactosidase é amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada em vegetais (particularmente em amêndoas, pêssegos, damascos e maçãs), em órgãos de animais, leveduras, bactérias e fungos (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). No ser humano, está situada no jejuno, na borda dos enterócitos, células responsáveis pela absorção de nutrientes. É codificada pelo gene LCT, que está localizado no cromossomo 2 (FRIEDRICH et al., 2014)).

Algumas características da β -galactosidase podem variar de acordo com a sua fonte. O peso molecular da enzima, por exemplo, pode variar de 850 kDa, para a *E. coli*, até 201 e 90 kDa para *Kluyveromyces marxianus* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente. A temperatura e o pH ótimos de operação podem diferir de acordo com a fonte enzimática ou quando se utiliza a enzima imobilizada. As β -galactosidases provenientes de fungos filamentosos possuem pH e temperatura ótimos de operação nas faixas de 3,0 - 5,0 e 50 – 55°C, respectivamente. Se provenientes de leveduras, o pH ótimo varia entre 6,0 – 7,0 e acima de 40°C ocorre desnaturação (RAM, 2011).

A enzima β -galactosidase tem sido usada preferencialmente em sua forma livre nas indústrias de laticínio em todo o mundo, porém em função de seu custo relativamente elevado, tem havido grande interesse na imobilização desta. Uma das

alternativas é a redução do custo de produção na síntese da enzima, utilizando meios de cultura mais baratos assim como soro de leite (SANTIAGO et al., 2004).

Li e colaboradores (1975) realizaram testes para averiguar a inibição da lactase por diversos compostos. Concluíram que Ag^+ , Hg^+ e Zn^{2+} são potentes inibidores, chegando até apenas 1% de atividade enzimática no caso do mercúrio. Averiguaram também que a galactose, quando adicionada ao meio com a lactase reduz a atividade em até 34%, enquanto a glicose e o EDTA não a alteraram. Corroborando com estes resultados, Li e colaboradores (2001) concluíram que a galactose e o mercúrio são inibidores efetivos da lactase, diminuindo a sua atividade em 28% e 4,9%, respectivamente. O EDTA neste estudo apresentou uma leve alteração na atividade com 90,9%.

Diferentes métodos podem ser empregados para extração de proteínas intracelulares, os quais dependem da força física da parede celular dos microrganismos, localização dentro da célula, estabilidade e do uso desejado para o composto de interesse. Métodos mecânicos, físicos, químicos, enzimáticos e a combinação destes podem ser aplicados. No caso de enzimas intracelulares, a eficiência do processo de ruptura deve ser principalmente acompanhada pelo rendimento da molécula alvo em sua forma ativa, através de ensaio de atividade enzimática. Além disso, após o rompimento, a proteína de interesse pode ser degradada por proteases. A redução da temperatura e a adição de inibidores de proteases pode minimizar esse efeito. A liberação de ácidos nucleicos e proteínas estruturais também pode aumentar a viscosidade da solução. Mudanças no pH ajudam a reduzir a viscosidade do homogeneizado celular (MEDEIROS, 2008).

1.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS




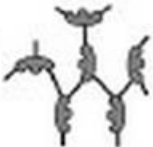


Enzimas são catalisadores munidos de algumas propriedades excelentes (elevada atividade, seletividade e especificidade) que permite a execução de processos químicos e bioquímicos mais complexos sob condições brandas. No caso de utilização de enzimas na área industrial como catalisador, a principal desvantagem de se adotar uma enzima em sua forma solúvel é sua baixa estabilidade, porém existem métodos que permitem tornar suas propriedades ainda melhores, como por exemplo a imobilização de enzimas (MATEO et al., 2007).

Imobilização é uma denominação genérica aplicada para referir-se a retenção de uma biomolécula, como por exemplo uma enzima, no núcleo de um reator ou de um sistema analítico (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009). A imobilização de enzimas tem se mostrado, nos últimos tempos, um potente instrumento para melhorar quase todas as características enzimáticas, como a estabilidade, atividade e seletividade (MATEO et al., 2007).

Inúmeras são as vantagens da imobilização enzimática, entre elas o reaproveitamento do biocatalizador, a diminuição do volume de reação (alta concentração de enzima em um menor volume de reator), a simplicidade de manejo operacional (variáveis do processo mais facilmente controladas devido a operação contínua) e a facilidade de purificação do produto sem contaminação pelo catalisador (enzima não solúvel na reação). Várias enzimas imobilizadas em suportes sólidos são amplamente utilizadas na fabricação de alimentos, produtos farmacêuticos e outros itens biologicamente importantes (KLEIN et al., 2013) .

Há vários métodos de imobilização e se baseiam nas ligações físicas e químicas entre o suporte e a enzima. Os mais empregados são adsorção química (ligação iônica e covalente) e física, ligação cruzada, confinamento em matriz ou micro encapsulamento. Estas metodologias são resumidas na tabela 1.

Quadro 1. Principais métodos de imobilização de enzimas.

Métodos de Imobilização Enzimática					
Enzimas Encapsuladas		Enzimas Ligadas			
Matriz Polimérica	Microcápsula	Ligação Covalente	Ligação Cruzada	Adsorção Física	Adsorção Iônica
					

Fonte: CARDOSO; MORAES; CASS, 2009.

1.5 FILMES À BASE DE PROTEÍNA DO SORO DO LEITE

A elaboração de uma gama de queijos compreende, basicamente, na concentração das caseínas e da gordura do leite, de 6 a 12 vezes, dependendo da diversidade (FOX, 1988). Durante essa fabricação, quando ocorre a quebra do

coágulo, a fração aquosa liberada é denominada soro do leite. Este subproduto representa 85-95% do volume do leite utilizado na produção de queijos e retém aproximadamente 55% dos nutrientes do leite. Entre estes, os mais abundantes são lactose (4,5-5% p/v), proteínas solúveis (0,6-0,8% p/v), lipídeos (0,4-0,5% p/v) e sais minerais (8-10% do extrato seco) (SMITHERS, 2008).

A porção proteica do soro do leite é bastante heterogênea, representa aproximadamente 20% das proteínas do leite, composto fundamentalmente por β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina sérica, imunoglobulinas e peptona proteose. A β -lactoglobulina compreende aproximadamente 57% das proteínas no soro, enquanto que a α -lactalbumina, albumina sérica, imunoglobulinas e peptona proteose representam, respectivamente 19%, 7%, 13% e 4%. Estas proteínas sofrem desnaturação a uma temperatura próxima de 70°C, diferente das caseínas que são termo resistentes (SAMMEL et al., 2007; PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2002).

Uma quantidade considerável de soro de leite, que é considerado um efluente residual, é desprezada anualmente, acarretando um grande problema ambiental, associados ao seu alto teor de matéria orgânica e conseqüentemente altos valores de DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio). O seu reaproveitamento tem sido analisado e proposto para aprimorar a eficiência econômica dos laticínios, diminuindo o impacto ambiental (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001).

O soro do leite é artefato com altíssimo valor nutricional e funcional e, se devidamente processado, tanto como concentrado ou isolado proteico, origina-se um excelente ingrediente para a produção de variados alimentos industrializados. Sob o enfoque nutricional, o soro de leite, por possuir um alto conteúdo de aminoácidos essenciais, é apontado como discretamente superior, se comparado à caseína. Aminoácidos essenciais, tais quais, lisina, treonina, triptofano, fenilalanina e tirosina (TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, 2008; LIU; XIONG; BUTTERFIELD, 2000).

Nas mais diversas aplicações alimentícias, as proteínas do soro de leite têm sido empregadas, devido aos seus atributos funcionais, tais como, a emulsificação, solubilidade, gelatinização, viscosidade, formação de espuma. (CURVELLO; DOS SANTOS VILAR, 2013; KORHONEN; PIHLANTO, 2007).

Através da aplicação de proteínas do soro do leite com a incorporação de plastificante e posterior desnaturação da solução obtém-se um filme transparente, flexível e brando. Este filme possui excelentes propriedades de barreira para aromas,

lipídios e oxigênio em baixa umidade relativa (KHWALDIA et al, 2004). No momento em que a formulação do filme passa por uma desnaturação da solução de proteína, os mesmos transformam-se em insolúveis em água e melhoram suas propriedades mecânicas (PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2002). Filmes elaborados somente a partir de concentrado ou isolado proteico aparentam-se delicados e quebradiços, sendo inviável sua utilização para elaboração de embalagens ou coberturas. Desta maneira, é essencial a incorporação de plastificantes na produção para aprimorar suas características de textura (VIEIRA et al., 2011; SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007).

Filmes à base de proteínas do soro do leite têm sido empregado na indústria alimentícia para as mais diversas funções como retardação de oxidação lipídica em amendoins (MIN; KROCHTA, 2008) e em salmão congelado (STUCHELL; KROCHTA, 1995), diminuição de perda de massa em ovos (ALLEONI; ANTUNES, 2005), prevenção do escurecimento de maçãs utilizando filmes enriquecidos de cera de abelha (PÉREZ-GAGO et al., 2003) e ação antimicrobiana com filmes incorporados de óleo essencial de orégano, alho e alecrim (SEYDIM; SARIKUS, 2006) e incorporados de lactoferrina (MIN; KROCHTA, 2005).

Filmes biodegradáveis ou comestíveis constituem um meio conveniente para prolongar a vida de prateleira de alimentos e aumentar a qualidade dos mesmos, sem contribuir para poluição ambiental. Além de atuar como barreiras seletivas para a umidade, gás e migração de solutos, os filmes podem funcionar como portadores de muitos ingredientes funcionais, tais como a enzima lactase (ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2009).

3 OBJETIVO

Desenvolver um filme reutilizável à base de isolado proteico de soro de leite, para a hidrólise da lactose do leite.

4. ARTIGO

Desenvolvimento de um filme proteico reutilizável para hidrólise de lactose

Isadora Franco Cardozo CARNEIRO¹, Robéria Lima DEVIDÉ², Evelyn Marssola CASTRO³, Elsa Helena Walter de SANTANA⁴, Cíntia Hoch Batista de SOUZA⁵, Lina Casale ARAGON-ALEGRO^{6*}

¹Mestranda em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: carneiro.isadora@hotmail.com.

²Graduanda de Nutrição, Universidade Norte do Paraná. Av Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: rlima.bio@gmail.com.

³Graduanda de Engenharia de Alimentos, Universidade Norte do Paraná. Av Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: evelynmarssola@gmail.com.

⁴Médica veterinária, doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina, docente do curso de Mestrado de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: elsahws@hotmail.com.

⁵Bióloga, doutora em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica pela Universidade de São Paulo, docente do curso de Mestrado de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: cinthiahoch@yahoo.com.br.

⁶Bióloga, doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo, docente do curso de Mestrado de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. RG: 26.285.095-3. CPF: 261.148.178-42. E-mail: lcalegro@yahoo.com.br (autora para correspondência).

1 INTRODUÇÃO

A intolerância à lactose é a má absorção da lactose associada aos sintomas típicos como flatulência, diarreia e inchaço abdominal. Essa má absorção deve-se à redução da capacidade de hidrólise da lactose, decorrente da hipolactasia, que é a diminuição do funcionamento da enzima β -galactosidase na mucosa do jejuno. A intolerância pode ser congênita, quando o indivíduo já nasce sem a capacidade de produzir a β -galactosidase, ou adquirida. Esta última pode ser classificada em primária (tendência natural do organismo em reduzir a produção da enzima) ou secundária (transitória, ocorre após episódios de diarreia persistente, geralmente em crianças) (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015; RANCIARO et al., 2014; SEQUEIRA et al., 2014; SILVEIRA; PRETTO, 2002).

Algumas condutas para se evitar os sintomas decorrentes da intolerância à lactose baseiam-se na ingestão de produtos lácteos com pouca ou nenhuma lactose, tratados previamente com a enzima β -galactosidase, e de produtos fermentados em que a lactose é parcialmente convertida em ácido lático. Há também a possibilidade de o consumidor adquirir a lactase exógena em preparados comerciais nas formas líquida, cápsulas, tabletes ou pó, que podem ser adicionados aos alimentos ou ingeridos juntamente com alimentos que contenham lactose. (DI STEFANO et al., 2002; LEVITT; WILT; SHAUKAT, 2013; MATTAR; MAZO, 2010; SAVAIANO, 2014; SHAUKAT et al., 2010). Apesar de estes produtos serem eficazes na atenuação dos sintomas, não são encontrados com facilidade em mercados e farmácias e seu custo é alto. Uma possível opção seria a elaboração de um filme à base de isolado proteico.

O isolado proteico de soro de leite, um ingrediente bastante utilizado pela indústria alimentícia, também pode ser aplicado na formação de filmes comestíveis e biodegradáveis (CURVELLO; DOS SANTOS VILAR, 2013; KORHONEN; PIHLANTO, 2007; LIU; XIONG; BUTTERFIELD, 2000; SMITHERS, 2008). Esses filmes podem auxiliar no prolongamento da vida de prateleira de alimentos, atuando como barreiras seletivas para umidade e podendo, além disso, carrear ingredientes funcionais (ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2009).

Os filmes à base de isolado proteico de soro de leite são utilizados para as mais diversas finalidades: retardação de oxidação lipídica em amendoins,

diminuição de perda de massa em ovos, prevenção do escurecimento de maçãs utilizando filmes enriquecidos de cera de abelha e ação antimicrobiana de filmes incorporados com óleo essencial de orégano, alho e alecrim e com lactoferrina (ALLEONI; ANTUNES, 2005; MIN; KROCHTA, 2005; MIN; KROCHTA, 2008; PÉREZ-GAGO et al., 2003; SEYDIM; SARIKUS, 2006).

Várias são as aplicações do filme proteico, mas não foram encontrados estudos na literatura em que se utilizou a enzima β -galactosidase como ingrediente funcional dos mesmos. Desta maneira, o desenvolvimento de um filme à base de isolado proteico de soro de leite contendo β -galactosidase imobilizada, abre uma nova perspectiva de mercado, permitindo que o consumidor possa utilizá-lo mais de uma vez para a hidrólise da lactose do leite. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um filme reutilizável à base de isolado proteico de soro de leite, para a hidrólise da lactose do leite.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção dos filmes

Foram elaborados dois tipos de filmes: 1) filme controle, composto de Isolado proteico do soro de leite, glicerol e tween 80; 2) filme composto por isolado proteico do soro de leite, glicerol e tween 80, adicionado da enzima β -galactosidase na concentração de 10%.

Os filmes foram produzidos a partir de isolado proteico de soro de leite (WPI, Arla Foods 92%, Århus, Dinamarca), Glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América), β -galactosidase (Maxilact LX 5000, DSM Food Specialities, Seclin, França) extraída de *Kluveromyces lactis*, Tween 80 (Synth, Diadema, Brasil). Para as análises de hidrólise, foi utilizada solução de lactose 4,8% (Jand Química, São Paulo, Brasil).

2.1.1 Filme Controle (F.C)

Os filmes foram produzidos segundo metodologia descrita por Yoshida e Antunes (2009), com modificações na concentração de glicerol utilizada. O concentrado proteico de soro (7%, em massa seca) foi disperso em água destilada, seguido de homogeneização em agitador magnético até a dissolução total. Em seguida, foi adicionado 6% de glicerol e a solução filmogênica foi aquecida à 90°C/30 minutos em banho-maria, com o objetivo de desnaturar as proteínas. Assim que foi retirada do banho-maria foi adicionado o tween 80 a 0,5% com a função de conservante. A solução então foi resfriada, em banho de gelo até atingir a temperatura de secagem (32°C). Para os testes das propriedades mecânicas, padronizou-se volumes de 50 mL em placas de Petri com 9 cm de diâmetro; para os demais testes, volumes de 20 mL da solução foram distribuídos em recipientes de 3,5 cm de diâmetro. As soluções distribuídas nas placas e recipientes foram secas por 96 horas a 32°C em B.O.D. Após secagem, os filmes foram removidos com o auxílio de uma espátula e armazenados em bandejas assepsiadas em B.O.D. a 25°C, até o momento das análises.

2.1.2 Filme Adicionado de β -galactosidase (F. β)

A metodologia para a produção dos filmes contendo β -galactosidase foi a mesma descrita em 2.2.1, diferindo apenas pela adição da enzima, na concentração de 10%, após o resfriamento a 32°C. O processo de secagem e o acondicionamento dos filmes foram os mesmos descritos em 2.2.1.

2.2 Caracterização dos filmes

Os filmes foram caracterizados quanto ao aspecto visual, solubilidade em água, propriedades mecânicas, capacidade de hidrólise.

2.2.1 Aspecto visual

Os filmes foram avaliados quanto ao aspecto visual no momento em que foram retirados dos recipientes após a secagem, com a finalidade de utilizar, para

as determinações analíticas, somente aqueles homogêneos (sem a presença de partículas insolúveis, bolhas e coloração uniforme), contínuos, sem rupturas ou zonas quebradiças.

2.2.2 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes em água foi estabelecida utilizando-se o método de Gontard et al. (1994), em triplicata. As amostras foram secas em estufa a 105°C por 24 horas e pesadas em balança analítica para obtenção da massa seca inicial. Posteriormente, foram imersas em 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação lenta (100 rpm) por 24 horas, a 25°C, utilizando-se uma mesa agitadora automática (TECNAL TE420, Piracicaba, Brasil). Após esse período, as amostras foram submetidas à secagem em estufa a 105°C por 24 horas e pesadas novamente, para obtenção da massa seca final. A solubilidade foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$\text{SOL} = (\text{Mi} - \text{Mf}) / \text{Mi} \times 100$$

Onde: **SOL** é a massa solubilizada em função da massa seca inicial (%); **Mi** é a massa seca inicial (g); **Mf** é a massa seca final, após solubilização (g).

2.2.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de tração dos filmes foram avaliadas em 8 amostras, utilizando-se Analisador de Textura CT3 (Brookfield, Middleboro, USA), de acordo com o método da *American Society for Testing and Material* (ASTM, 2010). As amostras foram cortadas em tiras de 80 mm de comprimento x 25 mm de largura, sendo a velocidade do teste 1 mm/s e a carga Trigger de 0,05 N. As medidas foram conduzidas em temperatura de 25°C. Foi determinada a resistência máxima à tração na ruptura (RMTR) e alongamento (A) a partir do pico de carga e a deformação no pico de carga, fornecidos pelo aparelho. Posteriormente, a resistência e o alongamento foram calculados utilizando as equações a seguir:

$$\mathbf{RMTR} = \mathbf{Fm/A}$$

Onde: **RMTR** é a resistência máxima à tração na ruptura (Mpa); **Fm** é a força máxima no momento da ruptura do filme (N); **A** é a área da secção transversal do filme (mm²).

$$\mathbf{A} = (\mathbf{Lf} - \mathbf{Lo/Lo}) \times 100$$

Onde: **A** é o alongamento máximo sem que haja ruptura (%); **Lf** é o comprimento final (mm); **Lo** é o comprimento inicial (mm).

2.3 Capacidade de hidrólise

A capacidade de hidrólise de F.β foi avaliada diariamente após a secagem e retirada do recipiente, durante 5 dias, em quatro temperaturas: 4°C, 10°C, 25°C e 50°C. Durante esse tempo, foram avaliadas amostras de duas produções, sendo cada análise realizada em triplicata.

As amostras foram dispostas em copos plásticos previamente assepsiados contendo 50 mL de solução esterilizada de lactose, em concentração de 4,8%. A cada hora, a concentração de glicose foi medida, utilizando-se o kit Bioliquid glicose (Laborclin, Pinhais, Brasil), cuja leitura foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm (Biomatte 3, Thermo Scientif, Waltham, Estados Unidos da América). A partir da absorbância, a porcentagem de hidrólise foi calculada através da equação a seguir:

$$\mathbf{H} = \frac{\{(\mathbf{Abs} \times \mathbf{Fc}) / 1000\} \times 2 \times 100}{\mathbf{Li}}$$

Onde: **H** é a capacidade de hidrólise (%); **Abs** é a absorbância obtida no teste de glicose; **Fc** é o fato de correção do padrão da glicose; **Li** é a lactose inicial (%).

2.4 Comparação de performance (F.β vs Enzima livre)

Foi comparado no primeiro dia de teste de capacidade de hidrólise a

performance do F. β com a enzima livre dispersa na solução 4,8% de lactose, nas mesmas concentrações dos filmes e nas mesmas temperaturas. O resultado foi apresentado em porcentagem de glicose na solução.

2.5 Análise dos dados

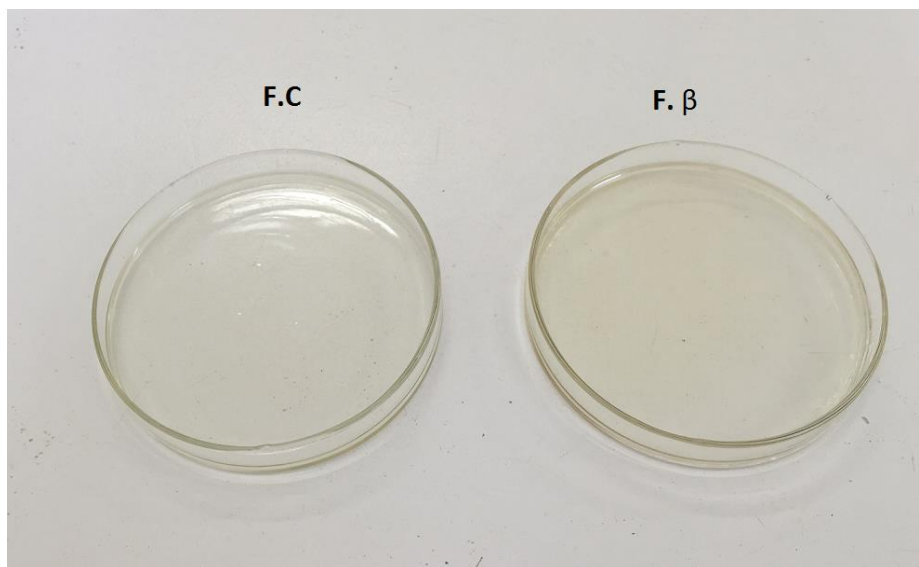
A avaliação dos dados foi feita por Análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa Statistica® (Stasoft; Estados Unidos da América). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Aspecto visual

Visualmente, todos os filmes à base de isolado proteico de soro de leite, adicionados ou não de β -galactosidase, apresentaram-se, no geral, homogêneos, sem bolhas e/ou rupturas, sem zonas quebradiças, com superfícies lisas, transparentes e levemente amarelados (Figura 1). Ambos soltaram-se facilmente das placas.

Figura 1 - Aspecto visual dos filmes à base de proteína de soro de leite, contendo (F. β) ou não (F.C) a enzima β -galactosidase.



Os filmes adicionados de 10% de enzima (F.β) apresentaram-se mais amarelados e maleáveis que os filmes controle (F.C). Uma explicação para isto é a de que, quando o glicerol foi adicionado ao isolado proteico, a quantidade colocada foi abundante e, conseqüentemente, nem todos os seus radicais hidroxila ligaram-se às proteínas do isolado, formando uma rede estruturada e rígida. Em F.β, a partir do momento em que a β- galactosidase foi adicionada, os radicais hidroxila que estavam livres ligaram-se à enzima, alterando a estrutura inicial da rede que havia sido formada inicialmente, atribuindo maior maleabilidade a este filme.

Mchugh e Krochta (1994) produziram filmes à base de isolado proteico de soro com glicerol e com sorbitol e glicerol e observaram que os que continham sorbitol e glicerol eram mais flexíveis que os que continham apenas glicerol.

Ramos et al. (2013) avaliaram a adição de três diferentes níveis de glicerol (40, 50 e 60%) a filmes produzidos a partir de isolado e concentrado proteicos de soro e encontraram aspectos visuais semelhantes aos verificados neste trabalho, sendo todos eles transparentes, flexíveis e homogêneos, com superfícies lisas, sem poros visíveis ou rachaduras. As mesmas características foram verificadas por Oses et al. (2009), para filmes preparados com isolado proteico de soro e diferentes concentrações de umidade (50% ou 75%).

Sothornvit et al. (2010) e Fernandez et al. (2007) produziram filmes a partir de isolado proteico de soro adicionados de argila orgânica e de ácidos graxos (esteárico, oleico e linoleico), respectivamente, e observaram que essas substâncias

afetaram a transparência dos filmes, tornando-os opacos.

3.2 Solubilidade em água

A solubilidade de F.C foi de 36,61%+1,08, maior que a de F.β, que foi de 26,09%+2,31. Isto ocorreu, provavelmente, devido à alta taxa de radicais hidroxila livre, advindas do glicerol, que o filme F.C possuía. Quando este filme foi colocado em contato com a água, a mesma interagiu com estes radicais livres, aumentando assim sua solubilidade. No filme F.β, como há uma menor quantidade de radicais livres, a solubilidade foi menor.

Os filmes mantiveram o formato após a realização do teste de solubilidade, provavelmente devido à essa rede formada, de alta estabilidade. McHugh e Krochta (1994) afirmaram que filmes à base de isolado proteico do soro de leite são parcialmente insolúveis em água em razão da presença de ligações dissulfídicas intermoleculares, tornando-os robustos e resistentes à solubilização em água.

A solubilidade dos filmes à base de isolado proteico de soro de leite produzidos por Kim e Ustunol (2001) foi de 31,6%, corroborando com os resultados do presente estudo. Entretanto, os filmes elaborados por Amin e Ustunol (2007), apresentaram solubilidade em torno de 28-26%, diferindo dos resultados obtidos neste trabalho, o que pode ser justificado pela maior quantidade de plastificante (glicerol) utilizado pelos autores.

Di Pierro et al. (2006) produziram filmes de isolado proteico de soro de leite e quitosana, com e sem a enzima transglutaminase. Os filmes controle apresentaram solubilidade de 36%, enquanto os que continham a enzima foram insolúveis. Os autores afirmam que a insolubilidade deveu-se à ligação cruzada entre a enzima e a quitosana.

Em 1998, Galiotta et al. elaboraram filmes controle (isolado proteico e glicerol) e filmes adicionados de formaldeído. A solubilidade dos filmes controle foi em torno de 40-30%, corroborando com os resultados do presente trabalho. No entanto, a solubilidade dos filmes com formaldeído caiu para 30-20%, provavelmente devido à formação de ligações covalentes devido à sua adição.

3.3 Propriedades mecânicas

Os parâmetros de propriedades mecânicas provêm conhecimento sobre as forças intermoleculares compreendidas na estabilização da matriz e sobre a energia requisitada para que o filme se rompa. A resistência máxima à tração é a tensão sustentada pelo filme até o momento de sua ruptura enquanto que o alongamento é a medida em milímetros de quanto o filme se distende antes de romper (MACLEOD; FELL; COLLETT, 1997). Ambos os parâmetros foram determinados a fim de constatar se os filmes eram resistentes o suficiente para suportar várias reutilizações.

Os dois filmes elaborados apresentaram resistência à ruptura. Isso ocorre porque, durante o preparo da solução formadora de filmes, a mesma passou por um tratamento térmico de 90°C/30min, o que provocou desnaturação das proteínas do soro, auxiliando na formação da matriz do filme. Esse tratamento térmico acarretou em alterações na estrutura tridimensional da proteína, como a exposição de grupos sulfidrilas e o estabelecimento de ligações covalentes S-S, o que auxilia a formação do filme com propriedades mecânicas aceitáveis, ou seja, filmes estáveis, com a capacidade de estender (FAIRLEY et al., 1996). Neste trabalho, não foi verificada diferença estatística na porcentagem de alongamento entre F.C ($64,48 \pm 20,00$) e F. β ($50,74 \pm 9,74$).

O filme controle apresentou maior resistência à ruptura ($0,93 \pm 0,06$ MPa) quando comparado ao filme adicionado de enzima ($0,35 \pm 0,05$ MPa). Provavelmente, isso é devido ao fato de que as proteínas desnaturadas do isolado, unidas pelo glicerol, formaram uma estrutura firme e rígida, necessitando-se de mais força para seu rompimento. Quando o filme foi acrescido de enzima, a β -galactosidase competiu com as proteínas do isolado pelos radicais livres do glicerol, desestabilizando a estrutura original, firme e rígida, e tornando-a maleável e menos resistente à ruptura.

Zhou, Wang e Gunasekaran (2009) produziram filmes de isolado proteico acrescidos de nano partículas de dióxido de titânio. A resistência máxima à ruptura e alongamento do filme padrão dos autores foi de 1.69 ± 0.03 e 55.56 ± 1.05 , respectivamente, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Em 2013, Schmid et al. realizaram testes com concentrações diferentes de isolado proteico em filmes, mantendo constante a quantidade do

plastificante, no caso o glicerol. Os autores constataram que conforme a concentração de isolado aumentava, a resistência máxima à ruptura diminuía. Possivelmente isto ocorreu pois havia uma maior exposição de grupos sulfidrilas para o plastificante se ligar e formar uma rede estável, porém maleável.

Shaw et al. (2002) efetuaram uma pesquisa em filmes de isolado proteico com diferentes tipos de plastificantes (glicerol, xilitol e sorbitol). Os filmes feitos com glicerol tiveram a maior porcentagem de alongamento e menor taxa de resistência máxima à ruptura, mimetizando os dados encontrados pelo atual estudo.

Gounga, Xu e Wang (2010) elaboraram pesquisas em filmes de isolado proteico com concentrações diferentes de isolado, glicerol e pululano. Os autores observaram que conforme a proporção entre o isolado e o plastificante diminuía, a resistência máxima à ruptura diminuía e o alongamento aumentava, validando os resultados obtidos no presente estudo, em que a proporção de isolado para plastificante foi de 1,6:1.

Pérez-Gago, Nadaud e Krochta (1999) pesquisaram as propriedades mecânicas de filmes de isolado proteico com e sem tratamento térmico. O alongamento dos filmes que produziram permaneceu entre 40-55%, corroborando com os resultados obtidos no atual estudo.

3.4 Capacidade de Hidrólise

Observou-se que a maior porcentagem de hidrólise da lactose obtida com a utilização do filme elaborado foi de 76,99%, quando este foi utilizado pela primeira vez, na temperatura de 4°C. A porcentagem de hidrólise foi avaliada durante 9 horas durante os cinco dias de testes.

No primeiro dia de hidrólise da solução contendo 4,8% de lactose, observou-se que quanto menor a temperatura de incubação utilizada, maior foi a capacidade de hidrólise do filme de isolado proteico (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de lactose hidrolisada em cinco dias em diferentes temperaturas (média

± desvio padrão) observados durante cinco dias, em diferentes temperaturas.

Temperatura	Tempo (Dias)				
	1	2	3	4	5
4°C	76,99 ^{aA} ± 2,92	75,20 ^{aA} ± 2,58	21,01 ^{aB} ± 2,46	18,01 ^{aB} ± 1,25	8,68 ^{bC} ± 0,32
10°C	71,67 ^{bB} ± 2,66	76,79 ^{aA} ± 1,77	23,73 ^{aC} ± 3,42	19,35 ^{aD} ± 1,33	11,57 ^{aE} ± 0,71
25°C	64,83 ^{cB} ± 2,11	68,47 ^{bA} ± 2,57	16,77 ^{bC} ± 0,62	5,30 ^{bD} ± 0,72	0
50°C	58,49 ^{dA} ± 2,12	23,12 ^{cB} ± 2,09	-	-	-

^{a,b,c,d} Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

^{A,B,C,D,E} Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança

No segundo dia de utilização, verificou-se que, nas soluções que foram incubadas a 10 e 25°C, houve um pequeno aumento da capacidade de hidrólise, em relação ao primeiro dia. Novamente, a taxa de hidrólise apresentou-se maior nas temperaturas mais baixas (4°C e 10°C). O filme incubado a 50°C apresentou uma queda considerável na capacidade de hidrólise da lactose, demonstrando que a alta temperatura possivelmente causou algum dano à enzima.

Na terceira vez em que os filmes foram utilizados, verificou-se relevante queda na capacidade de hidrólise, em todas as temperaturas, tendo variado entre 16,77 e 23,73. Além disso, o filme incubado a 50°C perdeu sua integridade e os testes nesta temperatura foram descontinuados.

Na quarta utilização dos filmes, verificou-se redução significativa ($p < 0,05$) da taxa de hidrólise da lactose nas temperaturas de 10 e 25°C, sendo maior nesta última. A capacidade de hidrólise variou entre 5,3 e 19,35%. Na quinta vez em que os filmes foram utilizados, não foi verificada hidrólise a 25°C. Nas outras temperaturas (4°C e 10°C), houve redução significativa da hidrólise, variando entre 8,68 e 11,57%.

Esses resultados demonstram que os filmes, da maneira como foram elaborados neste trabalho, funcionaram adequadamente apenas durante duas utilizações, somente nas temperaturas de 4°C, 10°C e 25°C, sendo necessárias mais pesquisas, avaliando-se maneiras de se adicionar uma quantidade maior de enzima ao filme ou, até mesmo, outros tipos de imobilização da enzima, que pode ter sido perdida durante as utilizações, justificando a redução da hidrólise durante o tempo.

2.5 Comparação de performance (F.β vs Enzima livre)

A fim de se comparar a performance da hidrólise promovida por F.β no primeiro dia de utilização, com a hidrólise promovida pela enzima livre, na mesma concentração em que esta estava presente no filme, em todas as temperaturas testadas, foi avaliada a concentração de glicose nas respectivas soluções. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 1.

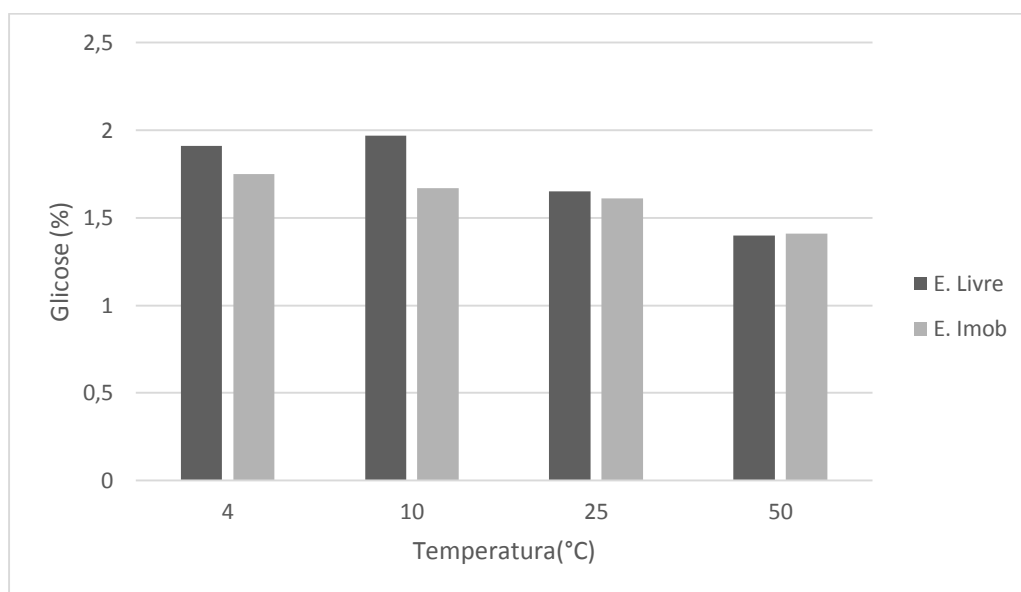


Figura 1 - Concentração de glicose nas soluções de lactose, ao final da primeira utilização dos filmes proteicos contendo β-galactosidase (E.Imob.) e da enzima β-galactosidase livre (E. livre), em diferentes temperaturas.

Observa-se que a concentração de glicose verificada nas soluções adicionadas do filme e da enzima livre foram semelhantes a 25°C e 50°C. Porém, quando incubados em temperaturas mais baixas (4°C e 10°C), verificou-se melhor performance da enzima livre.

Outros autores verificaram maior atividade da enzima livre, quando comparada à imobilizada, como pode ser observado a seguir. Neri et al. (2009) imobilizaram β-galactosidase proveniente de *Aspergillus oryzae* em partículas magnéticas de polisiloxano álcool-polivinílico e avaliaram a hidrólise, tanto da enzima livre quanto da imobilizada, em solução de lactose 50% a 40°C. Ao atingir seis horas, a porcentagem de glicose era de 15% e 9% para a livre e imobilizada, respectivamente.

Szczodrak (2000) imobilizou a β-galactosidase de *Kluyveromyces*

fragilis em esferas de sílica e observou a capacidade de hidrólise da mesma e da enzima livre em uma solução de lactose 5% a 35°C. Na quadragésima oitava hora de teste, a glicose atingiu sua taxa máxima de 2,4%. Nas mesmas condições, a taxa da glicose para a enzima imobilizada foi de 1,7%.

Porém, alguns autores verificaram que a enzima livre foi menos eficiente que a imobilizada. Haider e Husain (2009) imobilizaram a β -galactosidase advinda de *Aspergillus oryzae* em grânulos de amido e alginato de cálcio com uma camada de concavalina A, e pesquisaram sua eficiência e a da enzima livre e em leite e concentrado proteico do soro a 37°C. Na quinta hora de experimento, a taxa de glicose da enzima livre e imobilizada eram respectivamente 1,46% e 1,89%. Os resultados diferem do presente estudo em que a enzima livre foi mais eficiente que a enzima imobilizada.

4 Conclusão

Os filmes desenvolvidos neste trabalho, contendo a enzima β -galactosidase, apresentaram boas propriedades mecânicas. Porém, em relação à solubilidade, serão necessários novos testes a fim de se reduzi-la. A capacidade de hidrólise dos filmes foi adequada apenas durante duas utilizações, e somente nas temperaturas de 4°C, 10°C e 25°C, havendo necessidade de mais pesquisas, avaliando-se maneiras de se adicionar uma quantidade maior de enzima ao filme ou, até mesmo, a realização de outros tipos de imobilização da enzima, que pode ter sido perdida durante as utilizações, justificando a redução da hidrólise durante o tempo.

5 Referências

ALLEONI, A. C. C.; ANTUNES, A. J. Perfil de textura e umidade espremível de géis do albume de ovos recobertos com soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 153-7, 2005.

AMIN, S.; USTUNOL, Z. Solubility and mechanical properties of heat-cured whey protein-based edible films compared with that of collagen and natural casings. **International journal of dairy technology**, v. 60, n. 2, p. 149-153, 2007

ASTM. Tensile properties of thin plastic sheeting. **Annual Book of ASTM Standards**, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, D 882-10, 2010.

CURVELLO, B. Q.; DOS SANTOS VILAR, J. Avaliação sensorial do doce de leite elaborado com soro de leite. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande**, v.15, n.3, p.299-303, 2013.

Di STEFANO, M. et al. Lactose malabsorption, intolerance, and peak bone mass. **Gastroenterology**. Philadelphia, v.122, n.7, p.1793-1799, Jun. 2002.

DI PIERRO, P. et al. Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, p. 744-749, 2006.

FAIRLEY, P. et al. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 438-443, 1996.

FERNANDEZ, L. et al. Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of WPI-based edible films. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 4, p. 415-420, 2007.

GALIETTA, G. et al. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3123-3130, 1998.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International journal of food science & technology**, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

GOUNGA, M. E.; XU, S. Y.; WANG, Z. Film forming mechanism and mechanical and thermal properties of whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan content. **Journal of food biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 501-519, 2010.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate–starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 3, p. 172-177, 2009.

KIM, S. J.; USTUNOL, Z. Solubility and moisture sorption isotherms of whey-protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4388-4391, 2001.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, Anne. Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 8, p. 829-843, 2007.

KUMAR, Bathal Vijaya; VIJAYENDRA, Sistla Venkata Naga; REDDY, Obulam Vijaya Sarathi. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-13, 2015.

LEVITT, Michael; WILT, Timothy; SHAUKAT, Aasma. Clinical implications of lactose malabsorption versus lactose intolerance. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 47, n. 6, p. 471-480, 2013.

LIU, G.; XIONG, Y. L.; BUTTERFIELD, D. A. Chemical, physical, and gel forming properties of oxidized myofibrils and whey and soy proteins isolate. **Food Chemistry and Toxicology**, v.65, n.5, p.811-818, 2000.

MACLEOD, G. S.; FELL, J. T.; COLLETT, J. H. Studies on the physical properties of mixed pectin/ethylcellulose films intended for colonic drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 157, n. 1, p. 53-60, 1997.

MATTAR, R.; MAZO, D.F.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, mar-abr. 2010.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Sorbitol-vs glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 841-845, 1994.

MIN, S.; KROCHTA, J. M. Inhibition of *Penicillium commune* by Edible Whey Protein Films Incorporating Lactoferrin, Lacto-ferrin Hydrolysate, and Lactoperoxidase Systems. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p. M87-M94, 2005.

MIN, S.; KROCHTA, J. M. Ascorbic Acid-Containing Whey Protein Film Coatings for Control of oxidation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 2964-2969, 2008.

NERI, D. F. M. et al. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 92-99, 2009.

OSSES, J. et al. Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 125-131, 2009.

PÉREZ-GAGO, M. B.; NADAUD, P.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1034-1037, 1999.

PÉREZ-GAGO, M. B. et al. Effect of Solid Content and Lipid Content of Whey Protein Isolate-Beeswax Edible Coatings on Color Change of Fresh-cut Apples. **Journal of food science**, v. 68, n. 7, p. 2186-2191, 2003.

RAMOS, Ó. L. et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 110-122, 2013.

RANCIARO, Alessia et al. Genetic origins of lactase persistence and the spread of pastoralism in Africa. **The American Journal of Human Genetics**, v. 94, n. 4, p. 496-510, 2014.

SAVAIANO, Dennis A. Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. **The American journal of clinical nutrition**, v. 99, n. 5, p. 1251S-1255S, 2014.

SCHMID, M. *et al.* Effects of hydrolysed whey proteins on the techno-functional

characteristics of whey protein-based films. **Materials**, v. 6, n. 3, p. 927-940, 2013.

SEQUEIRA, Erica et al. Lactose intolerance: genetics of lactase polymorphisms, diagnosis and novel therapy. **Biomedical Reviews**, v. 25, p. 35-44, 2014.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food research international**, v. 39, n. 5, p. 639-644, 2006.

SHAW, N. B. et al. Physical properties of WPI films plasticized with glycerol, xylitol, or sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 164-167, 2002.

SHAUKAT, Aasma et al. Systematic review: effective management strategies for lactose intolerance. **Annals of internal medicine**, v. 152, n. 12, p. 797-803, 2010.

SILVEIRA, Themis Reverbel da; PRETTO, Fernanda Menegaz. Nutritional status and breath hydrogen test with lactose and lactulose in children. **Jornal de pediatria**, v. 78, n. 2, p. 89-90, 2002.

SMITHERS, Geoffrey W. Whey and whey proteins—from 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008.

SOTHORNVIT, R. et al. Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 279-284, 2010.

STATSOFT, INC. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2000.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 6, p. 631-637, 2000.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.2, p. 420-430, 2009.

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, v. 82, n. 3, p. 338-345, 2009.

ZHOU, J. J.; WANG, S. Y.; GUNASEKARAN, S. Preparation and characterization of whey protein film incorporated with TiO₂ nanoparticles. **Journal of food science**, v. 74, n. 7, p. N50-N56, 2009.

5 CONCLUSÕES

Os filmes produzidos foram eficientes na hidrólise da lactose, quando utilizados uma ou duas vezes, nas temperaturas de 4°C, 10°C e 25°C, porém a taxa de hidrólise foi bastante reduzida a partir da terceira utilização dos mesmos.

6 REFERÊNCIAS

ALLEONI, A. C. C.; ANTUNES, A. J. Perfil de textura e umidade espremível de géis do albume de ovos recobertos com soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 153-7, 2005.

ALMON, R. *et al.* Prevalence and trends in adult-type hypolactasia in different age cohorts in Central Sweden diagnosed by genotyping for the adult-type hypolactasia-linked LCT-13910C> T mutation. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 42, n. 2, p. 165-170, 2007

BROWN-ESTERS, O.; MC NAMARA, P.; SAVAIANO, D. Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 98-103, 2012.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

CURVELLO, B. Q.; DOS SANTOS VILAR, J. Avaliação sensorial do doce de leite elaborado com soro de leite. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande**, v.15, n.3, p.299-303, 2013.

Di STEFANO, M. *et al.* Lactose malabsorption, intolerance and peak bone mass. **Gastroenterology**. Philadelphia, v.122, n.7, p.1793-1799, Jun. 2002.

ENATTAH, N. S. *et al.* Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. **Nature genetics**, v. 30, n. 2, p. 233-237, 2002.

FOX, P. F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 10:522-35, 1988

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Lactose. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Londres: Blackie Academic & Professional, 478p. 1998.

FOX, P. F. Lactose: Chemistry and properties. In: **Advanced dairy chemistry**. Springer New York, 2009. p. 1-15.

FRIEDRICH, Deise C. *et al.* The lactase persistence genotype is a protective factor for the metabolic syndrome. **Genetics and molecular biology**, v. 37, n. 4, p. 611-615, 2014.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, Setembro/Outubro, p. 43-46, 2001

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

HOURIGAN, J. A. *et al.* Lactose: Chemistry, Processing, and Utilization. **Advances in**

dairy ingredients, p. 21-41, 2012.

HURLEY, W. L. **Lactose Synthesis**. Lactation Biology. Department of Animal Sciences, University of Illinois, Urbana- Champaign. 2009.

KHWALDIA, Khaoula et al. Milk proteins for edible films and coatings. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 239-251, 2004.

KLEIN, Manuela P. et al. High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate polymers**, v. 95, n. 1, p. 465-470, 2013.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, Anne. Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 8, p. 829-843, 2007.

KUMAR, Bathal Vijaya; VIJAYENDRA, Sistla Venkata Naga; REDDY, Obulam Vijaya Sarathi. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-13, 2015.

LEVITT, Michael; WILT, Timothy; SHAUKAT, Aasma. Clinical implications of lactose malabsorption versus lactose intolerance. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 47, n. 6, p. 471-480, 2013.

LI, S. C. *et al.* Isolation and characterization of jack bean beta-galactosidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 17, p. 6786-6791, 1975.

LI, S. C. *et al.* Purification and characterization of isoforms of β -galactosidases in mung bean seedlings. **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 349-359, 2001.

LIU, G.; XIONG, Y. L.; BUTTERFIELD, D. A. Chemical, physical, and gel forming properties of oxidized myofibrils and whey and soy proteins isolate. **Food Chemistry and Toxicology**, v.65, n.5, p.811-818, 2000.

LOMER, M.C.E.; PARKES, G.C.; SANDERSON, J.D. Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. Oxford, v.27, n.2, p.93-103, Jan. 2008.

MACCIOTTA, N. P. P. *et al.* Use of multivariate factor analysis to define new indicator variables for milk composition and coagulation properties in Brown Swiss cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 12, p. 7346-7354, 2012.

MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MATTAR, R. *et al.* Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. **Nutrition Journal**. London, v.8, p.46, Oct. 2009.

MATTAR, R.; MAZO, D.F.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, mar-abr. 2010.

MEDEIROS, F. O. D. **Adsorção e purificação da enzima beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica.** Universidade Federal Do Rio Grande. Rio Grande, RS, p. 104. 2008.

MIN, S.; KROCHTA, J. M. Inhibition of *Penicillium commune* by Edible Whey Protein Films Incorporating Lactoferrin, Lacto-ferrin Hydrolysate, and Lactoperoxidase Systems. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p. M87-M94, 2005.

MIN, S.; KROCHTA, J. M. Ascorbic Acid-Containing Whey Protein Film Coatings for Control of oxidation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 2964-2969, 2008.

NARANJO, Gabriela B. et al. The kinetics of Maillard reaction in lactose-hydrolysed milk powder and related systems containing carbohydrate mixtures. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3790-3795, 2013

NOLLET, L. M. L. **Food biochemistry and food processing.** Blackwell Publishing, 2012.

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Formation and properties of whey protein films and coatings. **Protein-based films and coatings**, p. 159-180, 2002.

PÉREZ-GAGO, M. B. et al. Effect of Solid Content and Lipid Content of Whey Protein Isolate-Beeswax Edible Coatings on Color Change of Fresh-cut Apples. **Journal of food science**, v. 68, n. 7, p. 2186-2191, 2003.

POMERANZ, Y. **Functional properties of food components.** Academic Press, 2012.

RAM, E. C. **β -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* in batch and continuous culture.** Durban University of Technology. Durban, South Africa. 2011.

RANCIARO, Alessia et al. Genetic origins of lactase persistence and the spread of pastoralism in Africa. **The American Journal of Human Genetics**, v. 94, n. 4, p. 496-510, 2014.

REHMAN, S.U. Reduced Lactose and Lactose-Free Dairy Products In: **Advanced Dairy Chemistry Volume 3.** Springer US, 2009. p. 98-103.

ROBAYO-TORRES, C. C.; QUEZADA-CALVILLO, R.; NICHOLS, B. L. Disaccharide digestion: clinical and molecular aspects. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 3, p. 276-287, 2006.

SANTIAGO, P. A. *et al.* Estudo da produção de b-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, Vol.24, n. 4, Out/Dez 2004.

SAMMEL, L. M. et al. Identifying constituents of whey protein concentrates that reduce the pink color defect in cooked ground turkey. **Meat science**, v. 77, n. 4, p. 529-539, 2007.

SAVAIANO, Dennis A. Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. **The American journal of clinical nutrition**, v. 99, n. 5, p. 1251S-1255S, 2014.

SEQUEIRA, Erica et al. Lactose intolerance: genetics of lactase polymorphisms, diagnosis and novel therapy. **Biomedical Reviews**, v. 25, p. 35-44, 2014.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food research international**, v. 39, n. 5, p. 639-644, 2006

SHIMAZU, Angélica Aimoto; MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria Victória Eiras. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 79-88, 2007.

SILVEIRA, Themis Reverbel da; PRETTO, Fernanda Menegaz. Nutritional status and breath hydrogen test with lactose and lactulose in children. **Jornal de pediatria**, v. 78, n. 2, p. 89-90, 2002.

SMITHERS, Geoffrey W. Whey and whey proteins—from 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008.

STUCHELL, Y. M.; KROCHTA, J. M. Edible coatings on frozen king salmon: effect of whey protein isolate and acetylated monoglycerides on moisture loss and lipid oxidation. **Journal of food science**, v. 60, n. 1, p. 28-31, 1995.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Physical-chemical profile of the whey of Minas-padrão and Mozzarella cheeses produced in some regions of Minas Gerais state. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

TEMESGEN, Melese; RATTA, Negussie. Risk of Lactose Intolerance and Dairy Food Nutrition: A Review. **Food Science and Quality Management**, v. 37, p. 19-31, 2015.

TISHKOFF, S. A. *et al.* Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. **Nature genetics**, v. 39, n. 1, p. 31-40, 2007.

VIEIRA, Melissa Gurgel Adeodato et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254-263, 2011.

WANG, Yilin et al. Small intestinal bacterial overgrowth is an uncommon cause of false positive lactose hydrogen breath test among patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome in Asia. **Journal of gastroenterology and hepatology**, 2014.

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, v. 82, n. 3, p. 338-345, 2009.