

# ESTUDO DA HIDRÓLISE DA LACTOSE NA OBTENÇÃO DE LEITE LACTOSE HIDROLISADO MICROFILTRADO E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO- QUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DA SUA VIDA ÚTIL

LÍGIA K. O. HOSHINO<sup>1</sup>; LEILA M. SPADOTI<sup>2</sup>; ADRIANA T.S. ALVES<sup>3</sup>; ADRIANE E.  
C. ANTUNES<sup>3\*</sup>; ALCINA M. LISERRE<sup>3</sup>; ARIENE G.F. VAN DENDER<sup>3</sup>; DARLILA A.  
GALLINA<sup>3</sup>, IZILDINHA MORENO<sup>3</sup>

N° 0901015

## RESUMO

A intolerância à lactose é o tipo mais comum de intolerância à carboidratos, afetando cerca de 70% da população adulta mundial. No mercado nacional existe apenas leite longa vida semi-desnatado ou integral lactose hidrolisado. Estes leites geralmente são mais escuros (Maillard), com sabor cozido, podendo apresentar menor valor nutricional devido a perdas por ação do calor. Este projeto teve por objetivos estudar a melhor condição de hidrólise da lactose na obtenção de um leite desnatado pasteurizado lactose-hidrolisado microfiltrado (**LDPLHM**), determinar as características físico-químicas e de cor instrumental do produto obtido e acompanhar a vida de prateleira deste leite de modo a determinar, físico-quimicamente, qual a vida útil deste produto. Concluiu-se que leites **LDPLHM** apresentam vida de prateleira de 15 a 20 dias quando estocados a 5°C e de 10 a 15 dias quando armazenados a 10°C.

## ABSTRACT

Lactose intolerance is the most common carbohydrate intolerance upsetting around 70% of adult world population. On the Brazilian market only exist whole and 1% fat UHT lactose hydrolyzed milk. Such milks usually present discoloration due to Maillard reaction, cooked flavor, and can present lower nutritional values due to losses induced by the thermal treatment. This project had as objective to study the optimal condition of lactose hydrolysis on the production of pasteurized lactose hydrolyzed micro-filtrated milk (**LDPLHM**), evaluation of the physical chemical parameters and instrumental color

---

1. Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, FEA/UNICAMP, Campinas-SP

2 Orientadora: Pesquisadora, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, ✉ Ispadoti@ital.sp.gov.br

3. Colaboradores: Pesquisadoras, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP. 3\* Colaboradora: Pesquisadora, FCA/UNICAMP, Limeira-SP

and to follow the shelf life of the product obtained in a way of to establish the shelf life with physical chemical parameters. It was concluded that milks **LDPLHM** presented shelf life of 15 to 20 days when stored at 5°C and of 10 to 15 days when stored at 10°C.

## **INTRODUÇÃO**

A síndrome da intolerância à lactose consiste em uma inabilidade para digerir completamente a lactose, o açúcar predominante do leite, devido a ausência ou baixa concentração da enzima beta-galactosidase, comumente chamada lactase, no intestino delgado. Considerando-se as vantagens que o leite pode conferir à saúde humana, seu consumo deve ser estimulado. Porém, a fim de evitar que ele cause problemas em indivíduos intolerantes à lactose uma alternativa seria o consumo de leite tratado com lactases comerciais, os chamados leites com baixo teor de lactose. Encontram-se disponíveis no mercado nacional leites com baixo teor de lactose do tipo longa-vida integrais ou semi-desnatados. Os chamados leites longa vida são leites submetidos a um processo térmico denominado UHT (*ultra high temperature*) (132-135°C/ 2 a 4 segundos). Atualmente não há oferta, no país, de leite com baixo teor de lactose desnatado, nem deste tipo de leite tratado por outro método a não ser o UHT. Estes leites geralmente são mais escuros, devido a maior reação de Maillard, têm sabor cozido e podem apresentar menor valor nutricional por ação do calor.

A fim de minimizar esses defeitos e poder, ao mesmo tempo, ter um leite com uma vida estendida, uma alternativa seria utilizar a pasteurização (72 a 75°C/15 a 20 segundos) em combinação com a microfiltração, processo este que permite a remoção física, por meio de membranas semipermeáveis, da maior parte da carga microbiana do leite, em condições amenas de temperatura (menores que 50°C).

## **OBJETIVOS**

a) Desenvolvimento de leite desnatado pasteurizado microfiltrado, com baixo teor de lactose. Para tanto estudou-se a melhor condição de hidrólise da lactose (concentração de lactase X tempo/temperatura de reação); b) Determinação das características físico-químicas e da cor instrumental do produto obtido e c) Avaliação durante estocagem refrigerada a 5 e 10°C, de modo a determinar, físico-quimicamente, qual a vida útil deste produto.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Neste projeto foram realizados 3 processamentos de LDPLHM. Foi utilizado como matéria-prima leite pasteurizado desnatado. Este leite foi entregue no TECNOLAT/ITAL um dia após sua pasteurização. O leite, assim que recebido, foi adicionado da enzima lactase e quando o mesmo atingiu o grau de hidrólise mínimo de 90%, foi microfiltrado. A microfiltração foi realizada em uma unidade piloto de microfiltração - MS1 (Tetra-Laval, França), equipada com membranas cerâmicas UTP Membralox (Societedes Céramiques Techniques, Bazet, França), com tamanho médio de diâmetro de poro de 1,4 µm. O leite microfiltrado foi envasado em garrafas de vidro estéreis (frasco tipo SCHOTT) e estocado em câmaras frias a 5 e 10 °C.

### **Testes para determinação da melhor condição de hidrólise da lactose do leite**

Para a hidrólise da lactose do leite foi empregada a enzima lactase, de duas marcas diferentes (A e B), nas concentrações de 0,4; 1 e 2 mL por litro de leite e nos tempos/temperaturas de reação de 3hs/40°C e de 21hs/10°C. O grau de hidrólise do leite, nos testes, foi acompanhado de forma estimativa por crioscopia (BRASIL; 2003). Outras análises para se determinar a melhor relação entre tempo, temperatura e concentração da lactase, para obtenção do grau de hidrólise desejado no leite, foram: a medição do pH e a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos presentes no leite (APHA, 2004), ambas feitas antes e após a hidrólise.

Após a escolha da melhor combinação de concentração de lactase, tempo e temperatura de reação, a partir dos resultados obtidos dos testes anteriormente descritos, em todos os processamentos realizados o grau de hidrólise passou a ser determinado por crioscopia (crioscópio digital Lactron M90) e confirmado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (BURGNER; FEINHBERG, 1992).

### **Caracterização físico-química dos LDPLHM e Avaliação da cor**

Os leites LDPLHM obtidos foram submetidos, com 1 dia de estocagem, as seguintes análises: Crioscopia – BRASIL (2003); Densidade- IAL (2005); Extrato seco total (EST) – IDF (1982); Lactose – ACTON (1977); Gordura – IAL (2005); Nitrogênio não caseínico (NNC) – AOAC (1995); Nitrogênio não protéico (NNP) – ASCHAFFENBURG; DREWRY (1959); Nitrogênio Total (NT) – AOAC (1995); Proteína

total (PT) – O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio total pelo fator 6,38; Cinzas – HORWITZ (1975); pH – utilizando-se um potenciômetro (pH-metro) digital modelo MICRONAL B-375; Acidez – IAL (2005).

O leite LDPLHM obtido, assim como amostras comerciais de leite longa vida lactose hidrolisados, foram analisados quanto a cor CIELab pelo colorímetro portátil de reflexão CR-400., no primeiro dia de estocagem refrigerada.

### **Acompanhamento da vida de prateleira**

A vida de prateleira dos leites LDPLHM, estocados a 5 e 10°C, foi avaliada por meio de análises físico-químicas (pH, acidez titulável e proteólise), durante um período de 30-40 dias. Para avaliação da proteólise foi adotado o chamado índice de proteólise (IP). Este índice corresponde à diminuição da caseína (CN) como porcentagem da proteína verdadeira (PV), onde: Caseína (CN) = (NT-NNC) X 6,38 e PV = (NT – NNP) X 6,38. Para determinação do fim da vida de prateleira do LDPLHM adotou-se a metodologia proposta por Elwell e Barbano (2006), os quais trabalharam com leite desnatado pasteurizado microfiltrado não hidrolisado. Segundo estes autores, a vida útil de um leite microfiltrado pasteurizado chega ao fim quando o mesmo apresenta um IP igual a 4,76%. Este valor foi estabelecido como o nível em que 50% do painel sensorial detecta sabor estranho ou amargo no leite.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Determinação da melhor condição de hidrólise da lactose**

O uso de 0,4 a 2 mL de lactase/L de leite, em temperatura/tempo de reação igual a 40°C/ 3 hs, levou à obtenção de amostras de leite coaguladas, por acidificação microbiana. Assim, essas condições foram descartadas para uso neste projeto.

Nos testes realizados utilizando o binômio 10°C/21hs, os resultados obtidos revelaram que uma hidrólise mínima da lactose de 90% foi conseguida utilizando a lactase A nas concentrações de 0.4; 1 e 2mL/ L de leite e na concentração de 2mL/L de leite, no caso da enzima B. O uso dessas concentrações não causou alterações significativas no pH do leite, portanto, os resultados de pH não serviram como parâmetro de escolha. Com relação à contagem total de microrganismos mesófilos, em todas as

concentrações utilizadas houve um acréscimo na contagem total, no entanto, na concentração de 0,4mL da marca A houve um aumento significativamente menor. Assim, a concentração de 0,4 mL/L de leite, da enzima A, em uma temperatura de estocagem de 10°C / 21 horas foi a escolhida para a hidrólise dos leites deste projeto.

### **Composição físico-química dos leites LDPLHM e avaliação de cor**

Os LDPLHM apresentaram a seguinte composição físico-química média: pH=6,72±0,09; Acidez titulável (°D) =15,52±0,42; EST (%)=8,34±0,11; Lactose (%)<0,2; Cinzas (%)=0,73±0,01; Gordura (%)=0±0; Proteína (%)=2,94±0,09; Densidade (g/mL)= 1,034±0,001 e Crioscopia (°H)= -0,785±0,062. De acordo com os resultados obtidos, os valores de densidade e acidez titulável, bem como os teores de proteína e de gordura dos leites LDPLHM estão dentro dos critérios estabelecidos pela Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002), para leite pasteurizado tipo A. Com relação aos valores de pH e de sais, a legislação não determina quais as faixas de valores adequadas para estes parâmetros. Porém, estes valores encontram-se dentro dos intervalos citados na literatura internacional de lácteos (FOX; McSWEENEY, 1998) .

Embora visualmente as amostras comerciais de leite hidrolisado se apresentassem mais “escuras” do que as de leite hidrolisado microfiltrado, o parâmetro luminosidade (L\*) apresentou valor semelhante entre todas as amostras.

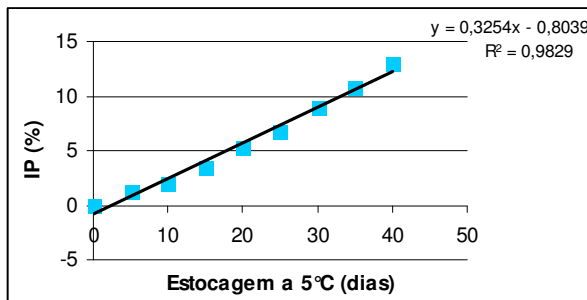
### **Avaliação de parâmetros físico-químicos do leite LDPLHM durante a estocagem**

Na **TABELA 1** e nas **FIGURAS 1** e **2** encontram-se os resultados médios das avaliações físico-químicas dos leites LDPLHM, durante a estocagem. Considerando-se que nesse trabalho adotou-se que a vida de prateleira de um leite LDPLHM chegaria ao fim quando o mesmo apresentasse um índice de proteólise igual ou superior a 4,76%, as amostras estocadas a 5°C apresentaram durabilidade média entre 15 a 20 dias, segundo os dados apresentados na **TABELA 1** e **FIGURA 1**. No caso dos leites estocados a 10°C, observou-se um prazo de validade médio de 10 a 15 dias. (**TABELA 1** e **FIGURA 2**). No Brasil, de modo geral, leites pasteurizados tipo A tendem a apresentar uma vida de prateleira de 5 a 6 dias. Assim, a microfiltração em combinação com o tratamento HTST pode ser utilizada para aumentar a vida útil deste leite refrigerado.

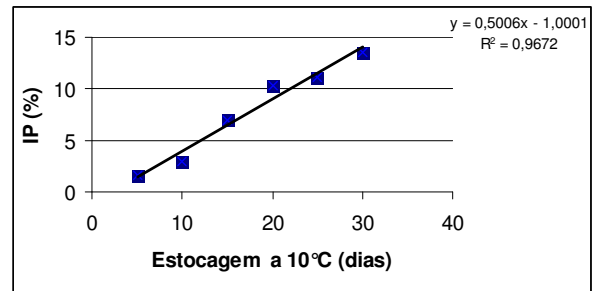
**Tabela 4:** Caracterização físico-química média (n=3 processamentos) das amostras de LDPLHM, durante estocagem a 5 e 10°C.

TEMPO	PARÂMETRO							
	pH	Acidez	NT	NNC	NNP	PV	CN/PV(%) <sup>2</sup>	IP(%) <sup>3</sup>
<b>LDPLHM<sup>1</sup> 5°C</b>								
Tempo 0 (1dia)	6,72	15,52	0,4609	0,1308	0,0326	2,7321	77,1029	0,00
Tempo 1 (5dias)	6,74	15,36	0,4567	0,1358	0,0343	2,6949	75,9848	1,29
Tempo 2 (10dias)	6,78	15,07	0,4630	0,1398	0,0324	2,7472	75,1030	2,00
Tempo 3 (15dias)	6,76	16,05	0,4500	0,1440	0,0351	2,6471	73,7272	3,37
Tempo 4 (20dias)	6,76	15,32	0,4556	0,1545	0,0336	2,6924	71,3465	5,25
Tempo 5 (25dias)	6,57	18,49	0,4806	0,1716	0,0387	2,8194	69,9179	6,68
Tempo 6 (30dias)	6,64	18,00	0,4841	0,1841	0,0400	2,8334	67,6177	8,98
Tempo 7 (35dias)	6,64	17,02	0,4695	0,1898	0,0451	2,7077	65,7399	10,86
Tempo 8 (40dias)	6,66	18,00	0,4731	0,1979	0,0420	2,7506	63,6784	12,92
<b>LDPLHM<sup>1</sup> 10°C</b>								
Tempo 0 (1 dia)	6,72	15,52	0,4609	0,1308	0,0326	2,7321	77,1029	0,00
Tempo 1 (5 dias)	6,69	15,36	0,4521	0,1372	0,0347	2,6630	75,4667	1,64
Tempo 2 (10 dias)	6,71	15,70	0,4537	0,1417	0,0341	2,6777	74,2833	2,89
Tempo 3 (15 dias)	6,69	17,27	0,4804	0,1717	0,0346	2,8442	69,2463	6,99
Tempo 4 (20 dias)	6,75	16,54	0,4748	0,1846	0,0342	2,8110	65,8647	10,37
Tempo 5 (25 dias)	6,63	15,56	0,4761	0,1903	0,0373	2,7995	65,1322	11,11
Tempo 6 (30 dias)	6,42	22,86	0,4610	0,1941	0,0352	2,7166	62,6820	13,56

LDPLHM<sup>1</sup> = leite desnatado pasteurizado lactose hidrolisado microfiltrado, CN/PV(%)<sup>2</sup> = caseína como porcentagem de proteína verdadeira; IP(%)<sup>3</sup> = índice de proteólise durante a estocagem, correspondendo à diminuição da caseína como porcentagem de proteína verdadeira.



**FIGURA 1:** Média dos Índices de Proteólise dos LDPLHM durante estocagem a 5°C.



**FIGURA 2:** Média dos Índices de Proteólise dos LDPLHM durante estocagem a 10°C.

Leites submetidos aos processos de microfiltração e pasteurização (72°C /15 seg.) são encontrados disponíveis comercialmente no Canadá e em países do norte europeu, apresentando uma vida útil média de 35 dias a 6°C. Apesar da existência comercial deste tipo de leite, há poucos artigos científicos caracterizando este tipo de produto físico-quimicamente e sensorialmente. Entre estes trabalhos, há o realizado por Elwell e Barbano (2006), no qual amostras de leite desnatado microfiltrado e pasteurizado armazenadas a temperatura de 6,1°C atingiram IP de 4,76% com 32 dias de estocagem.

Os leites comercializados no Canadá e em países do norte europeu, bem como os obtidos por Elwell e Barbano (2006) apresentam uma vida de prateleira maior do que a obtida para os leites deste projeto. Um dos motivos para essa menor vida de prateleira obtida para os LDPLHM certamente foi o fato do produto não ter passado por envase asséptico, o que comprometeu a vida de prateleira do produto. Além disso, em leite pasteurizado microfiltrado, a atividade proteolítica ocorre em grande parte devido à ação da plasmina, protease natural do leite cuja atividade é afetada pela concentração de células somáticas no mesmo. Considerando-se que a contagem de células somáticas do leite brasileiro (limite máximo de 1.000.000 cél/ml) tende a ser mais alta do que no Canadá (limite de 500.000 cél/ml,) e em países da União Européia (contagem máxima de 400.000 cél./ml) isso implicaria em maior concentração e atividade da plasmina no mesmo e conseqüentemente em maior atividade proteolítica e em redução da vida de prateleira do produto.

## CONCLUSÕES

- A melhor condição de hidrólise da lactose obtida foi: concentração de lactase A igual a 0,4 mL/L de leite, tempo/temperatura de reação de 21 horas a 10°C.
- As características físico-químicas do LDPLHM obtido encontram-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa 51 e/ou pela literatura internacional

especializada em lácteos. Visualmente, as amostras de LDPLHM apresentaram-se mais claras do que as amostras comerciais de leite lactose hidrolisado avaliadas, embora os valores de luminosidade ( $L^*$ ) não tenham apresentado grandes diferenças entre si.

- Os leites estocados a 5°C tiveram vida de prateleira de 15 a 20 dias e os estocados a 10°C de 10 a 15 dias, considerando-se que o término da vida útil dos leites LDPLHM era obtido quando os mesmos atingiam um índice de proteólise igual ou superior a 4,76.

## AGRADECIMENTO

CNPq e FAPESP

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16. ed. Washington, 1995.

APHA- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 17th ed. Washington : American Public Health Association, 2004.

ASCHAFFENBURG, R; DREWRY, J. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 15, London, 1959. **Proceedings**. London: International Dairy Federation, 1959. v.3, p.1631-1637.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa DAS nº 22, de 14 de abril de 2003. Portaria Ministerial, nº 574, de 8 de Dezembro de 1998. In: **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para controle de Leite e Produtos Lácteos**. Brasília, DF, 2003, 108P.

BURGNER, E.; FEINBERG, M. Determination of mono- and disaccharides in foods by interlaboratory study: quantification of bias components for liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 443-464, 1992.

ELWELL, M.W.; BARBANO, D.M. Use of microfiltration to improve fluid milk quality. **Journal of Dairy Science**, v.89, E. Suppl., p:E20-E30,2006.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry And Biochemistry**. 1 ed. Londres: Blackie Academic & Professional, 1998, 478p.

HORWITZ, W. ed. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 1975, v.II.

IAL-INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. Brasília: MS, 2005. 1018p

IDF-INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of the total solids content of cheese and processed cheese**. Bruxelas: FIL/IDF, 1982. 2p. (FIL/IDF, 4A).