

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a
Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Luismar Marques Porto, PhD

Co-Orientador: Prof. José Carlos Cunha Petrus, Dr.Eng.

CLAUDIMIR ANTONIO CARMINATTI

FLORIANÓPOLIS, 2001

Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis*

por

CLAUDIMIR ANTONIO CARMINATTI

Dissertação julgada para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área e concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Luismar Marques Porto, PhD
Orientador

Prof. José Carlos Cunha Petrus, Dr.Eng.
Co-Orientador

Profa. Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza, Dr.Eng.
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:

Prof. José Carlos Cunha Petrus, Dr.Eng. (EQA-UFSC) – Presidente

Prof. José Alexandre Borges Valle, Dr.Eng. (FURB) – Membro Externo

Prof. Agenor Furigo Junior, D.Sc. (EQA-UFSC) – Membro Interno

Prof. José Antonio Ribeiro de Souza, D.Sc. (EQA-UFSC) – Membro Interno

Florianópolis, 27 de junho de 2001

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas e no Laboratório de Processos de Separação por Membranas do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Luismar Marques Porto e José Carlos Cunha Petrus, pela orientação, compreensão e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Fátima de Jesus Bassetti, pelo apoio e amizade nos momentos mais necessários;

Aos meus amigos Luis Sergio, Estela, Amarildo, César e Meire pela companhia, amizade e incentivo;

Aos professores, coordenação e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSC, em especial ao sempre prestativo Edevilson, por todo o auxílio prestado;

À FUNCITEC, à UNOESC e ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC pela oportunidade;

À minha família, pelo incentivo e apoio nos momentos mais difíceis desta jornada.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	viii
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 - Soro de leite	6
3.2 - Lactose	11
3.3 - Lactase	15
3.4 - Hidrólise da lactose	18
3.4.1 - Formação de oligossacarídeos	19
3.4.2 - Métodos de hidrólise da lactose	21
3.4.3 - Cinética da hidrólise da lactose	27
3.5 - Processos de separação com membranas	30
3.5.1 - Separação por ultrafiltração	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 - Materiais	37
4.1.1 - Substrato	37
4.1.2 - Enzima	37
4.1.3 - Membrana	38

4.1.4 - Equipamentos utilizados na caracterização da membrana	38
4.1.5 - Equipamento utilizado no ensaio de ultrafiltração	38
4.1.6 - Materiais utilizados nas análises dos produtos	40
4.2 - Métodos	40
4.2.1 - Caracterização da membrana	40
4.2.2 - Ensaio laboratoriais	41
4.2.3 - Análise das amostras retiradas	43
4.2.4 - Determinação do grau de hidrólise	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 - Comparação da hidrólise enzimática da lactose em um reator em batelada e um reator a membrana	47
5.2 - Influência da temperatura, pH e concentração da enzima na hidrólise da lactose	52
5.2.1 - Influência da temperatura	52
5.2.2 - Influência do pH	54
5.2.3 - Influência da concentração da enzima	55
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	57
6.1 - Conclusões	57
6.2 - Sugestões	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1	- Estruturas da lactose, galactose e glicose	18
Figura 3.2	- Processos de hidrólise da lactose	22
Figura 3.3	- Principais aplicações para a osmose inversa, ultrafiltração e microfiltração	33
Figura 4.1	- Célula de ultrafiltração com fluxo perpendicular	39
Figura 5.1	- Comparação do grau de hidrólise da lactose em glicose realizada em um reator em batelada e um reator a membrana (temperatura 40 °C, pH 6, concentração de enzima 1250 mg.L ⁻¹)	47
Figura 5.2	- Comparação do grau de hidrólise da lactose do permeado e do retentado (temperatura 40 °C, pH 6, concentração de enzima 1250 mg.L ⁻¹)	48
Figura 5.3	- Microfotografia da fratura de uma membrana assimétrica de ultrafiltração indicando suas diferentes regiões morfológicas	49
Figura 5.4	- Comparação do grau de hidrólise da lactose da fração do permeado imediatamente inativada e da fração do permeado mantido em condições ótimas (37 °C) e inativada após 1 hora	50
Figura 5.5	- Análise de FTIR da membrana nova e da membrana utilizada no ensaio de hidrólise (temperatura 40 °C, pH 6, concentração de enzima 1250 mg.L ⁻¹)	52
Figura 5.6	- Grau de hidrólise da lactose em função do tempo a temperaturas de 30, 35, 40, 45 e 50 °C (pH 6, concentração de enzima 1250 mg.L ⁻¹)	53
Figura 5.7	- Grau de hidrólise da lactose em função do tempo a pH 5, 6 e 7 (temperatura 40 °C, concentração de enzima 1250 mg.L ⁻¹)	54
Figura 5.8	- Grau de hidrólise da lactose em função do tempo a concentrações de enzima de 400, 1250 e 2000 mg.L ⁻¹ (temperatura 40 °C, pH 6)	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1	- Composição média dos principais componentes do soro lácteo	7
Tabela 3.2	- Algumas possibilidades de aproveitamento de soros lácteos	8
Tabela 3.3	- Poder adoçante relativo de açúcares	12
Tabela 3.4	- Produtos obtidos por modificação enzimática e/ou química da lactose ...	14
Tabela 3.5	- Possíveis fontes de obtenção de β -galactosidase	15
Tabela 3.6	- Propriedades das lactases	16
Tabela 3.7	- Produtos desenvolvidos com a utilização de β -galactosidase	17
Tabela 3.8	- Principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas	25
Tabela 3.9	- Comparação entre diferentes técnicas de imobilização	26
Tabela 3.10	- Alguns modelos cinéticos enzimáticos	28
Tabela 3.11	- Parâmetros cinéticos obtidos utilizando a enzima β -galactosidase	29
Tabela 3.12	- Exemplos de aplicações de processos de separação com membranas	30
Tabela 3.13	- Principais processos com membranas e força motriz necessária à separação	32
Tabela 3.14	- Aplicações da ultrafiltração em processos industriais	33
Tabela 3.15	- Novos enfoques relativos a processos com membranas	36
Tabela 5.1	- Condições operacionais utilizadas nos ensaios de hidrólise da lactose	46

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ap	Absorbância do padrão na determinação da glicose
At	Absorbância do teste na determinação da glicose
C _p	Concentração do produto ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
C _{pa}	Concentração do padrão na determinação da glicose (mg.dL^{-1})
C _s	Concentração do substrato ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
C _t	Concentração do teste na determinação da glicose (mg.dL^{-1})
Da	Dalton, unidade de massa molecular (g.mol^{-1})
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio ($\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$)
DQO	Demanda Química de Oxigênio ($\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$)
DMF	N'N'-dimetilformamida
FTIR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
FTIR-ATR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier - Reflexão Interna
GOD	Glicose oxidase
K _I	Constante de inibição ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
K _m	Constante de Michaelis-Menten ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NLU	Neutral Lactose Unit (Unidades de Lactose Neutra)
POD	Peroxidase
PVDF	Polifluoreto de vinilideno comercial
V	Velocidade de hidrólise ($\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
V _m	Velocidade máxima de hidrólise ($\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

RESUMO

O soro de leite é o subproduto principal da indústria laticínia. Devido ao seu elevado poder poluente e a dificuldade de sua eliminação, as empresas estão buscando alternativas para o reaproveitamento dos componentes do soro, principalmente das proteínas e da lactose.

A lactose é um dissacarídeo que pode ser hidrolisado através dos métodos ácido ou enzimático, fornecendo como produtos glicose e galactose. No processo enzimático é utilizada β -D-galactosidase, que pode ser extraída de plantas, animais, fungos, bactérias e leveduras.

Neste trabalho, a lactose presente no permeado do soro de leite foi hidrolisada em um reator a membrana utilizando-se lactase (β -D-galactosidase) *Kluyveromyces lactis* Maxilact® L-5000. O grau de hidrólise foi determinado para diversas condições operacionais de temperatura (30, 35, 40, 45 e 50 °C), pH (4, 5, 6 e 7) e concentração de enzima (400, 1250 e 2000 mg.L⁻¹). Foram obtidas conversões entre 90 e 100% para temperaturas entre 30 e 40 °C, pH 6 e concentração de enzima de 1250 mg.L⁻¹.

A hidrólise foi realizada em um reator utilizando uma membrana de PVDF-DMF com alta porosidade que permitiu a passagem de compostos com baixa massa molecular, como a glicose, galactose e lactose, e impediu a permeação das enzimas, moléculas com alta massa molecular.

A possibilidade da interação entre a enzima e a membrana foi verificada através das análises de FTIR – Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier e MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura, realizadas na membrana nova e após sua utilização na célula de ultrafiltração.

Ensaio foram realizados para comparar a hidrólise da lactose do soro de leite utilizando dois modelos de reator: reator operado em batelada e reator a membrana. As condições operacionais nos dois experimentos foram as mesmas, temperatura de 40 °C, pH 6 e concentração de enzima de 1250 mg.L⁻¹. O reator a membrana mostrou-se mais eficiente, convertendo 92% da lactose em glicose e galactose, contra 82% do reator operado em batelada.

ABSTRACT

Cheese whey is a major byproduct of the dairy industry. Due to its high pollutant content and the difficulty usually associated with its elimination, there is the need for finding alternative solutions to the problem, and industry is looking at recovering processes of whey components, particular for proteins and lactose.

Lactose is a disaccharide that can be hydrolyzed by acid or enzymatic methods, producing mainly glucose and galactose. In the enzymatic process, β -D-galactosidase extracted from different sources is used. It can be found in plants, animals, fungi, bacteria and yeasts.

In this work, lactose present in the cheese whey permeate was hydrolyzed in a membrane reactor using the commercial lactase (β -D-galactosidase) *Kluyveromyces lactis* Maxilact[®] L-5000. The degree of hydrolysis was determined for several operating conditions of temperature (30, 35, 40, 45 and 50 °C), pH (4, 5, 6 and 7), and enzyme concentration (400, 1250 and 2000 mg.L⁻¹). Conversions from about 90 to 100% were obtained at temperatures of 30 to 40 °C, pH 6, and 1250 mg.L⁻¹ enzyme concentration.

Hydrolysis was carried out in a reactor with a PVDF-DMF high porosity membrane which allowed the permeation of low molecular weight compounds such as glucose, galactose and lactose, but retained the enzyme and other high molecular weight materials.

The possible interaction between the enzyme and the membrane was investigated by FTIR and scanning electron microscopy analyses, with tests made for the new and used membranes.

Assays were carried out to compare the lactose hydrolysis of cheese whey using two reactor models: batch reactor and membrane reactor. The same operational conditions, i.e., temperature of 40 °C, pH 6 and enzyme concentration of 1250 mg.L⁻¹ were used in both experiments. The membrane reactor was more efficient, converting 92% of the lactose to glucose and galactose, compared to 82% for the batch reactor.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Com a expansão do consumo mundial de leite, queijos e derivados nos últimos anos, a produção de soro, um dos principais subprodutos da indústria laticínia, aumentou consideravelmente. Devido ao elevado valor nutritivo e à sua importância comercial, diversos estudos têm sido realizados para a separação e recuperação das proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais presentes no mesmo.

O soro pode ter basicamente três destinos principais. O primeiro é o processamento até produtos diversos, incluindo iogurtes, sorvetes, bebidas lácteas e carbonatadas, e alimentos infantis; o segundo é a utilização diretamente na alimentação animal, e o terceiro destino é o seu tratamento para posterior despejo no esgoto, devido ao seu elevado poder poluente (BRANDÃO, 1994).

Para a separação dos componentes do soro, uma das mais promissoras técnicas é a ultrafiltração com membranas poliméricas. A ultrafiltração vem sendo utilizada nas indústrias alimentícias, principalmente na clarificação de sucos de frutas, cerveja e vinhos e na concentração de produtos lácteos, aonde vem sendo bastante utilizada na recuperação das proteínas do soro que, depois de concentradas, são utilizadas em dezenas de produtos alimentícios na forma líquida ou desidratada (OLIVEIRA, 2000; PETRUS, 1997).

A lactose é um dissacarídeo que, apesar de ser o sólido mais abundante encontrado no soro, é pouco utilizado na indústria alimentícia devido ao seu baixo poder adoçante e baixa solubilidade. Além disso, uma parcela da população sofre de intolerância à lactose, o que diminui a sua absorção pelo organismo, causando enjôos e mal estar. Para resolver estes problemas, a lactose pode ser hidrolisada em glicose e galactose, açúcares com melhores propriedades físicas, químicas e nutricionais.

Para a quebra da lactose, dois métodos têm sido utilizados: a hidrólise ácida (homogênea ou heterogênea) e a hidrólise enzimática (enzimas na forma livre, imobilizadas em suportes ou recuperadas). A hidrólise ácida requer condições de operação extremamente rigorosas, como elevadas temperaturas e pH ácido, formando diversos subprodutos que deverão ser purificados. A hidrólise enzimática ocorre em condições mais brandas, tanto de temperatura como pH, mas requer a utilização de uma etapa posterior para a separação dos produtos formados.

Diversos processos foram desenvolvidos para a hidrólise enzimática da lactose. A utilização de reatores em batelada tem sido pouco explorada, apesar do alto grau de hidrólise obtido, devido à inativação das enzimas no final do processo. Já a imobilização da enzima em reatores de leito fixo, leito fluidizado e suas variantes tem sido amplamente empregada, pois permite a utilização das enzimas em modo contínuo. Diversos suportes, técnicas de imobilização da enzima ao suporte e tipos de reatores com características próprias para a hidrólise da lactose têm sido estudados.

Especial atenção vem sendo dada à utilização da ultrafiltração em reatores a membrana com a enzima na forma solúvel para a hidrólise da lactose. A utilização destes reatores é uma tecnologia recente e ainda pouco estudada. A principal vantagem é a separação contínua dos produtos, que permeiam a membrana, dos reagentes e enzimas que, devido a sua elevada massa molecular, ficam retidas no reator.

A hidrólise pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles podemos destacar as condições operacionais, como temperatura, pH e pressão, e a concentração de reagentes e produtos, que podem inibir a atividade da enzima. Diversos modelos cinéticos foram desenvolvidos para o estudo da hidrólise enzimática, sendo o mais utilizado a equação de Michaelis-Menten com inibição competitiva pelo produto.

Na hidrólise enzimática da lactose utiliza-se a enzima lactase (β -galactosidase). Esta enzima pode ser extraída de diversas fontes como animais, fungos, bactérias, leveduras e vegetais, como broto de alfafa, pêssego e rosas selvagens. Porém, nem todas as lactases podem ser utilizadas. Enzimas extraídas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces sp* (*lactis* ou *fragilis*) são consideradas seguras, devido ao histórico de suas aplicações e aos numerosos estudos realizados (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Neste trabalho, ensaios de hidrólise enzimática da lactose foram realizados em um reator a membrana utilizando como substrato o soro de leite. A hidrólise foi realizada em uma célula de ultrafiltração com a enzima na forma solúvel. A enzima β -galactosidase *Kluyveromyces lactis* Maxilact[®] L-5000 foi utilizada em diversas condições operacionais de temperatura, pH e concentração, determinando-se o grau de hidrólise para cada condição. A conversão da lactose também foi realizada em um reator em batelada, comparando-se a eficiência do mesmo em relação ao reator a membrana.

OBJETIVOS

O desenvolvimento deste trabalho consistiu em estudar a hidrólise enzimática da lactose do soro de leite em um reator a membrana utilizando a enzima lactase (β -D-galactosidase) *Kluyveromyces lactis* Maxilact[®] L-5000. Os objetivos principais foram:

1. Obter os parâmetros ótimos para a realização da hidrólise enzimática da lactose em um reator a membrana utilizando a ultrafiltração tangencial para separação dos produtos glicose e galactose.
2. Analisar a influência de parâmetros como temperatura, pH e concentração de enzima na conversão da lactose em glicose e galactose.
3. Comparar o grau de hidrólise obtido na realização da hidrólise da lactose em um reator a membrana e um reator em batelada sob as mesmas condições operacionais.
4. Identificar a ocorrência de interação entre o polímero constituinte da membrana e a enzima utilizada nos ensaios de hidrólise.

É importante salientar que a disponibilidade desses dados é imprescindível para futuros esforços de pesquisa e desenvolvimento na área de reatores a membrana e separação por ultrafiltração. Com efeito, como os parâmetros variam muito, mesmo para uma única enzima, em função de sua origem e condições operacionais, não se pode simplesmente utilizar dados da literatura como parâmetros de referência.

Este trabalho visa, sobretudo, colaborar para a obtenção desses dados, estabelecendo parâmetros de referência com os quais se poderá no futuro comparar outros experimentos para a avaliação de novos materiais (membranas, outras enzimas, etc.), novas concepções de reatores a membrana, e enzimas produzidas em laboratório.

Pode-se dizer, portanto, que embora os resultados aqui alcançados possam ser fenomenologicamente preditos, os dados aqui gerados constituem um valioso recurso para a exploração de novas alternativas no importante processo de degradação enzimática da lactose.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Soro de leite

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios, resultante, principalmente, da produção de queijo. É um líquido quase opaco e de cor tendendo ao verde, que contém proteínas de alto valor nutritivo, aproximadamente metade dos sólidos do leite, muitos com significativo valor nutricional, e apresenta boas propriedades funcionais (MAWSON, 1994; ZADOW, 1986).

O soro pode ser definido como a porção aquosa que se separa do coágulo durante a fabricação convencional do queijo ou manufatura da caseína. Consiste em aproximadamente 85 a 90% do volume do leite usado para a transformação em queijo e retém cerca de 55% dos nutrientes do leite (MIZUBUTI, 1994).

ZALL (1984) define o soro como o fluido obtido pela separação do coágulo do leite integral, creme ou leite desengordurado. O soro é um diluente líquido que contém lactose, proteínas, minerais e traços de gordura e contém aproximadamente 6% de sólidos totais, dos quais 70% ou mais é lactose e 0,7% é proteína.

Segundo ZALL¹ (1992 *apud* FODA e LOPEZ-LEIVA, 2000), a produção mundial anual de soro é de aproximadamente 130 milhões de toneladas por ano, com a produção de queijo aumentando anualmente a uma taxa de 3%.

¹ ZAAL, R.R. *Sources and Composition of Whey and Permeate*. In: Zadow JG, editor. *Whey and Lactose Processing*. London: Elsevier Applied Science, 1992.

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), o Brasil produz um total aproximado de 900 mil toneladas por ano de queijo (RUBEZ, 1998). Levando em consideração que o soro representa 90% do volume de leite gasto para produzir 1 kg de queijo, pode-se deduzir que são gerados, em média, aproximadamente 7,2 milhões de toneladas anuais de soro.

A composição do soro depende não somente do tipo de produto elaborado (queijo, caseína), mas também do sistema de membranas utilizado, sua configuração, condições de operação e do total de sólidos do processado (ZADOW, 1984).

Na Tabela 3.1 é apresentada a composição média do soro láteo.

Tabela 3.1 – Composição média dos principais componentes do soro láteo.

Componente	Teor (%)
Água	93,4
Lactose	4,60
Proteína	0,70
Cinzas	0,65
Cálcio	0,10
Fósforo	0,08
Gordura	0,05
Outros	0,42

Fonte: Modificado de MIZUBUTI, 1994.

Através de vários processos, o soro pode ser seco e utilizado como alimento animal ou aditivo alimentar, ou pode ser convertido em produtos químicos, combustíveis e outros produtos através da fermentação. Um dos maiores obstáculos da utilização do soro é a grande quantidade de lactose presente, a qual contribui para sua baixa solubilidade, baixo poder adoçante e sua pobre digestibilidade quando utilizado como alimento. A lactose também é pouco fermentável quando comparada a outros açúcares (YANG e OKOS, 1989).

O soro pode ter basicamente três destinos principais. O primeiro é o seu processamento até produtos diversos, incluindo soro em pó, bebida láctea, ricota, concentrado protéico, formulações de alimentos infantis, iogurte, doce de leite, alimentos dietéticos, sopas, molhos, produtos de panificação, confeitarias, sorvetes e bebidas, molhos de carne e salsichas, entre outros (Tabela 3.2). O segundo seria o seu uso na alimentação animal, podendo ser utilizado na forma líquida, condensada, seca ou como produtos de soro seco. Finalmente, o terceiro destino seria o seu tratamento para posterior despejo no esgoto (BRANDÃO, 1994; MATHUR e SHAHANI, 1979).

Tabela 3.2 – Algumas possibilidades de aproveitamento de soros lácteos.

-
-
- Bebidas carbonatadas e fermentadas
 - Bebidas energéticas
 - Produção de biscoitos, alimentos lácteos em pó
 - Precipitados de albuminas e globulinas como aditivos alimentares
 - Preparados de albuminas utilizados como suplemento de valor nutritivo de alguns elementos
 - Preparados cosméticos e farmacêuticos
 - Fabricação de álcool
 - Produção de lactose
 - Fabricação de queijo de soro, Ziger, Urda, Ricotta, etc
 - Fabricação de ácido láctico para a indústria farmacêutica ou alimentícia
 - Meio de fermentação para a fabricação de antibióticos, combustíveis (metano)
 - Biomassa para a produção de alimentos
-
-

Fonte: Modificado de OLIVEIRA, 2000.

O soro de leite é utilizado na alimentação animal e humana há milênios, sendo que seu uso foi mais intensificado após a 2ª Guerra Mundial. Porém, estima-se que apenas 50% do total de soro produzido é aproveitado, retornando à alimentação animal ou humana, bem como para produção de medicamentos e outros produtos (MIZUBUTI, 1994).

Na alimentação humana o soro pode ser utilizado na forma líquida, condensada ou em pó, sendo que a forma em pó é geralmente preferida por apresentar maior tempo de armazenamento, podendo ser modificado e/ou misturado com outros produtos servindo a propósitos específicos (MATHUR e SHAHANI, 1979).

O soro pode ser utilizado de diferentes formas: soro fresco, pasteurizado ou não; soro condensado, contendo de 35 a 60% de sólidos, soro condensado adoçado, contendo 38% de sólidos e 38% de açúcares; soro seco e, finalmente, pode-se utilizar os componentes individuais do soro, como a lactose e proteínas (GILLIES, 1974).

O fracionamento do soro em lactose e proteínas do leite representa um expediente que permite a utilização dos constituintes de maior importância comercial presentes no soro de leite. A lactose tem várias propriedades funcionais úteis que tornam sua aplicação desejável em indústrias alimentícias e farmacêuticas (MATHUR *et al.*, 1980).

A quantidade de proteínas encontradas no soro corresponde a 0,7% da sua composição média e equivale à cerca de 20 a 25% do total de proteínas encontradas no leite (MIZUBUTI, 1994).

O soro é geralmente utilizado devido as suas proteínas como suplemento para ração animal e, mais recentemente, devido as suas propriedades funcionais e nutricionais, em alimentos processados (MAWSON, 1994).

O maior desenvolvimento de tecnologias de separação sólido-líquido tem sido utilizado pelas indústrias de laticínios para a recuperação das proteínas. Entre estas técnicas podemos citar a filtração em gel, a adsorção em suporte insolúvel, a precipitação pelo calor, a precipitação por agentes complexantes e a ultrafiltração com membrana (MIZUBUTI, 1994; MATTHEWS, 1984).

As proteínas do soro, devido ao seu alto valor nutricional, estão sendo utilizadas em diversos produtos, como leite desproteínizado, queijos, ricota e bebidas lácteas, conferindo aos mesmos boas propriedades funcionais, nutricionais e aromáticas (BRANDÃO, 1994; MATTHEWS, 1984).

Além de utilizar o soro diretamente na alimentação humana e animal, outra alternativa é utilizar o soro como substrato para a produção de proteínas unicelulares por *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* ou para a produção de biomassa de cogumelos comestíveis, como, por exemplo, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*, que podem ser utilizados como fonte de alimento ou ração animal (RABELLO, 1997; CRUZ, 1997; BARINOTTO, 1995).

Um dos principais problemas do soro é seu alto poder poluente. A maior parte produzida é enviada à estação de tratamento de efluentes ou, muitas vezes, despejada diretamente em rios ou sobre o solo. A carga poluente, representada pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), varia de 32000 a 60000 mg.L⁻¹, dependendo do processo de fabricação do queijo (BRANDÃO, 1994; MARWAHA e KENNEDY, 1988; DEMOTT *et al.*, 1981).

Uma das várias alternativas para diminuir a carga poluente do soro é utilizar microrganismos, como *Kluyveromyces sp*, para a conversão da lactose em biomassa ou, através da fermentação do soro, em etanol (PONSANO e CASTRO-GÓMEZ, 1995).

A fermentação do soro, dependendo dos microrganismos utilizados, pode produzir diversos compostos diferentes, dependendo da disponibilidade de um processo seguro para converter a lactose na substância desejada e da sua viabilidade econômica. Dentre as substâncias possíveis de serem produzidas encontram-se a proteína “single-cell” (biomassa), o ácido láctico, o álcool etílico, a riboflavina (vitamina B₂), metano, antibióticos, bebidas lácteas fermentadas, entre outras (BRANDÃO, 1994).

Diversos processos têm sido desenvolvidos para a diminuição do poder poluente do resíduo da produção de queijo, através do tratamento do soro ou da lactose.

HOBMAN (1984) relatou estudos que utilizaram o soro integral ou ultrafiltrado na manufatura de produtos fermentados, como alcoóis, solventes (etanol, cetona, butanol), ácidos e derivados, enzimas, leveduras de panificação, gomas, vitaminas, aminoácidos e proteínas unicelulares (biomassa).

BARFORD e colaboradores (1986) utilizaram digestores semicontínuos para promover a digestão anaeróbia do soro, com a adição de flocculantes químicos, obtendo uma eficiência na remoção de DQO na ordem de 99%.

KISAALITA e colaboradores (1987 e 1989) estudaram a conversão da lactose em ácidos orgânicos em escala laboratorial em um fermentador agitado, determinando os parâmetros cinéticos ótimos para esta conversão. A fermentação formou principalmente ácido acético e butírico.

YANG e colaboradores (1988) investigaram a geração de metano através da fermentação da lactose proveniente do soro de leite em pó. Uma cultura mista de bactérias homoláticas, homoacéticas e metanogênicas, a temperatura mesofílica (35 – 37 °C) e pH em torno de 7,0 foi utilizada, obtendo uma boa conversão de lactose em metano (5,3 mol metano/mol de lactose). O biogás pode ser utilizado no processo como fonte de energia.

3.2 - Lactose

A lactose (4-O-(β-D-galactopiranosil)-D-glicose) ou “açúcar do leite”, como é comumente conhecido, é o carboidrato característico do leite de vaca, sendo que no leite cru ele é responsável por 40% do total de sólidos. A lactose é o composto sólido em maior quantidade no leite desnatado, aproximadamente 50%, e no soro em torno de 70 a 80% (HOBMAN, 1984).

Este açúcar é encontrado no leite de todos os mamíferos, em diferentes teores e é responsável pelo seu sabor levemente adocicado. Outras fontes de origem são raras, sendo o único dos açúcares comuns não encontrado em plantas. Fisiologicamente a lactose é uma substância energética e seus monossacarídeos entram na constituição de cerebrosídeos, abundante na massa cerebral e mielina nervosa (BEHMER, 1991; ESKIN, 1990).

No organismo humano, a lactose age como uma promotora na absorção e retenção de cálcio no intestino e absorção de magnésio e manganês (MANAN *et al.*, 1999).

Este dissacarídeo, devido a sua baixa solubilidade, seu fraco poder adoçante (Tabela 3.3) e sua incapacidade de ser fermentado por diversos microrganismos, tem sua utilização limitada tanto em nível alimentar quanto industrial, além de existirem casos estatisticamente não negligenciáveis de sua intolerância ou de sua má absorção (PETRUS, 1990).

Tabela 3.3 – Poder adoçante relativo de açúcares.

Açúcar	Poder adoçante relativo
D-Frutose	173
Sucrose	100
D-Glicose	74
D-Galactose	32
Lactose	16

Fonte: Modificado de ZADOW, 1984.

Uma das desvantagens da lactose é a de não ser facilmente digerida por uma parte da população humana. No intestino humano, a lactose é geralmente hidrolisada pela enzima lactase, sendo absorvida como glicose e galactose. Porém, esta enzima não está presente em todas as pessoas, de modo que a ingestão de lactose pode levar à fermentação da mesma, gerando distensões, desconfortos e, em alguns casos, diarreias. A administração oral de lactase tem sido utilizada, mas nem sempre obtendo resultados satisfatórios, ocorrendo algumas vezes reações alérgicas (BÓDALO *et al.*, 1991; ZADOW, 1984).

A hidrólise enzimática da lactose, formando glicose e galactose, com a recuperação simultânea de proteínas, tem se mostrado um dos métodos mais promissores para remover a lactose do leite e de seus sub-produtos, como o soro (BÓDALO *et al.*, 1991).

Por suas propriedades químicas, físicas e funcionais, é da maior importância à manufatura e utilização da lactose em produtos derivados da indústria de laticínios. A lactose é comumente utilizada em alimentos para bebês e na indústria farmacêutica, onde sua capacidade de ser moldada em tabletes e pílulas é importante. Além disso, a transformação da lactose tem sido frequentemente considerada como um meio de superar os problemas gerados no descarte do soro da indústria laticínica (ZADOW, 1984).

A obtenção da lactose a partir do soro é feita envolvendo tipicamente a remoção de proteínas (por coagulação ou ultrafiltração), a evaporação sob vácuo, a refiltração seguida de mais evaporação, a indução à cristalização por sementeira, a centrifugação para remoção dos cristais e a secagem até pó em secador de leite fluidizado. Em geral, aproximadamente 50% da lactose é recuperada, enquanto que o líquido resultante pode ser vendido como soro em pó deslactosado (BRANDÃO, 1994; ZADOW, 1984).

O soro sem solubilização química da proteína é concentrado e resfriado para efetuar a cristalização da lactose, que é separada por filtração. Finalmente, recebe ar seco para formar a lactose bruta. A lactose bruta é refinada, descolorada e filtrada, apresentando o produto final alto grau de pureza (GILLIES, 1974).

Muitas aplicações podem ser propostas para a utilização da lactose, principalmente devido as suas características físico-químicas em relação a outros açúcares. Na indústria de alimentos pode ser utilizada na preparação de condimentos, de produtos para confeitarias, padarias e para uso como xarope (ZADOW, 1984).

Para ser transformada em lactose grau farmacêutico, a lactose em pó é concentrada e parcialmente acidificada. Este concentrado deverá ser tratado com carvão para a remoção de corantes, filtrado e, após passar por um cristalizador evaporativo, seco e moído. Para a produção da lactose farmacêutica são importantes a coloração da solução, o teor de proteínas, metais pesados, cálcio, sulfato, cloretos e a presença de microrganismos (BRANDÃO, 1994).

Segundo BRANDÃO (1994), a lactose pode ser utilizada como matéria-prima para diversos produtos, incluindo:

- a) Lactosil urea, que é preparada pela condensação da lactose e uréia. Ele pode ser usado como alimento de ruminantes para a síntese de proteínas.
- b) Lactitol, que é um adoçante não-nutritivo, semelhante ao sorbitol.
- c) Lactulase, que é um isômero da lactose obtido pelo tratamento do açúcar do leite em meio alcalino. A lactulase favorece o crescimento de *Bifidusbacterium bifidus* na flora intestinal, sendo também recomendado no combate à constipação infantil.

- d) Ligante: Um uso interessante da lactose em pó é como ingrediente principal no processamento de finos de minério de ferro, capturado em equipamentos de controle de poluição, reduzindo o uso de energia gasta na formação de “pellets”.

A molécula de lactose contém um número de sítios ativos (ligações glicosídicas, grupos redutores, grupos hidroxila livres, ligações carbono-carbono) que a tornam sensível a modificações enzimáticas e/ou químicas, sendo esta uma característica comum aos carboidratos. Na Tabela 3.4 é apresentada uma variedade de processos para a modificação enzimática e/ou química que tem sido estudados para utilização na indústria de alimentos (HOBMAN, 1984).

Tabela 3.4 – Produtos obtidos por modificação enzimática e/ou química da lactose.

Derivado	Processo	Uso potencial
Xarope hidrolisado	Hidrólise ácida ou enzimática	Alimentos doces
Lactulose	Isomerização	Alimentos para bebês
Ácido lactobiônico	Oxidação	Uso medicinal
Lactobionamidas	Reação de lactobiono-lactose com amida	Agente seqüestrante alcalino ou agente quelante
Lactitol	Hidrogenação	Açúcar
Lactitol palmitato	Esterificação de lactitol com ácido graxos	Emulsificantes em alimentos e detergentes
Polímeros	Polimerização	Espuma de poliuretano
Ácido ascórbico	Síntese	Vitamina C

Fonte: HOBMAN, 1984.

3.3 - Lactase

Lactase é o nome utilizado para a enzima β -D-galactosidase ou mais formalmente β -D-galactosidase galactohidrolase. Tipicamente a lactase catalisa a hidrólise de lactose e arabinoses, sendo capaz ainda de catalisar a síntese de certos oligossacarídeos (RICHMOND *et al.*, 1981).

Na Tabela 3.5 estão possíveis fontes para a obtenção da lactase, como plantas, organismos animais, bactérias, enzimas intracelulares, como por exemplo leveduras, e enzimas extracelulares, como por exemplo fungos (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Tabela 3.5 – Possíveis fontes de obtenção de β -galactosidase.

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

Fonte: Modificado de SHUKLA, 1975.

Diversos estudos sobre a lactase foram conduzidos, incluindo tópicos como: fontes para obtenção da enzima, métodos de isolamento e purificação, técnicas de ensaio, propriedades físico-químicas (tamanho, forma, desnaturação pelo calor, influência do pH), problemas relativos à hidrólise da lactose (biológicos e industriais) e disposição dos resíduos gerados na hidrólise (RICHMOND *et al.*, 1981).

As propriedades das β -galactosidasas dependem da sua fonte. A lactase extraída da *Escherichia coli* possuiu a maior massa molecular (520 kDa a 850 kDa), enquanto que as de menor massa molecular são as extraídas de *Saccharomyces fragilis* (201 kDa) e *Aspergillus oryzae* (90 kDa) (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

A temperatura e o pH ótimos diferem de acordo com a fonte e obtenção de cada enzima (Tabela 3.6) e também de acordo com o método de preparação comercial. A imobilização das enzimas, o método de imobilização e o tipo de suporte podem influenciar as condições ótimas de operação (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Tabela 3.6 – Propriedades das lactases.

Fontes	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Massa molecular (kDa)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0 – 4,0	55 – 60	124
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	50 – 55	90
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	37	201
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,3	35	135
<i>Escherichia coli</i>	7,2	40	540
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	60 – 65	
<i>Bacillus sp</i>	6,8	65	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7,0	42 – 45	
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2 – 7,1	55 – 57	530
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6,5 – 7,5	55	500 – 600
<i>Mucor pucillus</i>	4,5 – 6,0	60	
<i>Thermus aquaticus</i>	4,5 – 5,5	80	570

Fonte: Modificado de GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985.

Nem todas as lactases são aceitas ou reconhecidas como seguras para utilização na indústria de alimentos. Enzimas extraídas de *A. niger*, *A. oryzae* e *Saccharomyces sp* (*lactis* ou *fragilis*) são consideradas seguras, devido ao histórico de suas aplicações e aos numerosos estudos realizados (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

A lactase pode ser utilizada em processos com os mais diversos tipos de reatores, incluindo reatores em batelada, reatores de leite empacotado, reatores de reciclo e reatores de leite fluidizado. A atividade da enzima é afetada pela temperatura, fluxo do substrato, material do suporte de imobilização, método de imobilização e componentes do substrato (FINOCCHIARO *et al.*, 1980).

A remoção da lactose do leite tem sido extensamente estudada devido aos problemas nutricionais (intolerância à lactose) e aos interesses tecnológicos (solubilidade, poder adoçante e funcionalidade) envolvidos no desenvolvimento de produtos baseados na indústria laticínia (RICHMOND *et al.*, 1981). Alguns produtos desenvolvidos com a utilização de β -galactosidase estão apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Produtos desenvolvidos com a utilização de β -galactosidase.

-
-
1. Leite deslactosado
 2. Produtos derivados de leite com baixa concentração de lactose
 3. Iogurtes com baixa concentração de lactose
 4. Iogurte adoçado
 5. Concentrado para sorvete com baixa concentração de lactose
 6. Xaropes alimentícios e produtos adoçados
 7. Tratamento enzimático com lactase durante a produção de queijo
 8. Processamento de lactose extraída de soro doce e ácido
-
-

Fonte: Modificado de SHUKLA, 1975.

As enzimas comumente utilizadas para a hidrólise da lactose são extraídas de leveduras como *Kluyveromyces lactis*, que apresenta pH ótimo entre 6 e 7 e temperatura ótima de 35 °C, ou *Kluyveromyces fragilis*, com pH ótimo de 6,5 e temperatura ótima de 40 °C. Ainda podem ser obtidas de fungos como *A. niger*, com pH ótimo de 4,8 e temperatura ótima de 50 °C (ZADOW, 1984).

3.4 - Hidrólise da lactose

A lactose é um dissacarídeo, que ao sofrer hidrólise, forma como produtos glicose e galactose. Os dois monossacarídeos são unidos por uma ligação entre o carbono-1 da galactose e o carbono-4 da glicose (ZADOW, 1984).

Em princípio, a reação de hidrólise da lactose forma uma mistura isomolecular de glicose e galactose. Na prática, dependendo das condições, a mistura isomolecular não é alcançada, pois a galactose pode polimerizar ou se unir à lactose para formar oligossacarídeos (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

As estruturas da lactose, galactose e glicose estão representadas na Figura 3.1.

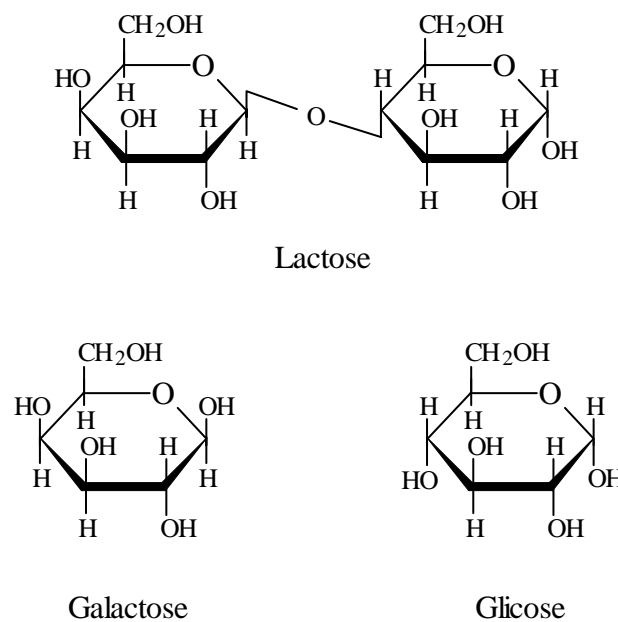


Figura 3.1 – Estruturas da lactose, galactose e glicose.

Fonte: ZADOW, 1984.

A hidrólise da lactose pode ser aplicada para evitar a intolerância à lactose em humanos, prevenir a cristalização da lactose na produção de sorvete, ou na produção de produtos fermentados, como iogurte. Dependendo do nível da hidrólise, o leite com lactose pré-digerida terá um gosto ligeiramente mais doce. Isto é causado pelo poder adoçante mais elevado da glicose + galactose em comparação com a lactose (OBÓN *et al.*, 2000).

O xarope produzido pela hidrólise da lactose pode ser utilizado como fonte de açúcar e, em alguns casos proteínas, em produtos de panificação, produtos de confeitaria, sorvetes, sobremesas, sucos de frutas, bebidas energéticas para atletas ou base para a produção de álcool (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

3.4.1 - Formação de oligossacarídeos

A lactose é o componente principal de diferentes tipos de soro (soro doce, soro ácido, soro permeado de ultrafiltração). Durante a hidrólise enzimática da lactose, além dos principais produtos da hidrólise – glicose e galactose, quantidades consideráveis de oligossacarídeos são também formadas (LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN, 1995).

Oligossacarídeos são polímeros compostos de resíduos de monossacarídeos unidos por ligações hemiacetálicas, neste caso denominadas ligações glicosídicas, em número que variam de duas até, aproximadamente, dez unidades (BOBBIO e BOBBIO, 1989).

A fonte das enzimas, o tempo de reação e a concentração inicial de lactose têm uma forte influência sobre a quantidade de oligossacarídeos formados (LÓPEZ-LEIVA e GUSMAN, 1995).

Dependendo da lactase utilizada, existem grandes diferenças entre a quantidade, tamanho e tipo dos oligossacarídeos formados. A lactase obtida de *Bacillus circulans* produz diversos oligossacarídeos em grandes quantidades, enquanto que as extraídas de *Kluyveromyces sp* produzem principalmente trissacarídeos (BOON *et al.*, 2000).

Estes oligossacarídeos são usualmente subprodutos da hidrólise enzimática, mas pouca atenção tem sido dada a este problema no planejamento de processos hidrolíticos. Isto ocorre essencialmente por duas razões: os oligossacarídeos podem ser eventualmente hidrolisados, quando um tempo de reação suficientemente longo é permitido; e os métodos necessários para detecção de oligossacarídeos são complicados e tediosos (PRENOSIL *et al.*, 1987a).

A ingestão de oligossacarídeos favorece a proliferação de *Lactobacillus bifidus* no intestino. Os efeitos fisiológicos da bifidobactéria no corpo humano vão desde a recuperação da flora intestinal após um tratamento com antibióticos até a produção de vitaminas e outros compostos utilizados no trato intestinal (WIJSMAN *et al.*, 1989).

Um número de oligossacarídeos compostos de diferentes monossacarídeos, entre eles os galacto-oligossacarídeos, contendo de 3 a 10 moléculas de galactose e glicose, são atualmente utilizados em adoçantes de baixas calorias, ingredientes de produtos alimentícios (bebidas, derivados de leite e ingredientes para panificadoras) e aditivos de cosméticos (SHIN *et al.*, 1998).

BURVALL e colaboradores (1979) estudaram a formação de oligossacarídeos durante a hidrólise da lactose a diferentes concentrações utilizando *Saccharomyces lactis*. A análise demonstrou que a quantidade de oligossacarídeos formados aumentou com a concentração inicial da lactose e alcançou um valor máximo (5-13% do peso total do açúcar) quando cerca de 65-75% da lactose foi hidrolisada.

PRENOSIL e colaboradores (1987b) utilizaram β -galactosidases extraídas de fungos (*A. niger* e *A. oryzae*) e de leveduras (*K. fragilis* e *K. lactis*) para comparar a produção de oligossacarídeos na hidrólise enzimática da lactose. Os resultados obtidos mostraram que a lactase obtida de *A. oryzae* é a que fornece a maior quantidade de polissacarídeos, especificamente trissacarídeos e tetrassacarídeos.

LÓPEZ-LEIVA e GUSMAN (1995) analisaram a formação de monossacarídeos (glicose + galactose) na hidrólise de soro permeado ultrafiltrado pela lactase extraída de *A. oryzae* imobilizada em um filme poroso. O reator produziu uma grande conversão em um curto tempo de residência (60% de conversão em 1 minuto). O aumento da concentração inicial de lactose provocou um aumento da conversão de oligossacarídeos, enquanto que com o aumento do tempo de residência, a concentração de oligossacarídeos diminuiu, ocorrendo a formação de mono e dissacarídeos.

SHIN e colaboradores (1998) estudaram a produção de oligossacarídeos utilizando a lactase extraída de *Bullera singularis* imobilizada em um suporte de “chitopearl” em um reator de leito empacotado a partir da lactose. Um rendimento de 55% em peso de oligossacarídeos foi obtido mantendo o sistema operando continuamente durante 15 dias.

BOON e colaboradores (1999) desenvolveram modelos para descrever simultaneamente a síntese de oligossacarídeos e a hidrólise da lactose. Aproximações baseadas em conceitos de engenharia e conceitos bioquímicos foram utilizadas. Os resultados da simulação foram comparados com os dados obtidos em batelada a várias concentrações iniciais de lactose catalisadas por β -galactosidase extraída de *B. circulans*. Nenhuma dependência com a concentração inicial da lactose foi encontrada quando foram considerados parâmetros envolvendo a inibição da hidrólise por formação de produtos.

FODA e LOPEZ-LEIVA (2000) utilizaram soro permeado (contendo 14, 20 e 23% de lactose) para a produção contínua de oligossacarídeos por hidrólise com Maxilact[®] 2000 L. Nos experimentos, dois tipos de reatores a membrana foram utilizados, um reator em batelada Amicon (escala laboratorial) e um reator em escala piloto com membrana de fibra oca. No reator em batelada a produção máxima de oligossacarídeos ($\approx 20\%$) foi obtida em um tempo aproximado de 2,45 horas, independente da concentração inicial de lactose, enquanto que para o reator em escala piloto, um rendimento máximo de 31% foi obtido para o soro contendo inicialmente 20% de lactose em um tempo aproximado de 4 horas.

BOON e colaboradores (2000) desenvolveram um modelo cinético para descrever a síntese de oligossacarídeos utilizando diversas temperaturas e várias lactases. O efeito da temperatura é pequeno quando comparado com a influência da concentração inicial da lactose. Os resultados mostraram que a utilização de enzimas provenientes de várias fontes altera a quantidade e o tipo dos oligossacarídeos formados. O modelo pode ser utilizado no projeto de um reator para a síntese de oligossacarídeos levando em conta os efeitos da temperatura e da origem das lactases.

3.4.2 - Métodos de hidrólise da lactose

Existem dois métodos utilizados para a hidrólise da lactose: o método ácido e o método enzimático (Figura 3.2). A reação é muito rápida quando ácidos são utilizados como catalisadores. A temperatura da reação no tratamento ácido é muito maior que no tratamento enzimático (150 °C e 30 – 40 °C, respectivamente), mas os produtos adquirem cor e odor que impedem sua utilização direta em alimentos. A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite ou soro sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as suas propriedades, aumentando seu poder adoçante relativo (LADERO *et al.*, 2000).

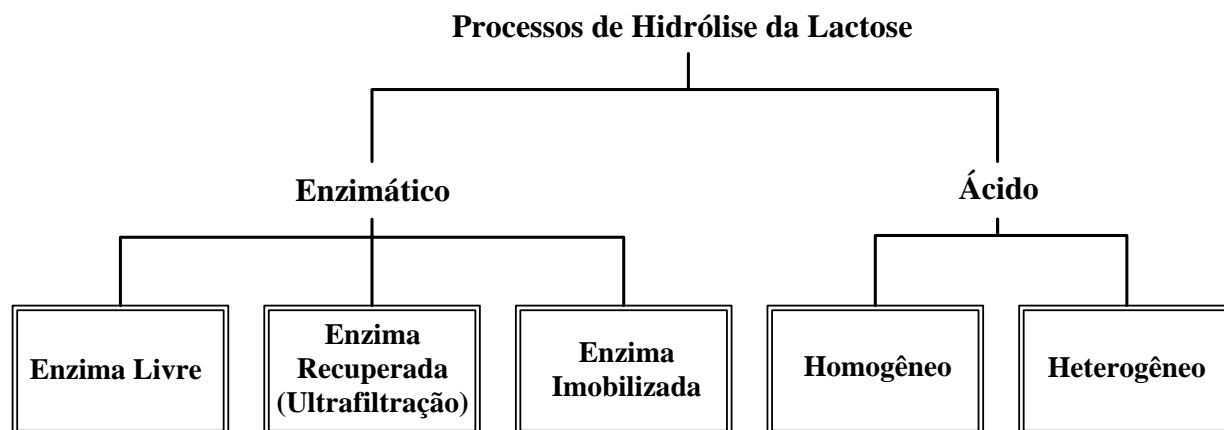


Figura 3.2 – Processos de hidrólise da lactose.

Fonte: HOBMAN, 1984.

O uso de enzimas permite condições mais moderadas de temperatura e pH e não causa problemas nos produtos obtidos, como a desnaturação das proteínas – que podem estar presentes na solução de lactose; a produção de uma cor marrom na solução, e o rendimento de subprodutos indesejáveis, normais nos métodos ácidos. Assim, para aplicações na indústria de alimentos, o método mais recomendável é o enzimático (SANTOS *et al.*, 1998).

3.4.2.1 - Hidrólise ácida

Na hidrólise ácida é necessária a utilização de ácidos minerais fortes a altas temperaturas. A utilização de condições severas causa problemas no produto obtido, como por exemplo, formação de sabores e odores estranhos. Desta maneira, processos de hidrólise ácida são geralmente utilizados em produtos desproteinizados, tais como permeados da ultrafiltração de leite ou de soro (ZADOW, 1984).

A hidrólise ácida em fase homogênea (uma fase) utiliza íons hidrogênio em solução (pH 1,0 a 1,5) para catalisar a hidrólise da lactose durante tratamento térmico (24 h a 60 °C ou 11 min a 140 °C). Já o processo heterogêneo (duas fases) utiliza uma resina de troca catiônica, onde os íons hidrogênio estão ligados. O processo heterogêneo é o mais utilizado, devido à possibilidade de regeneração da resina de troca catiônica (HOBMAN, 1984).

Na hidrólise ácida, um alto grau de conversão é obtido em um curto espaço de tempo sob condições severas. Um exemplo é a obtenção de 80% de hidrólise em 3 minutos a pH 1,2 e 150 °C. Durante este período, uma coloração marrom é formada, implicando numa etapa final de clarificação utilizando, por exemplo, carvão ativo (DEBOER e ROBBERTSEN, 1981).

Segundo GEKAS e LÓPEZ-LEIVA (1985), as desvantagens da hidrólise ácida são:

- a) Não pode ser aplicada na hidrólise de leite e em soluções contendo proteínas, pois a alta temperatura e baixo pH provocam a desnaturação das proteínas
- b) A presença de sais no soro causa a desativação do ácido. É necessária a desmineralização do soro (retirada de 90 a 95% dos sais)
- c) O aparecimento de coloração marrom implica na necessidade de se utilizar um descolorante
- d) Formação de sub-produtos indesejáveis
- e) Alto custo dos materiais para a construção da planta, devido aos agentes químicos extremamente agressivos.

3.4.2.2 - Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática da lactose é um processo complexo que envolve uma grande quantidade de reações seqüenciais, formando sacarídeos como produtos intermediários. Durante a reação, outros açúcares, além da glicose e galactose, são formados, dependendo da origem da β -galactosidase utilizada (PRENOSIL *et al.*, 1987a).

Com o desenvolvimento das lactases comerciais, houve uma grande melhora nas técnicas empregadas na hidrólise enzimática. A enzima pode ser utilizada de três maneiras: em batelada (“single use”), recuperada por membrana ou imobilizada. Nos processos em batelada, a enzima adicionada no início do processo de hidrólise é perdida quando o hidrolisado é pasteurizado. A recuperação por membrana é utilizada quando se tem interesse em impedir que a enzima seja perdida, de modo a poder reutilizá-la. Neste processo, a enzima é mantida na forma livre. No processo de imobilização, a enzima é fixada fisicamente ou quimicamente a um suporte sólido, de modo a impedir a sua livre circulação (FODA e LOPEZ-LEIVA, 2000).

Existem poucos trabalhos publicados que descrevem o processo em batelada (enzimas livres), pois diversos fatores influem em sua aplicação em nível industrial, tornando-a inviável comercialmente. Os altos custos referentes à aquisição de enzimas, associado aos efeitos da temperatura, pH e quantidade de sais, tornam esta técnica muito pouco aplicada (ZADOW, 1984).

Um dos meios de se evitar a perda da enzima é a aplicação de reatores com membrana, utilizando o processo de ultrafiltração para separar a lactase dos produtos de baixa massa molecular formados na hidrólise. As vantagens deste método são: utilização das enzimas na forma livre, possibilidade de reutilização das enzimas e menor inibição da reação pelos produtos formados, pois os mesmos são retirados continuamente do reator. A desvantagem é a necessidade de utilizar dois processos: hidrólise da lactose e separação dos produtos (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Devido à diferença entre o tamanho da enzima e dos solutos (glicose, galactose, oligossacarídeos), a enzima pode ser mantida na unidade de ultrafiltração, enquanto os açúcares permeiam a membrana, sendo recolhidos fora do reator (FODA e LOPEZ-LEIVA, 2000).

Apesar do alto custo, os sistemas em que ocorre a imobilização da enzima são mais viáveis economicamente do que os sistemas em que permanecem solúveis, pois os processos em que são mantidas imobilizadas podem ser executados continuamente e oferecem a possibilidade de reutilização das mesmas (SZCZODRAK, 2000).

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método único aplicável para todas. Isto se deve às diferentes características e composição química das enzimas, diferentes propriedades do substrato e do produto e a finalidade de aplicação do produto obtido. Assim, para cada aplicação de enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato, que resulte numa imobilização com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (BASSETTI, 1995).

Na Tabela 3.8 estão listadas as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas.

Tabela 3.8 – Principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas.

-
-
- Uso da mesma enzima por um período maior de tempo
 - Processos podem ser operados continuamente e podem ser facilmente controlados
 - Facilidade de separação do produto final
 - Redução do volume do reator (alta concentração enzimática em menor volume)
 - Condições de operação mais brandas
 - Facilidade de interrupção da reação
 - Maior estabilidade ao pH e a temperatura
-
-

Fonte: Modificado de BASSETTI, 1995.

Após a imobilização, a atividade da enzima é reduzida, sendo necessários cuidados especiais para evitar a contaminação, que pode provocar a sua perda (LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN, 1995).

Os principais componentes de um sistema de enzimas imobilizadas são: a enzima, o suporte e o modo de ligação ao suporte. Como componentes adicionais que contribuem para o melhor desempenho da enzima, e que devem ser levados em consideração na avaliação do sistema, tem-se: pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, liberação de cofatores e liberação do substrato com a remoção dos produtos. Estes fatores influem na performance do suporte e, portanto, afetam o comportamento da enzima (BASSETTI, 1995).

O material do suporte deve ser efetivamente inerte, conter um grande número de sítios para a imobilização da enzima e impor a menor quantidade de limitações para a ocorrência da reação. Os suportes mais utilizados para a imobilização das enzimas incluem vidro poroso, resinas de troca iônica, poliacrilamida e colágeno (BAKKEN *et al.*, 1989).

A estabilidade da enzima pode ser melhorada dramaticamente se uma técnica adequada de imobilização for empregada. No caso das β -galactosidases, existem vários procedimentos para imobilização: fixação ou união a suportes porosos por adsorção, interação iônica, afinidade, formação de complexos com metais (quelação) e formação de ligações covalentes (LADERO *et al.*, 2000).

As principais vantagens e desvantagens de algumas técnicas de imobilização estão citadas na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 – Comparação entre diferentes técnicas de imobilização.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Adsorção Física	<ul style="list-style-type: none"> • Simples, barata • Reagentes químicos não são necessários • Baixa probabilidade de desnaturação das enzimas 	<ul style="list-style-type: none"> • Pode ocorrer desorção devido à ligação fraca • O suporte tende a absorver outras espécies, como proteínas
Adsorção + Ligação Cruzada	<ul style="list-style-type: none"> • A desvantagem da adsorção simples é evitada 	<ul style="list-style-type: none"> • Não é tão simples como a adsorção • São utilizados reagentes químicos
Ligação Covalente	<ul style="list-style-type: none"> • Ligação muito forte • Não solta enzimas do suporte 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilização de reagentes químicos não aceitos no processamento de alimentos • Os suportes utilizados são caros.
Fixação em Gel	<ul style="list-style-type: none"> • Poucas alterações nas propriedades catalíticas • Grande quantidade de células podem ser imobilizadas • Reagentes químicos não são necessários 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitações difusionais • Limitada a substratos de baixa massa molecular
Fixação em Fibras	<ul style="list-style-type: none"> • A enzima é extremamente estável 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo rendimento • Fenômeno controlado pela difusão nos poros

Fonte: GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985.

YANG e OKOS (1989) estudaram a hidrólise da lactose utilizando β -galactosidase (obtida de *A. niger*) imobilizada em uma resina de fenol-formaldeído. Os ensaios foram realizados a temperaturas e concentração inicial da lactose variando entre 8 a 60 °C e 2,5 a 20%, respectivamente. Os resultados indicaram que a temperatura ótima de operação para este método depende do tempo de operação, mas é independente da concentração inicial ou da conversão da lactose.

BAKKEN e colaboradores (1989) utilizaram a lactase extraída de *A. oryzae* imobilizada em um reator de fluxo espiral para estudar a hidrólise da lactose contida em leite desnatado. Os dados de tempo de residência foram utilizados para avaliar a dispersão longitudinal. A 30 °C e um tempo de residência de 7 minutos, 80% da lactose presente foi convertida em glicose e galactose.

BAKKEN e colaboradores (1990) imobilizaram a β -galactosidase obtida de *A. oryzae* em um reator de fluxo axial-anular para hidrolisar a lactose presente em leite desnatado. Os dados foram obtidos a três temperaturas (30, 40 e 50 °C). Utilizando um tempo de residência de 10 min e a temperatura de 40 °C, 70% da lactose foi hidrolisada utilizando o reator de fluxo axial-anular.

PETERSON e colaboradores (1989a e b) estudaram a hidrólise da lactose utilizando lactase imobilizada em um reator contínuo de leito capilar operando a 30 °C. Soluções contendo 50, 100 e 150 g de lactose foram utilizadas no reator. A análise dos dados indicou uma conversão da lactose de 24 a 99% para tempos de reação variando de 0,06 a 6,3 min.

3.4.3 - Cinética da hidrólise da lactose

A hidrólise da lactose em glicose e galactose tem sido modelada por diversos autores utilizando enzimas obtidas de bactérias, leveduras e fungos. Em geral, a modelagem utiliza alguma forma da equação de Michaelis-Menten, que fornece a relação entre a velocidade de hidrólise V do substrato e a concentração do substrato C_S limitante (SORENSEN e NOVAK, 1996; GHALY e BEM-HASSAN, 1995).

Na Tabela 3.10 estão alguns dos modelos utilizados, onde:

- V = Velocidade de hidrólise ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
- V_m = Velocidade máxima de hidrólise ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
- C_S = Concentração do substrato ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
- C_P = Concentração do produto ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
- K_m = Constante de Michaelis-Menten ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
- K_I = Constante de inibição ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Tabela 3.10 – Alguns modelos cinéticos enzimáticos.

Modelo cinético	Equação
Michaelis-Menten sem inibição	$V = \frac{V_m \cdot C_S}{K_m + C_S} \quad (3.1)$
Michaelis-Menten com inibição competitiva por produto	$V = \frac{V_m \cdot C_S}{C_S + K_m \cdot \left(1 + \frac{C_P}{K_I}\right)} \quad (3.2)$
Michaelis-Menten com inibição acompetitiva por produto	$V = \frac{V_m \cdot C_S}{K_m + C_S \cdot \left(1 + \frac{C_P}{K_I}\right)} \quad (3.3)$
Michaelis-Menten com inibição não-competitiva por produto	$V = \frac{V_m \cdot C_S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{C_P}{K_{II}}\right) + C_S \cdot \left(1 + \frac{C_P}{K_{I2}}\right)} \quad (3.4)$

Fonte: Modificado de SANTOS *et al.*, 1998.

Os parâmetros V_m e K_m caracterizam as reações enzimáticas que são descritas pela cinética de Michaelis-Menten. V_m é dependente da concentração total da enzima, enquanto K_m é independente (FOGLER, 1992).

O modelo cinético geralmente utilizado para descrever a hidrólise enzimática da lactose é a equação de Michaelis-Menten com inibição competitiva por produto - galactose, que é apresentada através da equação 3.2 na Tabela 3.10 (YANG e OKOS, 1989).

Na Tabela 3.11 são apresentados os parâmetros cinéticos obtidos por diversos autores para a enzima β -galactosidase obtida de várias fontes na forma solúvel e insolúvel em diversas condições de temperatura. Analisando os dados, verifica-se a existência de uma grande diferença entre os valores de V_m e K_m . Isto se deve principalmente à forma como a enzima é utilizada. Solubilidade, método de imobilização, tipo de suporte, concentração inicial da enzima e condições de operação (temperatura, pH, fluxo) podem alterar significativamente a atividade da enzima.

Tabela 3.11 – Parâmetros cinéticos obtidos utilizando a enzima β -galactosidase.

Fonte	T (°C)	Parâmetros cinéticos		Referência
		V_m ($\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	K_m (mmol.L^{-1})	
<i>Aspergillus oryzae</i>	30	0,94	52	PETERSON <i>et al.</i> , 1989a
<i>Bacillus circulans</i>	60	–	41,7	NAKANISHI <i>et al.</i> , 1983
<i>Aspergillus niger</i>	40	383	70,5	YANG e OKOS, 1989
<i>Kluyveromyces lactis</i>	37	123	17,3	CAVILLE e COMBES, 1995
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	40	1170	5,76	MAHONEY e WHITAKER, 1977
<i>Escherichia coli</i>	21	570	0,23	HENG e GLATZ, 1994
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	40	580	23	SANTOS <i>et al.</i> , 1998.
<i>Aspergillus oryzae</i>	30	2,2 – 4,5	105 – 150	PORTACCIO <i>et al.</i> , 1998
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	43	2	43,6	CARRARA e RUBIOLO, 1996

BAKKEN e colaboradores (1989, 1990 e 1992) empregaram reatores de fluxo espiral e de fluxo axial-anular e lactases de *A. oryzae* e *B. circulans* para descrever o desempenho dos reatores e calcular os parâmetros cinéticos para a hidrólise enzimática da lactose utilizando o modelo de Michaelis-Menten com diversos mecanismos de inibição.

PETERSON e colaboradores (1989a e b) estudaram o desempenho de um reator de leito capilar na hidrólise da lactose dissolvida em uma solução tampão de acetato e modelaram a reação de hidrólise bem como a desativação da enzima durante o tempo de operação. O modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva por produto foi utilizado para obter os parâmetros cinéticos da hidrólise no reator.

LADERO e colaboradores (2000) utilizaram o modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva por produto (galactose) para determinar os parâmetros cinéticos da hidrólise da lactose utilizando β -galactosidase de *K. fragilis* imobilizada em um suporte de sílica-alumina. A influência de um grande número de variáveis envolvendo temperatura, concentração do substrato e produtos, e concentração da enzima foi analisada.

3.5 - Processos de separação com membranas

Os processos de separação com membranas semi-permeáveis vêm, cada vez mais, tornando-se importantes alternativas aos processos convencionais de separação nas indústrias químicas, farmacêuticas, biotecnológicas e de alimentos (MAZID, 1988). A Tabela 3.12 apresenta alguns exemplos de aplicações utilizando membranas.

Os principais atrativos para estes processos são o baixo consumo de energia, a redução no número de etapas em um processamento, a maior eficiência na separação e a maior qualidade do produto final (PETRUS, 1997).

Tabela 3.12 – Exemplos de aplicações de processos de separação com membranas.

Área	Aplicações
Química	<ul style="list-style-type: none"> • Quebra do azeótropo benzeno/hexano • Fracionamento CO₂/CH₄ • Fracionamento do ar: obtenção de gás inerte e de corrente rica em oxigênio
Biotecnológica e farmacêutica	<ul style="list-style-type: none"> • Desidratação de etanol • Purificação de enzimas • Fracionamento de proteínas
Alimentícia e bebidas	<ul style="list-style-type: none"> • Concentração de leite e do soro de queijo • Concentração e clarificação de suco de frutas • Clarificação e desalcoolização de vinhos e cervejas
Tratamento de águas	<ul style="list-style-type: none"> • Dessalinização de águas • Tratamento de esgotos municipais • Desmineralização de águas p/ caldeiras
Tratamento de despejos industriais	<ul style="list-style-type: none"> • Recuperação de íons metálicos – Couro • Recuperação de proteínas – Laticínios • Tratamento águas – Papel e Celulose
Medicina	<ul style="list-style-type: none"> • Rim artificial – Hemodiálise • Pulmão artificial – Oxigenadores • Ar enriquecido em oxigênio

Fonte: Modificado de HABERT *et al.*, 1997.

Membranas podem ser consideradas como películas poliméricas ou inorgânicas semi-permeáveis, que atuam como barreiras seletivas para uma filtração em nível molecular, separando duas fases e restringindo, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas (solutos) presentes na solução (OLIVEIRA, 2000).

As membranas sintéticas comerciais são produzidas a partir de duas classes distintas de material: os polímeros, na sua grande maioria materiais orgânicos (poliamidas, polissulfonas, poliacrilonitrila, polieterimida, polifluoreto de vinilideno), e os inorgânicos, como metais e cerâmicos (alumina, zircônia, sílica e hematita) (HABERT *et al.*, 1997).

A eficiência da membrana depende de vários fatores, tais como: propriedades da membrana, propriedades da solução, polarização, bem como das condições operacionais. A estrutura morfológica, por sua vez, refere-se essencialmente à densidade e porosidade (tamanho, número e distribuição dos poros) das camadas constituintes da membrana (MAZID, 1988).

A porosidade, a espessura, o diâmetro de poros e a permeabilidade são importantes para a escolha da membrana. Estas características dependem do material de que é feita e também da técnica de fabricação da membrana (JULIANO, 2000).

De um modo geral, as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. Tanto as membranas densas como as porosas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. As membranas anisotrópicas se caracterizam por uma região superior muito fina, mais fechada (com poros ou não), chamada de “pele”, suportada em uma estrutura porosa. Quando ambas as regiões são constituídas por um único material, a membrana é do tipo anisotrópica integral. Casos materiais diferentes sejam empregados, a membrana será do tipo anisotrópica composta (HABERT *et al.*, 1997).

No caso de membranas porosas, o tamanho dos poros e sua distribuição de tamanhos irão determinar quais moléculas ou partículas serão retidas pela membrana e quais poderão passar através de seus poros (HABERT *et al.*, 1997).

A Tabela 3.13 apresenta como os processos de separação com membranas podem ser classificados quanto ao tipo de membrana utilizada na separação, princípio de operação, fenômenos envolvidos ou força motriz promotora da separação.

Tabela 3.13 – Principais processos com membranas e força motriz necessária à separação.

Processos com membranas	Força motriz na separação
Osmose Inversa	Diferença de pressão
Ultrafiltração	Diferença de pressão
Microfiltração	Diferença de pressão
Pervaporação	Diferença de concentração + pressão (vácuo)
Diálise	Diferença de concentração
Eletrodiálise	Diferença de potencial elétrico

Fonte: PETRUS, 1997.

A aplicação de uma força motriz, promotora de movimento, sob uma membrana em contato com uma solução, promove o fluxo de solvente e/ou soluto através desta membrana. A parte da solução conhecida como “permeado” ou “filtrado” consiste em moléculas menores do que o tamanho médio dos poros da membrana que, juntamente com o solvente, passam através da membrana. A outra parte da solução a ser tratada, que fica retida, é denominada “concentrado”, e é composta por solutos de alta massa molecular, tais como as macromoléculas e partículas coloidais (OLIVEIRA, 2000).

Entre os processos que utilizam como força motriz de separação a diferença de pressão, a osmose inversa é utilizada na retenção de íons metálicos, sais em solução e açúcares de baixa massa molecular. A microfiltração é normalmente utilizada para remover partículas em suspensão e células em processos fermentativos e na clarificação de líquidos. Já a ultrafiltração exerce um papel intermediário entre estes dois processos, pois é uma técnica efetiva para a concentração ou fracionamento de macromoléculas ou quando se deseja um permeado cristalino, livre de qualquer partícula em suspensão (PETRUS, 1997).

Aplicações importantes para a osmose inversa, ultrafiltração e microfiltração nas indústrias de alimentos são mostradas na Figura 3.3.

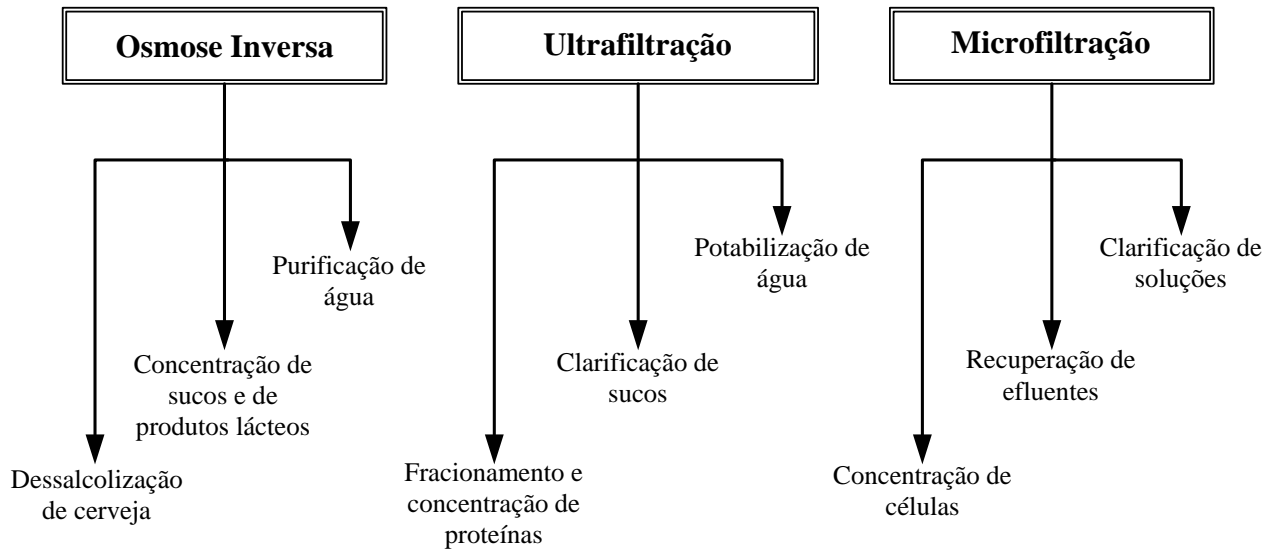


Figura 3.3 – Principais aplicações para a osmose inversa, ultrafiltração e microfiltração.

Fonte: PETRUS, 1997.

3.5.1 - Separação por ultrafiltração

Os processos de ultrafiltração são, talvez, os processos com membranas mais amplamente utilizados, juntamente com a diálise e a microfiltração. A ultrafiltração pode ser utilizada para clarificação de alimentos, concentração de solutos indesejáveis (rejeitados) e fracionamento de solutos (JULIANO, 2000). Algumas aplicações da ultrafiltração estão relacionadas na Tabela 3.14.

Tabela 3.14 – Aplicações da ultrafiltração em processos industriais.

- Concentração e fracionamento de solutos
- Recuperação de tintas coloidais utilizadas na pintura de veículos
- Produção de queijo
- Recuperação de proteínas do soro de queijo
- Recuperação da goma na indústria têxtil
- Clarificação de sucos
- Tratamento de efluentes

A ultrafiltração é um processo de separação utilizado quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo macromoléculas. As membranas de ultrafiltração apresentam poros na faixa entre 1 e 100 nm. Como os poros das membranas de ultrafiltração são menores, é necessária uma maior força motriz para se obter fluxos permeados elevados o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente (HABERT *et al.*, 1997).

Num equipamento de ultrafiltração industrial (fluxo tangencial), a solução a tratar circula sob pressão em contato com uma membrana finamente porosa. Sob efeito desta pressão, o solvente (normalmente a água) e os solutos de baixa massa molecular passam através da membrana, constituindo o permeado, e as macromoléculas e partículas coloidais são retidas (PETRUS, 1997).

Durante a ultrafiltração ocorrem fenômenos responsáveis pelo declínio do fluxo de permeado. Este declínio geralmente é decorrente de fenômenos resistivos. Um destes fenômenos é conhecido por *fouling*, que é geralmente caracterizado pela associação dos fenômenos da camada de gel (adsorção de partículas na superfície da membrana) e da colmatagem, que é o bloqueamento dos poros (OLIVEIRA, 2000).

Segundo CHERYAN (1986), o *fouling* é provocado pelo acúmulo de partículas macromoleculares na superfície da membrana, e/ou cristalização e precipitação de solutos menores na superfície e nos poros da membrana.

A formação da camada de gel ocorre quando a concentração de partículas junto à superfície filtrante atinge um determinado valor, não variando mais. Ocorre então uma precipitação de macromoléculas sobre a membrana, formando a camada de gel. Esta camada perturba o funcionamento hidrodinâmico do sistema pelo aparecimento de uma resistência suplementar e de novas características de permeação (PETRUS, 1997).

A colmatagem é caracterizada pela penetração e pelo acúmulo de partículas presentes em soluções macromoleculares nas paredes internas dos poros das membranas. A intensidade da colmatagem depende da membrana e do soluto, das condições operacionais e do tempo de operação (OLIVEIRA, 2000).

Este problema pode ser revertido pela limpeza da membrana. Porém, alguns *fouling*s são irreversíveis, necessitando assim, da troca da membrana após determinado tempo de uso (JULIANO, 2000).

Outro fenômeno responsável pelo declínio do fluxo de permeado é a “polarização por concentração”, que é a maior concentração de macrossolutos próxima à superfície da camada da membrana. Quando uma solução, contendo solutos dissolvidos, total ou parcialmente e sob pressão, entra em contato com uma membrana, soluto é levado à superfície desta película seletiva por transporte convectivo. O solvente e as partículas de dimensões menores do que o diâmetro dos poros da membrana atravessam-na. Isto leva ao aumento na concentração de macrossolutos na superfície da membrana em relação à concentração no seio da solução que está sendo ultrafiltrada. O aumento da concentração de partículas na superfície da membrana leva ao estabelecimento de um gradiente de concentração entre estes dois pontos: superfície da membrana e seio da solução. Com o objetivo de dissipar este gradiente, moléculas de soluto se difundem no sentido contrário ao do solvente que permeia a membrana (OLIVEIRA, 2000).

O estabelecimento e o controle de parâmetros operacionais como temperatura, velocidade de escoamento da solução, pressão e turbulência, além das propriedades físicas da solução como a viscosidade, difusividade e densidade são fatores importantes para reduzir os efeitos dos fenômenos de formação da camada de gel, colmatagem e polarização por concentração (OLIVEIRA, 2000).

O aumento da temperatura, dentro de limites toleráveis pela membrana e pelo produto, promove um aumento no fluxo de permeado pela redução da viscosidade da solução e pelo aumento da difusão através da camada de gel e da própria membrana. Temperaturas entre 30 e 60 °C são freqüentemente utilizadas. Dependendo do tipo de membrana, altas temperaturas podem agravar a sua compactação e mesmo alterar as suas características físicas e propriedades seletivas (PETRUS, 1997).

Alta velocidade de escoamento da solução junto à superfície da membrana também favorece um maior fluxo de permeado por reduzir o perfil de concentração na zona de polarização e controlar o crescimento da camada de gel (PETRUS, 1997).

Quanto a pressão, de uma maneira geral, o fluxo permeado aumenta linearmente com o aumento da mesma. Todavia, na prática, observa-se um desvio considerável desta relação teórica. Pressões elevadas podem provocar a compactação da membrana, tanto da camada superficial quanto da subestrutura porosa, resultando na diminuição do tamanho de poros, com conseqüente aumento na resistência hidráulica e diminuição da taxa de permeação (OLIVEIRA, 2000).

O desenvolvimento dos processos com membranas experimentou uma grande expansão, sendo uma área com grande potencial de desenvolvimento. Na Tabela 3.15 estão relacionadas algumas áreas que tem recebido maior enfoque.

Tabela 3.15 – Novos enfoques relativos a processos com membranas.

-
-
- Desenvolvimento de membranas mais resistentes mecânica e quimicamente, através da pesquisa de novos materiais cerâmicos ou poliméricos
 - Preparação de membranas através de blendas poliméricas ou pela adição de aditivos poliméricos ou inorgânicos
 - Preparação de membranas microporosas assimétricas que tenham pouca ou nenhuma capacidade de adsorção de micropartículas e sejam de fácil limpeza
 - Preparação de membranas com alta densidade de poros superficiais, com alta permeabilidade e altos níveis de retenção
 - Melhor entendimento e equacionamento dos fenômenos que promovem redução do fluxo de permeado e utilização de dispositivos e técnicas que possam reduzir a zona de polarização e a formação da camada de gel
-
-

Fonte: PETRUS, 1997.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Materiais

4.1.1 - Substrato

O substrato utilizado foi o permeado resultante da ultrafiltração do soro de leite desnatado, obtido de trabalho em andamento no Laboratório de Processos de Separação por Membranas – LABSEM, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – EQA, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, em Florianópolis, SC.

Todo o permeado do soro de leite utilizado foi obtido em um único ensaio de ultrafiltração realizado sob as condições de operação de pH 6,5, temperatura de 50 °C e pressão de 3 bar. O permeado do soro foi armazenado em recipientes com capacidade para 500 mL e conservado à temperatura de -18 °C.

Análise realizada no Laboratório de Bromatologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP – Campinas, SP, obteve uma concentração de 4,0% de lactose no soro de leite ultrafiltrado.

4.1.2 - Enzima

Em todos os experimentos a enzima utilizada foi lactase (β -D-galactosidase) *Kluyveromyces lactis*, um produto comercializado com o nome de Maxilact[®] L-5000, Gist-Brocades, Holanda, gentilmente fornecida pela empresa Global Food, São Paulo, Brasil. A enzima lactase estava a uma concentração de aproximadamente 5%, sendo armazenada em refrigerador à temperatura de 5 °C.

Cada grama do produto contém 5000 unidades de lactose neutra (Neutral Lactose Units – NLU). Uma NLU é definida como a quantidade de enzima que pode liberar 1,0 μmol de o-nitrofenol por minuto sob as condições do teste. A quantidade de proteínas é da ordem de 54,9 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.1.3 - Membrana

Todos os ensaios realizados utilizaram a mesma membrana, obtida de trabalho em andamento no Laboratório de Processos de Separação por Membranas – LABSEM, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – EQA, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, em Florianópolis, SC.

A membrana foi preparada através do método de inversão de fases por difusão induzida pela coagulação da solução polimérica em banho de não-solvente, utilizando-se um suporte de poliéster-propileno (Viledon Filter – Carl Freudenberg, Alemanha). A membrana foi preparada com a seguinte composição:

- 10% de PVDF – Polifluoreto de vinilideno comercial, Aldrich
- 3% de LiCl – Cloreto de Lítio, Synth
- 87% de DMF – N’N’-dimetilformamida ($\text{CH}_3\text{H}_7\text{NO}$), Merck.

4.1.4 - Equipamentos utilizados na caracterização da membrana

- Espectrômetro de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Perkin Elmer
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo XL–30, Phillips.

4.1.5 - Equipamento utilizado no ensaio de ultrafiltração

Todos os ensaios realizados em escala laboratorial utilizaram uma célula de ultrafiltração, cujo esquema está representado na Figura 4.1.

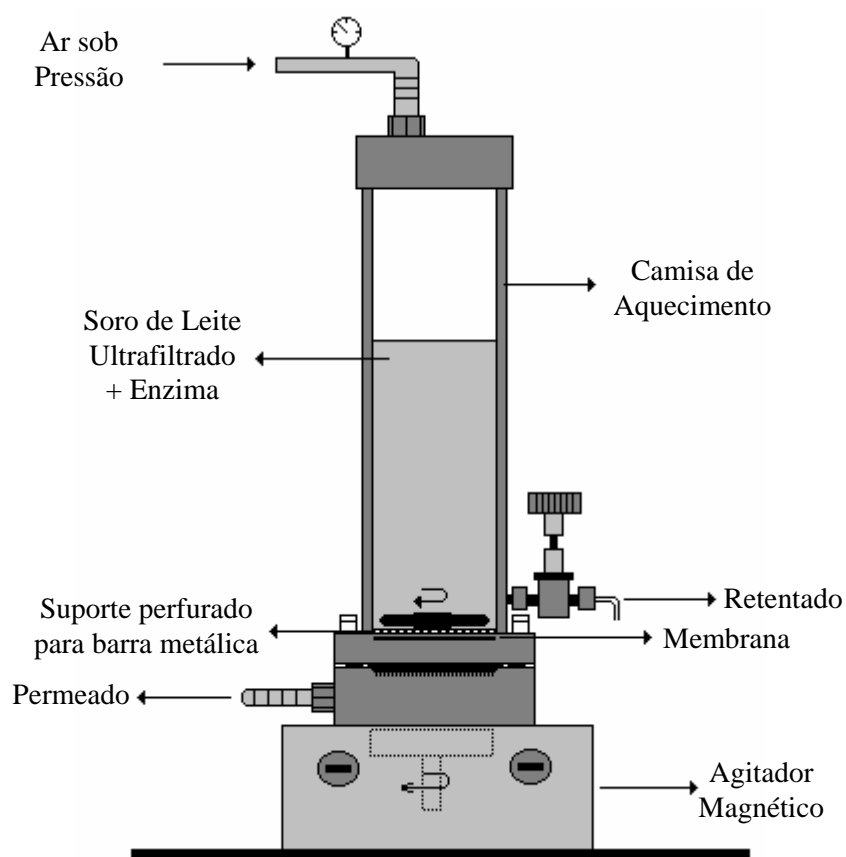


Figura 4.1 – Célula de ultrafiltração com fluxo perpendicular.

Fonte: Reproduzido e modificado de PETRUS, 1997.

A célula foi confeccionada em aço inoxidável ANSI 316 com capacidade volumétrica de 170 cm^3 e área útil filtrante de $15,9 \text{ cm}^2$, sendo a mesma apoiada sobre um dispositivo de agitação mecânica, que permitiu a movimentação do substrato através da utilização de uma barra metálica (“peixinho”).

Um banho termostaticado com circulação de água através da camisa da célula de ultrafiltração foi utilizado para manter a temperatura do ensaio no nível desejado.

O controle de pressão pôde ser realizado pela utilização de ar comprimido, injetado pelo topo do dispositivo. Um manômetro foi utilizado para indicar a pressão no interior da célula de ultrafiltração.

Duas amostras foram obtidas simultaneamente através dos pontos de coleta de permeado e retentado para análise.

4.1.6 - Materiais utilizados na análise dos produtos

- Kit Enzimático para determinação de Glicose Enzimática da empresa Analisa Diagnóstica, Minas Gerais.
- Espectrofotômetro analógico CELM E225D, com cubetas de vidro de 1 cm de diâmetro.
- Banho termostaticado.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Caracterização da membrana

A caracterização da membrana foi realizada para determinar a ocorrência de alguma interação membrana-enzima, o que pode provocar diminuição do fluxo de permeado. As técnicas utilizadas na caracterização estão descritas a seguir.

4.2.1.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Permite uma caracterização rápida e precisa da superfície e das subestruturas porosas da membrana. A área a ser analisada é bombardeada por um feixe de elétrons, de intensidade variada. A interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra emite uma série de radiações, que fornecem informações sobre a composição, topografia da membrana, etc.

Para a observação da seção transversal e da superfície, a membrana foi cuidadosamente fraturada em nitrogênio líquido (-160 °C). O suporte de poliéster-propileno foi retirado quando da imersão da membrana no nitrogênio líquido, pois o mesmo é de difícil fratura. Devido à alta voltagem empregada para a aceleração dos elétrons, as amostras foram metalizadas. O processo consiste em recobrir o material com uma fina camada de ouro, para evitar que ocorra alteração ou mesmo queima da membrana.

Os ensaios de microscopia eletrônica de varredura foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Materiais – LABMAT, do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC.

4.2.1.2 - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

No estudo dos polímeros, a Espectroscopia na Região do Infravermelho permite analisar os compostos presentes na estrutura dos mesmos e a interação entre eles. Exceto para isômeros óticos, não se conhecem compostos com um mesmo espectro.

A Espectroscopia por Reflexão Interna (FTIR–ATR) foi utilizada devido à baixa transmissão (opacidade) da membrana.

A técnica mede o nível vibracional das moléculas através do contato da amostra com um cristal com alto índice de refração e baixa absorção na região do infravermelho. Geralmente, a radiação atinge uma profundidade variando entre 0,1 a 5,0 micra, dependendo, principalmente, do ângulo de incidência e do comprimento de onda.

As análises foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC.

4.2.2 - Ensaio laboratoriais

Os ensaios laboratoriais para determinação da hidrólise da lactose em glicose e galactose utilizando a lactase (β -galactosidase) *K. lactis* foram realizados utilizando a célula de ultrafiltração com fluxo perpendicular esquematizada na Figura 4.1, sob diferentes condições operacionais, através da alteração das variáveis temperatura, pH e concentração de enzima. As condições de operação estão especificadas na apresentação dos resultados.

Após a membrana ser fixada ao dispositivo de ultrafiltração, 150 mL de permeado do soro foram acrescentados ao sistema, juntamente com a enzima. O reator foi então fechado e a pressão dentro da célula foi controlada através da injeção de ar comprimido. Uma rotação de 200 rpm foi utilizada para manter o conteúdo do reator em constante agitação.

Os ensaios foram realizados durante um período de 4 horas. A primeira amostra foi retirada com 1 minuto de ensaio e as demais em intervalos de 15 minutos, sendo coletadas amostras simultaneamente do retentado e do permeado, que foram imediatamente mergulhadas em banho-maria a 90 °C durante 5 minutos para provocar a inativação das enzimas que tivessem permeado a membrana.

Após encerrar o experimento, uma amostra do permeado e outra do retentado foram coletadas, inativadas e armazenadas em refrigerador a -18 °C. O conteúdo restante do permeado do soro foi eliminado e a membrana utilizada no ensaio foi retirada, seca e numerada para posterior caracterização.

Nos ensaios realizados a temperaturas diferentes da ambiente, a célula foi mantida na temperatura especificada através da utilização de um banho termostatizado. A enzima foi acrescentada apenas após o permeado do soro atingir a temperatura de realização do ensaio, iniciando-se então o experimento.

Em intervalos regulares de tempo foram coletadas amostras e pesadas em balança analítica para a quantificação do fluxo de permeado. Procurou-se manter um fluxo constante de $20 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ em todos os experimentos, controlando-se a pressão do sistema.

Na realização da hidrólise da lactose em reator batelada, a célula de ultrafiltração foi modificada através da utilização de um plástico no lugar da membrana, o que impediu a permeação do substrato. As amostras retiradas do retentado foram colocadas em banho-maria a 90 °C para inativar as enzimas e armazenadas para posterior determinação da conversão de lactose em glicose e galactose.

4.2.3 - Análise das amostras retiradas

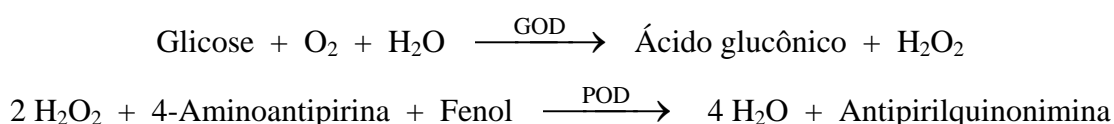
4.2.3.1 - Determinação da concentração de glicose

Nas amostras de permeado e retentado, o objetivo principal foi determinar a concentração de glicose presente. Todas as amostras foram analisadas utilizando-se o kit de Glicose Enzimática da empresa Analisa Diagnóstica, Minas Gerais.

O kit contém os reagentes acondicionados em frascos. Para o preparo do reagente de cor, dissolveu-se o conteúdo do frasco em 250 mL de água destilada, juntamente com o conteúdo de um frasco de enzimas. O reagente permanece estável durante 2 meses em um recipiente de vidro âmbar entre 2 – 8 °C. O frasco que contém o padrão de 100 mg.dL⁻¹ de glicose foi mantido em refrigerador entre 2 e 8 °C.

a) Princípio do método

O método baseia-se na oxidação da glicose a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio com a enzima glicose oxidase atuando como catalisador. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha. A coloração é determinada em espectrofotômetro ajustado para absorvância a 505 nm. As reações que ocorrem durante a realização do teste são:



A linearidade do método é garantida até uma concentração de glicose máxima de 4 mg.dL⁻¹. Acima disso, foram realizadas diluições para a adequação da amostra à faixa de análise do teste.

b) Análise das amostras

As amostras com concentração superior a 4 mg.dL⁻¹ foram diluídas sucessivas vezes para se adequarem à faixa de operação do método.

Em um tubo de ensaio colocou-se 2 mL do reagente de cor e 20 μ L da amostra obtida nos ensaios e previamente descongelada. Após a retirada da quantidade necessária ao teste, a amostra foi novamente congelada para realização de novas determinações.

Paralelamente, em outro tubo de ensaio, preparou-se um branco, contendo apenas 2 mL do reagente de cor, e um padrão, contendo 2 mL do reagente de cor e 20 μ L do padrão de glicose. O branco foi utilizado para a calibração do zero do espectrofotômetro e o padrão, que continha uma concentração conhecida de glicose, para determinar a curva de calibração do teste. Devido à linearidade do teste, apenas uma leitura do padrão foi realizada.

Os tubos de ensaio preparados foram colocados em banho-maria. A amostra foi incubada à temperatura de 37 °C durante 10 minutos. A leitura foi realizada em no máximo uma hora após a incubação em espectrofotômetro ajustado para absorvância a 505 nm.

A absorvância obtida é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra, devendo ficar entre os valores de 0,000 a 0,800, que é a precisão máxima do espectrofotômetro utilizado. Quando a absorvância for maior do que 0,800, a amostra deve ser diluída e realizada nova leitura. O valor da concentração de glicose obtido deve ser multiplicado pelo fator de diluição da amostra.

Para a obtenção dos resultados foi utilizada a equação (4.1):

$$C_t = \frac{A_t \cdot C_{pa}}{A_p} \quad (4.1)$$

onde:

C_t = Concentração do teste (mg.dL^{-1})

C_{pa} = Concentração do padrão (100 mg.dL^{-1})

A_t = Absorvância do teste

A_p = Absorvância do padrão

Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.2.4 - Determinação do grau de hidrólise

O grau de hidrólise foi determinado através da estequiometria da reação, considerando que para cada molécula de lactose degradada são formadas uma molécula de glicose e uma molécula de galactose, segundo a reação:



Através da determinação da concentração de glicose, foi possível calcular a quantidade hidrolisada pela diferença da lactose presente no início do ensaio e no instante da coleta da amostra. Estes valores, convertidos para percentagem, foram utilizados na construção dos gráficos grau de hidrólise *versus* tempo apresentados nos resultados para as condições operacionais testadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidrólise enzimática do permeado do soro de leite ultrafiltrado utilizando lactase (β -D-galactosidase) Maxilact[®] L-5000 foi realizada utilizando-se em todos os ensaios a célula de ultrafiltração esquematizada na Figura 4.1. Este dispositivo, para fins práticos, pode ser considerado como um reator a membrana, permitindo a permeação dos produtos da reação, e retenção, principalmente da enzima, devido a sua elevada massa molecular.

A célula de ultrafiltração utilizada permitiu o estudo da hidrólise da lactose sob diversas condições operacionais. As variáveis analisadas foram temperatura, pH e concentração da enzima, conforme descritas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Condições operacionais utilizadas nos ensaios de hidrólise da lactose.

Temperatura (°C)	pH	Concentração de enzima (mg.L ⁻¹)
30		
35		
40	6	1250
45		
50		
	4	
	5	
40	6	1250
	7	
		400
40	6	1250
		2000

5.1 - Comparação da hidrólise enzimática da lactose em um reator em batelada e um reator a membrana

Foram realizados dois ensaios para determinação da conversão máxima de lactose em glicose e galactose. Os dois experimentos hidrolisaram o permeado do soro de leite a uma temperatura de 40 °C, pH 6 e concentração de enzima de 1250 mg.L⁻¹. A única diferença entre os ensaios foi a utilização da célula de ultrafiltração.

No primeiro ensaio, o dispositivo operou como um reator em batelada. Uma amostra do substrato foi retirada a cada 15 minutos para análise. No outro experimento, a célula foi utilizada como um reator a membrana, ocorrendo a permeação dos produtos formados – glicose e galactose e retenção da enzima. Duas amostras foram obtidas, uma de permeado e outra de retentado, para análise do grau de conversão.

Analisando os valores para o grau de hidrólise da lactose em glicose, representados na Figura 5.1, percebe-se que a conversão máxima para a hidrólise da lactose realizada em um reator a membrana alcança um valor na ordem de 92%, enquanto que no reator em batelada a conversão máxima obtida foi de 82%.

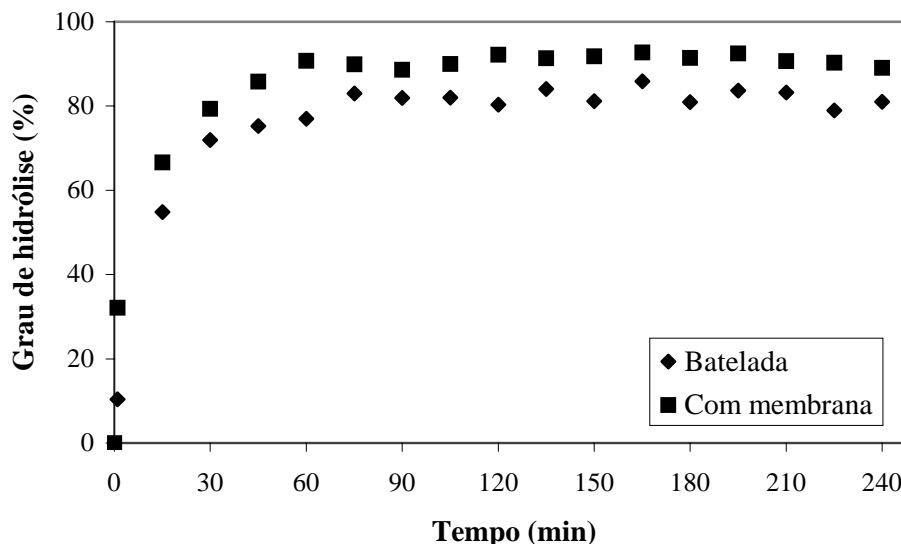


Figura 5.1 – Comparação do grau de hidrólise da lactose em glicose realizada em um reator em batelada e um reator a membrana (temperatura 40 °C, pH 6, concentração de enzima 1250 mg.L⁻¹).

As conversões máximas para ambos os reatores foi alcançada com aproximadamente 60 minutos de ensaio, permanecendo praticamente constante durante o período restante (3 horas) do experimento.

A menor conversão para o reator em batelada ocorre devido à permanência dos produtos dentro do reator, diminuindo a velocidade de conversão. Este fenômeno não ocorre no reator a membrana, pois os produtos de reação, glicose e galactose, permeiam a membrana, sendo retirados continuamente do sistema.

Analisando os dados de conversão para o reator em batelada, nota-se que próximo aos 240 min começa a ocorrer uma queda na conversão. Esta queda não é significativa, mas pode indicar o início da “polimerização” da glicose e galactose, diminuindo assim a eficiência do reator, ocorrendo um princípio de reversibilidade. Os monossacarídeos competem com a lactose pelos sítios ativos da enzima, formando oligossacarídeos.

Para comprovar que o produto formado permeou a membrana, as amostras retiradas do permeado e do retentado foram analisadas em função da conversão de lactose em glicose e galactose. A Figura 5.2 apresenta os dados para o experimento realizado nas condições operacionais de temperatura de 40 °C, pH 6 e concentração de enzima de 1250 mg.L⁻¹.

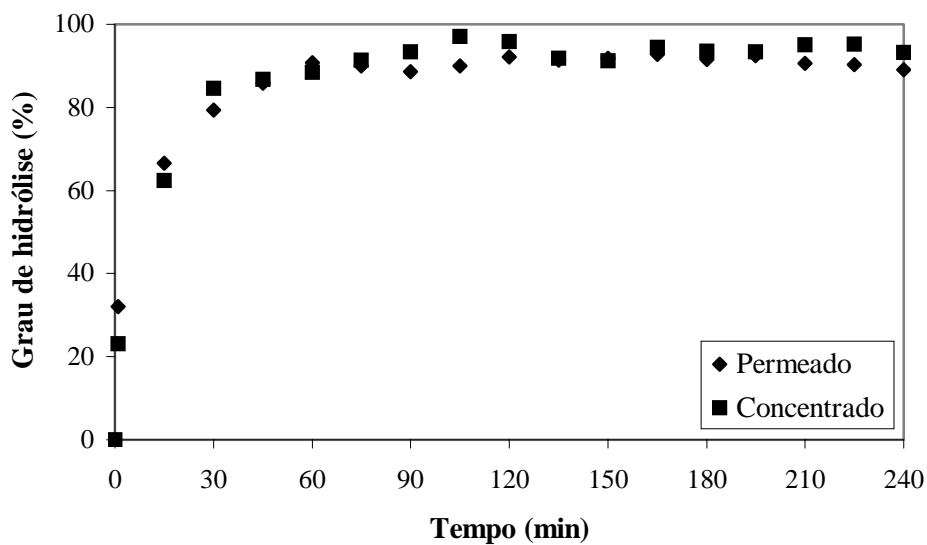


Figura 5.2 – Comparação do grau de hidrólise da lactose do permeado e do retentado (temperatura 40 °C, pH 6, concentração de enzima 1250 mg.L⁻¹).

A análise das curvas da Figura 5.2 demonstra que o grau de hidrólise é praticamente idêntico para as duas amostras. Isto indica que o produto formado no reator permeia a membrana, sendo retirado da célula de ultrafiltração (reator) como permeado.

A membrana utilizada à base de PVDF e DMF foi escolhida por ser uma membrana de baixo custo. As concentrações dos reagentes utilizados em sua elaboração permitem obter uma membrana com uma excelente permeabilidade, requisito fundamental na hidrólise de permeado do soro, devido a grande quantidade deste produto derivado da indústria de laticínios.

Na Figura 5.3 é apresentada uma microfotografia de uma membrana microporosa e assimétrica de PVDF, identificando as diferentes regiões morfológicas. Nessa figura não aparece o suporte de poliéster-polipropileno, retirado da membrana devido à dificuldade de fraturar o mesmo para a realização da microfotografia. Percebe-se que os poros da pele filtrante existentes na sub-estrutura da membrana são relativamente grandes. Isto permite a permeação de lactose, glicose e galactose e parte da enzima no início do processo, produzindo uma continuidade da hidrólise enzimática no permeado, necessitando assim de uma etapa posterior para a inativação da enzima. Após algum tempo de processo, forma-se sob a pele filtrante uma camada de gel, composta por moléculas que adsorvem na membrana, impedindo a passagem de moléculas grandes, como as enzimas.

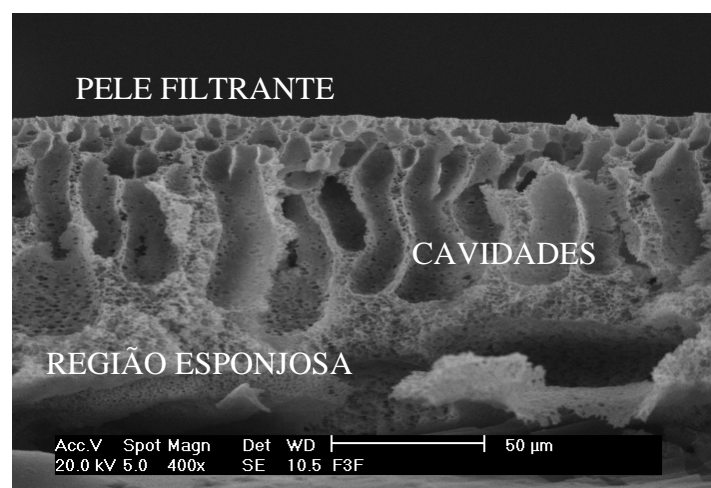


Figura 5.3 – Microfotografia da fratura de uma membrana assimétrica de ultrafiltração indicando suas diferentes regiões morfológicas.

Para verificar se ocorreu a permeação dos produtos, reagentes e enzima, um ensaio foi realizado analisando-se o grau de hidrólise alcançado. A diferença dos outros ensaios consistiu em dividir a amostra do permeado. Uma parte da amostra foi inativada imediatamente e analisada, enquanto a outra metade foi mantida em banho-maria à temperatura de 37 °C durante 1 hora. Ao fim deste período, esta amostra também foi inativada e analisada. Para comprovar a ocorrência da permeação da enzima, os valores obtidos para o grau de hidrólise deveriam ser diferentes.

A Figura 5.4 apresenta os resultados obtidos na verificação da permeabilidade da membrana às moléculas de elevada massa molecular, como as enzimas. As condições de operação foram temperatura de 40 °C, pH 6 e concentração de enzima de 1250 mg.L⁻¹.

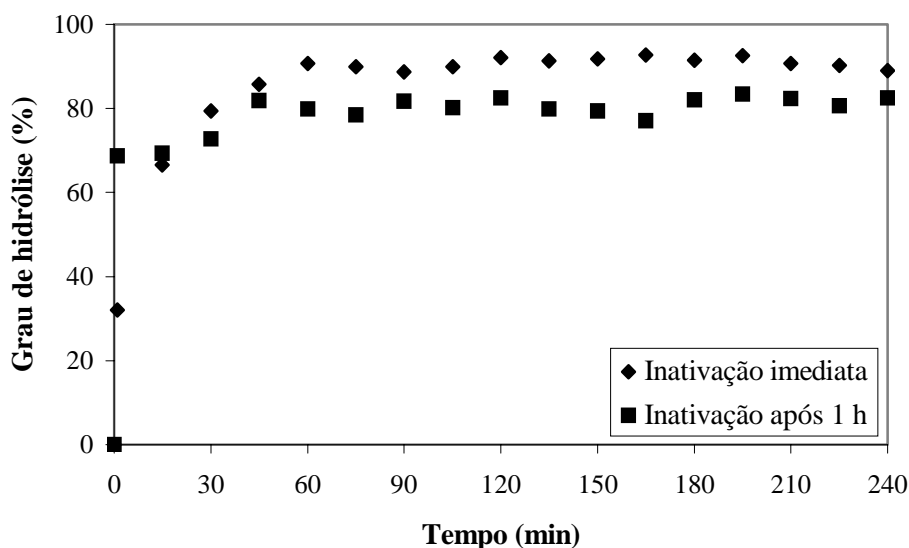


Figura 5.4 – Comparação do grau de hidrólise da lactose da fração do permeado imediatamente inativada e da fração do permeado mantido em condições ótimas (37 °C) e inativada após 1 hora.

Analisando a Figura 5.4, observa-se que no início a fração da amostra de permeado mantida em condições ótimas durante 1 hora e posteriormente inativada obteve um grau de hidrólise de aproximadamente 70%, muito superior ao valor de 32% obtido para a amostra imediatamente inativada. Esta diferença demonstra que somente no início do processo ocorreu a permeação da enzima juntamente com lactose e suas frações, glicose e galactose.

Analisando os dados das amostras coletadas ao se chegar ao máximo de concentração de glicose, aproximadamente 30 minutos após o início do ensaio, o grau de hidrólise para as duas condições do permeado praticamente tornam-se iguais. A provável explicação está na ocorrência dos fenômenos de entupimento da membrana, como a colmatagem e *fouling*, explicados na Revisão Bibliográfica.

A ocorrência destes fenômenos diminui a permeabilidade da membrana através da formação de uma camada superficial de gel sobre a pele filtrante da membrana (colmatagem) ou através da diminuição do diâmetro efetivo dos poros (*fouling*), impedindo a passagem dos reagentes de massa molecular elevada.

Para confirmar esta hipótese, foi realizada a Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR, em duas membranas utilizadas nos ensaios. A primeira membrana foi analisada antes de ser realizado qualquer teste, isto é, uma membrana nova, sem uso, enquanto a segunda membrana foi utilizada em um ensaio de hidrólise enzimática nas condições operacionais de temperatura de 40 °C, pH 6 e concentração de enzima de 1250 mg.L⁻¹.

Na Figura 5.5 são apresentados os espectros no infravermelho obtidos na análise de FTIR para as duas membranas. A região do espectro analisada está compreendida entre os números de onda de 1100 a 1800 cm⁻¹, pois a absorbância do PVDF e das proteínas, através do radical NH⁺, encontra-se nesta região.

O pico correspondente à região de 1630 cm⁻¹ é decorrente da vibração do radical NH⁺ da proteína dissolvida na superfície da membrana com o flúor, pois as proteínas têm uma forte afinidade por superfícies hidrofóbicas, como é o caso da membrana de PVDF.

A análise da Figura 5.5 demonstra que durante a utilização da membrana na ultrafiltração do soro de leite ocorre uma ligação a nível estrutural entre os polímeros formadores da membrana e algumas moléculas presentes no substrato, em especial as da enzima, o que provoca a modificação da análise do espectro do FTIR, aparecendo uma banda referente à proteína (radical NH⁺ da lactase) na membrana utilizada. A ocorrência desta interação diminui a permeabilidade da membrana através da diminuição do diâmetro efetivo dos poros, o que provoca a formação de uma camada superficial de gel sobre a pele filtrante da membrana, impedindo a passagem dos reagentes de massa molecular elevada.

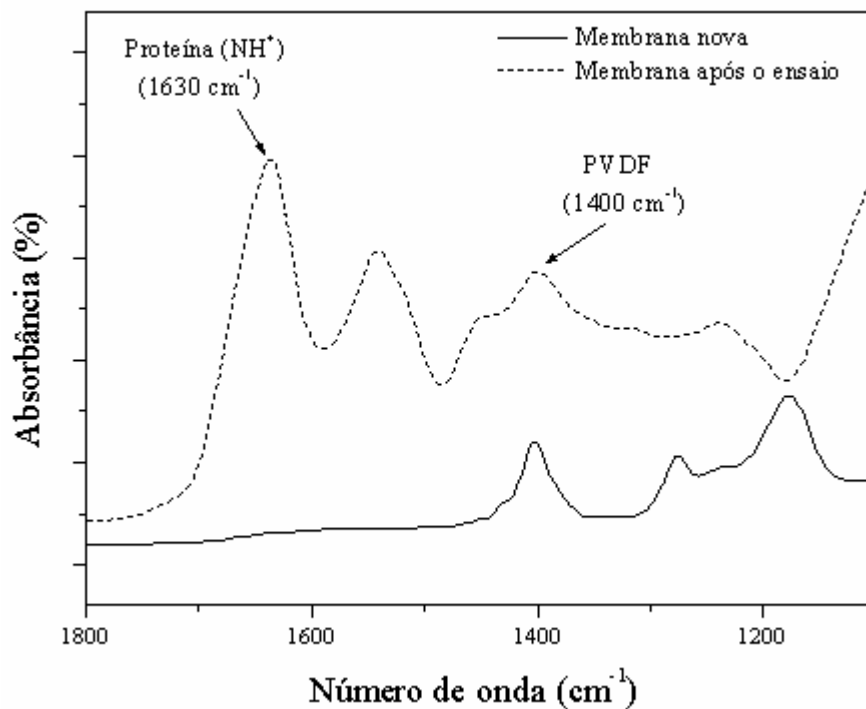


Figura 5.5 – Análise de FTIR da membrana nova e da membrana utilizada no ensaio de hidrólise (temperatura 40 °C, pH 6, concentração de enzima 1250 mg.L⁻¹).

5.2 - Influência da temperatura, pH e concentração da enzima na hidrólise da lactose

5.2.1 - Influência da temperatura

As reações enzimáticas são fortemente dependentes de uma temperatura ótima. Esta temperatura ótima influencia diretamente a atividade da enzima, aumentando a velocidade da reação e, por conseqüência, a conversão do substrato em produtos. Temperaturas abaixo ou acima desta faixa inibem a atividade enzimática e, a temperaturas muito superiores, ocorre a inativação da enzima, devido à desnaturação da enzima. Como conseqüência, o conhecimento da faixa de atividade ótima para cada enzima é fundamental para a otimização dos processos envolvendo reações enzimáticas.

Para determinar a faixa de temperatura ótima da enzima β -galactosidase, foram realizados ensaios a diversas temperaturas, conforme especificadas na Tabela 5.1, mantendo-se o pH em 6,0 e a concentração de enzimas em 1250 mg.L^{-1} . A concentração da glicose, através da análise da quantidade encontrada no permeado, foi utilizada como parâmetro para verificar a melhor faixa de temperatura, pois a maior conversão é obtida na faixa de maior atividade enzimática.

A Figura 5.6 apresenta os resultados obtidos para a conversão da lactose em glicose e galactose a diversas temperaturas. O grau de hidrólise obtém seu máximo em aproximadamente 60 minutos, permanecendo constante durante o resto do ensaio. Na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C ocorreram as melhores conversões, obtendo-se valores próximos a 100% de hidrólise.

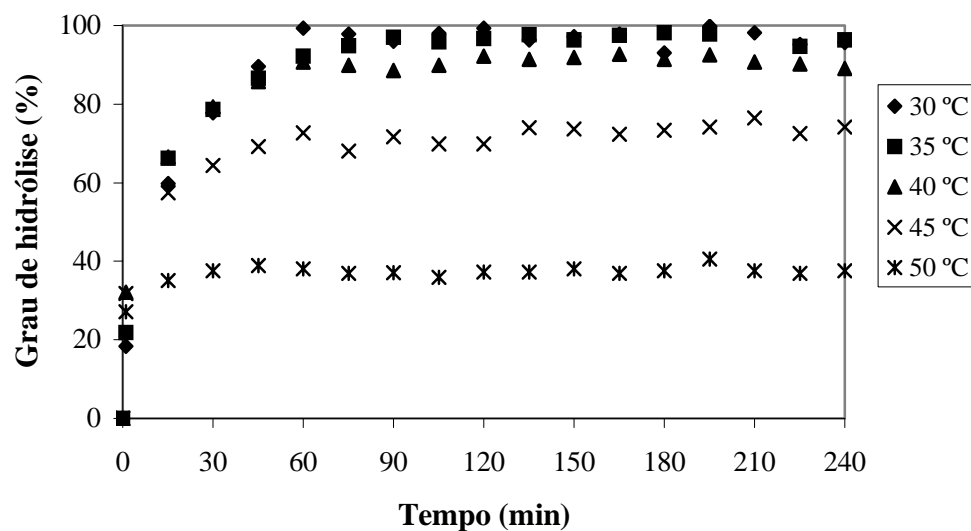


Figura 5.6 – Grau de hidrólise da lactose em função do tempo a temperaturas de 30, 35, 40, 45 e 50 °C (pH 6, concentração de enzima 1250 mg.L^{-1}).

Com o aumento da temperatura, a conversão da lactose reduziu sensivelmente. A 45 °C a conversão máxima obtida foi de aproximadamente 70%, enquanto que para a temperatura de 50 °C, apenas 35% da lactose hidrolisou. Pode-se concluir que à medida que se aumenta a temperatura, a atividade enzimática diminui, chegando à completa inativação a aproximadamente 90 °C, devido à desnaturação das enzimas.

Analisando os dados da Figura 5.6, verifica-se que a conversão manteve-se constante após alcançar o ponto máximo. Isto é uma evidência de que a hidrólise enzimática da lactose em um reator com utilização do processo de ultrafiltração não sofre nenhum tipo de inibição da conversão por produtos ou reagentes.

Os dados obtidos estão de acordo com LADERO e colaboradores (2000) que obtiveram uma atividade máxima para a enzima na faixa de temperatura próxima de 40 °C utilizando a lactase imobilizada obtida de *K. fragilis*.

5.2.2 - Influência do pH

Quatro diferentes valores de pH foram utilizados: 4, 5, 6 e 7. O permeado do soro inicialmente em pH 6 foi acidificado com a utilização de ácido cítrico 0,1 mol.L⁻¹, enquanto que o pH 7,0 foi alcançado com a utilização de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹.

A Figura 5.7 apresenta os valores para o grau de hidrólise da lactose obtidos nos ensaios com pH 5, 6 e 7. As condições operacionais de temperatura (40 °C) e concentração de enzima (1250 mg.L⁻¹) foram mantidas constantes durante os três experimentos.

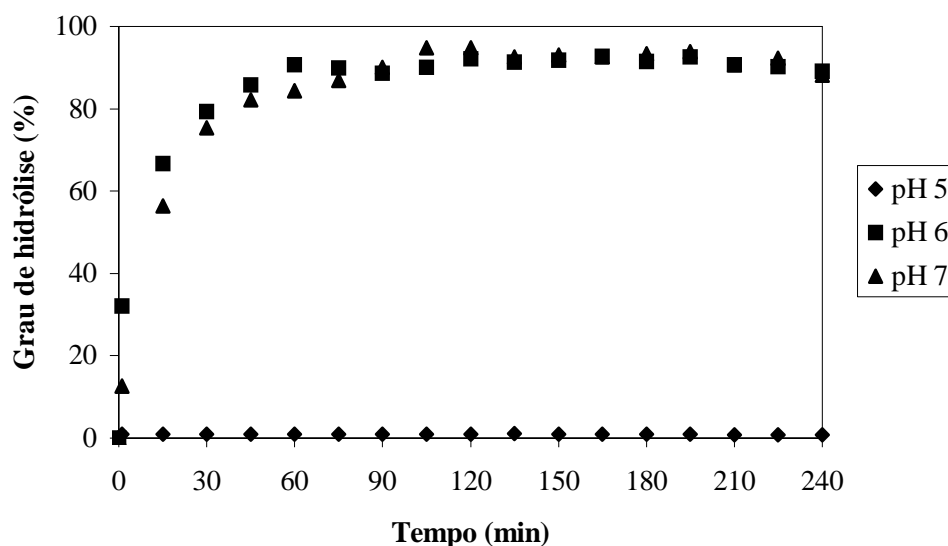


Figura 5.7 – Grau de hidrólise da lactose em função do tempo a pH 5, 6 e 7 (temperatura 40 °C, concentração de enzima 1250 mg.L⁻¹).

A análise dos dados demonstra que o grau de hidrólise foi praticamente igual quando a reação ocorreu em pH 6 e 7. A conversão máxima obtida foi da ordem de 90%. Analisando mais detalhadamente os valores, verifica-se que o tempo necessário para alcançar a conversão máxima em pH 6 foi de aproximadamente 60 min, enquanto que para pH 7 foi de 90 minutos.

Nos ensaios realizados em pH ácido os valores para o grau de hidrólise puderam ser praticamente desconsiderados. Para pH 4 não se conseguiu verificar a formação de glicose pelo teste utilizado, enquanto que para pH 5 o valor máximo obtido foi de 1%. Estas variações do grau de hidrólise permitem concluir que a faixa ideal de pH é entre 6 e 7. À medida que o pH é alterado, a atividade da enzima começa a diminuir, sendo que a maior diminuição ocorre em pH ácido.

A variação de 1 grau na escala de acidez resultou em valores acentuadamente diferentes. Enquanto a atividade enzimática foi pouco reduzida com a utilização do permeado do soro ajustado para pH neutro, a atividade em pH 5 diminuiu sensivelmente, e a enzima foi praticamente inativada em pH 4.

5.2.3 - Influência da concentração da enzima

A Figura 5.8 apresenta os dados relativos aos ensaios de hidrólise enzimática da lactose realizados a diferentes valores de concentração de enzima: 400 mg.L⁻¹, 1250 mg.L⁻¹ e 2000 mg.L⁻¹. As condições operacionais utilizadas foram temperatura de 40 °C e pH 6.

Analisando os dados, percebe-se que para a concentração de enzima de 1250 mg.L⁻¹ obteve-se o mais alto grau de hidrólise nos instantes iniciais da hidrólise (tempo de 5 min), enquanto que para as outras concentrações de lactase ocorreu uma hidrólise inicial menor.

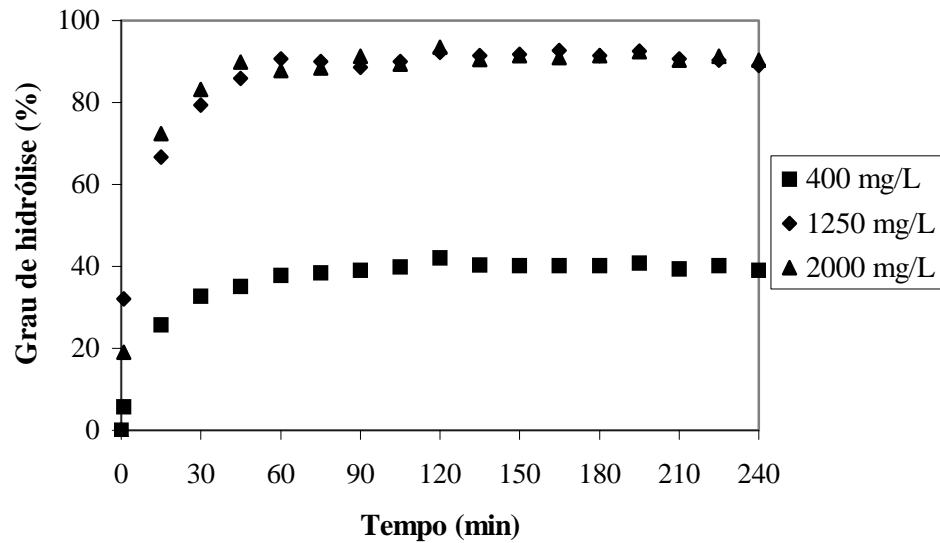


Figura 5.8 – Grau de hidrólise da lactose em função do tempo a concentrações de enzima de 400, 1250 e 2000 mg.L⁻¹ (temperatura 40 °C, pH 6).

O tempo necessário para atingir o máximo grau de hidrólise foi de 60 minutos para as concentrações de 400 e 1250 mg.L⁻¹, enquanto que para 2000 mg.L⁻¹, o tempo foi de 45 minutos. Neste ponto, os graus de hidrólise obtidos para os valores da concentração de enzima de 1250 e 2000 mg.L⁻¹ foram praticamente idênticos, alcançando uma conversão máxima na ordem de aproximadamente 90%, enquanto que para a concentração de 400 mg.L⁻¹ houve um rendimento expressivamente menor, na ordem de 40%.

A análise dos dados permite concluir que não existe uma significativa melhora na taxa de conversão quando são utilizadas concentrações maiores do que 1250 mg.L⁻¹. O excesso de enzimas no meio não aumenta o grau de hidrólise, apenas diminui o tempo para obtenção do rendimento máximo de 60 para 45 min.

A utilização de 400 mg.L⁻¹ de enzima diminuiu consideravelmente o grau de hidrólise máximo obtido. Isto ocorre devido à menor quantidade de sítios ativos disponíveis para ocorrer a hidrólise, diminuindo o grau de conversão da lactose em glicose e galactose.

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 - Conclusões

Do que foi apresentado no capítulo anterior, e considerando-se os resultados reportados na literatura, podemos concluir que:

1. A utilização de um reator a membrana permite uma conversão maior de lactose em glicose e galactose em comparação a um reator em batelada, pois no reator a membrana os produtos são continuamente retirados, não ocorrendo a inibição da atividade enzimática pela ação dos produtos formados.
2. Variações nas condições operacionais de temperatura, pH e concentração de enzima influenciaram consideravelmente o grau de hidrólise da lactose. Quanto mais próximas às condições operacionais estiveram das condições naturais do permeado do soro, isto é, temperatura de 37 °C e pH 6,0, maior foi o rendimento da hidrólise, o que está em concordância com o que se espera de um processo enzimático.
3. A influência da temperatura começa a ter maior importância a partir de 40 °C. Em temperaturas menores o grau de hidrólise mantém-se praticamente constante, mas em temperaturas superiores a 40 °C, a atividade da enzima é fortemente influenciada, ocorrendo uma queda significativa na taxa de hidrólise.
4. Na hidrólise enzimática da lactose em pH's ácidos inferiores a 6,0, ocorre uma queda significativa de rendimento, sendo que em pH 4 ocorre a inativação da enzima. Em pH 7 a atividade enzimática mantém-se muito próxima da atividade do pH ótimo, 6,0.

5. Para os valores testados, a concentração ótima de enzima se estabeleceu em 1250 mg.L⁻¹. O grau de hidrólise manteve-se praticamente igual para a concentração de 2000 mg.L⁻¹ e reduziu-se acentuadamente quando 400 mg.L⁻¹ de enzima foram utilizados.
6. Para a hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando-se *Kluyveromyces lactis*, o maior grau de hidrólise observado foi de aproximadamente 100% em 1 hora de ensaio, com as seguintes condições de operação: temperatura de 30 °C, pH 6 e concentração de enzima de 1250 mg.L⁻¹.
7. A membrana utilizada permitiu a passagem de compostos com baixa massa molecular, glicose, galactose e lactose, impedindo, quase que totalmente, a permeação da enzima.
8. No início da hidrólise ocorreu a permeação da enzima e da lactose juntamente com os produtos formados devido à alta porosidade da membrana. Após 30 minutos de operação ocorreu a formação do fenômeno da colmatagem, impedindo a passagem da enzima. Este fenômeno produz a redução do fluxo de permeado e precisa ser melhor estudado.

6.2 - Sugestões

1. Determinar o grau de hidrólise da lactose em outras condições operacionais de temperatura, pH e concentração de enzima, para determinar as condições ótimas para realizar a hidrólise enzimática da lactose.
2. Utilizar β-galactosidases provenientes de outras fontes, como *Aspergillus niger*, para determinar a influência da origem da enzima no processo enzimático da lactose em um reator a membrana.

3. Estudar a influência da variação do fluxo de permeado no grau de hidrólise, identificando parâmetros que possibilitem o scale-up do processo de ultrafiltração em nível industrial para a hidrólise da lactose.
4. Analisar as condições para a imobilização da enzima no interior de uma membrana, verificando assim, a possibilidade de recuperar simultaneamente as proteínas do soro e hidrolisar a lactose do permeado.
5. Estudar um método para separar os produtos formados – glicose e galactose durante a reação de hidrólise enzimática da lactose, permitindo uma melhor utilização da glicose na indústria alimentícia.
6. Verificar a queda da atividade da lactase em um sistema contínuo de hidrólise, com o objetivo de realizar a troca da enzima no interior do reator após a queda da atividade tornar-se significativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKKEN, A.P.; HILL Jr., C.G.; AMUNDSON, C.H. Hydrolysis of Lactose in Skim Milk by Immobilized Beta-Galactosidase in a Spiral Flow Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.33, n.10, p.1249–1257. 1989.

BAKKEN, A.P.; HILL Jr., C.G.; AMUNDSON, C.H. Use of Novel Immobilized β -Galactosidase Reactor to Hydrolyze the Lactose Constituent of Skim Milk. **Biotechnology and Bioengineering**, v.36, n.3, p.293–309. 1990.

BAKKEN, A.P.; HILL Jr., C.G.; AMUNDSON, C.H. Hydrolysis of Lactose in Skim Milk by Immobilized β -Galactosidase (*Bacillus circulans*). **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, n.4, p.408–417. 1992.

BARFORD, J.P.; CAIL, R.G.; CALLANDER, I.J.; FLOYD, E.J. Anaerobic Digestion of High-Strength Cheese Whey Utilizing Semicontinuous Digesters and Chemical Flocculant Addition. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, n.11, p.1601–1607. 1986.

BARINOTTO, M.E.P. **Produção de Proteína Unicelular a Partir de Soro de Queijo por *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus***. (Mestrado). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1995. 70p.

BASSETTI, F.J. **Caracterização da Invertase Imobilizada em Sílica de Porosidade Controlada e sua Aplicação em Reator de Leito Fixo e Fluidizado**. (Mestrado). Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 1995. 188p.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do Leite: Leite, Queijo, Manteiga, Caseína, Iogurte, Sorvetes e Instalações**. 15 ed. São Paulo: Nobel, 1991. 320p.

BOBBIO, F.O. e BOBBIO, P.A. **Introdução à Química dos Alimentos**. 2 ed. rev. e atual. São Paulo: Livr. Varela, 1989. 223p.

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

BOON, M.A.; JANSSEN, A.E.M.; VAN DER PADT, A. Modelling and Parameter Estimation of the Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides by β -Galactosidase from *Bacillus circulans*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.64, n.5, p.558–567. 1999.

BOON, M.A.; JANSSEN, A.E.M.; VAN'T RIET, K. Effect of Temperature and Enzyme Origin on the Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.2–4, p.271–281. 2000.

BRANDÃO, S.C.C. Soro: Um Desafio para as Fábricas de Queijos. **Leite & Derivados**, n.15, p.13–19. 1994.

BURVALL, A.; ASP, N.G.; DAHLQVIST, A. Oligosaccharide Formation During Hydrolysis of Lactose with *Saccharomyces lactis* Lactase (Maxilact[®]). Part 1. Quantitative Aspects. **Food Chemistry**, v.4, p.243–250. 1979.

CARRARA, C.R. e RUBIOLO, A.C. Determination of Kinetics Parameters for Free and Immobilized β -Galactosidase. **Process Biochemistry**, v.31, n.3, p.243–248. 1996.

CAVAILLE, D. e COMBES, D. Characterization of β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.22, p.55–64. 1995.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration Handbook**. Pennsylvania: Technomic Pub. 1986. 360p.

CRUZ, R.C.B. **Utilização do Soro de Leite para Produção de Micelo de *Pleurotus ostreatus***. (Mestrado). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1997. 67p.

- DEBOER, R. e ROBBERTSEN, T. A Purified, Hydrolysed Lactose Syrup Made from Ultrafiltration Permeate. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.35, n.2, p.95–111. 1981.
- DEMOTT, B.J.; DRAUGHON, F.A.; HERALD, P.J. Fermentation of Lactose in Direct-Acid-Set Cottage Cheese Whey. **Journal of Food Protection**, v.44, n.8, p.588–590. 1981.
- ESKIN, N.A.M. **Biochemistry of Foods**. 2 ed. New York: Academic, 1990. 557p.
- FINOCCHIARO, T.; OLSSON, N.F.; RICHARDSON, T. Use of Immobilized Lactase in Milk Systems. **Adv Bloch Engineering Biotechnology**, v.15, p.71–88. 1980.
- FODA, M.I. e LOPEZ-LEIVA, M. Continuous Production of Oligosaccharides from Whey Using a Membrane Reactor. **Process Biochemistry**, v.35, n.6, p.581–587. 2000.
- FOGLER, H.S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 838p.
- GEKAS, V. e LÓPEZ-LEIVA, M.H. Hydrolysis of Lactose – a Literature Review. **Process Biochemistry**, v.20, n.1, p.2–12. 1985.
- GHALY, A.E. e BEN-HASSAN, R.M. Kinetics of Batch Production of single-Cell Protein from Cheese Whey. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.50, n.1, p.79–92. 1995.
- GILLIES, M.T. Whey Processing and Utilization. **Food Technology Review**, v.19, p.211. 1974.
- HABERT, A.C., BORGES, C.P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Escola Piloto em Engenharia Química. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 1997. 112p.
- HENG, M.H. e GLATZ, C.E. Ion Exchange Immobilization of Charged β -Galactosidase Fusions for Lactose Hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, n.6, p.745–752. 1994.

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

JULIANO, L.N. **Síntese e Caracterização de Membranas para Clarificação de Suco de Frutas**. (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2000. 85p.

KISAALITA, W.S.; PINDER, K.L.; LO, K.V. Acidogenic Fermentation of Lactose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, n.1, p.88–95. 1987.

KISAALITA, W.S.; LO, K.V.; PINDER, K.L. Kinetics of Whey-Lactose Acidogenesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.33, n.5, p.623–630. 1989.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis With an Immobilized β -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, n.8, p.583–592. 2000.

LÓPEZ-LEIVA, M.H. e GUZMAN, M. Formation of Oligosaccharides During Enzymatic Hydrolysis of Milk Whey Permeates. **Process Biochemistry**, v.30, n.8, p.757–762. 1995.

MAHONEY, R.R. e WHITAKER, J.R. Stability and Enzymatic Properties of β -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Food Biochemistry**, v.1, p.327–350. 1977.

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

MARWAHA, S.S. e KENNEDY, J.F. Review: Whey – Pollution Problems and Potential. **International Journal of Food Science and Technology**, v.23, n.4, p.323–336. 1988.

MATHUR, B.N. e SHAHANI, K.M. Use of Total Whey Constituents for Human Food. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.1, p.99–105. 1979.

MATHUR, B.N.; PATEL, J.N.; SARMA, S.C. Application of Ultra-Filtration for Deproteinization of Whey for Lactose Production. p.231–232. 1980.

MATTHEWS, M.E. Whey Protein Recovery Process and Products. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.11, p.2680–2692, 1984.

MAWSON, A.J. Bioconversions for Whey Utilization and Waste Abatement. **Bioresource Technology**, v.47, n.3, p.195–203. 1994.

MAZID, M.A. Separation and Fractionation of Macromolecular Solutions by Ultrafiltration. **Separation Science and Technology**, v.23, n.14–15, p.2191–2210. 1988.

MIZUBUTI, I.Y. Soro de Leite: Composição, Processamento e Utilização na Alimentação. **Semana Ciências Agrárias**, v.15, n.1, p.80–94. 1994.

NAKANISHI, K.; MATSUNO, R.; TORII, K.; YAMAMOTO, K.; KAMIKUBO, T. Properties of Immobilized β -Deuterium-Galactosidase from *Bacillus circulans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.5, n.2, p.115–120. 1983.

OBÓN, J.M.; CASTELLAR, M.R.; IBORRA, J.L.; MANJÓN, A. Beta-Galactosidase Immobilization for Milk Lactose Hydrolysis: A Simple Experimental and Modelling Study of Batch and Continuous Reactors. **Biochemical Education**, v.28, n.3, p.164–168. 2000.

OLIVEIRA, E.H.P. **Preparação de Membranas Microporosas para Tratamento de Efluentes da Indústria de Alimentos**. (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000. 122p.

PETERSON, R.S.; HILL Jr., C.G.; AMUNDSON, C.H. Effects of Temperature on the Hydrolysis of Lactose by Immobilized Beta-Galactosidase in a Capillary Bed Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.34, n.4, p.429–437. 1989a.

PETERSON, R.S.; HILL Jr., C.G.; AMUNDSON, C.H. Lactose Hydrolysis by Immobilized Beta-Galactosidase in Capillary Bed Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.34, n.4, p.438–446. 1989b.

PETRUS, J.C.C. Hidrólise da Lactose em Reator a Membrana. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v.1, p.17–19. 1990.

- PETRUS, J.C.C. **Preparação, Modificação e Caracterização de Membranas Assimétricas para Clarificação de Suco de Frutas**. (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997. 139p.
- PONSANO, E.H.G. e CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. Fermentação do Soro de Queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma Alternativa para a Redução de sua Capacidade Poluente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n.1, p.170–173. 1995.
- PORTACCIO, M.; STELLATO, S.; ROSSI, S.; BENCIVENGA, U.; MOHY ELDIN, M.S.; GAETA, F.S.; MITA, D.G. Galactose Competitive Inhibition of β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) Immobilized on Chitosan and Nylon Supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, n.1-2, p.101–106. 1998.
- PRENOSIL, J.E.; STUKER, E.; BOURNE, J.R. Formation of Oligosaccharides During Enzymatic Lactose. Part I. State of Art. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, n.9, p.1019–1025. 1987a.
- PRENOSIL, J.E.; STUKER, E.; BOURNE, J.R. Formation of Oligosaccharides During Enzymatic Lactose Hydrolysis and Their Importance in a Whey Hydrolysis Process. Part 2. Experimental. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, n.9, p.1026–1031. 1987b.
- RABELLO, G. **Utilização do Resíduo do Soro de Leite na Produção de Biomassa do Cogumelo Comestível *Lentinula edodes***. (Mestrado). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997. 78p.
- RICHMOND, M.L., GRAY, J.I.; STINE, C.M. Beta-Galactosidase – Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.9, p.1759–1771. 1981.
- RUBEZ, J. **O Setor Lácteo no Brasil**. Seminário Internacional do Setor Lácteo. Buenos Aires: Sociedade Rural Argentina, 1998. 12p.
- SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis by a β -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, n.7, p.558–567. 1998.

SHIN, H.; PARK, J.; YANG, J. Continuous Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose by *Bullera singularis* Beta-Galactosidase Immobilized in Chitosan Beads. **Process Biochemistry**, v.33, n.8, p.787–792. 1998.

SHUKLA, T.P. β -Galactosidase Technology: A Solution to the Lactose Problem. **Critical Reviews in Food Technology**, v.1, p.325–356. 1975.

SORENSEN, R. e NOVAK, N. The Use of Michaelis-Menten Kinetics in Cell Biology and Physiology Teaching Laboratories. **Biochemical Education**, v.24, n.1, p.26–28. 1996.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate by Immobilized Beta-Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.10, n.6, p.631–637. 2000.

WIJSMAN, R.M; HEREIJGERS, J.L.P.M.; GROOTE, J.M.F.H. Selective Enumeration of Bifidobactéria in Fermented Dairy Products. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.43, n.3, p.395–405. 1989.

YANG, S. e OKOS, M.R. Effects of Temperature on Lactose Hydrolysis by Immobilized Beta-Galactosidase in Plug-Flow Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.33, n.7, p.873–885. 1989.

YANG, S; TANG, I; OKOS, M.R. Defined Bacterial Culture Development for Methane Generation from Lactose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.32, n.1, p.28–37. 1988.

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

ZADOW, J.G. Utilization of Milk Components: Whey. **Advances in Milk Processing**. v.1. 1986.

ZALL, R.R. Trends in Whey Fractionation and Utilization, a Global Perspective. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.11, p.2621–2629. 1984.