

**Adriana Dantas
Silvani Verruck
Elane Schwinden Prudencio**

Ciência e Tecnologia
de Leite e Produtos Lácteos
Sem Lactose

**Adriana Dantas
Silvani Verruck
Elane Schwinden Prudencio**

Ciência e Tecnologia de Leite e Produtos Lácteos Sem Lactose

**Atena Editora
2019**

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Lorena Prestes e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

D192c Dantas, Adriana.
Ciência e tecnologia de leite e produtos lácteos sem lactose
[recurso eletrônico] / Adriana Dantas, Silvani Verruck, Elane
Schwinden Prudencio. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia.
ISBN 978-85-7247-112-1
DOI 10.22533/at.ed.121191102

1. Engenharia de alimentos. 2. Laticínios – Processamento.
3. Leite – Análise. 4. Tecnologia de alimentos – Lactose. I. Verruck,
Silvani. II. Prudencio, Elane Schwinden.

CDD 637

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de
responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos
autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
LEITE E INTOLERÂNCIA A LACTOSE	2
PRODUÇÃO DE LEITE SEM LACTOSE	11
Hidrólise da lactose em produtos lácteos	11
Enzima β -galactosidase	11
Hidrólise com enzimas solúveis	14
Processos alternativos para hidrólise	26
Separação da lactose.....	20
Separação por membranas	20
Cristalização	24
Cromatografia	29
LACTOSE EM LEITE E DERIVADOS	33
INOVAÇÃO EM LEITES E PRODUTOS LÁCTEOS SEM LACTOSE	48
REFERÊNCIAS.....	55
SOBRE AS AUTORAS	69

Leite e seus produtos têm sido empregados na dieta humana devido à composição em macro e micronutrientes, como as suas proteínas de alta qualidade e o cálcio. Contudo, a partir de uma perspectiva tecnológica, a lactose é o mais importante carboidrato no leite porque ela pode ter um forte efeito sobre uma variedade de produtos lácteos. Por exemplo, a lactose é essencial na fermentação por bactérias lácticas na preparação de iogurte, bem como na produção de muitas variedades de queijo. A lactose é usada também como material de origem para vários derivados de lactose, incluindo galacto-oligosacarídeos, lactulose e lactitol. Por ser um carboidrato redutor, pode participar da reação de Maillard, que ocorre em produtos lácteos submetidos a altas temperaturas.

Principalmente nos países desenvolvidos, tem-se observado que o consumo de leite diminuiu. Tal fato é creditado à descoberta de que alguns indivíduos adultos apresentam reduzida atividade da enzima lactase, o que resultaria no diagnóstico de intolerância à lactose. Este tipo de intolerância ocorre quando o corpo humano é incapaz de produzir a enzima lactase necessária para hidrolisar a lactose, um dissacarídeo, em glicose e galactose, dois monossacarídeos, para que o corpo possa metabolizar. Como resultado, a lactose é fermentada no intestino, onde pode produzir condições desagradáveis, como por exemplo, gases, inchaço e diarreia. Como alternativa para esta população intolerante à lactose, surgiu nos últimos anos um aumento nas pesquisas e lançamentos de produtos lácteos sem lactose.

No mercado encontram-se produtos lácteos com baixo teor de lactose que são alternativas para o público que apresenta má digestão da mesma. Dentre eles se destacam os lácteos fermentados, os queijos, o doce de leite, o leite condensado e os leites com reduzido teor de lactose. Assim, produtos com baixo teor de lactose e sem lactose oferecem novas e grandes oportunidades mercadológicas, sendo um nicho de mercado em expansão, favorável para investimento das indústrias de laticínios. Desta forma, esta revisão tem como objetivo disponibilizar informações sobre a ciência e tecnologia de leite e produtos lácteos sem lactose, tendo como público alvo indústrias, estudantes de graduação e pós-graduação e profissionais da área de alimentos. Visando reunir tais informações, este trabalho abordou os seguintes temas: leite e intolerância a lactose; as principais formas de produção do leite sem lactose; uma discussão sobre a lactose no leite e em seus derivados e, uma descrição sobre as mais relevantes inovações em leites e produtos lácteos sem lactose.

LEITE E INTOLERÂNCIA A LACTOSE

O leite, sem outra especificação, é definido como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011). O Brasil detém a quarta colocação entre os produtores mundiais de leite e a primeira entre os países da América do Sul. O leite encontra-se ainda entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, à frente inclusive de *commodities* tradicionais como café e suco de laranja (FAOSTAT, 2017). Desta forma, no Brasil, o leite desempenha papel relevante para a população como alimento, gerando empregos e contribuindo para a renda (COSTA; QUEIROGA; PEREIRA, 2009). Entretanto, apesar desta produção, o Brasil ainda é um grande importador de produtos lácteos (EPAGRI, 2017). Cabe ressaltar que a importação destes produtos ocorre devido às exigências de consumidores, que conseqüentemente irão pautar mudanças na estratégia de pesquisas e produção. Sendo assim, para suprir a demanda interna de produtos, ainda há muito potencial para a produção leiteira no Brasil, principalmente no que diz respeito à produção de derivados lácteos sem lactose.

O consumo de leite UHT sem lactose aumentou 224% no Brasil desde 2014, e representa 4% do mercado de laticínios. As vendas de produtos lácteos sem lactose superam os US\$ 300 milhões e US\$ 2 per capita anuais. Além disso, apresenta uma tendência de alta anual estimada entre 10% e 15% nos próximos cinco anos (MILKPOINT, 2018). Esse aumento no consumo de produtos lácteos sem lactose está relacionado com a crescente ocorrência de intolerância a lactose ou a dietas especiais. A intolerância à lactose se caracteriza pela diminuição ou ausência da produção da enzima lactase-florizina hidrolase (NP_002290.2- número de acesso no NCBI) que tem a função de hidrolisar a lactose em glicose e galactose para serem absorvidas no intestino delgado. A lactase-florizina hidrolase é, portanto, essencial para a nutrição de mamíferos recém-nascidos, cuja única fonte de nutrição é o leite (SWALLOW, 2011). Essa enzima é codificada pelo gene *LCT* (NG_008104 - número de acesso no NCBI), e verificou-se que a capacidade de digerir a lactose na idade adulta é devido a mutações *cis-acting* na expressão gênica, que são herdadas de forma dominante. A lactose, ao contrário dos seus monossacarídeos (isto é, glicose e galactose), é pouco absorvida no intestino delgado. Portanto, as pessoas que não carregam mutações no gene *LCT* não digerem e absorvem a lactose, o que levará ao quadro clínico de intolerância a lactose (DEKKER; DAAMEN, 2011).

A deficiência de lactase pode ser genética (deficiência primária de lactase) ou

relacionada à doença (deficiência secundária de lactase) (Figura 1). A deficiência primária de lactase pode se apresentar de duas maneiras diferentes. A mais grave dessas formas é conhecida como deficiência de lactase congênita (DLC), e é uma doença autossômica recessiva grave e rara que afeta recém-nascidos (BERG et al., 1969). O recém-nascido apresenta diarreia líquida ao ser amamentado ou receber fórmulas contendo lactose e caso não seja diagnosticada precocemente a DLC pode levar ao óbito devido à desidratação intensa (MATTAR; MAZO, 2010).

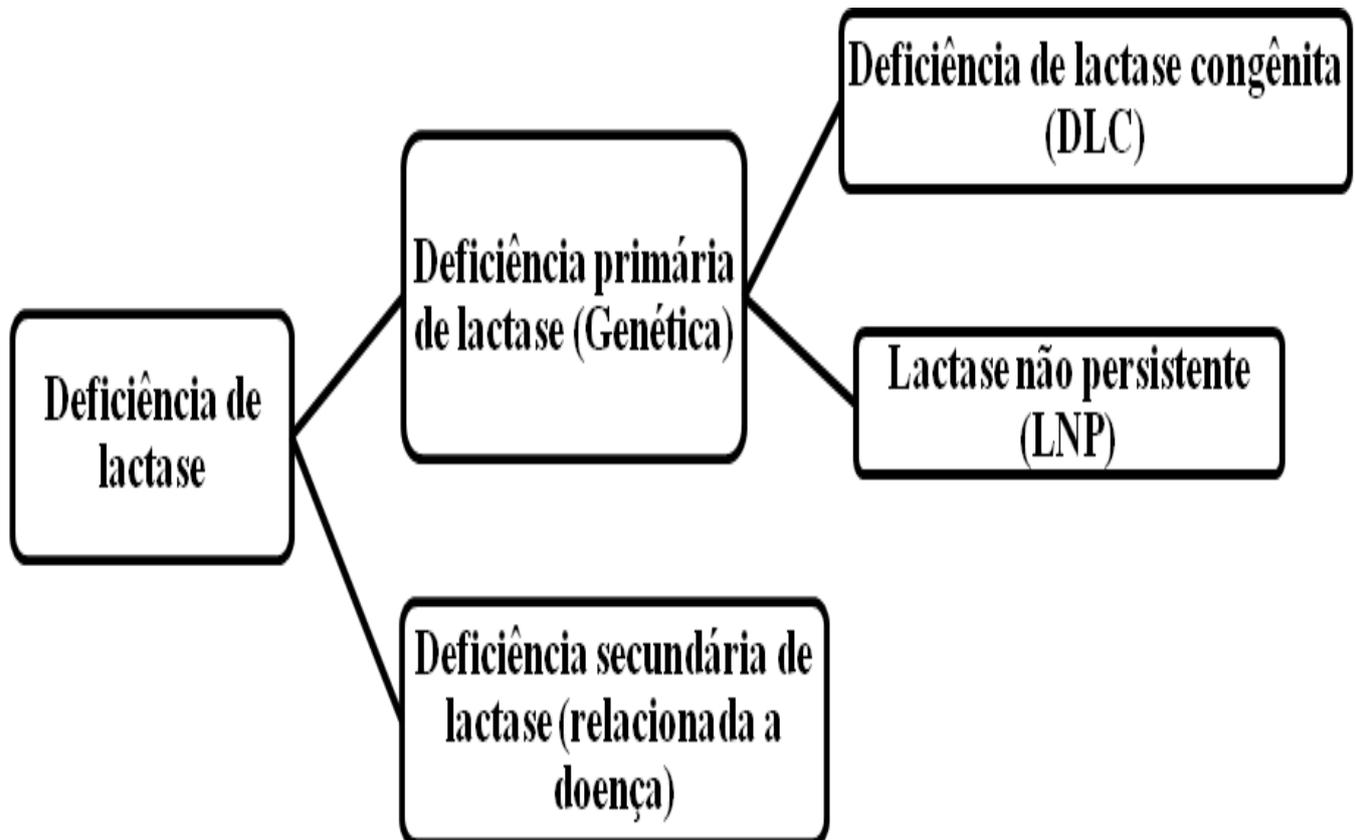


Figura 1: Tipos de deficiência de lactase.

Fonte: Adaptado de Corgneau et al. (2017).

Kuokkanen et al. (2006) relataram cinco mutações distintas na região codificadora do gene da lactase (*LCT*) para pacientes com DLC. Vinte e sete pacientes de 32 (84%) eram homozigotos para uma mutação não caracterizada, c.4170T → A (Y1390X), designada “Fin_{major}”. Eles também apresentaram quatro mutações raras - duas que resultam em um desvio de enquadramento predito e truncamento precoce em S1666fsX1722 e S218fsX224 e mutações de dois pontos que resultam em substituições Q268H e G1363S do polipeptídeo 1.927 - confirmaram as mutações da lactase como causadoras de DLC. Estas descobertas facilitaram o teste genético na prática clínica e permitiram o aconselhamento genético para esta doença grave. Por fim, os dados desses autores demonstraram que, em comparação com a hipolactasia primária do adulto (intolerância à lactose mais comum) causada por uma variante do elemento regulador, a forma DLC representa o resultado de mutações que afetam a estrutura

da proteína que inativa a enzima lactase-florizina hidrolase. No caso da DLC, a dieta restritiva de lactose é necessária para o desenvolvimento normal do recém-nascido (ROBAYO-TORRES; NICHOLS, 2007).

A lactase não persistente (LNP), também chamada de hipolactasia primária do adulto, a forma menos grave e mais encontrada de intolerância à lactose, consiste numa regulação negativa da atividade da lactase em células intestinais após o desmame (MATTAR; MAZO, 2010). Conforme pode ser visualizada na Figura 2a, a conversão de lactose em glicose e galactose requer atividade de lactase. A lactose-florizina hidrolase intestinal possui dois sítios ativos: um catalisa a hidrólise da lactose, enquanto o outro catalisa a hidrólise de outros carboidratos (incluindo a florizina). A lactose-florizina hidrolase está localizada no intestino delgado e apresenta maior expressão no jejuno (CORGNEAU et al., 2017). Assim como outras enzimas envolvidas na digestão e absorção de carboidratos, a lactose-florizina hidrolase está ancorada na superfície da borda em escova (SWALLOW, 2011). Em condições normais, após a hidrólise da lactose pela lactose-florizina hidrolase, a glicose e a galactose são transportadas através das membranas celulares epiteliais para os enterócitos e depois para a corrente sanguínea (WRIGHT; HIRAYAMA; LOO, 2007). A glicose entra para o pool de glicose do intestino, e a galactose é metabolizada no fígado para ser convertida em glicose, entrar nesse pool e servir como fonte de energia (MATTAR; MAZO, 2010). Em caso de deficiência de lactase, a lactose ingerida não é degradada no intestino delgado e passa para o cólon, onde serve como fonte de energia para a abundante microbiota (Figura 2b).

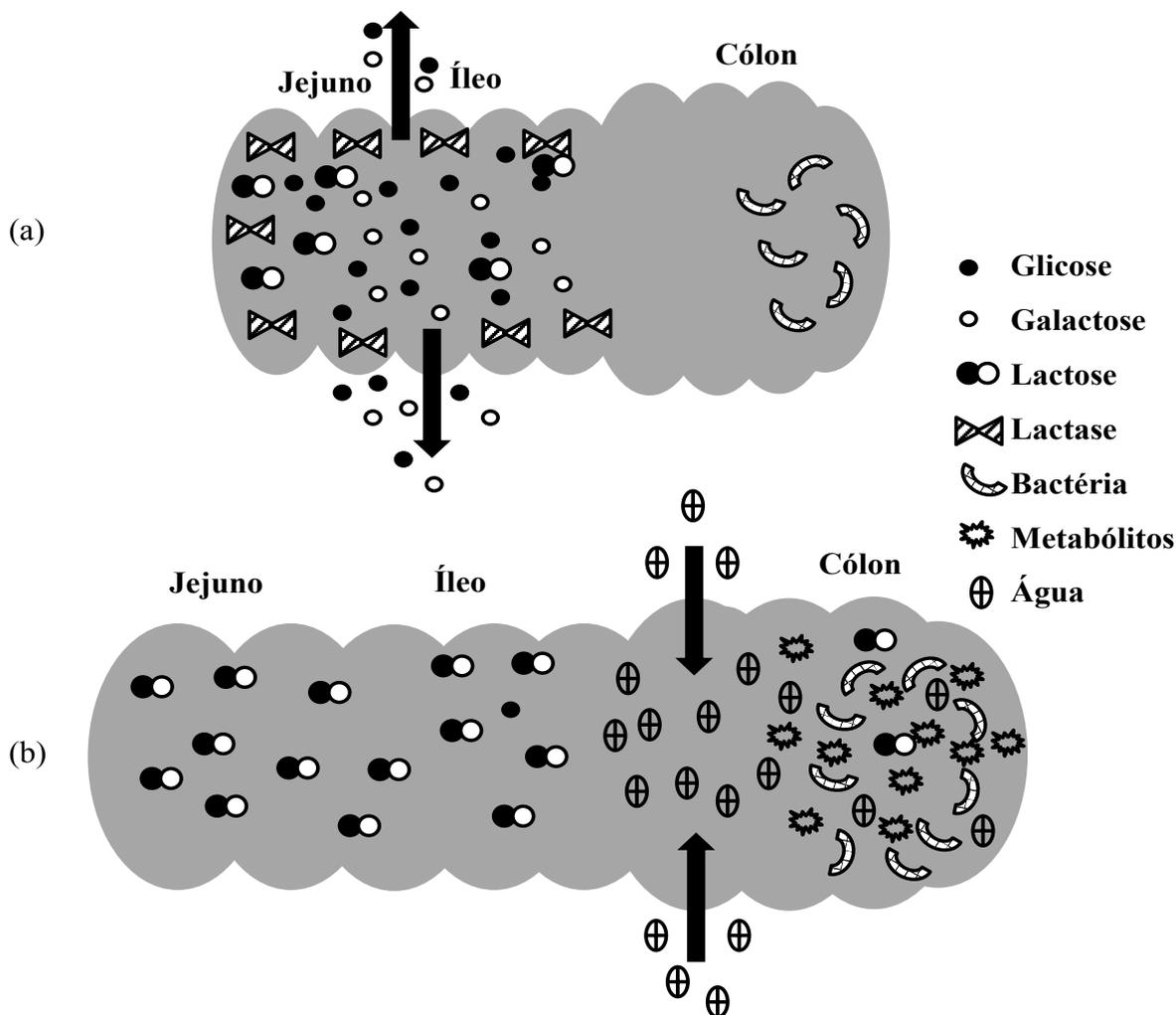


Figura 2 – Representações esquemáticas (a) da digestão normal da lactose, e (b) da digestão quando há deficiência de lactase.

Fonte: As autoras.

Entre as centenas de bactérias do cólon, algumas têm a capacidade de metabolizar a lactose, em particular as bifidobactérias, lactobacilos e *Escherichia coli*. As β -galactosidases bacterianas catalisam as mesmas reações químicas que a lactase-florizina hidrolase, mas diferem desta na estrutura, nas propriedades enzimáticas e na regulação (CORGNEAU et al., 2017). Quando as β -galactosidases bacterianas liberam glicose e galactose, as bactérias intestinais as convertem em uma variedade de produtos, incluindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) e gás hidrogênio (CORGNEAU et al., 2017). Essa fermentação geralmente causa dor abdominal e inchaço. O fato de a lactose não ser hidrolisada em glicose e galactose impede o aumento da concentração de glicose no sangue que é normalmente observada após a ingestão de lactose. Assim, a má absorção de lactose pode ser verificada por uma análise de glicose no sangue. Uma concentração de glicose no sangue que aumenta menos de 20 mg/100 mL após a ingestão de uma dose grande (de 50 a 100 g) de lactose é indicativa de deficiência de lactase (LEVITT; WILT; SHAIKAT, 2013).

A presença de produtos de fermentação no cólon aumenta a pressão osmótica no lúmen. Devido à alta permeabilidade hidráulica da mucosa do cólon, o intestino não

consegue manter um bom gradiente osmótico entre o sangue e o lúmen, de modo que a água se move do sangue para o lúmen para tornar os conteúdos luminiais isotônicos (CORGNEAU et al., 2017). Dependendo da quantidade de lactose no cólon, o influxo de água pode causar severas diarreias e considerável perda de líquido (LEVITT; WILT; SHAUKAT, 2013). Os AGCCs não parecem causar problemas, pois são absorvidos pelo sangue e servem como fonte de energia. Mas, além disso, a quantidade de gás produzida pelas reações de fermentação bacteriana pode ser enorme. A degradação de 12,5 g de lactose (equivalente a aproximadamente um copo de 250 mL de leite fluido) pode liberar até 2600 mL de CO₂ e 4000 mL de H₂ (WOLIN, 1981), enquanto a taxa de excreção usual é inferior a 1000 mL de gás por dia (TOMLIN; LOWIS; READ, 1991). Uma grande parte desses gases é excretada, causando flatulência, enquanto o restante é absorvido pelo intestino e expirado pelos pulmões com a respiração. O H₂ exalado é hoje utilizado como diagnóstico não invasivo de intolerância à lactose. É comumente considerada a técnica mais confiável, não invasiva e barata (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2007). Uma concentração de expiração superior a 20 ppm de H₂ acima da linha de base indica intolerância à lactose (JÄRVELÄ; TORNIAINEN; KOLHO, 2009). Em indivíduos com intolerância à lactose, os sintomas clínicos aparecem entre 1 e 3 h após o consumo e é intimamente dependente da quantidade de lactose ingerida, com grandes variações entre os indivíduos (EFSA, 2010). Portanto, a diferença entre a hipolactasia primária do adulto (LNP) e a deficiência de lactase congênita (DLC) é molecular: na primeira, a enzima lactase é normal, mas diminui a expressão ao longo da vida; na segunda a enzima lactase está ausente, ou é truncada (ROBAYO-TORRES; NICHOLS, 2007).

A deficiência secundária de lactase é causada por doenças ou tratamentos que lesionam a mucosa intestinal (Doença de Crohn, inflamação intestinal crônica, quimioterapia para câncer, etc.) (MATTAR; MAZO, 2010). Uma vez que a enzima lactase-florizina hidrolase localiza-se na borda em escova da mucosa, se houver qualquer alteração morfológica poderá impactar na diminuição da capacidade de hidrolisar a lactose (OLIVEIRA, 2013). Mesmo que a lactase pareça ser a enzima mais vulnerável, as atividades de outras dissacaridasas e enzimas de borda em escova também são reduzidas (FLATZ, 1987). Esta condição é apenas temporária e a atividade da lactase reaparece uma vez que o epitélio se recupera (EFSA, 2010).

A prevalência da lactase não persistente (LNP) está fortemente relacionada à etnia (WELSH et al., 1978). Em geral, a grande maioria dos indivíduos que se originam de zonas onde a ordenha não é tradicional são maus digestores de lactose (70 - 100%). Por outro lado, indivíduos provenientes de locais com uma antiga tradição de consumo de leite, apresentam baixa prevalência de má digestão de lactose (CORGNEAU et al., 2017). A Tabela 1 apresenta a prevalência de intolerância a lactose em adultos de diferentes países. Com exceção da população da Europa setentrional e central e de seus descendentes nas Américas e na Australásia, cerca de 75% da população mundial é constituída por indivíduos lactase não persistentes (LNP), dos quais cerca de 30%

não apresentam sintomas. Isso significa que 50% da população adulta mundial sofre de intolerância à lactose. A prevalência de má digestão é acima de 50% na América do Sul e na África e chega a quase 100% em alguns países asiáticos. Nos Estados Unidos, a prevalência varia de 15 (em caucasianos) a 80% (em populações afro-americanas). Na Europa, varia de cerca de 2% na Escandinávia a 17% na Finlândia e de 2 a 70% na Itália (DEKKER; DAAMEN, 2011). Assim, a prevalência é baixa em indivíduos de descendência do norte da Europa (15%), média para africanos, latinos, europeus orientais e sul-americanos (70 - 80%) e alta em muitas populações asiáticas (perto de 100%) (Figura 3) (PAIGE, 2005). Portanto, o leite e muitos outros produtos lácteos não fazem parte da dieta regular de grande parte da população mundial. Como o leite é uma fonte importante de nutrientes essenciais como proteína, riboflavina, cálcio, vitamina D, niacina, vitamina B12, fósforo, magnésio, vitamina A, zinco e iodo, a falta de ingestão de laticínios pode levar a deficiências nutricionais (DEKKER; DAAMEN, 2011).

Local	Prevalência (%)
Alemanha	14,8
Áustria	20,1
Brasil (brancos)	57
Brasil (crianças índias Terenas)	89,3 após 4 anos
Brasil (japoneses)	100
Brasil (mulatos)	57
Brasil (negros)	80
China (Norte)	87,3
Estônia (ligados aos finlandeses)	24,8
França	23,4
Hungria	37
Índia (Norte)	67,5
Índia (sul)	86,8
Itália	51(Norte) 71(Sicilia)
Japão (adultos)	89
Jordânia (beduínos)	24
Jordânia (oeste) e Palestina	75
Rússia (Nordeste)	35,6
Sibéria (oeste, nativos Khants)	94
Somalis	76
Sudão (tribo Béja, pecuaristas)	16,8
Sudão (tribo Nilotes, agricultores)	74,5
Suécia (crianças caucasianas)	10
Suécia (crianças não-caucasianas)	66
Suécia (idoso caucasiano)	5
Tuaregues	12,7
Turquia	71,3

Tabela 1- Prevalência de intolerância a lactose em adultos de diferentes países

Fonte: Adaptado de Mattar e Mazo (2010).

É importante salientar que há diferenças significativas entre a intolerância à lactose e a alergia a proteína do leite de vaca (APLV). A Tabela 2 exemplifica resumidamente as principais diferenças entre elas. Algumas pessoas intolerantes à lactose ainda apresentam a percepção de que é preciso retirar o leite e os derivados lácteos da sua dieta. A retirada apenas se justifica quando quadros alérgicos estão presentes (APLV), a deficiência de lactase-florizina hidrolase é congênita ou há o diagnóstico de galactosemia (patologia caracterizada pela inabilidade do organismo de converter galactose em glicose). Nos casos de hipolactasia primária, a forma mais comum de intolerância a lactose, a retirada do leite e seus derivados da dieta não é necessária e também não recomendada (FAO, 2013). A recomendação diária de consumo de leite e derivados lácteos varia entre os países e entre a faixa etária. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) esta recomendação é de uma (1) porção até cinco (5) dependendo do país e da faixa etária, o que corresponde a quantidades que variam entre 250 a 800 mL de leite fluido (FAO, 2013).

	Alergia à Proteína do Leite	Intolerância à lactose
Causa	Resposta imune anormal à ingestão de proteína do leite de vaca	Baixos níveis intestinais da enzima lactase que digere a lactose (açúcar do leite)
Idade de início	Geralmente na infância	Infância precoce/tardia
Sintomas	Dor abdominal, vômitos, diarreia, congestão nasal, erupção cutânea,...	Produção de gases no abdômen, inchaço, cólicas, diarreia,...
Diagnóstico	Eliminação de alimentos e testes; Teste de sangue RAST	Teste de hidrogênio na respiração, teste genético ou teste de curva de glicose
Uso/Prevenção de leite e derivados	Eliminar a proteína do leite de vaca da dieta	Não há necessidade de eliminar alimentos lácteos; experimentar diferentes quantidades/tipos de alimentos lácteos para melhorar a tolerância; uso de produtos lácteos comerciais sem lactose ou de baixo teor de lactose.

Tabela 2 - Comparação entre Alergia ao Leite de Vaca (APLV) e Intolerância à Lactose.

Adaptado de: Miller et al. (2000).

As pessoas que consomem menos leite e outros alimentos lácteos como resultado da intolerância à lactose geralmente têm menor ingestão de cálcio e outros nutrientes fornecidos pelo leite, como vitamina D, riboflavina, potássio, fósforo e magnésio. Uma ingestão inadequada de cálcio aumenta o risco de osteoporose, hipertensão e, possivelmente, de câncer de cólon (MILLER et al., 2000). O grau de má absorção de lactose varia muito entre os seres humanos, mas a maioria pode ingerir até 18 g de lactose diariamente sem apresentar nenhum sintoma (CORGNEAU et al., 2017). A gravidade dos sintomas depende muito da taxa de esvaziamento gástrico, do tempo de trânsito intestinal e da microflora intestinal. A constituição da refeição ingerida

juntamente com a lactose é, portanto, importante. Em geral, a ingestão de lactose através de um produto de maior viscosidade, como o iogurte, dará menos problemas do que um produto lácteo líquido (DEKKER; DAAMEN, 2011).

A pesquisa sobre os fatores envolvidos na digestão da lactose estimulou o desenvolvimento de estratégias que permitem que pessoas com baixa atividade de lactase consumam produtos lácteos sem apresentar sintomas desagradáveis (MILLER et al., 2000). Hoje em dia, mais e mais produtos lácteos de baixa lactose estão comercialmente disponíveis. O uso de produtos com baixo teor ou isentos de lactose alivia os problemas associados à digestão de produtos lácteos por uma grande parte da população mundial, que então pode se beneficiar dos nutrientes essenciais presentes nos produtos lácteos (DEKKER; DAAMEN, 2011). As formas de deslactosação do leite serão descritos na próxima seção.

PRODUÇÃO DE LEITE SEM LACTOSE

A produção de leite com reduzido teor de lactose ou considerado zero lactose pode ser feita a partir da hidrólise da lactose (com formação de galactose e glicose), ou ainda por meio da retirada desse dissacarídeo do leite. O processo mais comum de hidrólise consiste na utilização da enzima β -galactosidase, porém, outros mecanismos serão discutidos neste tópico. No que tange à separação da lactose, as formas estudadas são a utilização de membranas, cristalização e cromatografia.

2.1 Hidrólise da lactose em produtos lácteos

2.1.1 Enzima β -galactosidase

A lactase é amplamente distribuída na natureza e pode ser isolada de fontes diferentes, tais como plantas (amêndoas, pêssegos, damascos, maçãs), órgãos de animais, leveduras, bactérias e fungos (RICHMOND; GRAY; STINE, 1981). No contexto industrial, o termo mais empregado para designar essa enzima é β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23). Ela foi nomeada de tal maneira pela sua capacidade de hidrolisar pequenos galactosídeos (como lactose) em riboses (HUSAIN, 2010). A lactose é um substrato específico e, embora todas as lactases, independentemente da fonte, possam ser classificadas como β -galactosidases, o inverso não ocorre. Muitas β -galactosidases em células de plantas e órgãos de mamíferos (com exceção da β -galactosidase intestinal) atuam sobre polissacarídeos, galactolipídeos ou glicoproteínas da parede celular, tendo pouca ou nenhuma atividade sobre a lactose (DEKKER; DAAMEN, 2011). As β -galactosidases podem agir também como transferases de glicosídeo, nesse caso, há a formação de diferentes tipos de galactooligosacarídeos (GalOS) (HUBER; KURZ; WALLENFELS, 1976).

A β -galactosidase mais estudada até o momento é a produzida pela bactéria intestinal Gram-negativa *Escherichia coli*, conhecida como LacZ (JUERS et al., 2001). Bartesaghi et al. (2018) estudaram a estrutura de β -galactosidase de *Escherichia coli* K12 por meio da técnica de crio-microscopia eletrônica (Figura 4). A enzima tem um peso molecular de 463 kDa e é formada por quatro subunidades idênticas, cada uma contendo 1021 resíduos de aminoácidos. Segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2009), cada unidade dimérica contribui com o sítio de união a Mg^{2+} e dois resíduos catalíticos (um de cada polipeptídeo); logo, existem dois sítios ativos para cada tetrâmero, e o local de ligação é um sulco profundo na interface das cadeias de

polipeptídeo.

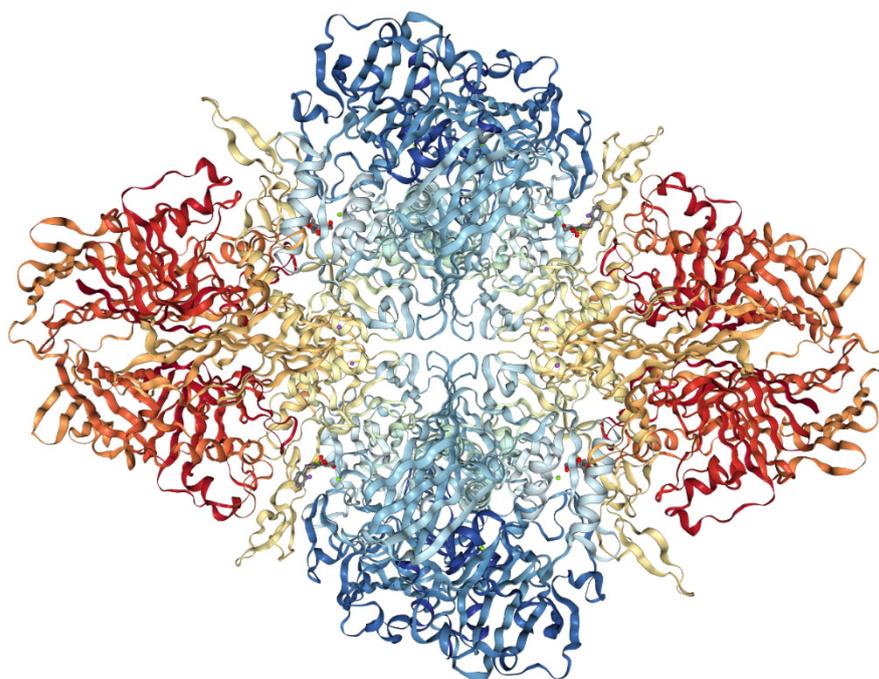


Figura 4 – Esquema estrutural da β -galactosidase de *Escherichia coli* K12.

Fonte: PDB (*ProteinDataBase*), 2018. <http://www.rcsb.org/pdb>

As β -galactosidases de outras bactérias e leveduras têm tamanho de subunidade aproximadamente similar e podem ocorrer em forma dimérica (CHENG et al., 2012; RUTKIEWICZ-KROTEWICZ et al., 2016; LANSKY et al., 2017) ou tetramérica (PEREIRA-RODRÍGUEZ et al., 2012; WANG et al., 2015), em contraste com as β -galactosidases fúngicas, que são ativas como monômeros (MAKSIMAINEN et al., 2013; AGUSTÍN et al., 2017).

Sequências primárias de aminoácidos foram estabelecidas para β -galactosidases de vários microrganismos, e a comparação com a enzima de *E. coli* mostra extensas homologias de sequências e regiões altamente conservadas. Por exemplo, as enzimas de *Kluyveromyces* são mais do que 30% idênticas à enzima de *E. coli*, sugerindo uma relação evolutiva. As glicosil-hidrolases foram agrupadas em famílias diferentes com base na similaridade de sequência e estrutura, e as lactases de levedura pertencem à família 2, assim como as enzimas de *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Xanthomonas campestris* (DEKKER; DAAMEN, 2011).

Uma marcante desvantagem do uso da enzima derivada de *E. coli*, é o fato de que os produtos deste microrganismo não apresentam o status *Generally Recognized as Safe* (GRAS), sendo assim um grande obstáculo para a aplicação de tal enzima na indústria alimentícia. Por consequência, as β -galactosidases mais empregadas neste ramo da indústria derivam do cultivo de fungos filamentosos (*Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*) e leveduras (*Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*) (DEKKER; DAAMEN, 2011). Contudo, diferentes espécies também vêm sendo estudadas tanto

para hidrólise da lactose como para produção de galactooligossacarídeos, ou para ambos os processos (KAMRAN et al., 2016; CARDOSO et al., 2017; CHANALIA et al., 2018, respectivamente). Exemplos de β -galactosidases comercialmente disponíveis são as que estão sob o nº 072-04141 do catálogo da Wako Pure Chemical Industries, Ltd., e G1875 da Sigma-Aldrich. Em relação ao pH, as lactases podem ser classificadas em dois grandes grupos: β -galactosidases de pH ótimo neutro (ZHOU; CHEN, 2001; VIEIRA et al., 2013; SRIVASTAVA; MISHRA; CHAND, 2015) e β -galactosidases com máxima atividade em pH ácido (VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011; CHIBA; YAMADA; ISOBE, 2015; CAREVIĆ et al., 2016; NIU et al., 2017). β -galactosidases neutras são geralmente utilizadas em produtos alimentícios neutros, como o leite (WOLF; GASPARIN; PAULINO, 2018), enquanto as β -galactosidases ácidas são empregadas em suplementos nutricionais (WANG et al., 2009).

Novas β -galactosidases bem como tecnologias inovadoras ligadas à produção dessa enzima vêm sendo descobertas e estudadas pelos pesquisadores (DUAN et al., 2017; JOSE et al., 2017; LIU et al., 2017; YOU, Chang, et al., 2017; YOU, Zhang, et al., 2017). Erich et al. (2015) realizaram uma triagem de 1,3 milhões de clones de metagenoma para descobrir novas β -galactosidases. Seis β -galactosidases de metagenoma foram descobertas e apresentaram melhor desempenho de hidrólise da lactose no leite quando comparado com a β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (nome comercial GODO-YNL2, produzida pela Shusei Co, Ltd., Tóquio, Japão). Desses seis metagenomas, escolheu-se então a β -galactosidase mais promissora para caracterização dos parâmetros cinéticos, o que revelou valores de afinidade pela lactose (K_M) e inibição pelo produto (K_I) igualmente mais favoráveis em relação à GODO-YNL2.

Patentes com forte apelo industrial também foram criadas (BECERRA FERNANDEZ et al., 2012; CHEN et al., 2012; ISHIKAWA et al., 2016; KATASE et al., 2010; KHRAMTSOV et al., 2017; LARSEN et al., 2016; NAKAMURA et al., 2015; PAN et al., 2018a; PAN et al., 2018b). Minamitani e Sugiura (2017) patentearam um método que consiste na aplicação de campo elétrico pulsado em cultivos microbianos (*Streptomyces* spp. e *Escherichia* spp.) a fim de controlar a produtividade de enzimas (α - e β -galactosidase, celulase, esterase e lipase).

Realçando os conceitos discutidos na seção anterior deste livro, a lactose é um dissacarídeo que produz D-galactose e D-glicose quando hidrolisado (Figura 5). É um açúcar redutor, ou seja, tem um grupo carbonila livre ou potencialmente livre (um grupo aldeído no caso da lactose). Como outros açúcares redutores, a lactose existe parcialmente sob a forma de cadeia aberta com um grupo aldeído, que pode formar uma estrutura hemiacetal e, portanto, um anel (FOX, 2009). A literatura relata também a versão não redutora do dissacarídeo de glicose e galactose (HASHIMOTO et al., 2011). Para obtenção desse açúcar, os autores apontaram a seguinte metodologia: primeiramente, uma α -galactosidase (de *Aspergillus niger* APC-9319) reage (via

condensação) com uma substância que contém galactose e glicose, gerando um oligossacarídeo, que por sua vez, apresenta os grupos α -galactosil e β -galactosil — (Gal)(α)1-1(β)Gal. Na sequência, uma β -galactosidase é empregada na reação de hidrólise desse oligossacarídeo, resultando em dissacarídeos não redutores, que foram isolados do meio reacional. Hashimoto et al. (2011) afirmam que o método desenvolvido é atrativo para preparar dissacarídeos não redutores contendo o grupo α -galactosil, o qual é útil como conservante para matérias-primas farmacêuticas e produtos alimentícios. O dissacarídeo não redutor exibe várias funções fisiológicas, tais como fortalecimento do sistema imunológico e efeito anticancerígeno, e tratamento da dermatite atópica.

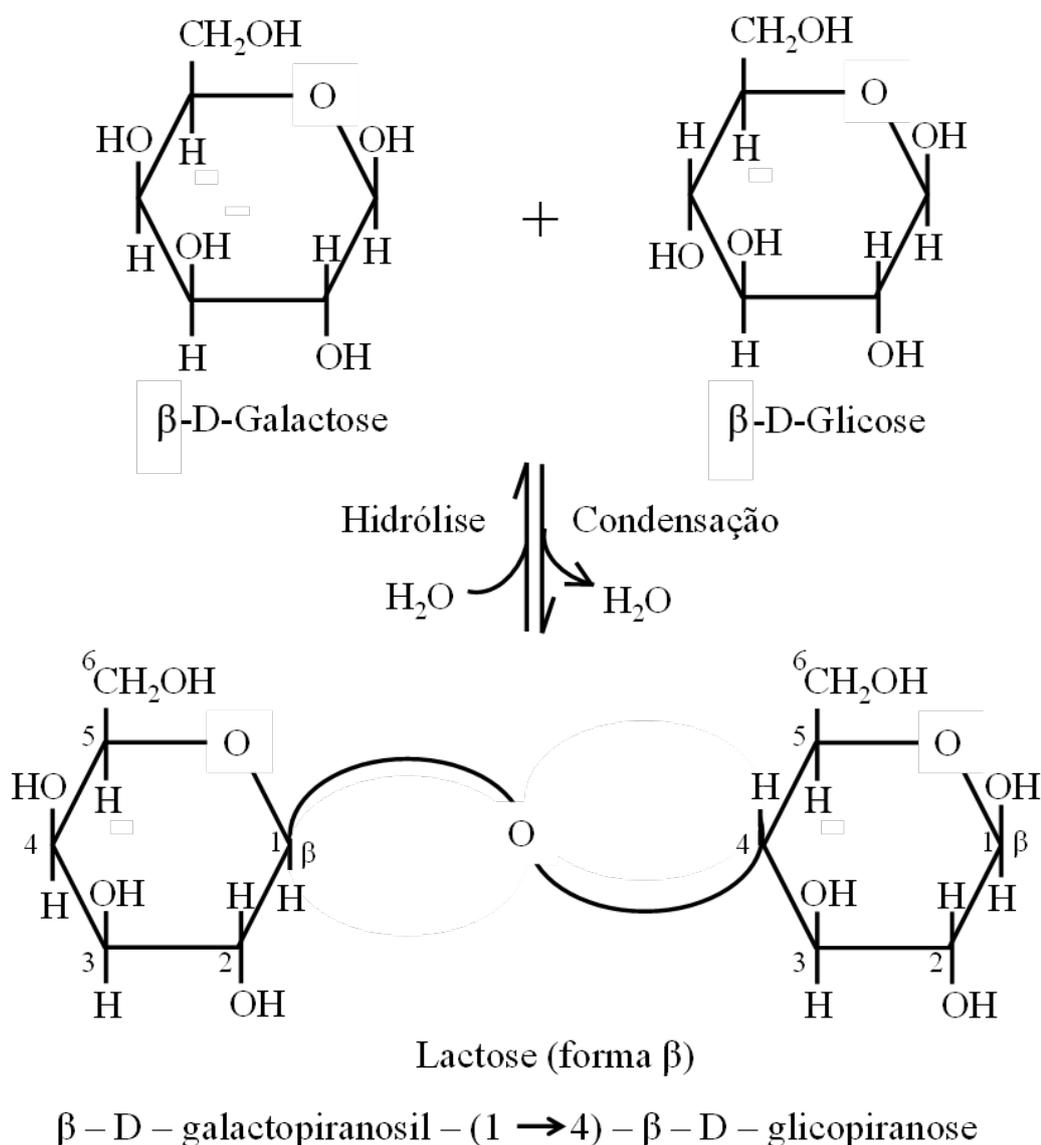


Figura 5 – Formação da lactose.

Fonte: As autoras.

2.1.2 Hidrólise com enzimas solúveis

Um grande avanço na tecnologia de produtos lácteos sem lactose data de 1973,

quando Kosikowski e Wierzbicki (1973) propuseram um método de hidrólise da lactose no leite cru e pasteurizado. A indústria de laticínios respondeu à ideia e passou a produzir leites sem lactose ou com teor reduzido (70% de hidrólise), utilizando para tal a enzima lactase. Este processo foi comercializado como Lactaid (McNeil Nutritionals, Fort Washington, PA) em 1974 por Alan Kligerman (BARBANO, 2017).

O mecanismo bioquímico da hidrólise da lactose (Figura 6) por meio da β -galactosidase é complexo e pode ser resumido da seguinte forma: o primeiro passo é a formação de um complexo enzima-galactose com simultânea liberação da glicose. Na segunda etapa, o complexo enzima-galactose é transferido para um acceptor que contenha um grupo hidroxil. Em uma solução com baixa concentração de lactose, a água será mais competitiva para ser o acceptor deste complexo, neste caso, a galactose é formada e liberada do sítio ativo. Por outro lado, se o intermediário enzima-galactose+ reagir com outro açúcar (por exemplo, lactose, glicose ou galactose) em vez de água, ocorre então a síntese de oligossacarídeos por uma reação de transglicosilação. Esta reação pode se tornar quantitativamente significativa em altas concentrações de lactose (MAHONEY, 1998; ZHOU; CHEN, 2001).

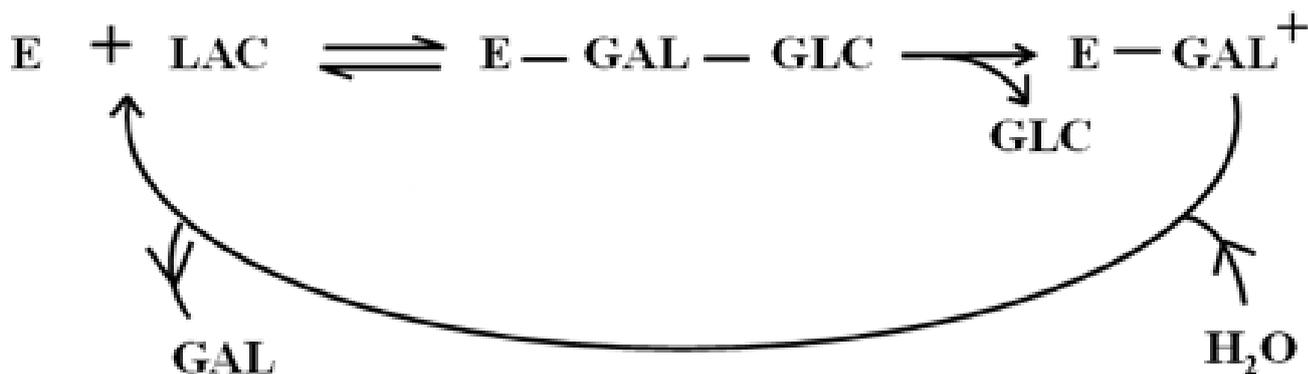


Figura 6 - Mecanismo esquemático de hidrólise da lactose por β -galactosidase.

E: enzima; LAC: lactose; GAL: galactose; GLC: glicose; GAL⁺: estado de transição de carbono.

Fonte: Adaptado de Mahoney (1998).

O processo industrial de hidrólise da lactose é relativamente simples e não requer equipamento especial em plantas de laticínios. Ao se utilizar uma enzima livre para a hidrólise da lactose, vários fatores devem ser considerados. Estes incluem concentração de substrato, pH de operação, temperatura máxima e tempo de contato permissível, atividade enzimática e custo (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Bosso et al. (2016) investigaram a hidrólise das enzimas comerciais β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (líquido) e β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (lío-filizado) em leite UHT integral e desnatado. Foram testadas diferentes concentrações enzimáticas, valores de pH e temperatura. Observou-se alta taxa de hidrólise para a enzima de *K. lactis* em pH 7,0 e 40 °C, e de *A. oryzae* em pH 5,0 e 55 °C. Aquela apresentou taxas de hidrólise significativamente maiores quando comparada à esta.

Inui (2018) patenteou um método de tratamento enzimático (utilizando β -galactosidase comercial) para leite e produtos lácteos. A enzima é adicionada junto ao leite na quantidade de 65 mU para cada 100 μ L de leite (37 °C por três horas). O tratamento enzimático é finalizado pelo aquecimento (60 °C durante 10 minutos), inativando desse modo a enzima. Alternativamente, Zadow (1986) comenta que a hidrólise poderia ser feita *overnight* sob temperatura de refrigeração.

Na obtenção do leite em pó hidrolisado, emprega-se o mesmo equipamento (*spray dryer*) que é utilizado no processo do leite em pó comum, com algumas modificações no fluxograma. Em resumo, a secagem de produtos lácteos no *spray dryer* ocorre da seguinte forma: o leite concentrado é atomizado na câmara de secagem onde as gotas de leite encontram ar quente. A diferença de temperatura e pressão entre o ar quente e a matriz alimentar possibilita a secagem rápida do material (SCHUCK, 2009). Tanto Fialho et al. (2018) como Torres et al. (2017) relataram processos bem parecidos de obtenção do leite em pó sem lactose por meio de hidrólise enzimática. A princípio, faz-se uma concentração do leite fluido até aproximadamente 40% (m m^{-1}) de matéria seca. No caso de Fialho et al. (2018), antes da hidrólise enzimática, os autores submeteram o leite concentrado a uma pasteurização lenta e ainda adicionaram 0,03% m m^{-1} de azida de sódio para evitar crescimento microbiano. Na sequência, adiciona-se a enzima lactase na proporção de 0,6% m m^{-1} ou seguindo a recomendação do fabricante. Apesar de usarem a mesma enzima (Lactomax Super, da Prozyn, São Paulo), a temperatura de incubação também diferiu entre os autores (40 e 34 °C); e o tempo de incubação variou de acordo com a porcentagem de hidrólise que objetivavam (25 até 99%). Torres et al. (2017) inativaram a enzima (90 a 95 °C por 60 s) antes da passagem do leite pelo *spray dryer*, enquanto Fialho et al. (2018) seguiu direto para a etapa final de secagem.

2.1.3 Processos alternativos para hidrólise

Objetivando facilitar o processo de hidrólise e ao mesmo tempo diminuir os custos na produção do alimento, há na literatura vários relatos de meios alternativos e inovadores. Alguns autores adotam uma postura mais inflexível, como por exemplo Albayrak e Yang (2002). Segundo eles, uma vez que o custo da enzima é o fator mais importante que determina a economia do processo, apenas sistemas contínuos que envolvem o reuso de um único lote de enzima podem ser considerados. Assim, processos tecnicamente exequíveis incluiriam a adição direta de enzima solúvel com sua subsequente reciclagem por meio de processos de membrana; ou uso de enzimas imobilizadas.

Tais reatores de membrana são projetados com base no princípio de transferência de massa seletiva. A hidrólise é normalmente realizada num fluxo isento de proteína (SEN et al., 2016), como o permeado de leite ou soro obtidos da ultrafiltração (UF). A enzima é recuperada da mistura reacional por meio de um segundo equipamento de

UF, e o permeado contendo lactose hidrolisada, agora sem a enzima, é adicionado ao retentado do soro ou leite (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

Novalin, Neuhaus e Kulbe (2005) descreveram um reator de difusão de membrana no qual a β -galactosidase era transferida para um reator de fibra oca e a lactose no leite desnatado hidrolisada continuamente. O reator foi baseado em um módulo de fibra oca (10 kDa cut-off, área da membrana de 4,9 m²). A alimentação foi bombeada através dos tubos, mas a enzima de alta massa molecular permanecia do lado de fora, às margens da superfície. A temperatura da alimentação foi ajustada e a solução enzimática circulava em circuito fechado. Foram incluídos na linha de circulação da enzima um módulo de irradiação UV e uma unidade de filtração estéril, a fim de controlar o crescimento microbiano. Com um fluxo de leite desnatado de 9,9 L h⁻¹ foi alcançada uma taxa de conversão de lactose de 78,1%. Os autores relataram que os principais problemas estavam relacionados à necessidade de uma alta área de membrana (devido à baixa taxa de transferência de massa), e ao controle do crescimento microbiano na circulação da enzima, apesar da filtração estéril e do módulo UV. Posteriormente, a condição de operação foi otimizada (temperatura de 15 \pm 2 °C) visando alcançar um bom custo-benefício (NEUHAUS et al., 2006). Rios et al. (2004) apontam também outras desvantagens de um reator contínuo de reciclagem de membrana: queda do fluxo do permeado devido à incrustação da membrana, e as frequentes limpezas necessárias para eliminar os substratos não reagentes.

O uso de β -galactosidase imobilizada para hidrólise da lactose é também justificado pela redução dos custos com enzimas e processamento — a vida útil de um sistema imobilizado pode chegar até alguns milhares de horas (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Uma das vantagens é que a enzima pode ser recuperada após o processo de hidrólise no leite, não sendo necessária a inativação enzimática por tratamento térmico. Como resultado dessa recuperação, contaminantes (proteínas, tais como enzimas inativadas pelo tratamento térmico, e semelhantes) podem ser evitados (INUI, 2018). Cerlesi (2000) priorizou essa vantagem secundária da utilização de enzima imobilizada. Ele patenteou a aplicação de lactase imobilizada com o objetivo principal de manter o produto final livre de resíduos de enzimas, e não de minimizar os custos com enzimas. A imobilização da β -galactosidase oferece ainda outras vantagens sobre a forma livre, como a rápida terminação das reações, formação controlada do produto, e adaptabilidade a vários projetos de engenharia (HUSAIN, 2010).

A hidrólise enzimática da lactose em leite, soro, ou lactose pura foi realizada em vários reatores de diferentes configurações, sob condições operacionais variáveis de temperatura e pH (BAYRAMOGLU; TUNALI; ARICA, 2007; GROSOVA et al., 2008; NERI et al., 2008; CHEN et al., 2009; HAIDER; HUSAIN, 2009). Os reatores contendo β -galactosidase imobilizada têm sido extensivamente estudados, porque este é o ponto crítico na produção industrial de leite e soro sem lactose. Como já mencionado, os reatores enzimáticos utilizados incluem sistemas de membrana enzimática, reatores de leite fluidizado, reatores de fibra oca, reatores de leito fixo e reatores de tanque agitado.

Em aplicações comerciais, a hidrólise da lactose é comumente realizada no modo de operação batelada em reatores de tanque agitado, empregando-se β -galactosidase livre ou imobilizada. O processo em batelada é tradicional, simples e fácil de controlar; no entanto Rios et al. (2004), em concordância com Albayrak e Yang (2002), relatam que o sistema tem algumas desvantagens, principalmente relacionadas a altos custos de enzimas e mão-de-obra. A β -galactosidase imobilizada em suportes altamente ativados permitiu a reutilização contínua da enzima, a fim de melhorar seu rendimento global em comparação com um procedimento em batelada (HUSAIN, 2010).

Muitos tipos de suportes e materiais podem ser encontrados na literatura e descritos como eficientes na imobilização de β -galactosidases (Tabela 3), como a sílica, cerâmica, grafeno, entre outros. Exemplo de uma β -galactosidase imobilizada comercialmente disponível é a enzima de *Escherichia coli* G3M (#A3102, Mo-BiTec), presa por ligação covalente às matrizes de polivinil ou dextrana.

Material de suporte	Referências
Sílica	(ESCOBAR et al., 2016; GONZALEZ-DELGADO et al., 2017; PAVEL et al., 2017; GONZALEZ-DELGADO et al., 2018)
Esferas de vidro	(ESKANDARLOO; ABBASPOURRAD, 2018)
Cerâmicas	(De LATHOUDER et al., 2006; De LATHOUDER et al., 2008)
Quitosana	(BELLE et al., 2018; WAHBA, 2018b)
Grafeno	(KISHORE et al., 2012; SATAR et al., 2016)
Suportes magnéticos	(BELHACENE et al., 2015; KHAN; HUSAIN; NAQVI, 2016; KRIZNIK et al., 2018)
Polímeros naturais e sintéticos	(MATSUNO et al., 2007; GONZALEZ-CATANO et al., 2017; MISSON; JIN; ZHANG, 2017; WAHBA, 2018a; WOLF; GASPARIN; PAULINO, 2018)
Mistura de quitosana e sílica	(RICARDI et al., 2018)
Mistura de quitosana e hidrogel	(FACIN et al., 2015)

Tabela 3 – Principais suportes estudados na imobilização da β -galactosidase.

Quando o alvo de um bioprocesso é a obtenção de produtos puros (e no nosso caso é, pois geralmente almeja-se um produto sem resíduos de lactose, e com maior teor de glicose e galactose), as enzimas purificadas são preferidas por eliminarem reações paralelas. Porém, segundo Ng (2001), essa tecnologia muitas vezes esbarra no custo de isolamento, purificação, estabilização (imobilização) e regeneração dos

cofatores. Por outro lado, o emprego de suspensões celulares pode ser mais vantajoso do que sistemas enzimáticos, uma vez que a(s) enzima(s) envolvida(s) na reação de interesse se encontra(m) em seu ambiente natural, o que faz com que permaneça(m) ativa(s) e estável(is) durante todo o processo catalítico (CÁNOVAS; IBORRA, 2005). Nesse sentido, Panesar (2008) permeabilizaram células de *Kluyveromyces marxianus* objetivando alcançar a máxima atividade da β -galactosidase. As condições ótimas de permeabilização possibilitou a obtenção de uma atividade enzimática de 1573 UI/g. Essas células de levedura permeabilizadas exibiram 89,7% de hidrólise de lactose em leite desnatado após 150 min de incubação. No trabalho de Zhou et al. (2013), um mutante de *Kluyveromyces marxianus* KM foi estudado e aplicado na hidrólise de lactose. Ao se utilizar a suspensão celular nas reações, obteve-se 99,2% de hidrólise da lactose numa solução de lactose (9%), 99,0% de hidrólise numa solução de soro (12% de lactose), e 99,3% de hidrólise no leite (teor de lactose de 46,5 g/L) após 3h, 4h, e 3h de incubação, respectivamente.

Vasiljevic, Wismer e Jelen (2003) estudaram os efeitos sensoriais de extratos celulares de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842, e observaram que a intensidade de aroma desagradável aumentou após 2% de adição dos extratos. De acordo com Jelen e Tossavainen (2003), o sabor do leite hidrolisado com extratos celulares nunca pode ser totalmente puro e, portanto, a abordagem foi proposta para o uso com produtos aromatizados (iogurte, por exemplo), ou como um potencializador de fermentação devido à presença de atividade proteolítica contaminante.

A lactose também pode ser hidrolisada via rota ácida, em pH inferior a 2 e temperatura de 100–150 °C por um curto período de tempo (GAJENDRAGADKAR; GOGATE, 2017; PENNA, 2009). O ajuste do pH pode ser feito por adição direta de ácido ou por tratamento com uma resina de troca iônica (THOMPKINSON; MATHUR; RAJORE, 1991). No caso da adição do ácido, o íon H^+ do ácido clorídrico (HCl) ou ácido sulfúrico (H_2SO_4) na presença de água ataca a ligação β -1,4-glicosídica da lactose (Figura 7), resultando em duas unidades monossacarídicas, glicose e galactose.

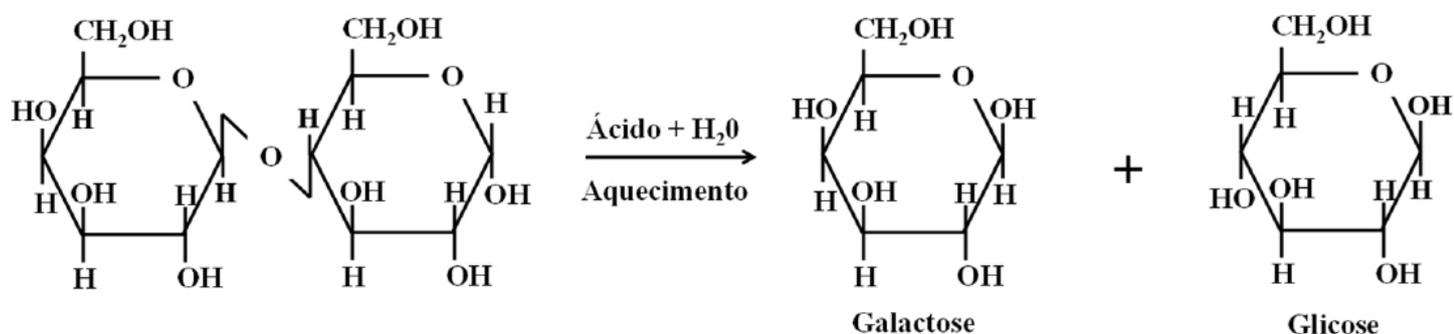


Figura 7. Esquema de reação da hidrólise da lactose catalisada por ácido.

Fonte: Adaptado de Gajendragadkar e Gogate (2017).

O produto hidrolisado é castanho e requer neutralização, desmineralização e descoloração antes da utilização. Há risco também de alteração do sabor em virtude

de produtos secundários que podem ser formados durante a reação (PENNA, 2009). Segundo Harju, Kallioinen e Tossavainen (2012), o escurecimento do meio reacional depois de neutralizado é o maior obstáculo, pois leva a etapas complicadas de remoção de coloração que aumentam os custos do processamento e causam problemas de descarte.

Gajendragadkar e Gogate (2017) estudaram o efeito de uma unidade ultrassônica na hidrólise ácida de lactose. A introdução do ultrassom no processo de hidrólise realizado com HCl 3N a 70 °C reduziu o tempo necessário para obtenção de 90% de hidrólise: de 4 h (sem a presença de ultrassom) para 3 h. Esse procedimento foi feito tanto para uma solução de lactose pura quanto para lactose isolada de soro (obtido de um laticínio local de Matunga, Índia), e isso não resultou em alterações significativas no progresso da hidrólise. Quando as mesmas condições foram estudadas em uma escala ampliada, os resultados foram praticamente os mesmos. Os autores comentam que a aplicação do ultrassom aumenta as taxas de transferência de calor e massa entre os reagentes e o catalisador devido à geração de turbulência e ondas de choque. Os efeitos do ultrassom também podem resultar em quebra rápida da ligação covalente β -1,4-glicosídica, resultando em aumento das taxas de reações.

2.2 Separação da lactose

2.2.1 Separação por membranas

As tecnologias de separação por membranas começaram a se tornar uma realidade industrial através do trabalho pioneiro de Loeb e Sourirajan (1963) que desenvolveram as primeiras membranas anisotrópicas, feitas de acetato de celulose, capazes de fornecer fluxos e permeabilidades razoáveis para dessalinização da água do mar por osmose reversa. Desde então, progressos notáveis também foram alcançados no desenvolvimento de membranas mais robustas e equipamentos mais bem projetados (MAUBOIS, 2011). A separação por membranas se baseia na separação de moléculas ou partículas com base em diferenças de tamanho, ou seja, osmose reversa (OR), nanofiltração (NF), ultrafiltração (UF) e microfiltração (MF) (Figura 8) (MAUBOIS, 2011).

Entre as indústrias de alimentos, a indústria de laticínios é, sem dúvida, aquela que apresenta a maior utilização das tecnologias de membrana (GÉSAN-GUIZIOU, 2007). Existem numerosas razões para este sucesso: profundo conhecimento das características bioquímicas do leite e dos coprodutos (principalmente soro de leite), que ajuda muito na otimização da separação diferencial desejada; o dinamismo de várias equipes de pesquisa; a temperatura de funcionamento que não causa danos irreversíveis às propriedades biológicas dos componentes do leite; a alta poluição ambiental inaceitável causada pela descarga de soro de queijo, etc (MAUBOIS, 2011).

A MF pode ser descrita como a forma mais porosa de separação por membranas - em vez de usar um critério de separação em massa molecular, as membranas de MF são geralmente identificadas pelo tamanho do poro em micrômetros (μm) (KELLY, 2011). Gordura, materiais agregados, bactérias e células somáticas são normalmente retidos durante a MF, enquanto a proteína passa através da membrana mais porosa (MAUBOIS, 2011).

Por outro lado, a UF e uma combinação de UF e NF podem ser usadas para a separação da lactose do soro ou do leite (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). No final da década de 1970, membranas de ultrafiltração foram desenvolvidas para remover as proteínas do soro a fim de produzir concentrado proteico de soro de leite (WPC) antes de ir para a planta de produção de lactose (PATERSON, 2011). A UF é um processo de filtração por membrana que separa o material macromolecular (como proteínas e gordura, se presente), sendo prontamente recuperado de soluções (geralmente soro de leite), enquanto materiais de baixa massa molecular (lactose, minerais, outros solutos e água) permeiam a membrana. A UF opera a pressões muito mais baixas quando comparada com a OR e a NF, sendo as pressões transmembranares típicas de 70-170 kPa (KELLY, 2011).

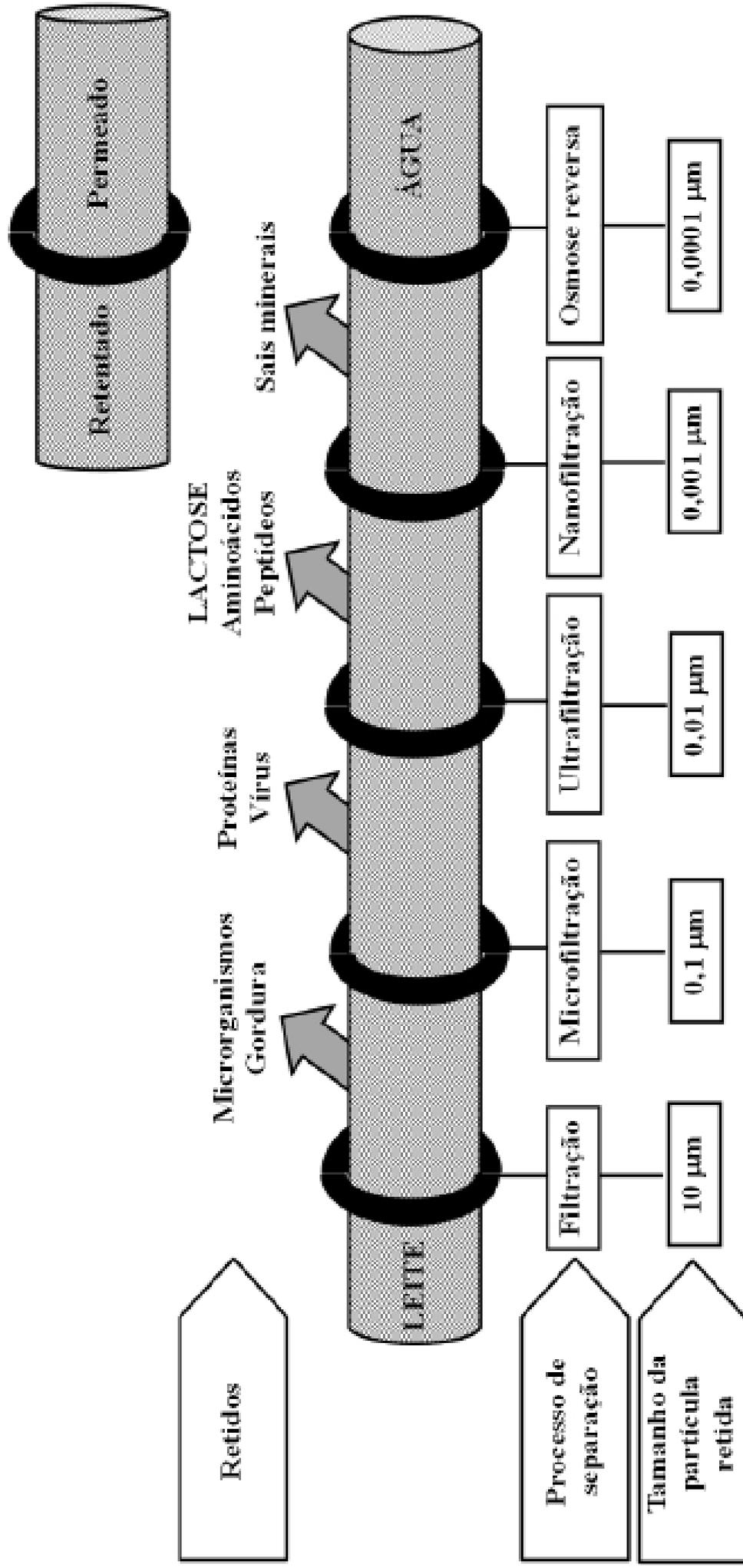


Figura 8. Comportamento do leite durante os processos de separação por membranas.

Fonte: As autoras.

Quando a UF é usada para separação de lactose, outros compostos menores do que a lactose também são permeados em conjunto com a água, enquanto o teor de proteína aumenta no retentado. Além disso, se toda a lactose tiver que ser removida é necessário que sejam realizadas etapas de diafiltração (adição de água pura ao retentado) (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). No permeado da UF de soro de leite ou leite, a pureza da lactose é superior a 80% da matéria seca total. Enquanto que os minerais monovalentes e outras moléculas pequenas podem ser removidos do permeado da UF com a NF (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Conforme ilustrado na Figura 9, diferentes tamanhos de poros de membranas podem ser utilizados para a separação da lactose.

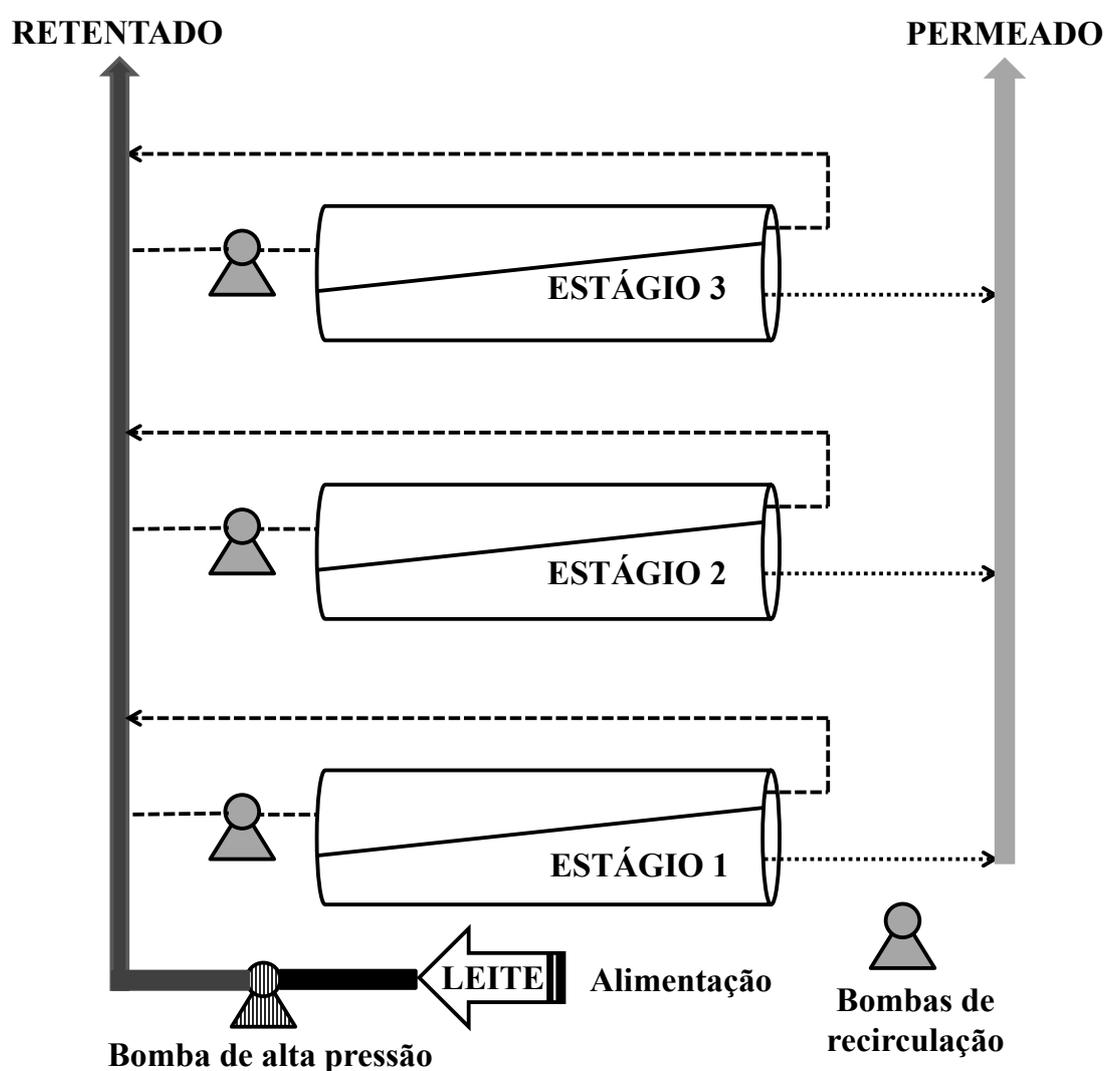


Figura 9. Representação esquemática de uma unidade de separação por membranas de múltiplos estágios (três estágios) com demonstração da circulação do retentado e do permeado.

Fonte: As autoras.

NF é a nomenclatura adotada para a separação de solutos que ocorre na faixa nanométrica (10^{-9} m). Um intervalo de exclusão de tamanho de 10-100 Da atende à permeação de água, íons minerais e compostos nitrogenados de baixo peso molecular. No entanto, alguma lactose também é permeada neste processo (1 a 2%). As membranas de NF são normalmente fabricadas com uma camada de poliamida num suporte de polissulfona microporosa, o que permite a permeabilidade vários íons monovalentes (KELLY, 2011). Combinando a diluição do retentado de NF e diafiltração, a redução de sais pode ser aumentada de 35 a 50% para 60 a 70%, porém há aumento de custo e maior utilização de água (GERNIGON et al., 2011). Outros processos, no entanto, são necessários para produzir uma solução de lactose mais pura (mais de 95% da matéria seca total) (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Atualmente, nos tipos mais novos de membranas de NF, a perda de moléculas orgânicas foi melhorada, especialmente a lactose. De fato, a perda de lactose é hoje menor do que as encontradas na eletrodialise ou na troca iônica, tornando o retentado mais valioso e levando a um permeado com menor demanda biológica de oxigênio (DBO) (GERNIGON et al., 2011).

Por fim, também é relatado o uso de OR para separação da lactose de soro de leite ou de leite desnatado (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). No leite desnatado ou soro de leite, a pressão osmótica está em torno de 0,7 MPa, uma pressão que deve ser excedida na OR antes que o permeado (isto é, essencialmente água) flua através da membrana. No entanto, quando o leite ou soro é concentrado por OR até 25% de sólidos totais (retentado), a pressão osmótica aumenta para 2,7-3,5 MPa. Assim, o efeito osmótico de aumentar a concentração de lactose e minerais nos retentados de OR limita o fluxo de permeado e a concentração máxima que se pode atingir (KELLY, 2011). Portanto, devido à alta concentração de sais também presentes no retentado de OR é necessário que se faça um tratamento adicional a fim de purificar a lactose para uso industrial ou farmacêutico. Esta purificação pode ser realizada através da técnica de cristalização.

2.2.2 Cristalização

A cristalização da lactose é amplamente utilizada na produção comercial de lactose. A separação da lactose diretamente do leite por cristalização não é viável devido à alta viscosidade do leite concentrado e ao rendimento muito baixo da cristalização da lactose (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Conforme podem ser visualizadas na Figura 10, as etapas básicas no processo de produção são concentração do soro de leite, cristalização, lavagem, separação do cristal, secagem e embalagem (PATERSON, 2011).

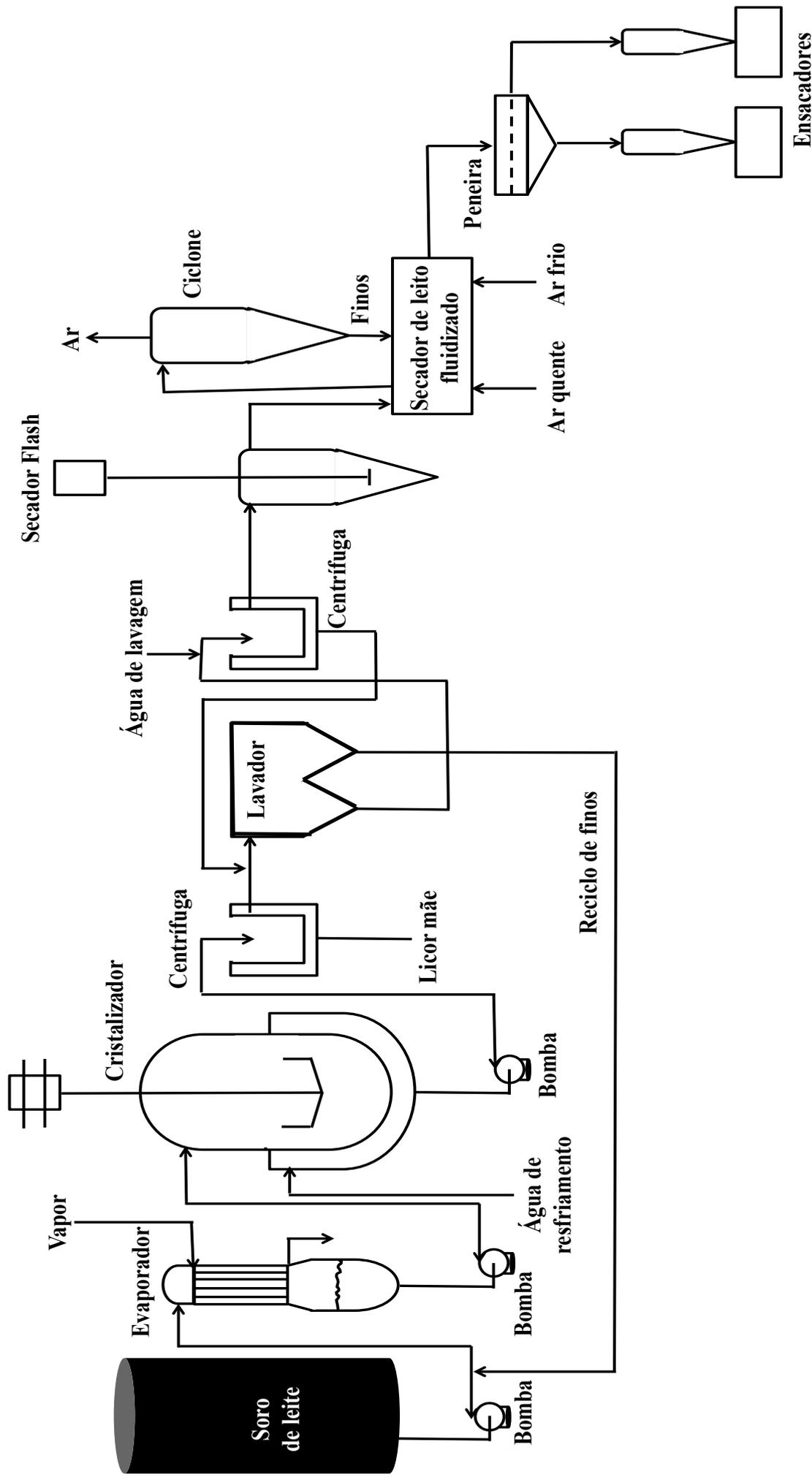


Figura 10. Representação esquemática das etapas industriais envolvidas na cristalização da lactose.

Fonte: As autoras.

Industrialmente, a lactose pode ser cristalizada a partir de soro de leite ou do concentrado de permeado de UF (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). A concentração ideal do permeado de soro de leite para a cristalização da lactose geralmente é conseguida pela combinação entre tecnologia de separação por membranas seguida por evaporação até cerca de 110 g de lactose por 100 g de água (58% de sólidos totais para os permeados de soro). Quanto maior o teor de sólidos totais atingido no evaporador, maior o rendimento de lactose que pode ser alcançado a partir da etapa de cristalização (PATERSON, 2011).

O processo de cristalização da lactose é uma etapa fundamental no processamento de soro de leite em pó e lactose. Controlar isto parece ser fundamental durante o estágio de secagem e armazenamento, uma vez que a transição da lactose para sua forma cristalizada diminui as proporções de compostos higroscópicos (lactose amorfa) (SCHUCK, 2011). A maioria das plantas industriais de lactose usa um cristizador de resfriamento por bateladas. O licor-mãe saturado que chega do evaporador está em torno de 70 °C e é resfriado a cerca de 15 °C durante o processo de cristalização (PATERSON, 2011). A temperatura final geralmente depende das condições ambientais da planta e do fluxo de resfriamento disponíveis. Se água gelada estiver disponível, então pode-se alcançar uma temperatura mais baixa, desde que haja tempo suficiente disponível nos cristizadores para permitir que o crescimento extra dos cristais ocorra. Existe uma correlação direta entre o rendimento de lactose obtida na planta e a temperatura final alcançada (PATERSON, 2011).

Algumas plantas usam cristizadores contínuos por evaporação, e estas permitem o uso de concentrados com maior teor de sólidos totais e conseqüentemente maior rendimento. Nestes sistemas, a maior parte da nucleação e crescimento dos cristais ocorre no evaporador onde a solução é bombeada por meio de tubos permutadores de calor e para o corpo cristizador onde ocorre a evaporação, aumentando a concentração da lactose em solução. Isso aumenta a supersaturação, o que permite que os cristais que estão presentes cresçam. Devido à supersaturação e ao movimento do fluido com cristais presentes, ocorre uma nucleação secundária contínua que garante que haja mais cristais começando a crescer o tempo todo. Para permitir que grande parte da lactose restante em solução seja recuperada, a suspensão retirada é colocada em cristizadores de resfriamentos descontínuos, onde haverá crescimento dos cristais. O resultado é uma ampla distribuição de tamanho de cristais, mas com bons rendimentos (PATERSON, 2017).

A etapa de cristalização é a parte mais importante do processo de produção de lactose e é a área que é considerada a mais difícil de acertar. Existem muitas variáveis que afetam o processo e estas frequentemente interagem entre si, dificultando

determinar exatamente qual efeito cada variável possui. Sabe-se que uma das etapas críticas é a nucleação primária, que ocorre no início do processo de cristalização, ela precisa ser bem controlada para que se produza cristais de tamanho uniforme (PATERSON, 2011).

Após a etapa de cristalização, é realizada a etapa de lavagem dos cristais. Há vários tipos de equipamentos diferentes usados para este fim, como a lavagem nas centrífugas, hidrociclones até os tanques de decantação dispostos para coletar os cristais de tamanhos diferentes à medida que são lavados. A área de lavagem é onde muitas das perdas podem ocorrer em uma planta de lactose, e é onde o teor final de cinzas do produto é largamente determinado (PATERSON, 2017). A eficácia da lavagem é afetada pelo tamanho do cristal obtido nos cristalizadores. Quando uma grande quantidade de finos é produzida, os estágios de lavagem são menos eficazes e resultam em produtos de baixa qualidade. O aumento da dificuldade em separar esses finos dos fluxos líquidos também leva a rendimentos muito mais baixos (PATERSON, 2011). A última etapa da operação de lavagem é a separação dos cristais da solução de lavagem. Isso geralmente é feito em uma centrífuga, produzindo um bolo de cristais de lactose que é alimentado para o secador de cristais de lactose. Sabe-se na indústria que, se este bolo apresenta muita umidade, haverá problemas para secar os cristais no secador (PATERSON, 2017).

A secagem é um passo crítico na produção de cristais de lactose, pois os problemas encontrados durante a secagem podem resultar em aglomeração ao longo do armazenamento. A secagem inicia depois que os cristais de lactose são separados do líquido de lavagem, geralmente por uma centrífuga e são alimentados ao secador como um bolo úmido que varia de 3 a 12% de umidade. Em muitas plantas, o bolo é alimentado para um secador tipo Flash antes de ser movido pneumáticamente para um secador de leito fluidizado. Em outros, o bolo é alimentado diretamente em um leito fluidizado (PATERSON, 2017). No secador tipo Flash, os cristais entram em contato com ar quente (120-150 °C), que seca rapidamente o xarope de lactose na superfície dos cristais, criando uma pequena camada de lactose amorfa na sua superfície. Do secador tipo Flash, os cristais viajam para um secador de leito fluidizado. O secador de leito fluidizado geralmente tem duas seções. A primeira seção é a seção de secagem final, que seca a lactose de cerca de 1% de umidade livre até o conteúdo final de umidade. A segunda seção do secador de leito fluidizado é usada para resfriar o produto antes de peneirar e embalar. A falha em resfriar o produto antes de embalar pode levar a um empastamento na embalagem induzido pelo gradiente de temperatura. Para evitar a aglomeração, a umidade final deve ser baixa o suficiente para garantir que a atividade de água (a_w) do produto final seja inferior a 0,3 e que a temperatura do produto seja inferior a 30 °C (PATERSON, 2011). Estes cristais estão prontos para uso comercial (grau comestível).

Se o interesse é fabricar lactose de grau farmacêutico é necessário realizar etapas adicionais de purificação (Figura 11). A lactose mono-hidratada de grau

farmacêutico é produzida a partir de cristais de lactose de grau comestível, por meio da sua dissolução em água limpa. A solução resultante é misturada com carvão ativado e um floculante e depois filtrada. A solução de lactose limpa é então concentrada e cristalizada. Cristalizadores contínuos ou em batelada podem ser usados para este processo, seguindo as etapas demonstradas na Figura 11.

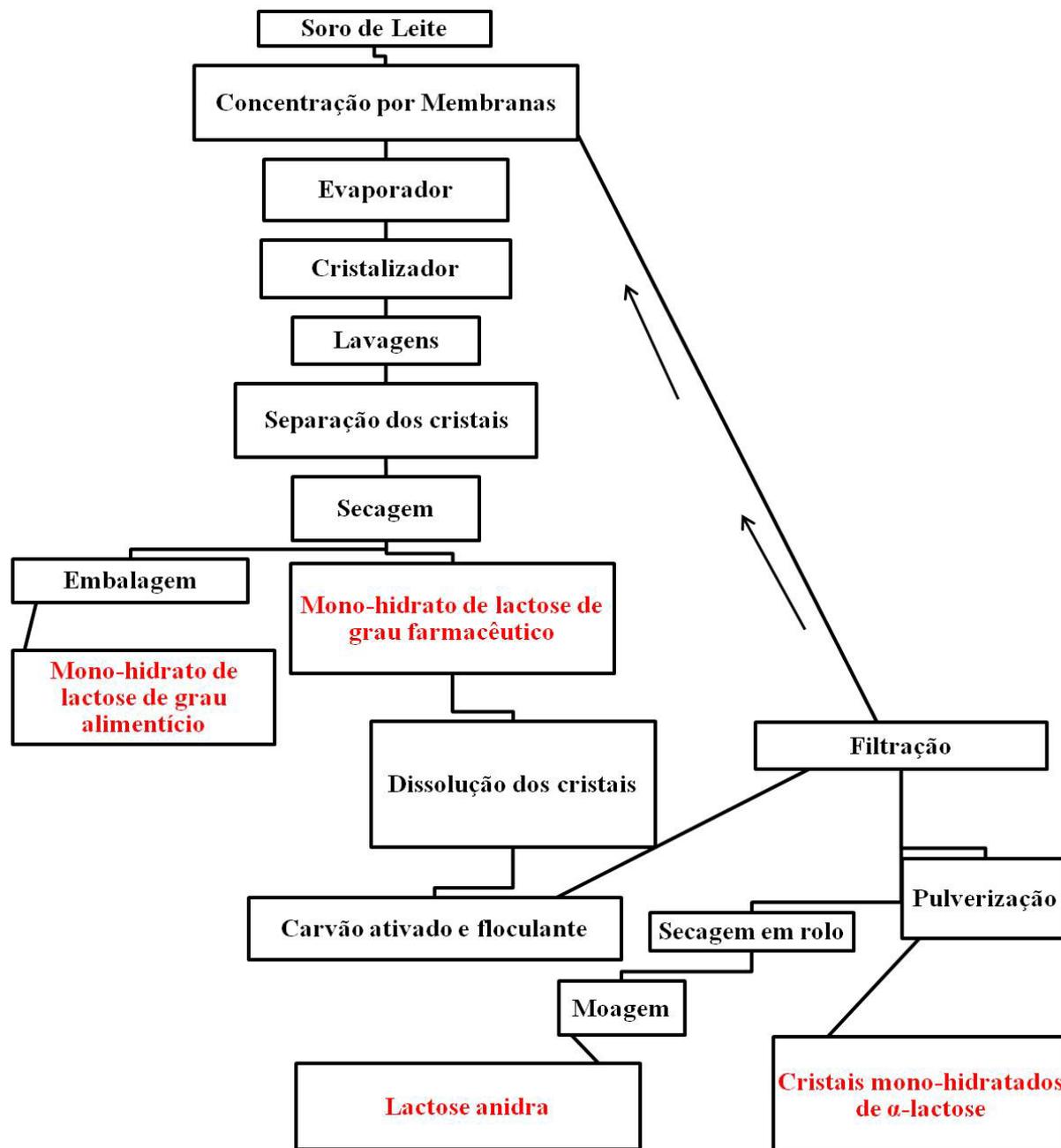


Figura 11. Fluxograma das etapas de produção de lactose de grau alimentício e de grau farmacêutico.

Fonte: Elaborado pelas autoras.

Também pode-se produzir lactose de grau farmacêutico anidra. Este é o cristal de lactose na forma β , que é o mais doce dos dois isômeros da lactose. Para produzir

cristais de β -lactose, a lactose deve ser cristalizada a temperaturas acima de 93,5 °C. Para isso, a solução de lactose limpa, produzida como na fabricação de monohidrato de lactose de grau farmacêutico, é pulverizada sobre um secador de rolos (PATERSON, 2011). O resultado da cristalização rápida a temperaturas acima de 93,5 °C é uma torta de cristais muito finos contendo tipicamente 70 a 80% de β -lactose e 20 a 30% de moléculas de α -lactose sem água de cristalização. A torta é então moída e peneirada para produzir partículas do tamanho desejado e o produto é embalado (PATERSON, 2011).

Ainda, é possível obter lactose seca por pulverização (*spray dryer*), muito utilizada na produção de fármacos como excipiente. Pós de lactose secos por pulverização são produzidos a partir de cristais mono-hidratados de α -lactose, suspendendo-os em água limpa e depois secando a mistura por pulverização. Isto resulta em aglomerados esféricos de cristais ligados por lactose amorfa. A lactose amorfa tende a estar no centro dos aglomerados, reduzindo os problemas de aglomeração que ocorrem quando está presente na superfície. Além disto, o formato esférico da partícula significa que o produto apresenta boas propriedades de fluxo e com isso, forma comprimidos muito bons (PATERSON, 2011).

2.2.3 Cromatografia

A separação cromatográfica é baseada em diferenças nas velocidades de fluxo dos componentes do líquido a ser tratado quando passados através de uma coluna de resina. O leito de resina é composto de partículas de resina porosa tendo grupos funcionais com os quais os componentes a serem separados interagem diferencialmente. O eluato é dividido em frações contendo a composição desejada. Para separar os componentes um do outro, eles devem ter diferentes afinidades com a resina (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). A cromatografia baseada na interação diferencial de componentes de uma solução mista com uma resina pode ser classificada como cromatografia de troca iônica (IEC), cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e cromatografia de afinidade (AC) (ARDO; CHATTERTON; VARMING, 2011). Ainda outra versão do processo é a cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), em que a separação é baseada nas diferenças de tamanho molecular dos componentes. Um componente, tal como uma proteína, pode ser demasiado grande para entrar na partícula de resina porosa, e então eluir mais rapidamente a partir do leito de resina se comparado com os compostos menores (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). No entanto, a cromatografia industrial é frequentemente baseada em mais de um tipo de interação. A cromatografia por exclusão de íons (IEX) ocorre quando a resina e o eluato estão em equilíbrio. A concentração de compostos iônicos no interior da resina é muito menor que a externa, o que acelera o fluxo de compostos iônicos através da coluna (WHEATON; BAUMAN, 1953a, 1953b).

A lactose pode ser separada eficientemente do leite e do soro por fortes resinas

de troca catiônica (GEISSER et al., 2005; HARJU, 1990; HARJU; HEIKKILA, 1988; KARL LAUER; GEORG STOECK; FRIEDRICH BATZ, 1974; YAGUCHI; ROSE, 1971). A separação é baseada nos diferentes efeitos de exclusão de íons e tamanhos de minerais e proteínas, e provavelmente também na capacidade da lactose de formar complexos com cátions ligados a fortes resinas de troca catiônica. Esta formação de complexos de cátions-lactose retarda o fluxo de lactose através da coluna de resina.

Segundo Harju (1987), é importante que a resina de troca catiônica esteja em equilíbrio com os cátions do leite. Em princípio, a separação cromatográfica pode permitir a remoção de compostos moleculares pequenos não ionizados (por exemplo, lactose) de moléculas grandes (por exemplo, proteínas) e moléculas pequenas ionizadas (por exemplo, sais). Quando a resina está na forma de sódio, a lactose é separada de outros componentes do leite. No entanto, a troca iônica ocorre e o cálcio do leite é ligado à resina, o que leva à destruição das micelas de caseína e ao desaparecimento da cor branca do leite. Se a resina estiver na forma de cálcio, a separação é fraca e a proteína pode precipitar na coluna. Assim, a alta temperatura (65 °C) é preferida devido ao melhor controle do crescimento microbiano e melhor separação. Ainda segundo estes autores, a concentração do leite antes da separação cromatográfica reduz a quantidade de água necessária para a eluição. Usando este método é possível separar a lactose muito especificamente dos outros componentes do leite, abrindo novas possibilidades para o desenvolvimento de processos e produtos na indústria de lácteos (HARJU, 1987).

Além disso, métodos de separação cromatográfica da lactose podem ser especialmente importantes quando se deseja retirar completamente a lactose e seus monossacarídeos (glicose e galactose) dos produtos (BATISTA et al., 2017). Algumas pessoas possuem deficiência no metabolismo da galactose, então é necessário que esta seja retirada do leite/produto. A galactosemia é um erro inato do metabolismo de carboidratos, causado por um comprometimento de qualquer uma das três enzimas que metabolizam galactose. Quando há deficiência de uma dessas enzimas, as vias alternativas do metabolismo da galactose entram em ação, o que leva à acumulação de outros metabólitos, sendo eles o galactitol e o galactonato. O galactitol se acumula nas células e tem sido apontado como agente causador de catarata e pseudotumor cerebral (DEMIRBAS et al., 2018). Baseado nesse problema, Batista et al. (2017) desenvolveram uma coluna de bioafinidade utilizando uma lectina que se liga à lactose objetivando sua retirada. Para isso, uma lectina de *Brosimum gaudichaudii* (brosimina) foi extraída, purificada e imobilizada em polianilina. Outros suportes também foram testados no processo de imobilização, mas o melhor suporte foi polianilina modificada com glutaraldeído (PANIG). O complexo PANIG-brosimina conseguiu remover 46,3% da lactose testada. Além disso, testes usando leite desnatado mostraram que é possível remover completamente a lactose, sugerindo que este material é muito promissor como uma alternativa para produzir leite sem lactose por meio da separação por cromatografia de bioafinidade. Os autores salientam que em processos de alta

escala, o uso de reatores sequenciais contendo PANIG-brosimina poderiam fornecer altos níveis de remoção de lactose, o que geraria um produto que atende os requisitos pedidos por indivíduos com intolerância à lactose e/ou galactose.

LACTOSE EM LEITE E DERIVADOS

A lactose está presente em todos os leites utilizados para alimentação humana (mulher, vaca, cabra, búfala, ovelha, camelo fêmea, jumenta, etc.). A Tabela 4 apresenta os teores de lactose (mínimo e máximo) relatados na literatura para diferentes espécies. Conseqüentemente, os derivados produzidos com estes tipos de leites também apresentam algum teor de lactose (Tabela 5). Pessoas intolerantes à lactose tendem a evitar o leite e produtos lácteos com a presença da lactose para controlar os sintomas relacionados à intolerância. No entanto produtos sem lactose e com baixo teor de lactose representam uma solução simples e eficaz para que estes indivíduos mantenham a ingestão de nutrientes relacionados ao consumo de leite e produtos lácteos (TROISE et al., 2016).

Espécie	Lactose (g/100g)
Mulher	6,3 – 7,0
Égua	6,0 – 7,2
Jumenta	5,8 – 7,4
Búfala	3,2 – 4,9
Vaca	4,4 – 5,6
Cabra	3,2 – 4,5
Ovelha	4,1 – 5,9

Tabela 4 - Teores de lactose (mínimo e máximo) relatados na literatura para diferentes espécies.

Fonte: Adaptado de GANTNER et al. (2015).

Tipo de produto	g/100g
Leite	
Desnatado	4,8
Semi- desnatado	4,7
Integral	4,6
Condensado, integral, adoçado	12,3
Pó desnatado	52,9
Evaporado, integral	8,5
Creme	
Único	2,2
Duplo	1,7
Amargo	2,7
Creme <i>fraiche</i>	2,1
Imitação de creme	2,3-6,8
logurte	
Natural	4,0
Fruta	4,0
logurte de beber	4,0
Fromage frais natural	3,0
Fromage frais de fruta	0,3
Tzatziki (com pepinos)	4,7
Sobremesas	
Milkshake comum	4,5
Sorvete de baunilha não lácteo	4,8
Sorvete de baunilha lácteo	5,2
Sorvete de chocolate	4,7
Arroz doce	3,9
Creme feito com leite integral	5,2
Mousse de chocolate	3,8

Tabela 5 - Teores de lactose para diferentes produtos lácteos, sem tratamento com lactase ou separação da lactose.

Fonte: Adaptado de Mattar e Mazo (2010).

No Brasil, estão em vigor duas resoluções que tratam das regras para rotulagem de produtos que contenham ou não lactose em sua composição. Sendo uma para tratar dos requisitos técnicos para os alimentos para dietas com restrição de lactose e outra para estabelecer os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos demais alimentos. A primeira é a Resolução da Diretoria Colegiada número 135/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que inclui os alimentos para dietas com restrição de lactose no regulamento de alimentos para fins especiais (BRASIL, 2017a). A segunda é a Resolução da Diretoria Colegiada número 136/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que define como as informações de lactose devem ser colocadas no rótulo, independentemente do tipo de alimento (BRASIL, 2017b).

De acordo com a RDC 136/2017, a declaração da presença de lactose se torna obrigatória nos alimentos — incluindo bebidas, ingredientes, aditivos alimentares e

coadjuvantes de tecnologia — que contenham lactose em quantidades maiores do que 100 (cem) miligramas por 100 (cem) gramas ou mililitros do alimento tal como exposto à venda. Ou seja, qualquer alimento que contenha lactose em quantidade acima de 0,1% deverá trazer a expressão “**Contém lactose**” em seu rótulo (BRASIL, 2017b). Os alimentos desta categoria (“Contém lactose”) devem trazer as seguintes informações no seu rótulo:

- Ser escrito em caixa alta e em negrito.
- A impressão deve ser em contraste com o fundo da caixa.
- A altura mínima deve ser de 2mm e não pode ser menor que a letra utilizada na lista de ingredientes.
- A declaração deve ficar em um local da embalagem que não seja encoberto, que seja removível pela abertura do lacre ou de difícil visualização, como área de selagem e de torção.

Apenas os estabelecimentos que preparam os alimentos, sejam eles sem embalagens ou embalados no próprio ponto de venda a pedido do consumidor, não estão obrigados a informarem sobre o conteúdo de lactose (BRASIL, 2017b).

Enquanto isso, a RDC 135/2017 diferencia o teor de lactose nos produtos que são isentos desse carboidrato daqueles que apresentam baixo teor de lactose. Sendo assim, por definição, os produtos **isentos de lactose** são alimentos para dietas com restrição de lactose que contêm quantidade de lactose igual ou menor a 100 (cem) miligramas por 100 (cem) gramas ou mililitros do alimento pronto para o consumo. Por outro lado, os alimentos com **baixo teor de lactose** são alimentos para dietas com restrição de lactose que contêm quantidade de lactose maior que 100 (cem) miligramas por 100 (cem) gramas ou mililitros e igual ou menor do que 1 (um) grama por 100 (cem) gramas ou mililitros do alimento pronto para o consumo (BRASIL, 2017a). O Quadro 1 resume e relaciona a quantidade de lactose presente no alimento com a declaração obrigatória no rótulo do produto. Além disso, os teores de lactose e galactose devem ser declarados em gramas e sem o percentual do valor diário (%VD), abaixo de carboidratos, na tabela de informação nutricional. Assim, o mercado brasileiro de alimentos possui três tipos de rotulagem para a lactose: “zero lactose”, “baixo teor”, ou “contém lactose”.

Quantidade de lactose no alimento	Frase no rótulo
Abaixo de 100 mg/100g ou ml	Zero Lactose Isento de Lactose 0% Lactose Sem Lactose Não Contém Lactose
De 100mg até 1g/100g ou ml	Baixo Teor de Lactose Baixo em Lactose
Igual ou acima de 100mg/100g ou ml	Contém Lactose

Quadro 1: Resumo e relação entre a quantidade de lactose presente no alimento com a declaração obrigatória no rótulo do produto.

Fonte: Brasil (2017a,b).

McSweeney e Fox (2009) apresentaram uma revisão de processos industriais para produção de produtos lácteos isentos ou reduzidos de lactose, especialmente leite sem lactose. Os processos podem ser divididos em três categorias: tratamento com β -galactosidase solúvel, redução de lactose por tecnologias de membrana e redução de lactose em leite por métodos cromatográficos.

A disponibilidade de preparações comerciais de lactase, bem como diferentes processos para separação da lactose favorece o desenvolvimento de diferentes abordagens tecnológicas para fabricar leite com baixo teor ou isentos de lactose (TROISE et al., 2016). Os fatores que influenciam a hidrólise enzimática são: a concentração de lactose dos produtos, o pH, a presença de alguns ativadores (íons mono e bivalentes), o tempo e a temperatura da incubação da enzima. As lactases comercialmente disponíveis têm uma faixa de temperatura ideal entre 35 °C e 65 °C (MAHONEY, 1997) e o crescimento de bactérias indesejadas durante a incubação da lactase devem ser evitados. Os leites com baixo teor ou isentos de lactose resultantes são caracterizados por um aumento do valor crioscópico (de 0,454 a 0,650 °C) e um sabor doce mais intenso, uma vez que a doçura da glicose e da galactose é significativamente maior do que a da lactose (LANGE, 2005).

Uma nova fase no desenvolvimento do leite sem lactose foi alcançada quando a Valio Ltd lançou em 2001 seu produto que tinha a doçura de leite normal e continha <0,01% de lactose (HARJU, 2004; JELEN; TOSSAVAINEN, 2003). O desenvolvimento do leite sem lactose da Valio foi baseado em um processo de separação cromatográfica, que permite a separação específica da lactose do leite (HARJU, 2004; JELEN; TOSSAVAINEN, 2003). A separação cromatográfica permite reter os minerais do leite com as proteínas, ao contrário de outras técnicas de separação (HARJU, 1987, 2004). O método foi estudado por Harju (2004) para a separação de parte da lactose do leite, pois a fração restante foi hidrolisada enzimaticamente, resultando num leite com

sua doçura natural. Harju e Heikkila (1988) patentearam um método de separação e subsequente recuperação da lactose de soro de leite, utilizando cromatografia e cristalização, respectivamente.

Uma abordagem mais fácil de adotar em laticínios e uma tecnologia mais fácil de licenciar para outros laticínios foi desenvolvida com base nas técnicas de membrana (TOSSAVAINEN; SAHLSTEIN, 2007). Para isso, o leite foi ultrafiltrado, o permeado de UF foi ainda nanofiltrado e o permeado da nanofiltração foi ainda concentrado com osmose inversa. O retentado de osmose reversa foi devolvido de volta ao retentado de UF, retornando assim os minerais, após o que a lactose residual foi hidrolisada com β -galactosidase. O leite apresenta o mesmo sabor que o leite normal, apesar da remoção parcial da lactose antes da hidrólise enzimática (TOSSAVAINEN; SAHLSTEIN, 2007).

Lange (2005, 2009) também descreveram um processo para fabricação de leite sem lactose sem doçura extra. O processo incluiu um passo de ultrafiltração em que parte da lactose foi removida e o retentado de UF foi diluído para uma concentração de proteína de 4% e uma concentração de lactose de 3%. Depois disso, a lactose residual é hidrolisada enzimaticamente. A doçura do leite era semelhante à do leite normal, mas o leite tinha um nível mineral de apenas 0,47%. No leite normal, o conteúdo mineral é de cerca de 0,75%. Isso pode causar uma diferença no sabor. A Natrell Inc. no Canadá lançou seu leite sem lactose com base neste processo de separação por membrana em 2002 (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Mais tarde, muitos novos processos para a produção de leite sem lactose foram desenvolvidos. A maioria são combinações de filtração por membranas e hidrólise enzimática (CHOI; LEE; WON, 2007; HOLST; LAURITZEN, 2009; KALLIOINEN; TIKANMAKI, 2010; TIKANMAKI; KALLIOINEN, 2015).

A Figura 12 apresenta um fluxograma das etapas mais empregadas nos dias atuais para produção de leite sem lactose, com adição da enzima após o tratamento térmico. As técnicas de tratamento térmico, como pasteurização (Figura 13), UHT direto (Figura 14) e UHT indireto (Figura 15), são similares às usadas para o leite normal (contendo lactose). Provavelmente, o tratamento térmico mais comum usado na produção industrial de leite sem lactose é o UHT (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). No entanto, alguns produtos, como o queijo sem lactose, não podem ser fabricados a partir de um leite tratado por UHT devido à maior desnaturação proteica causada por este tratamento em comparação ao tratamento de pasteurização (70-75 °C/15s). Por isso, vários laticínios que hoje produzem derivados lácteos sem lactose também utilizam o processo enzimático após o tratamento térmico de pasteurização. Este leite, por sua vez, é o mais utilizado para produzir derivados lácteos sem lactose.

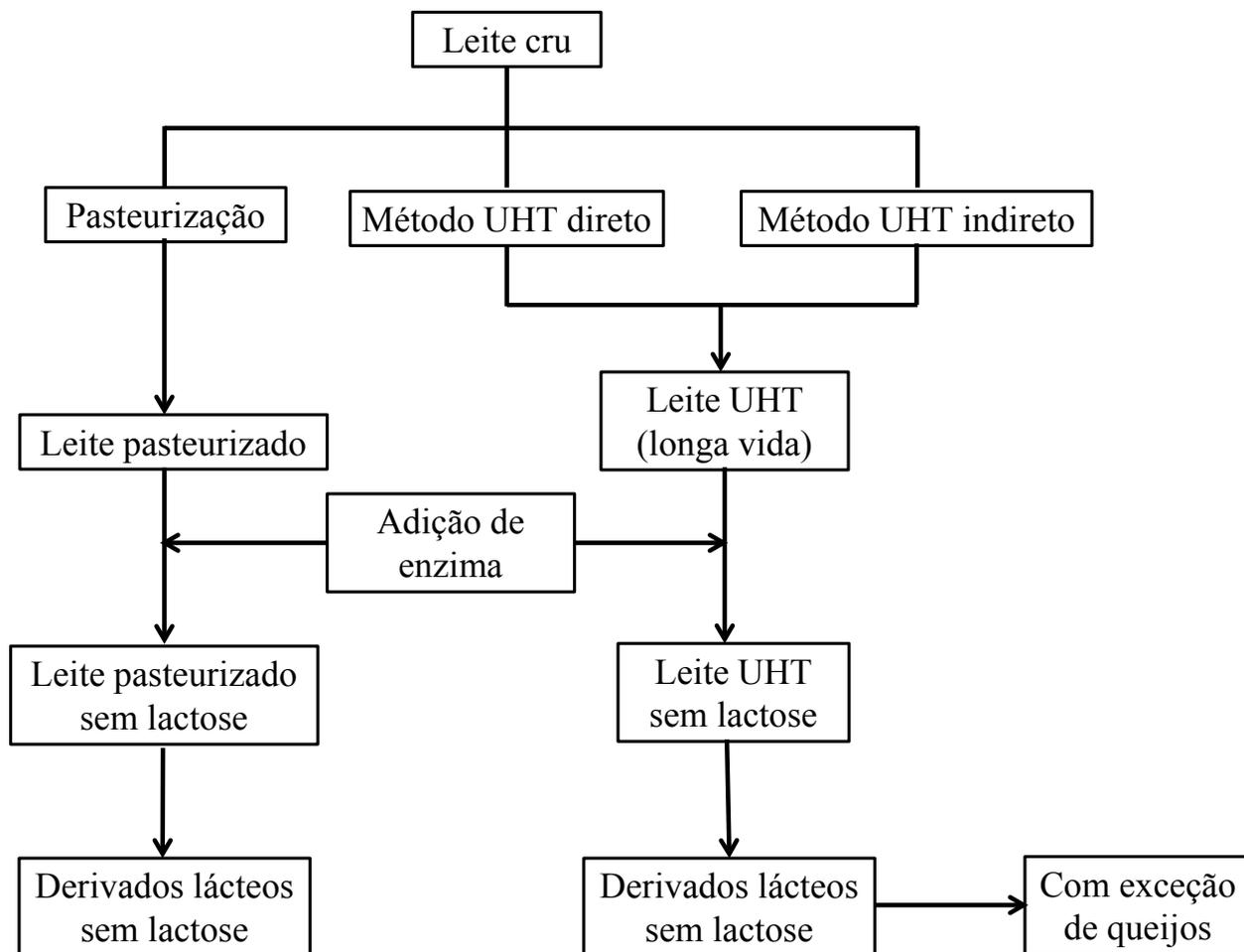


Figura 12: Representação das etapas de obtenção de derivados lácteos sem lactose a partir do leite cru.

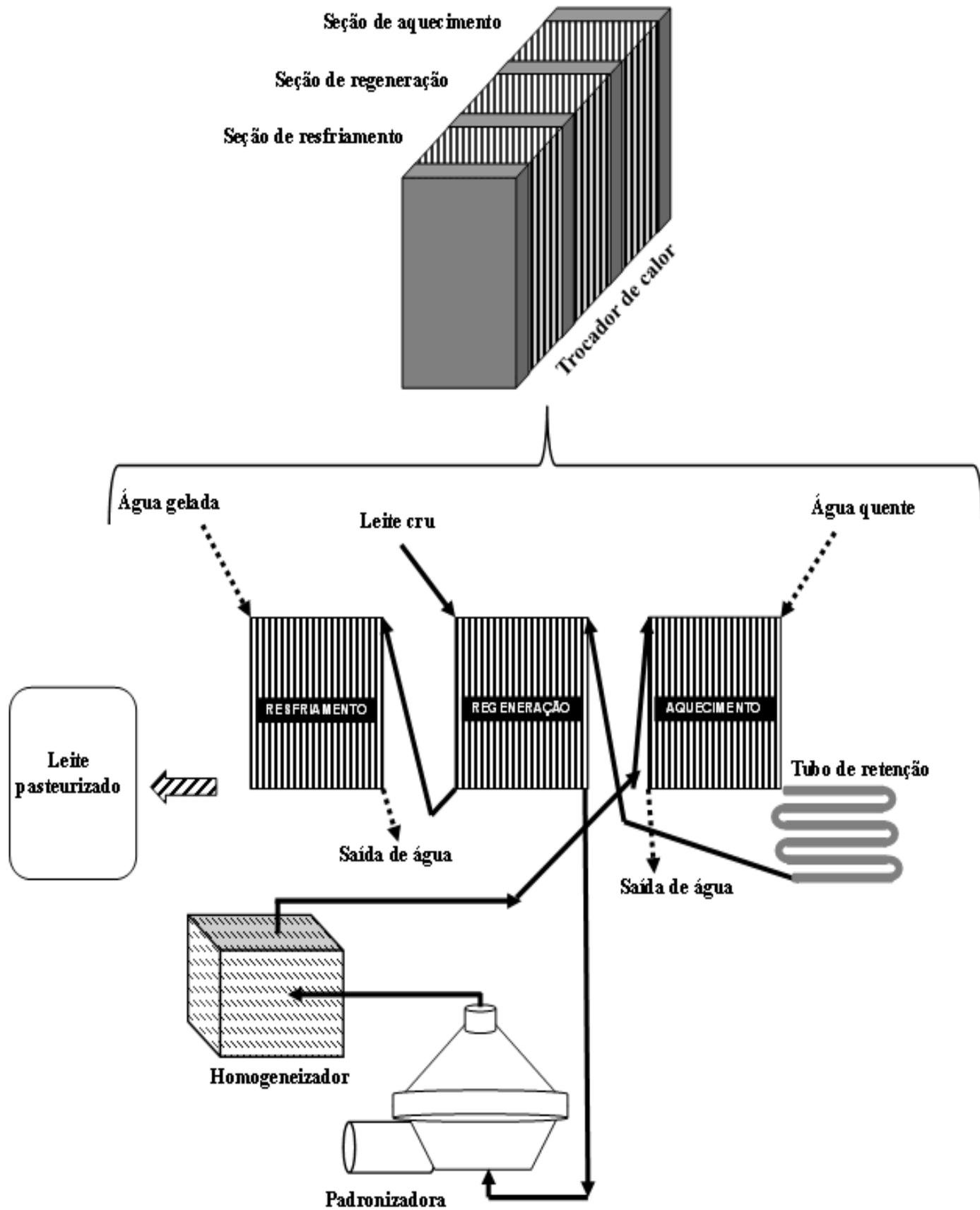


Figura 13: Etapas do processamento do leite pasteurizado.

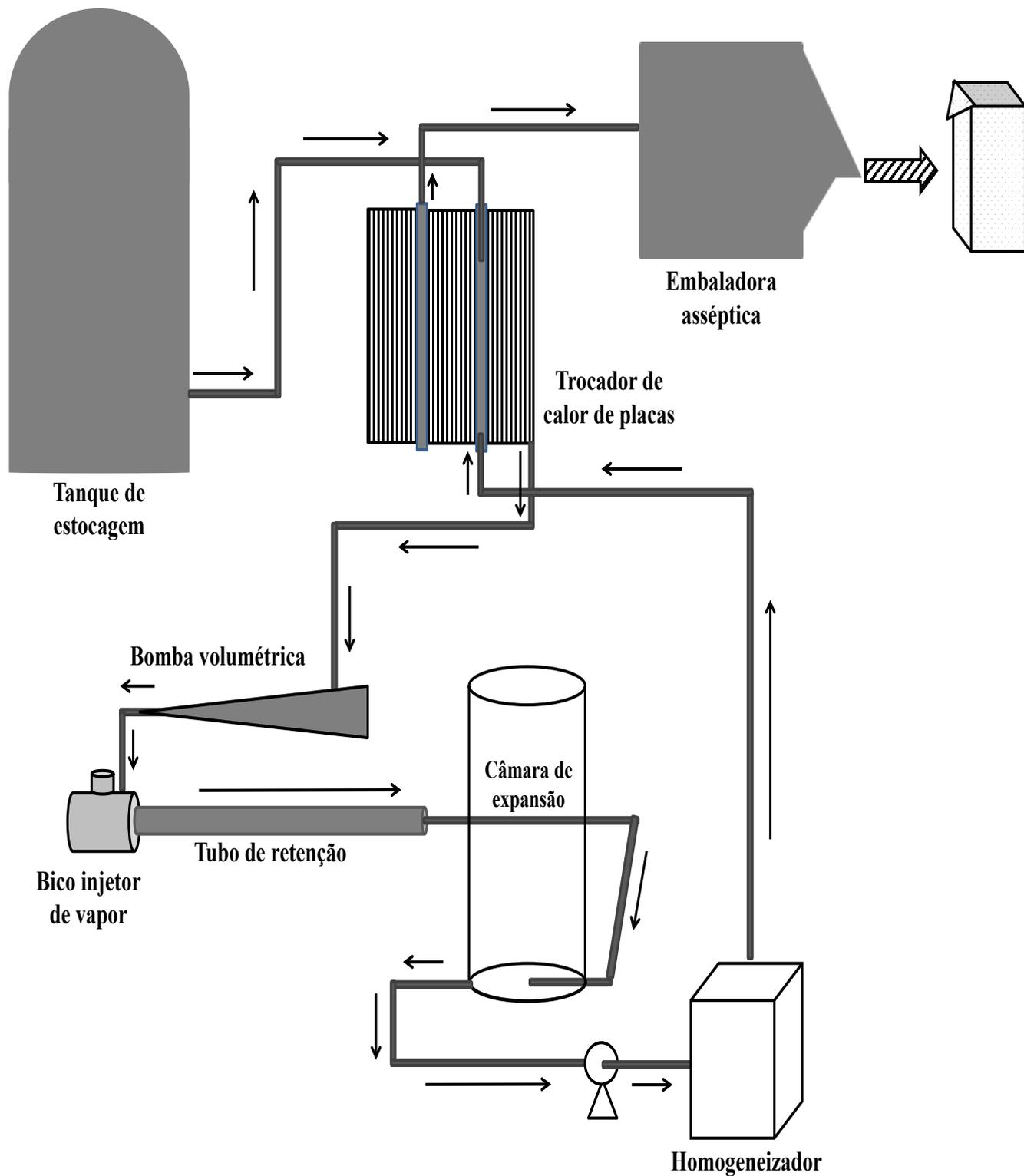


Figura 14: Etapas do processamento do leite longa vida pelo método UHT direto.

Fonte: As autoras.

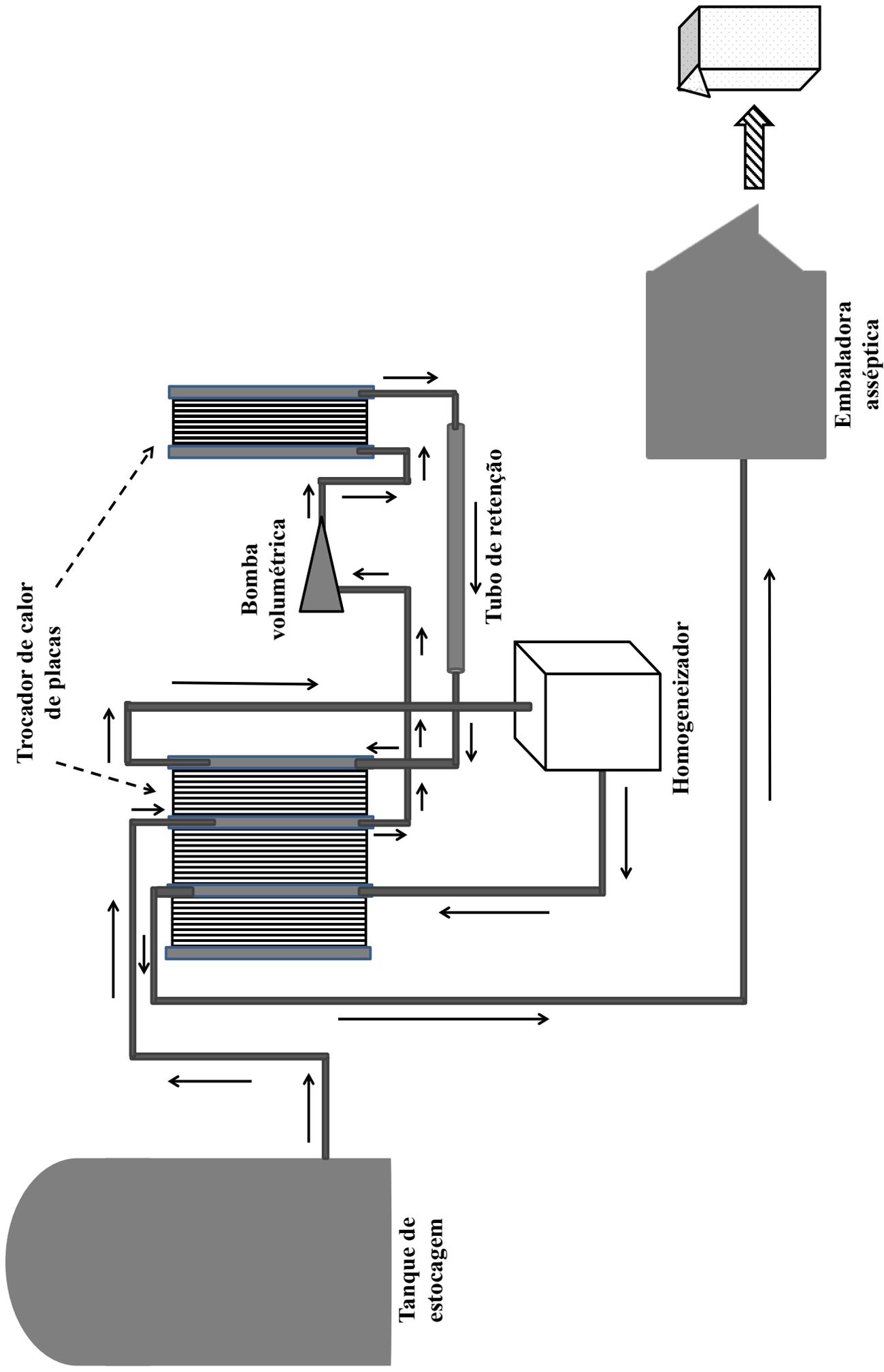


Figura 15: Etapas do processamento do leite longa vida pelo método UHT indireto.

Fonte: As autoras.

Pode-se produzir leite com baixo teor ou isento de lactose através da adição "em batelada" da lactase antes da etapa de tratamento UHT (*Ultra High Temperature*). Neste caso a hidrólise da lactose pode ser feita por sistema de batelada de uso único; sistemas de recuperação (reutilização enzimática) ou usando enzimas imobilizadas (MAHONEY, 1997). Recentemente, graças ao uso de tecnologia de embalagem asséptica, a adição da lactase em cada caixa de leite torna-se possível (no processo de adição na embalagem), como observado na Figura 12. Este processo reduz os custos operacionais, pois requer menor quantidade de enzima e economiza o tempo de espera necessário para a hidrólise do lote (TROISE et al., 2016). Além disso, permite atingir concentrações mais baixas de lactose (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). É importante salientar que o leite com baixo teor ou isento de lactose obtido pelo processo de adição da enzima na embalagem após o processamento térmico apresenta lactase ativa durante a vida de prateleira do produto, uma vez que a enzima é adicionada após a esterilização (TROISE et al., 2016). Enquanto o leite com baixo teor ou isento de lactose obtido pelo processo de adição da enzima "em batelada" não tem atividade residual de lactase porque a enzima é inativada durante a esterilização. Conseqüentemente, no leite obtido pelo processo de adição da enzima na embalagem após o tratamento térmico, a hidrólise da lactose continua durante o período de armazenamento, enquanto que nas amostras obtidas pelo processo "em batelada" a hidrólise é interrompida ao final da incubação do lote (que é quando se atinge o nível de hidrólise almejado) (TROISE et al., 2016).

A presença da lactase ativa na embalagem final pode ter algumas desvantagens, pois a alta concentração de glicose e galactose torna o produto menos estável em comparação com o leite UHT convencional. De fato, é bem conhecido que as lactases comerciais têm atividades enzimáticas secundárias que podem gerar outros intermediários reativos (EVANGELISTI et al., 1999; TOSSAVAINEN; SAHLSTEIN, 2007). Em particular, as preparações de lactase comerciais podem ter tanto atividade arilsulfatase, que catalisa a degradação de alquilfenóis de leite gerando compostos voláteis (DEKKER; DAAMEN, 2011; STRESSLER et al., 2016), como atividade proteolítica que libera peptídeos e aminoácidos livres, favorecendo o escurecimento não enzimático e o desenvolvimento de sabores estranhos durante a vida de prateleira (TROISE et al., 2016).

Os leites com baixo teor de lactose obtidos por essas duas tecnologias apresentam composição química e perfis sensoriais diferentes devido à maior concentração de aminoácidos livres (NURSTEN, 2005; VAN BOEKEL, 1998). Troise et al. (2016) investigaram a influência de ambas as tecnologias de produção de leite com reduzido teor de lactose durante seis meses de armazenamento. Eles mostraram que a atividade proteolítica da cadeia lateral da lactase causou a liberação de aminoácidos com uma formação significativamente maior de produtos da reação de Maillard e de sabores desagradáveis em quatro de cinco amostras produzidas pela adição da enzima na embalagem após o tratamento térmico. Esses autores concluíram que a adição de

lactase após a esterilização do leite pode ter consequências sensoriais e nutricionais negativas, principalmente relacionadas à atividade proteolítica lateral da enzima, especialmente durante o armazenamento prolongado. A qualidade das lactases utilizadas pode ter um impacto significativo na percepção sensorial. A eliminação das atividades secundárias já melhora a qualidade sensorial de produtos lácteos com baixo teor de lactose e sem lactose (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

Os efeitos da adição de lactase após o tratamento térmico foram comparados ao perfil químico do leite convencional tratado por UHT ao longo de nove meses de armazenamento (JANSSON et al., 2014a, 2014b). Os resultados mostraram que o leite com baixo teor de lactose é caracterizado por uma maior concentração de aminoácidos livres e furosina, maiores taxas de reação para a formação de voláteis e, em geral, condições mais favoráveis para a reação de Maillard ocorrer do que o leite convencional tratado por UHT. Além disso, esses artigos destacaram que a β -caseína e a α_{s1} -caseína foram hidrolisadas significativamente no leite com baixo teor de lactose após aproximadamente 90 dias de armazenamento (TROISE et al., 2016). Devido a estes problemas, o tratamento térmico do leite sem lactose deve ser o mais suave possível (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Segundo Tossavainen e Kallioinen (2007) o UHT direto (Figura 14) é um método mais suave que o UHT indireto (Figura 15) para produção de leite sem lactose. No entanto, a temperatura de armazenamento também é um fator muito importante em relação à qualidade do leite sem lactose. As reações de Maillard podem progredir significativamente durante a vida útil do produto em temperatura ambiente e este é um fator mais importante do que a tecnologia UHT utilizada (TOSSAVAINEN; KALLIOINEN, 2007). A intensidade das reações de Maillard durante o tratamento térmico pode ser reduzida significativamente utilizando pós-hidrólise, i.e., adicionando enzima assepticamente após o tratamento térmico. Embora isso não diminua a taxa das reações de Maillard durante o armazenamento, isso leva a níveis mais baixos de escurecimento. Independentemente do tipo de tecnologia UHT utilizada e do método de hidrólise, a temperatura durante o tempo de armazenamento deve ser a mais baixa possível (TOSSAVAINEN; KALLIOINEN, 2007).

Milkovska-Stamenova e Hoffmann (2017) estudaram o efeito da hidrólise da lactose na reação de Maillard durante o processamento de produtos lácteos. Os altos teores de proteínas e açúcares redutores (principalmente lactose) no leite favorecem as reações de Maillard durante o processamento térmico necessário para reduzir a carga bacteriana dos produtos lácteos e prolongar sua vida útil também (MOATSOU, 2013). A reação de Maillard é iniciada pela redução de açúcares (por exemplo, aldoses) reagindo com grupos amino em proteínas, ou seja, principalmente grupos ϵ -amino de resíduos de lisina, produzindo produtos de glicação relativamente estáveis (por exemplo, produtos Amadori) (NURSTEN, 2011). Estes produtos estão presentes em baixos teores no leite cru e colostro, enquanto aumenta durante o processamento industrial (MILKOVSKA-STAMENOVA; HOFFMANN, 2016a, 2016b). O efeito sobre as propriedades físico-químicas das proteínas do leite, como redução da digestibilidade

e biodisponibilidade, que podem diminuir o valor nutricional do leite são amplamente discutidos (NURSTEN, 2011). Estruturas glicadas também podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico e, portanto, desencadear alergias alimentares (TODA et al., 2014; VERHOECKX et al., 2015). Além disso, os produtos de Amadori são precursores de produtos finais de glicação avançada (AGEs), levantando algumas preocupações sobre potenciais riscos à saúde, pois podem contribuir para o desencadeamento de respostas inflamatórias e estresse oxidativo com efeitos vasculares e renais potencialmente prejudiciais (POULSEN et al., 2013; STIRBAN; TSCHÖPE, 2015). Sendo assim, Milkovska-Stamenova e Hoffmann (2017) demonstraram em termos quantitativos que o armazenamento aumentou a lactosilação até quatro vezes em leite UHT com lactose e em fórmula infantil com lactose. Enquanto a exosilação aumentou até onze vezes no leite UHT sem lactose e três vezes na fórmula infantil. Além disso, o leite UHT sem lactose apresentou um aumento no número e na quantidade de peptídeos hexosilados durante três meses de armazenamento, que foi ampliado ainda mais quando submetido à aquecimento moderado (MILKOVSKA-STAMENOVA; HOFFMANN, 2017). O leite sem lactose contém maiores níveis de glicação que os produtos lácteos com lactose, devido à alta reatividade da d-glicose e da d-galactose (obtida pela clivagem enzimática da lactose) em comparação com a lactose dissacarídica (MILKOVSKA-STAMENOVA; HOFFMANN, 2016b). É uma preocupação constante da ciência e tecnologia de leite e derivados diminuir a ocorrência destas reações e seus produtos, sendo este, um campo de investigação sempre atual, que sempre está em busca de novas alternativas e soluções.

A partir do leite sem lactose (principalmente o pasteurizado) é possível desenvolver todos os derivados lácteos que estão disponíveis no mercado na sua forma normal. Já estão à venda derivados lácteos isentos de lactose (“lac-free”) como leite em pó, fórmulas infantis, leites fermentados (incluindo iogurte e kefir), vários tipos de queijos, manteiga, creme de leite, leite condensado, doce de leite, requeijão, sorvete, sobremesas lácteas, etc.

O teor de lactose também pode ser reduzido em produtos lácteos através da fermentação de bactérias do ácido lático. A coalhada, o kefir e o iogurte têm sido tradicionalmente produzidos e consumidos em substituição ao leite normal. Nestes produtos, aproximadamente 30% da lactose é convertida durante o seu processo de fabricação (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). No entanto, a fim de se obter produtos isentos de lactose Ivanova et al. (1990) descreve um processo para produzir um leite ultrafiltrado que é utilizado na produção de kefir. A partir deste processo, obtém-se uma delactosilação parcial que reduz a proporção de lactose para proteína de cerca de 1,5:1 para cerca de 1:1. Nenhuma modificação indesejável das propriedades organolépticas do kefir foi observada durante o processo produtivo deste produto (IVANOVA et al., 1990). O ideal na produção de derivados lácteos sem lactose é que o processo de retirada ou hidrólise da lactose não modifique as propriedades às quais o consumidor já está acostumado naquele tipo de produto. Streiff et al. (1990)

descreveram um processo para fazer iogurte sem lactose. Este processo também compreende as etapas de ultrafiltração do leite e hidrólise da lactose com uma lactase. Uma vez que menos sacarose precisa ser adicionada ao iogurte ao final do processo, o sabor mais doce provocado pela glicose + galactose no produto não apresenta um problema para a produção deste derivado (STREIFF; HOYDA; EPSTEIN, 1990). Moreira et al. (2017) produziram um iogurte com baixo teor de lactose e adição de farinha de alfarroba. Na análise sensorial realizada os consumidores atribuíram melhores notas aos produtos com maior teor de doçura; assim, o iogurte enriquecido com alfarroba apresentou geralmente uma melhor aceitabilidade, especialmente o produto com lactose hidrolisada que apresentava um sabor mais doce (MOREIRA et al., 2017).

A maioria dos queijos duros, semi-duros e moles curados é naturalmente isenta de lactose ou contém níveis muito baixos de lactose porque, durante a fermentação por bactérias iniciadoras, a lactose é transformada em ácido láctico nos estágios iniciais do amadurecimento do queijo (MONTI et al., 2017). No entanto, em muitos casos, pessoas com má absorção de lactose relutam em comer queijos porque os níveis de lactose desses produtos não são claramente declarados (GILLE et al., 2018). A ocorrência de baixas concentrações de lactose em queijo Gouda (VAN SCHEPPINGEN et al., 2017), queijo Grana-Padano (MONTI et al., 2017) e manteiga (CONZUELO et al., 2010) são relatados na literatura. A Tabela 6 descreve o teor de lactose presente em diferentes tipos de queijos. É possível perceber que em queijos duros, semi-duros ou moles curados os sacarídeos (como lactose, galactose e glicose) são naturalmente metabolizados pela microflora. Como resultado, estes tipos de queijo contém uma concentração muito baixa de lactose.

Produto	Lactose (g kg⁻¹)
Queijos duros	
Emmental	<LDM
Gruyère	<LDM
Sbrinz	<LDM
Suíço	<LDM
Montanhês	<LDM
Queijos semi-duros	
Appenzeller	<LDM
Vacherin Fribourgeois	<LDM
St. Paulin	0,3 ± 0,1
Tête de Moine	<LDM
Tilsiter Suíço - Past	<LDM
Tilsiter Suíço Vermelho	<LDM
Tilsiter Suíço surchoix	<LDM
Raclette	<LDM
Cream cheese	<LDM
Queijos moles	
Vacherin Mont-D'Or	<LDM
Limburger	<LDM
Tomme	<LDM
Brie (45% gordura)	<LDM
Brie (60% gordura)	<LDM
Camembert (60% gordura)	<LDM
Camembert (45% gordura)	<LDM
Feta (Suíço)	<LDM
Queijos frescos	
Cottage	18,24 ± 5,95
Muçarela	7,43 ± 1,71
Requeijão desnatado	46,40 ± 8,59
Requeijão semi-desnatado	44,25 ± 11,3
Requeijão integral	36,18 ± 2,61
Queijos sem Lactose (LF)	
LF Cottage	0,37 ± 0,14
LF Requeijão desnatado (0.1% gordura)	0,51 ± 0,25

Tabela 6: Teor de lactose em queijos duros, semi-duros, moles, frescos e com denominação de isentos de lactose.

Fonte: Adaptado de Gille et al. (2018). LDM: valor abaixo do Limite de Detecção do Método (0,024 g kg⁻¹).

O menor teor de lactose nesses produtos, na verdade, explica muito bem porque, em locais onde há alta incidência de má absorção de lactose, o leite é consumido principalmente por adultos na forma de queijos, manteiga e leite fermentados. Enquanto em locais com incidência muito baixa de má absorção de lactose, grandes quantidades de leite não modificado são consumidas pela população adulta (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Pollman (1989) analisou queijo duro ralado não encontrou níveis de lactose superiores a 10 mg/100g e nem de galactose superiores a 30 mg/100g. Mais recentemente, Portnoi e MacDonald (2013) resumiram os resultados do teor de lactose e galactose dos queijos analisados desde 2001, principalmente

por análise enzimática e apenas recentemente por cromatografia. Todas as amostras analisadas, com exceção de uma, não continham lactose detectável, e apenas duas amostras apresentaram quantidade de galactose maior que o limite de detecção do método. Conforme visualizado também na Tabela 6, os demais tipos de queijos, como os frescos, necessitam de uma etapa de delactosilação prévia do leite para a produção de um derivados isento de lactose.

Outro produto que tradicionalmente contém menor teor de lactose devido ao seu processo de produção é a manteiga. Ao fazer manteiga, 100 kg de leite são convertidos em 5 kg de manteiga e mais de 99% da água é removida. Ao mesmo tempo, cerca de 99% da lactose também é removida. As concentrações de lactose são também reduzidas durante as etapas de malaxagem e lavagem da massa com a saída do leitelho (CONZUELO et al., 2010; SCHRIPSEMA, 2008). Na Índia, o ghee (uma versão de manteiga clarificada) é tradicionalmente produzido e, neste produto, até mesmo o um por cento final de água e lactose é eliminado (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). No entanto, para assegurar a denominação de produto isento de lactose é recomendado utilizar leite ou creme de leite previamente delactosilado por processo físico ou enzimático.

Por outro lado, o leite em pó produzido a partir de leite não delactosilado é um dos produtos que apresentam o maior teor de lactose entre os derivados lácteos disponíveis no mercado (Tabela 5). Fernández, Schebor e Chirife (2003) observaram que a lactose hidrolisada no leite em pó era mais escura que em leite em pó tradicional devido à maior disponibilidade de açúcares redutores, o que favorece a reação de Maillard. Problemas como esse na produção de leite em pó hidrolisado levam a uma redução na qualidade do pó, incluindo dificuldade na reidratação, aspectos sensoriais alterados e baixo rendimento (FERNANDEZ; SCHEBOR; CHIRIFE, 2003). Embora a tecnologia do leite em pó hidrolisado já seja difundida e utilizada industrialmente, ainda assim se consiste num processo desafiador, em virtude das características físicas do produto hidrolisado. Segundo Schuck et al. (2015), durante a secagem, o leite com a lactose hidrolisada tem um número maior de moléculas (glicose e galactose, em oposição à lactose) no estado amorfo, e conseqüentemente o produto fica altamente higroscópico, o que torna a produtividade do processamento custosa devido ao entupimento das câmaras e à conservação do pó. Para solucionar o caso, a indústria de laticínios continua investigando as mudanças significativas que ocorrem na composição do leite em pó com lactose hidrolisada, quando esse leite é obtido via condições tradicionais de secagem (TORRES et al., 2017).

No sorvete, a lactose constitui aproximadamente 20% dos carboidratos presentes (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996). A porcentagem de lactose em sorvete pode depender da formulação. Quando a hidrólise da lactose é realizada, o sorvete requer menos adição de açúcar para obter a doçura desejável. A hidrólise de 70% da lactose no leite aumenta sua doçura em uma quantidade comparável à adição de aproximadamente 2% de sacarose (ZADOW, 1986). Os monossacarídeos produzidos a partir da lactose

diminuem o ponto de congelamento da mistura de sorvete, aumentam a doçura relativa e promovem a facilidade de derretimento do sorvete (MATAK et al., 2003). O ponto de congelamento da mistura de sorvete é diretamente proporcional ao número de partículas de lactose em solução (MATAK et al., 2003). Lindamood, Grooms e Hansen (1989) relataram que o ponto de congelamento do sorvete diminui proporcionalmente à extensão da hidrólise da lactose na mistura de gelados comestíveis. O ponto de congelamento da mistura de sorvetes não tratados com β -galactosidase foi $-1,458$ °C, enquanto o ponto de congelamento de misturas que sofreram 25, 50 ou 100% de hidrólise da lactose foram $-1,62$, $-1,67$ e $-1,928$ °C, respectivamente (LINDAMOOD; GROOMS; HANSEN, 1989). O baixo ponto de congelamento é frequentemente responsável pelo derretimento acelerado do sorvete (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996). A hidrólise da lactose no sorvete resulta em um produto mais macio (MCSWEENEY; FOX, 2009). Outro efeito positivo da hidrólise prévia da lactose pode ser observado em leites condensados ou doces de leites. O defeito de textura arenosa e negativa em leites concentrados pode ser superado pela hidrólise da lactose. Sabioni et al. (1984) relataram menos arenosidade em doce de leite com lactose hidrolisada em comparação com o leite condensado no qual a lactose não foi hidrolisada.

Ohlsson et al. (2017) certificaram o conteúdo de glicose, galactose e lactose em produtos lácteos (leite e leites fermentados), bem como em suas variantes sem lactose. Os produtos foram comprados no mercado local da Suécia e submetidos à análise cromatográfica de troca iônica com detecção eletroquímica (HPAEC-ECD). Os autores concluíram que os níveis de lactose estavam abaixo ou perto dos limites de detecção, tanto no leite UHT sem lactose como nos produtos lácteos fermentados (iogurte, kefir e leite fermentado tradicional sueco) sem lactose.

INOVAÇÃO EM LEITES E PRODUTOS LÁCTEOS SEM LACTOSE

Segundo um relatório de pesquisa publicado neste ano pela FMI (*Future Market Insights*, fornecedora de serviços de consultoria e inteligência de mercado, sediada em Londres), a demanda global por alimentos deverá crescer de 59% para 98% nos próximos 30 anos, sendo cada vez mais importante para os fabricantes de produtos alimentícios introduzir alimentos inovadores em mercados já consolidados, como o de produtos lácteos sem lactose. A pesquisa revela ainda que a região do mundo em que há maior valor de mercado para os produtos lácteos sem lactose é a APEJ (Ásia-Pacífico, exceto Japão) (Figura 16), além de aumento e valorização desses produtos também na América Latina.

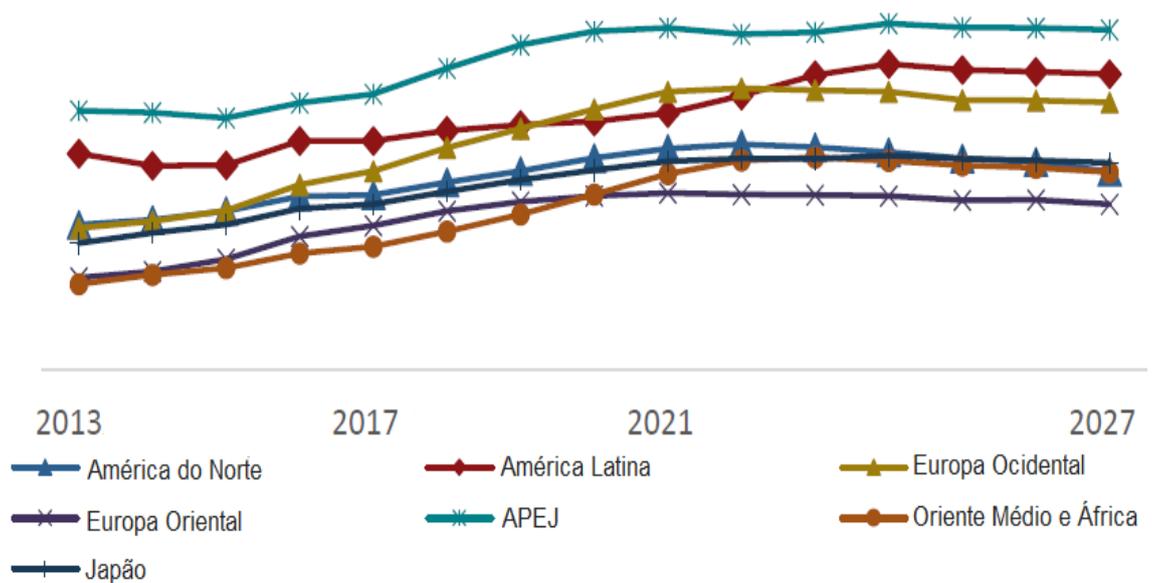


Figura 16. Crescimento global ano após ano do valor de mercado de produtos lácteos sem lactose, por região (2017-2027).

Fonte: Adaptado de FMI (2018).

Em relação aos diversos tipos de produtos lácteos, observa-se uma tendência de queda do valor de mercado do leite sem lactose (Figura 17), se opondo ao valor de mercado do iogurte sem lactose, que tende a aumentar até 2024. Em 2017 já se percebeu que a maior parte da movimentação financeira global dos lácteos sem lactose veio do iogurte (Figura 18), representando 21,9% do valor de mercado, seguido do queijo e manteiga (18%). Apesar das tecnologias para produzir leite com lactose reduzida, mudanças na demografia e estilo de vida nos Estados Unidos não favoreceram o crescimento do consumo de leite fluido (BARBANO, 2017). Recentemente, uma

combinação de técnicas (remoção parcial de lactose por ultrafiltração e hidrólise enzimática da lactose remanescente) produziu um leite fluido reduzido em calorias e lactose (Fairlife, Chicago, IL). A Tabela 7 resume todos os estudos de produtos lácteos inovadores, apresentados e discutidos detalhadamente nos parágrafos abaixo.

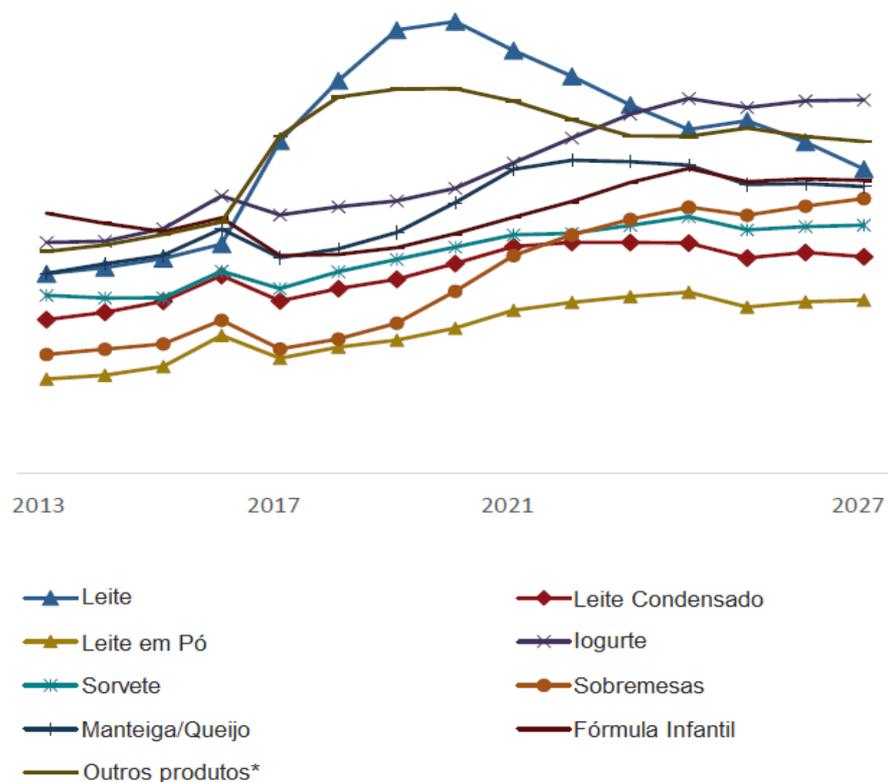


Figura 17. Crescimento global ano após ano do valor de mercado de produtos lácteos sem lactose, por tipo de produto (2017–2027).

Fonte: Adaptado de FMI (2018). (*)Preparações culinárias, sobremesas regionais, kefir, produtos de confeitaria e chocolates; com teor de lactose zero ou reduzido.

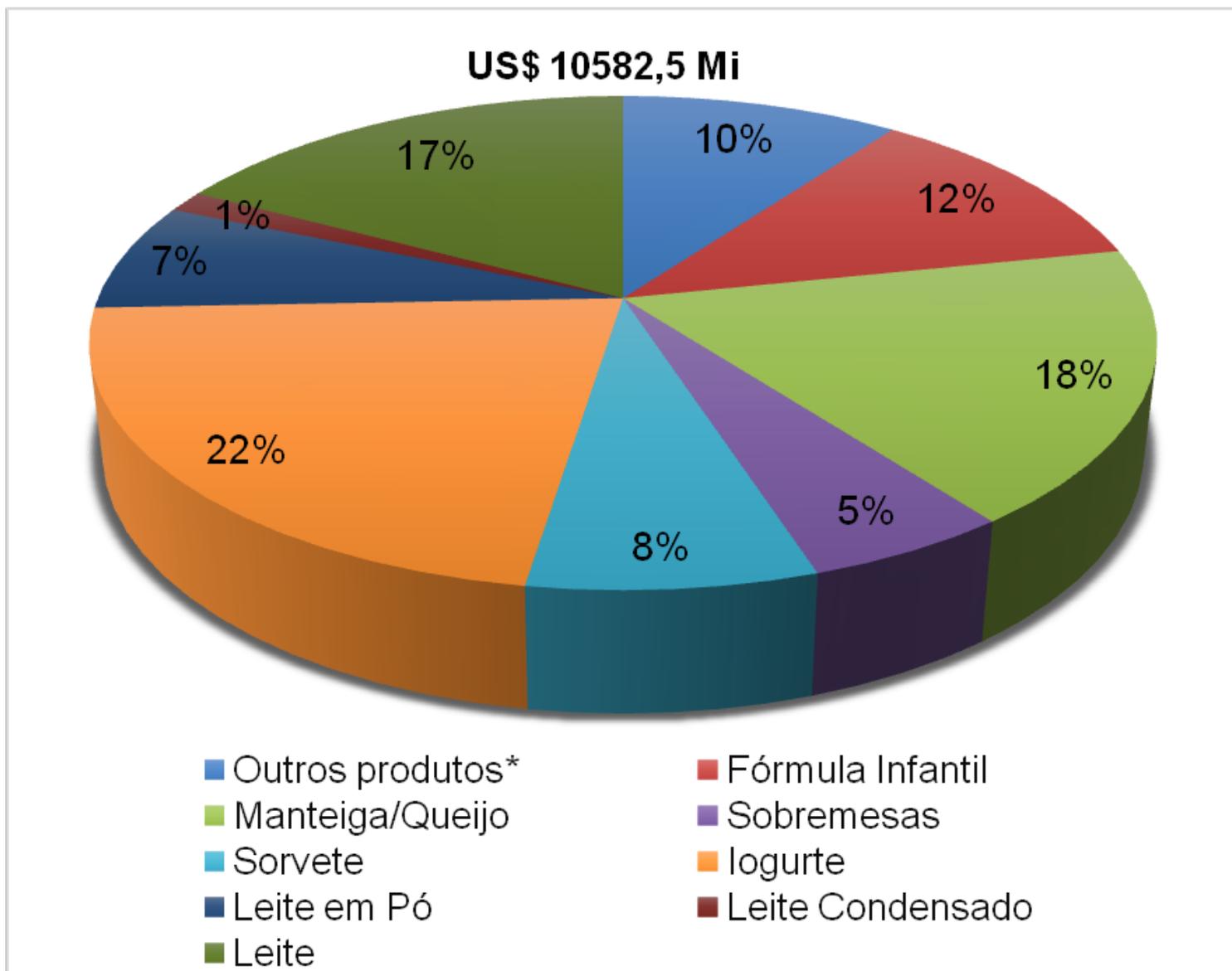


Figura 18. Análise BPS global do valor de mercado de produtos lácteos sem lactose, por tipo de produto (2017).

Fonte: Adaptado de FMI (2018). (*)Preparações culinárias, sobremesas regionais, kefir, produtos de confeitaria e chocolates; com teor de lactose zero ou reduzido.

Combinação de técnicas (remoção parcial de lactose por ultrafiltração e hidrólise enzimática da lactose remanescente) produziu um leite fluido reduzido em calorias e lactose (Fairlife, Chicago, IL). A Tabela 7 resume todos os estudos de produtos lácteos inovadores, apresentados e discutidos detalhadamente nos parágrafos abaixo.

Produto	Tratamento prévio da matéria-prima	Teor de lactose no(s) produto(s) final(is)	Autores
Leite prebiótico	Transgalactosilação da lactose	2,1 g/L	(PLOU et al., 2016)
logurte prebiótico	Transgalactosilação da lactose	1,44%	(RAZA et al., 2018)
logurte probiótico	Hidrólise da lactose	<LDM	(VARGA; ROMAN; TOTH, 2004)
logurte	Hidrólise da lactose	≤0,01 mg / 100 cm ³	(TONGUC; KARAGOZLU, 2017)
logurte adicionado de cranberry e mirtilo	Hidrólise da lactose	≤0,01%	(DABIJA; ROPCIUC, 2016)
Bebida fermentada à base de soro	Hidrólise da lactose	-	(MATIJEVIĆ; LISAK; BOŽANIĆ, 2011)
Bebida láctea com preparado de toranja	Ultrafiltração e hidrólise da lactose	<1%	(RAHIMI et al., 2017)
Queijo cottage prebiótico	Hidrólise da lactose	<0,1 g / 100 g	(NICOLETTI; VERDI; ENDRES, 2016)
Queijo muçarela	Ultrafiltração	0,00%	(MOYNIHAN et al., 2016)
Queijo Canestrato Pugliese	Adição de <i>Bifidobacterium bifidum</i> Bb02 (com consequente hidrólise da lactose)	<LDM	(CORBO et al., 2001)
Frozen	Hidrólise da lactose	<LDM	(SKRYPLONEK et al., 2017)
Achocolatado	Hidrólise da lactose	<LDM	(LI et al., 2015)

Tabela 7 – Produtos lácteos com baixo teor de lactose ou sem lactose desenvolvidos recentemente.

LDM: valor abaixo do Limite de Detecção do Método

Os alimentos funcionais têm o potencial de promover a saúde por meio de mecanismos não encontrados na nutrição convencional, e os efeitos restringem-se à promoção da saúde e bem-estar, maximizando as funções fisiológicas do indivíduo em vez de curar doenças (GRANATO et al., 2010). Aproximadamente 60% dos europeus consomem alimentos funcionais, de modo que as mulheres consomem a maior quantidade de bebidas funcionais (FMI, 2018). No Brasil, os alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ao todo, são seis grandes grupos que compõem a lista de nutrientes e não nutrientes que tem alegações padronizadas, e entre estes estão os

microrganismos probióticos e alguns compostos alimentares com efeito prebiótico (ANVISA, 2002).

A literatura carece de pesquisas relacionadas à produção de derivados lácteos probióticos sem lactose, mas sabe-se que o consumo de produtos ricos em bactérias probióticas é proposto como estratégia de redução dos sintomas de intolerância a lactose, pois algumas delas têm a capacidade de metabolizar o dissacarídeo, como é o caso das bifidobactérias e lactobacilos (CORGNEAU et al., 2017). Isso foi observado nos trabalhos de Corbo et al. (2001) e Vesa et al. (1996). Vesa et al. (1996) estudaram o leite fermentado da marca Ofilus, que continha *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium sp.*, e verificaram nos adultos voluntários com deficiência de lactase boa tolerância e digestibilidade da lactose. Corbo et al. (2001) analisaram as propriedades microbiológicas e bioquímicas do queijo Canestrato Pugliese suplementado com bifidobactérias (*Bifidobacterium bifidum* Bb02 e *Bifidobacterium longum* Bb46). Em contraste com o queijo controle (sem adição dos probióticos), a lactose foi completamente hidrolisada nos queijos elaborados com as bifidobactérias, e esses dados corroboram com as atividades encontradas para α - e β -galactosidase — que foram marcadamente mais pronunciadas na presença de bifidobactérias, especialmente *B. bifidum* Bb02.

Até o momento foi documentado na literatura apenas um produto probiótico sem lactose utilizando como base leite sem lactose (lactose previamente hidrolisada): Varga, Roman e Toth (2004) produziram iogurtes probióticos utilizando *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus acidophilus*. Matijević, Lisak e Božanić (2011) também elaboraram um derivado probiótico sem lactose, mas com outra matéria-prima: Whey Protein reconstituído e subsequentemente hidrolisado. Assim, foram desenvolvidas duas bebidas de soro fermentadas, uma contendo o probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5 e a outra com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12.

Como já esclarecido no subitem 2.1.1, a β -galactosidase pode catalisar também a reação de transgalactosilação da lactose, produzindo conseqüentemente, prebióticos denominados galacto-oligossacarídeos (GalOS). Com base nesse conhecimento, Plou et al. (2016) desenvolveu um leite com presença significativa de GalOS e, ao mesmo tempo, baixo teor de lactose (concentração final de 2,1 g/L, sendo que inicialmente era 45 g/L). A justificativa desse trabalho se deu no fato de que os produtos lácteos infantis são geralmente suplementados com GalOS e/ou fruto-oligossacarídeos, a fim de imitar os múltiplos benefícios dos oligossacarídeos do leite humano. Logo, em vez de adicionar GalOS à fórmula infantil, a outra alternativa (empregada pelos autores) é a de formar tais oligossacarídeos *in situ* durante o tratamento típico do leite com β -galactosidasas para eliminar a lactose. Raza et al. (2018) também empregaram essa técnica para produzir um iogurte prebiótico com baixo teor de lactose. Primeiramente foi feito a transgalactosilação enzimática do leite, e na seqüência, o iogurte. A lactose no iogurte prebiótico ($1,44 \pm 0,01\%$) foi estatisticamente menor em comparação com o

iogurte controle ($3,4 \pm 0,02\%$). Em outras palavras, aproximadamente 60% da lactose foi bioconvertida, resultando nas quantidades de 0,9 g de GalOS, 0,9 g de glicose e 0,55 g de galactose por 100 g de produto. A avaliação organoléptica quanto à cor, consistência e aceitabilidade geral foi estatisticamente similar para ambos os iogurtes, enquanto o sabor e a sinerese foram melhorados no iogurte prebiótico devido aos monossacarídeos e GalOS recém-produzidos, respectivamente. Os autores concluíram que a transgalactosilação da lactose do leite melhora a aceitabilidade do iogurte e é importante para os indivíduos intolerantes à lactose.

A inulina é uma fibra dietética que também se classifica como prebiótica. Frutanos desse tipo são utilizados como ingredientes no desenvolvimento de novos produtos não apenas por suas propriedades nutricionais, mas também devido a razões tecnológicas. A inulina pode ser utilizada como substituto de gordura em alimentos, pois possui a capacidade de promover na boca uma sensação semelhante à da gordura. Seu maior peso molecular quando comparado ao das oligofrutoses por exemplo, torna-a menos solúvel e com habilidade de formar microcristais quando misturada à água ou leite. Esses microcristais não são percebidos na boca, mas interagem para formar uma textura finamente cremosa (PIMENTEL; GARCIA; PRUDENCIO, 2012). Por isso, Nicoletti, Verdi e Endres (2016) utilizaram a inulina para desenvolver um queijo cottage sem lactose com reduzido teor de sódio e gordura (redução de 41 e 30%, respectivamente). Conseguiu-se uma concentração final de inulina no queijo de aproximadamente 5,31% sem alteração das características sensoriais.

Apesar dos seis grupos que compõem o quadro de ingredientes funcionais no Brasil, outras matérias-primas são exploradas a fim de descobrir novos compostos que possam vir a ter essa alegação. Pesquisadores romenos (DABIJA; ROPCIUC, 2016) estudaram leites fermentados sem lactose adicionados de cranberry e mirtilo. Cranberries são uma importante fonte de vitaminas E, K, C e fibras, além de ter uma boa quantidade de proantocianidinas (COMBS; MCCLUNG, 2017; NEMZER et al., 2018), que por sua vez possui efeitos anticancerígenos, bloqueando as bactérias e prevenindo infecções (CÔTÉ et al., 2011; YU et al., 2016; ALSHAIBANI; ZHANG; WU, 2017). Mirtilos contêm antocianidinas (NEMZER et al., 2018; ZHOU et al., 2018) que ajudam na reparação do DNA e estimulam a secreção de insulina, razão pela qual são recomendados aos diabéticos (NORBERTO et al., 2013; SHI et al., 2017). Assim, os autores alegam que o produto obtido é um alimento orgânico funcional que não usa conservantes, aditivos, ou organismos geneticamente modificados.

Rahimi et al. (2017) produziram uma bebida láctea sem lactose de toranja, enriquecida com pectina. O produto foi feito a partir de leite permeado obtido da ultrafiltração seguido da hidrólise enzimática. O leite permeado fornece ingredientes nutracêuticos altamente valiosos, incluindo lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulina, fatores de crescimento, aminoácidos (cadeia essencial e ramificada), lactose, proteínas solúveis, vitaminas e minerais (BRANGER et al., 1999). Já o suco concentrado de toranja contém altos níveis de nutrientes, como ácidos fenólicos,

licopeno, pectina, minerais e vitaminas; conta também com a presença de antioxidantes naturais, como limonina e naringina (DREWNOWSKI; HENDERSON; SHORE, 1997). Por tudo isso, a bebida desenvolvida é candidata à alegação de propriedade funcional.

Excetuando-se as pesquisas de possíveis ou reais propriedades funcionais dos produtos sem lactose, outros relatos inovadores de derivados lácteos sem lactose foram encontrados. Tonguc e Karagozlu (2017) desenvolveram uma bebida láctea fermentada visando atender consumidores intolerantes à lactose e galactose. Para tal, foi utilizada como base da bebida, uma mistura na proporção de 1:1 de leite sem lactose e dois tipos de fórmula infantil. Os resultados indicaram que o teor de galactose das bebidas foi reduzido a um nível que é adequado para as dietas de pacientes com galactosemia, além do fato das propriedades químicas, microbiológicas e sensoriais destes produtos corresponderem às características comuns de qualidade de um produto lácteo fermentado comercial. Skryplonek et al. (2017) elaboraram um *frozen* sem lactose e investigaram os impactos da hidrólise da lactose no produto final. O trabalho foi desenvolvido de modo que a hidrólise enzimática (Ha-lactase) ocorreu simultaneamente com a fermentação. Após a aeração e congelamento, o produto resultante mostrou propriedades de textura e viscosidade otimizadas se comparado com o controle, além de aumento da sua qualidade sensorial. Moynihan et al. (2016) combinaram a técnica de ultrafiltração com outras estratégias visando a produção de queijos muçarelas com diferentes e reduzidos teores de lactose, mas que ao mesmo tempo mantinha constante os níveis de caseína. Por fim, Li et al. (2015) estudaram a hidrólise enzimática da lactose em leite integral e desnatado objetivando a produção de leites achocolatados com reduzido teor de açúcar, já que o poder de doçura dos monossacarídeos formados é maior do que o da lactose.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC n. 02, de 07 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 jan. 2002.

AGUSTÍN, R.-D. et al. Structural features of *Aspergillus niger* β -galactosidase define its activity against glycoside linkages. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 12, p. 1815-1829, 2017.

ALBAYRAK, N.; YANG, S.-T. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 4, p. 371-383, 2002.

ALSHAIBANI, D.; ZHANG, R.; WU, V. C. H. Antibacterial characteristics and activity of *Vaccinium macrocarpon* proanthocyanidins against diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Functional Foods**, v. 39, p. 133-138, 2017.

ARDÖ, Y.; CHATTERTON, D. E. W.; VARMING, C. Chromatographic methods. In: FUQUAY, J.; FOX, P.; MCSWEENEY, P. (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd. ed. London, UK: Elsevier Ltd, 2011, p. 1:169.

BARBANO, D. M. A 100-Year Review: The production of fluid (market) milk. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9894-9902, 2017.

BARTESAGHI, A. et al. Atomic resolution cryo-EM structure of β -galactosidase. **Structure**, v. 26, n. 6, p. 848-856.e3, 2018.

BATISTA, K. A. et al. Development of a new bioaffinity stationary phase for lactose removal using a lactose-binding lectin immobilized onto polyaniline. **Separation and Purification Technology**, v. 185, p. 54-60, 2017.

BAYRAMOGLU, G.; TUNALI, Y.; ARICA, M. Y. Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. **Catalysis Communications**, v. 8, n. 7, p. 1094-1101, 2007.

BECERRA FERNANDEZ, M. et al. QUEIZUAR SL. **New Kluyveromyces lactis yeast strain deposited in Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) under DSM 24900, for producing sugars (such as glucose and/or galactose), ethanol, protein, and biomass**. WO2012175760-A1. 2012.

BELHACENE, K. et al. Simple eco-friendly beta-galactosidase immobilization on functionalized magnetic particles for lactose hydrolysis. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 14, n. 3, p. 631-638, 2015.

BELLE, A. S. et al. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. **Food Chemistry**, v. 246, p. 266-274, 2018.

BOSSO, A. et al. Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial beta-galactosidase in UHT and skimmed milk. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 159-165, 2016.

- BERG, N. O. et al. SEVERE FAMILIAL LACTOSE INTOLERANCE—A GASTROGEN DISORDER? **Acta Paediatrica**, v. 58, n. 5, p. 525–527, set. 1969.
- BRANGER, E. B. et al. Sensory characteristics of cottage cheese whey and grapefruit juice blends and changes during processing. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 1, p. 180-184, 1999.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado**, oBrasília, DF, 30 dez 2011Diário Oficial da União, , 2011.
- BRASIL. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 135, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2017. Altera a Portaria SVS/MS nº 29, de 13 de janeiro de 1998, que aprova o regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre os alimentos para dietas com restrição de lactose**.Brasília, DF, 08 fevereiro 2017Diário Oficial da União, , 2017a.
- BRASIL. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 136, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2017. Estabelece os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos**.Brasília, DF, 08 fevereiro 2017Diário Oficial da União, 2017b.
- CARDOSO, B. B. et al. β -galactosidase from *Aspergillus laticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 67-74, 2017.
- CAREVIĆ, M. et al. Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin. **International Dairy Journal**, v. 54, p. 50-57, 2016.
- CERLESI, P. CENTRALE DEL LATTE DI MILANO S.R.L. **Method and plant for hydrolysis of lactose in milk with an enzyme fixed on a support**. A23C9/1206. EP0997071A3. 2000.
- CHANALIA, P. et al. Purification and characterization of beta-galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. **Bioorganic Chemistry**, v. 77, p. 176-189, 2018.
- CHENG, W. et al. Structural insights into the substrate specificity of *Streptococcus pneumoniae* beta(1,3)-galactosidase BgaC. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 27, p. 22910-8, 2012.
- CHEN, W. et al. Immobilization of recombinant thermostable beta-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* for lactose hydrolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 491-8, 2009.
- CHEN, Z, et al. UNIV JIANGNAN. **Bacterial strain for producing a beta-galactosidase, where the beta-galactosidase is classified/named as *Bacillus aryabhatai* SK22.003 and is preserved in Chinese Type Culture Collection Center, which has a preservation number of M2011464**. CN102533607-A; CN102533607-B. 16 jan. 2012.
- CHIBA, S.; YAMADA, M.; ISOBE, K. Novel acidophilic β -galactosidase with high activity at extremely acidic pH region from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 3, p. 263-267, 2015.
- CHOI, S. H.; LEE, S.-B.; WON, H.-R. Development of lactose-hydrolyzed milk with low sweetness using nanofiltration. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 20, n. 6, p. 989–993, 2007.
- COMBS, G. F.; MCCLUNG, J. P. Vitamin K. In: COMBS, G. F. e MCCLUNG, J. P. (Ed.). **The Vitamins** (Fifth Edition): Academic Press, 2017, p.243-265.
- CONZUELO, F. et al. An integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk

and dairy products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7141–7148, 2010.

CORBO, M. R. et al. Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 3, p. 551-561, 2001.

CORGNEAU, M. et al. Recent advances on lactose intolerance: Tolerance thresholds and currently available answers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 15, p. 3344-3356, 2017.

COSTA, R. G.; QUEIROGA, R. D. C. R. E.; PEREIRA, R. A. G. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 307–321, 2009.

CÁNOVAS, M.; IBORRA, J. L. Whole cell biocatalysts stabilization for l-carnitine production. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 3-4, p. 149-158, 2005.

CÔTÉ, J. et al. Effect of juice processing on cranberry antibacterial properties. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2922-2929, 2011.

DABIJA, A.; ROPCIUC, S. Sgem. Aspects concerning obtaining innovative fermented dairy product. 16th International Multidisciplinary Scientific Geoconference (SGEM 2016), 2016, Albena, BULGARIA. Stef92 Technology Ltd, Jun 30-Jul 06. p.185-192.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed Editora, 2009.

DE LATHOUDER, K. M. et al. Carbon coated monoliths as support material for a lactase from *Aspergillus oryzae*: Characterization and design of the carbon carriers. **Carbon**, v. 44, n. 14, p. 3053-3063, 2006.

DE LATHOUDER, K. M. et al. Polyethyleneimine (PEI) functionalized ceramic monoliths as enzyme carriers: preparation and performance. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 50, n. 1, p. 20-27, 2008.

DEKKER, P. J. T. et al. **Enzyme preparations yielding a clean taste**, 28 nov. 2015. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US9011948>>. Acesso em: 14 jul. 2018.

DEKKER, P. J. T.; DAAMEN, C. B. G. Enzymes exogenous to milk in dairy technology: β -d-Galactosidase. In: FUQUAY, J.; FOX, P.; MCSWEENEY, P. (Eds.). **Encyclopedia of dairy sciences**. 2nd. ed. London, UK: Elsevier Ltd, 2011, p. 2:276.

DEMIRBAS, D. et al. Hereditary galactosemia. **Metabolism**, v. 83, p. 188–196, 2018.

DREWNOWSKI, A.; HENDERSON, S. A.; SHORE, A. B. Taste responses to naringin, a flavonoid, and the acceptance of grapefruit juice are related to genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 2, p. 391-7, 1997.

DUAN, X. et al. Optimal extracellular production of recombinant *Bacillus circulans* β -galactosidase in *Escherichia coli* BL21(DE3). **Process Biochemistry**, v. 53, p. 17-24, 2017.

EFSA. Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. **EFSA Journal**, v. 8, n. 9, p. 1777, set. 2010.

EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2015-2016**. Florianópolis, SC, Brasil: Dioesc, 2017.

ERICH, S. et al. Novel high-performance metagenome β -galactosidases for lactose hydrolysis in the

dairy industry. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 27-37, 2015.

ESCOBAR, S. et al. In situ immobilization of beta-galactosidase from *Bacillus circulans* in silica by sol-gel process: Application in prebiotic synthesis. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 4, p. 396-404, 2016.

ESKANDARLOO, H.; ABBASPOURRAD, A. Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using beta-galactosidase immobilized on functionalized glass beads. **Food Chemistry**, v. 251, p. 115-124, 2018.

EVANGELISTI, F. et al. Deterioration of protein fraction by Maillard reaction in dietetic milks. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 2, p. 237-243, 1999.

FACIN, B. R. et al. Immobilization and controlled release of β -galactosidase from chitosan-grafted hydrogel. **Food Chemistry**, v. 179, p. 44-51, 2015.

FAO. **Milk and dairy products in human nutrition**. [s.l.: s.n.].

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations Database**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

FERNANDEZ, E.; SCHEBOR, C.; CHIRIFE, J. Glass transition temperature of regular and lactose hydrolyzed milk powders. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology**, v. 36, n. 5, p. 547-551, 2003.

FIALHO, T. L. et al. Lactose hydrolyzed milk powder: Thermodynamic characterization of the drying process. **Drying Technology**, v. 36, n. 8, p. 922-931, 2018.

FLATZ, G. Genetics of lactose digestion in humans. **Advances in human genetics**, v. 16, p. 1-77, 1987.

FOX, P. F. Lactose: Chemistry and Properties. In: MCSWEENEY, P. e FOX, P. F. (Ed.). **Advanced dairy chemistry: lactose, water, salts and minor constituents**. New York, NY: Springer New York, 2009, p.1-15.

FUTURE MARKET INSIGHTS. Lactose free dairy products market: yoghurt product type to lead in terms of revenue during the forecast period: global industry analysis (2012 - 2016) and opportunity assessment (2017 - 2027). Disponível em: <<https://www.futuremarketinsights.com/reports/lactose-free-dairy-products-market>>. Acesso em: 24 ago. 2018.

GAJENDRAGADKAR, C. N.; GOGATE, P. R. Ultrasound assisted acid catalyzed lactose hydrolysis: Understanding into effect of operating parameters and scale up studies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 9-15, 2017.

GEISSER, A. et al. Separation of lactose from human milk oligosaccharides with simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, n. 1, p. 17-23, 2005.

GERNIGON, G. et al. Demineralization. In: FUQUAY, J.; FOX, P.; MCSWEENEY, P. (Eds.). . **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd. ed. London, UK: Elsevier Ltd, 2011, p. 4:738.

GÉSAN-GUIZIOU, G. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Applications en agroalimentaire. **Techniques de l'Ingénieur**, p. 17 (French)., 2007.

GILLE, D. et al. Detection of lactose in products with low lactose content. **International Dairy Journal**, v. 83, p. 17-19, 2018.

GONZALEZ-CATANO, F. et al. Improvement of covalent immobilization procedure of -galactosidase

from *Kluyveromyces lactis* for galactooligosaccharides production: Modeling and kinetic study. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 6, p. 1568-1578, 2017.

GONZALEZ-DELGADO, I. et al. Beta-galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 257, p. 51-61, 2018.

GONZALEZ-DELGADO, I. et al.. Production of high galacto-oligosaccharides by pectinex ultra SP-L: optimization of reaction conditions and immobilization on glyoxyl-functionalized silica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 1649-1658, 2017.

GRANATO, D. et al. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 455-470, 2010.

GROSOVA, Z. et al. Entrapment of beta-galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 4, p. 763-7, 2008.

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

HARJU, M. A method for the specific separation of lactose from skim milk. **Meijeritieteellinen Aikakauskirja**, v. 45, n. 1, p. 82–93, 1987.

HARJU, M. **A process for the specific separation of lactose from milk**, 11 nov. 1990. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/EP0226035B1/en>>. Acesso em: 10 jul. 2018.

HARJU, M. Chromatographic and enzymatic removal of lactose from milk. **Bulletin- linternational Dairy Federation**, v. 389, p. 4–8, 2004.

HARJU, M. E.; HEIKKILA, H. O. **Process of recovering lactose from whey**, 12 out. 1988. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US4955363A/en>>. Acesso em: 10 jul. 2018.

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

HASHIMOTO, H. et al. AMANO PHARM KK (AMAN-C) ENSUIKO SUGAR REFINING CO LTD (ENSU-Non-standard). **Preparing non-reducing disaccharide useful as health food, by reacting alpha-galactosidase with galactose and glucose to obtain oligosaccharide having alpha-galactosyl group, and hydrolyzing oligosaccharide using beta-galactosidase**. Int CI^{07H} 001/00. JP4759028-B2. 31 jul. 2008, 31 ago. 2011.

HOLST, H. H.; LAURITZEN, K. **Process for producing lactose-free milk**, 10 abr. 2009. Disponível em: <<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2009043356>>. Acesso em: 14 jul. 2018.

HUBER, R. E.; KURZ, G.; WALLENFELS, K. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of beta-galactosidase (*E. coli*) on lactose. **Biochemistry**, v. 15, n. 9, p. 1994-2001, 1976.

HUSAIN, Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 41-62, 2010.

INUI, T. M.-S. O. SAISEI PHARMA Co., ltd. **ENZYME-TREATED MILK PRODUCT, METHOD FOR PRODUCING SAME, COMPOSITION, AND PRODUCT**. Int CI^{A61K} 35/20. FR. 16803348.8. 31 maio 2016, 07 mar. 2018.

ISHIKAWA, K. et al. AMANO ENZYME INC(AMAN-C). **New standard beta-galactosidase useful for preparing pharmaceutical for lactose-intolerance patient, supplement, or dairy-products e.g. processed milk, skimmed milk powder or yogurt, comprises specific amino acid sequence.** WO2016027747-A1. 12444D. 2016.

IVANOVA, L. N. et al. **Process for producing kefir**, 20 abr. 1990. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US4957752>>. Acesso em: 14 jul. 2018

JANSSON, T. et al. Lactose-hydrolyzed milk is more prone to chemical changes during storage than conventional ultra-high-temperature (UHT) milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 31, p. 7886–7896, 2014a.

JANSSON, T. et al. Chemical and proteolysis-derived changes during long-term storage of lactose-hydrolyzed ultrahigh-temperature (UHT) milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 46, p. 11270–11278, 2014b.

JÄRVELÄ, I.; TORNIAINEN, S.; KOLHO, K.-L. Molecular genetics of human lactase deficiencies. **Annals of Medicine**, v. 41, n. 8, p. 568–575, 2009.

JELEN, P.; TOSSAVAINEN, O. Low lactose and lactose-free milk and dairy products - prospects, technologies and applications. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 2, p. 161-165, 2003.

JOSE, V. L. et al. In depth analysis of rumen microbial and carbohydrate-active enzymes profile in Indian crossbred cattle. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 160-170, 2017.

JUERS, D. H. et al. A structural view of the action of *Escherichia coli* (*lacZ*) beta-galactosidase. **Biochemistry**, v. 40, n. 49, p. 14781-94, 2001.

KALLIOINEN, H.; TIKANMAKI, R. **Low-lactose and lactose-free milk product and process for production thereof**, 4 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/y2010/0055289.html>>. Acesso em: 14 jul. 2018.

KAMRAN, A. et al. Lactose hydrolysis approach: Isolation and production of β -galactosidase from newly isolated *Bacillus* strain B-2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 99-103, 2016.

KARL LAUER; GEORG STOECK; FRIEDRICH BATZ. **Chromatographic fractionation of whey**, 27 mar. 1974. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US3969337>>. Acesso em: 10 jul. 2018

KATASE, T. et al. AMANO ENZYME INC (AMAN-C). **New beta galactosidase gene derived from Bacillus circulans useful in food for producing milk and diary products.** WO2010140435-A1. 2010.

KELLY, P. M. Membrane-based fractionation. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd. ed. London, UK: Elsevier Ltd, 2011, p. 3:864.

KHAN, M.; HUSAIN, Q.; NAQVI, A. H. Graphene based magnetic nanocomposites as versatile carriers for high yield immobilization and stabilization of beta-galactosidase. **Rsc Advances**, v. 6, n. 58, p. 53493-53503, 2016.

KHRAMTSOV, A. G. et al. UNIV N CAUCASUS FEDERAL (UYNC-Non-standard). **Method for combined enzyme beta-galactosidase production involves preparation of lactose-containing raw material with lactose.** RU2622078-C1. 68662Q. 2017.

KISHORE, D. et al. Immobilization of beta-galactosidase onto functionalized graphene nano-sheets using response surface methodology and its analytical applications. **Plos One**, v. 7, n. 7, p. 13, 2012.

- KOSIKOWSKI, F. V.; WIERZBICKI, L. E. Lactose hydrolysis of raw and pasteurized milks by *Saccharomyces lactis* lactase. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 1, p. 146-148, 1973.
- KUOKKANEN, M. et al. Mutations in the translated region of the lactase gene (LCT) underlie congenital lactase deficiency. **American journal of human genetics**, v. 78, n. 2, p. 339–44, 2006.
- KRIZNIK, L. et al. Hyper-activation of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles. **Journal of Cleaner Production**, v. 179, p. 225-234, 2018.
- LANGE, M. **Process for making a lactose-free milk and milk so processed**, 15 abr. 2005. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US6881428B2/en>>. Acesso em: 14 jul. 2018.
- LANGE, M. **Process for making a lactose-free milk and milk so processed**, 4 fev. 2009. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/CA2360837A1/un>>. Acesso em: 14 jul. 2018.
- LANSKY, S. et al. Structural basis for enzyme bifunctionality - the case of Gan1D from *Geobacillus stearothermophilus*. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 22, p. 3931-3953, 2017.
- LARSEN, M. K. et al. DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS(DUPO-C). **New host cell capable of expressing a polypeptide having beta-galactosidase activity or transgalactosylating activity and having cellulase, mannanase and pectinase activity inactive useful for producing the dairy product**. WO2016071504-A1. 283664, 2016.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman, 2008.
- LEVITT, M.; WILT, T.; SHAUKAT, A. Clinical Implications of Lactose Malabsorption Versus Lactose Intolerance. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 47, n. 6, p. 471–480, jul. 2013.
- LINDAMOOD, J. B.; GROOMS, D. J.; HANSEN, P. M. T. Effect of hydrolysis of lactose and sucrose on firmness of ice cream. **Food Hydrocolloids**, v. 3, n. 5, p. 379–388, 1 nov. 1989.
- LIU, Y. et al. Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1055-1063, 2017.
- LI, X. E. et al. Sugar reduction of skim chocolate milk and viability of alternative sweetening through lactose hydrolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1455-1466, 2015.
- LOEB, S.; SOURIRAJAN, S. Sea Water Demineralization by Means of an Osmotic Membrane. In: GOULD, R. F. (Ed.). **Saline Water Conversion**. [s.l.] AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1963. p. 117–132.
- LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 93–103, 2007.
- MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. Significance of Lactose in Dairy Products. In: **Advanced Dairy Chemistry**. New York, NY: Springer New York, 2009, p. 35–104.
- MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 147-154, 1998.
- MAHONEY, R. R. Lactose: enzymatic modification. In: **Advanced Dairy Chemistry Volume 3**. Boston, MA: Springer US, 1997, p. 77–125.

- MAKSIMAINEN, M. M. et al. The crystal structure of acidic β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 109-115, 2013.
- MARSHALL, R. T.; ARBUCKLE, W. S. **Ice Cream**. Boston, MA: Springer US, 1996.
- MATAK, K. E. et al. The influence of lactose hydrolysis on the strength and sensory characteristics of vanilla ice cream. **Transactions of the ASAE**, v. 46, n. 6, p. 1589–1593, 2003.
- MATIJEVIĆ, B.; LISAK, K.; BOŽANIĆ, R. Impact of enzymatic hydrolyzed lactose on fermentation and growth of probiotic bacteria in whey. **Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka**, v. 61, n. 2, p. 154-160, 2011.
- MATSUNO, H. et al. Superior activities of enzymes physically immobilized on structurally regular poly(methyl methacrylate) surfaces. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 9, p. 2174-2179, 2007.
- MATTAR, R.; MAZO, D. F. DE C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 322, 2010.
- MAUBOIS, J. L. Liquid milk products: membrane-processed liquid milk. In: FUQUAY, J.; FOX, P.; MCSWEENEY, P. (Eds.). . **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd. ed. London, UK: Elsevier Ltd, 2011, p. 3:307.
- MILKOVSKA-STAMENOVA, S.; HOFFMANN, R. Identification and quantification of bovine protein lactosylation sites in different milk products. **Journal of Proteomics**, v. 134, p. 112–126, 2016a.
- MILKOVSKA-STAMENOVA, S.; HOFFMANN, R. Hexose-derived glycation sites in processed bovine milk. **Journal of Proteomics**, v. 134, p. 102–111, 2016b.
- MILKOVSKA-STAMENOVA, S.; HOFFMANN, R. Influence of storage and heating on protein glycation levels of processed lactose-free and regular bovine milk products. **Food Chemistry**, v. 221, p. 489–495, 2017.
- MILKPOINT. **Euromonitor: consumo de alimentos sem glúten e lactose cresce no Brasil | Giro de Notícias | MilkPoint**. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/brasileiro-aumenta-consumo-de-alimentos-sem-gluten-e-lactose-208642/>>. Acesso em: 4 jul. 2018.
- MILLER, G. D. et al. **Handbook of Dairy Foods and Nutrition**, Second Edition. 2000.
- MINAMITANI, Y.; SUGIURA, T. AMANO ENZYME INC (AMAN-C), UNIV YAMAGATA NAT CORP (UYYA-Non-standard). **Controlling enzyme e.g. galactosidase, cellulase, esterase, and lipase productivity of microorganism e.g. Streptomyces and Escherichia by applying pulsed electric field to microorganism**. WO2017146009-A1. 599674, 2017.
- MISSON, M.; JIN, B.; ZHANG, H. Recirculating spiral bioreactor for galactooligosaccharide production using polymer nanofiber-beta-galactosidase assembly. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 44, p. 12479-12487, 2017.
- MITTAL, S. B. et al. The effect of protease contamination in lactase on the flavour of lactose-hydrolyzed milks. **Australian Journal of Dairy Technology (Australia)**, 1991.
- MOATSOU, G. Sanitary procedures, heat treatments and packaging. In: PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W. (Eds.). . **Milk and Dairy Products in Human Nutrition : Production, Composition, and Health**. London, UK: Wiley-Blackwell, 2013. p. 700.

- MONTI, L. et al. Lactose, galactose and glucose determination in naturally “lactose free” hard cheese: HPAEC-PAD method validation. **Food Chemistry**, v. 220, p. 18–24, 1 abr. 2017.
- MOREIRA, T. C. et al. Elaboration of yogurt with reduced level of lactose added of carob (*Ceratonia siliqua* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 326–329, 1 mar. 2017.
- MOYNIHAN, A. C. et al. Effect of standardizing the lactose content of cheesemilk on the properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7791-7802, 2016.
- NAKAMURA, G. et al. AMANO ENZYME INC(AMAN-C). **New modified beta-galactosidase comprising specified amino acid sequences used in enzyme composition for producing oligosaccharide and preparation of pharmaceuticals, and medicinal foods for lactose intolerance patient**. WO2015046408-A1. 22632J, 2015.
- NEMZER, B. et al. Phytochemical and physical properties of blueberries, tart cherries, strawberries, and cranberries as affected by different drying methods. **Food Chemistry**, v. 262, p. 242-250, 2018.
- NERI, D. F. M. et al. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. **Catalysis Communications**, v. 9, n. 14, p. 2334-2339, 2008.
- NEUHAUS, W. et al. Optimization of an innovative hollow-fiber process to produce lactose-reduced skim milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, n. 1, p. 1-14, 2006.
- NG, Matthew. **Cell Permeabilization using supercritical carbon dioxide**. 2001. 132 p. Dissertação (Mestrado) - Ciências Aplicadas em Engenharia Química, Universidade de Waterloo. Waterloo, Ontario, 2001.
- NICOLETTI, G.; VERDI, K. J.; ENDRES, C. M. Development of cottage cheese lactose free with fiber addition and reduction of sodium and fat. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 4, p. 186-196, 2016.
- NIU, D. et al. Biochemical characterization of three *Aspergillus niger* β -galactosidases. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 37-43, 2017.
- NORBERTO, S. et al. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1518-1528, 2013.
- NOVALIN, S.; NEUHAUS, W.; KULBE, K. D. A new innovative process to produce lactose-reduced skim milk. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 2, p. 212-218, 2005.
- NURSTEN, H. Maillard Reaction. In: FUQUAY, J.; FOX, P.; MCSWEENEY, P. (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd. ed. London, UK: Elsevier Ltd, 2011, p. 3:217-3:235.
- NURSTEN, H. E. **The Maillard reaction : chemistry, biochemistry, and implications**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2005.
- OHLSSON, J. A. et al. Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products. **International Dairy Journal**, v. 73, p. 151-154, 2017.
- OLIVEIRA, V. **ALERGIA À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA E INTOLERÂNCIA À LACTOSE: ABORDAGEM NUTRICIONAL, PESQUISA QUALITATIVA E PERCEPÇÕES DOS PROFISSIONAIS DA ÁREA DE SAÚDE**. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora, 2013.
- PAIGE, D. M. Lactose intolerance. In: CABALLERO, B.; ALLEN, L.; PRENTICE, A. (Eds.). .

Encyclopedia of Human Nutrition. 2nd. ed. Oxford, UK: Elsevier Ltd, 2005. p. 1280–1295.

PAN, L. et al. UNIV SOUTH CHINA TECHNOLOGY(UYSC-C). **New *Bacillus subtilis* capable of improving secretion of signal peptide useful for enhancing secretion and expression of target protein, preferably heat-resistant beta-galactosidase or transglutaminase**. CN107674119-A. 14513T 2018a.

PAN, L. et al. UNIV SOUTH CHINA TECHNOLOGY(UYSC-C) **New signal peptide capable of improving secretion efficiency for enhancing secretion and expression of target protein, preferably heat-resistant beta-galactosidase or transglutaminase**. CN107698669-A. 15441D, 2018b.

PANESAR, P. S. Application of response surface methodology in the permeabilization of yeast cells for lactose hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 91-96, 2008.

PATERSON, A. H. J. Lactose: production, applications. In: FUQUAY, J.; FOX, P.; MCSWEENEY, P. (Eds.). . **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd. ed. London, UK: Elsevier Ltd, 2011, p. 3:196.

PATERSON, A. H. J. Lactose processing: From fundamental understanding to industrial application. **International Dairy Journal**, v. 67, p. 80–90, 2017.

PAVEL, I. A. et al. Effect of meso vs macro size of hierarchical porous silica on the adsorption and activity of immobilized beta-galactosidase. **Langmuir**, v. 33, n. 13, p. 3333-3340, 2017.

PENNA, A. L. B. O leite: importância biológica, industrial e comercial. Fisiologia da produção de leite – composição, propriedades físico-químicas, análises. In: **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu, 2009. Cap. 2, p. 21-84.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, Á. et al. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. **Journal of Structural Biology**, v. 177, n. 2, p. 392-401, 2012.

PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Iogurte probiótico com frutanos tipo inulina de diferentes graus de polimerização: características físico-químicas e microbiológicas e estabilidade ao armazenamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1059-1070, 2012.

PLOU, F. J. et al. Low-lactose, prebiotic-enriched milk. In: WATSON, R. R. e PREEDY, V. R. (Ed.). **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**: Academic Press, 2016, p.47-57.

POLLMAN, R. M. Ion chromatographic determination of lactose, galactose, and dextrose in grated cheese using pulsed amperometric detection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 3, p. 425–428, 1989.

PORTNOI, P. A.; MACDONALD, A. Lactose and galactose content of cheese. In: VICTOR R. PREEDY, R. R. W. AND V. B. P. (Ed.). . **Handbook of cheese in health: production, nutrition and medical sciences**. London, UK: Wageningen Academic Publishers, 2013. p. 495–513.

POULSEN, M. W. et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 10–37, 2013.

RAHIMI, M. et al. Characterization and sensory evaluation of a novel grapefruit beverage made with lactose-free demineralized milk permeate. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 1, p. e12313, 2017.

RAZA, A. et al. Enzymatic conversion of milk lactose to prebiotic galacto-oligosaccharides to produce low lactose yogurt. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 4, p. e13586, 2018.

- RICARDI, N. C. et al. Highly stable novel silica/chitosan support for beta-galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, v. 246, p. 343-350, 2018.
- 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.
- RIOS, G. M. et al. Progress in enzymatic membrane reactors – a review. **Journal of Membrane Science**, v. 242, n. 1, p. 189-196, 2004.
- ROBAYO-TORRES, C. C.; NICHOLS, B. L. Molecular differentiation of congenital lactase deficiency from adult-type hypolactasia. **Nutrition reviews**, v. 65, n. 2, p. 95–8, 2007.
- RUTKIEWICZ-KROTEWICZ, M. et al. Structural studies of a cold-adapted dimeric beta-D-galactosidase from *Paracoccus sp.* 32d. **Acta Crystallographica Section D Structural biology**, v. 72, n. Pt 9, p. 1049-61, 2016.
- SABIONI, J. G. et al. Control of lactose crystallization in “dulce de leche” by *Kluyveromyces lactis* fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 8, p. 1694–1698, 1984.
- SATAR, R. et al. Elucidating the binding efficacy of beta-galactosidase on graphene by docking approach and its potential application in galacto-oligosaccharide production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 5, p. 807-814, 2016.
- SCHRIPSEMA, J. Comprehensive analysis of polar and apolar constituents of butter and margarine by nuclear magnetic resonance, reflecting quality and production processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2547–2552, 2008.
- SCHUCK, P. Lactose: crystallization. In: FUQUAY, J.; FOX, P.; MCSWEENEY, P. (Eds.). . **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd. ed. London, UK: Elsevier Ltd, 2011, p. 3:182.
- SCHUCK, P. Understanding the factors affecting spray-dried dairy powder properties and behavior. In: CORREDIG, M. (Ed.). **Dairy-Derived Ingredients**: Woodhead Publishing, 2009, p. 24-50.
- SCHUCK, P. et al. Concentracao e secagem de produtos lacteos dificeis. **Industria de laticinios**, p. 66-68, 2015.
- SEN, P. et al. Studies on hydrolysis of skimmed milk using immobilized β -galactosidase in a membrane reactor. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, n. 10, Part A, p. 3403-3417, 2016.
- SHI, M. et al. Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 16-29, 2017.
- SKRYPLONEK, K. et al. Lactose-free frozen yogurt: production and characteristics. **Acta Scientiarum Polonorum-Technologia Alimentaria**, v. 16, n. 2, p. 171-179, 2017.
- SRIVASTAVA, A.; MISHRA, S.; CHAND, S. Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. **New Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 412-418, 2015.
- STIRBAN, A.; TSCHÖPE, D. Vascular effects of dietary advanced glycation end products. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, p. 836498, 2015.
- STREIFF, P. J.; HOYDA, D. L.; EPSTEIN, E. **Process for the production of low calorie yogurt**, 25 out. 1990. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US4956186>>. Acesso em: 14 jul. 2018

- STRESSLER, T. et al. Homologous expression and biochemical characterization of the arylsulfatase from *Kluyveromyces lactis* and its relevance in milk processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5401–5414, 2016.
- SWALLOW, D. M. Lactose intolerance. In: FUQUAY, J.; FOX, P.; MCSWEENEY, P. (Eds.). . **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd. ed. London, UK: Elsevier Ltd, 2011. p. 3:236.
- THOMPSON, D. K.; MATHUR, B. N.; RAJORE, R. B. Process alternatives for lactose hydrolysis. **Indian Dairyman**, v. 43, 394-402, 1991.
- TIKANMAKI, R.; KALLIOINEN, H. **Low-lactose and lactose-free milk product and process for production thereof**, 29 ago. 2015. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20100055286A1/en>>. Acesso em: 14 jul. 2018
- TODA, M. et al. The Maillard reaction and food allergies: is there a link? **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 1, p. 61–7, 2014.
- TOMLIN, J.; LOWIS, C.; READ, N. W. Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. **Gut**, v. 32, n. 6, p. 665–9, jun. 1991.
- TONGUC, I. E.; KARAGOZLU, C. Yoghurt drink for lactose and galactose intolerant patients. **Italian Journal of Food Science**, v. 29, n. 4, p. 697-706, 2017.
- TORRES, J. K. F. et al. Technological aspects of lactose-hydrolyzed milk powder. **Food Research International**, v. 101, p. 45-53, 2017.
- TOSSAVAINEN, O.; KALLIOINEN, H. Proteolytic changes in lactose hydrolysed UHT milks during storage. **Milchwissenschaft**, v. 62, n. 4, p. 410–414, 2007.
- TOSSAVAINEN, O.; SAHLSTEIN, J. **Process for producing a lactose-free milk product**, 13 maio 2007. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/EP1503630B1>>. Acesso em: 14 jul. 2018
- TROISE, A. D. et al. The quality of low lactose milk is affected by the side proteolytic activity of the lactase used in the production process. **Food Research International**, v. 89, p. 514–525, 2016.
- VAN BOEKEL, M. A. J. S. Effect of heating on Maillard reactions in milk. **Food Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 403–414, 1998.
- VAN SCHEPPINGEN, W. B. et al. Selective and sensitive determination of lactose in low-lactose dairy products with HPAEC-PAD. **Journal of Chromatography B**, v. 1060, p. 395–399, 2017.
- VARGA, Z.; ROMAN, M.; TOTH, A. Production of lactose-free probiotic yoghurts for lactose-sensitive people. **Acta Alimentaria**, v. 33, n. 4, p. 377-385, 2004.
- VASILJEVIC, T.; WISMER, W.; JELEN, P. Sensory effects of lactose hydrolysis in milk by crude cellular extracts from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842. **Milk Science International**, v. 58, n. 3/4, p. 167-170, 2003.
- VERA, C.; GUERRERO, C.; ILLANES, A. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 6, p. 745-752, 2011.
- VERHOECKX, K. C. M. et al. Food processing and allergenicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 80, p. 223–240, 2015.
- VESA, T. H. et al. Digestion and tolerance of lactose from yoghurt and different semi-solid fermented

- dairy products containing *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria in lactose maldigesters--is bacterial lactase important? **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, n. 11, p. 730-3, 1996.
- VIEIRA, D. C. et al. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 54-64, 2013.
- WAHBA, M. I. Processed gellan gum beads as covalent immobilization carriers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 270-278, 2018a.
- WAHBA, M. I. Sodium bicarbonate-gelled chitosan beads as mechanically stable carriers for the covalent immobilization of enzymes. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 2, p. 347-361, 2018b.
- WANG, H. et al. An acidophilic β -Galactosidase from *Bispora sp.* MEY-1 with high lactose hydrolytic activity under simulated gastric conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5535-5541, 2009.
- WANG, H. et al. Functional display of active beta-galactosidase on *Bacillus subtilis* spores using crust proteins as carriers. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 1755-1759, 2015.
- WELSH, J. D. et al. Intestinal disaccharidase activities in relation to age, race, and mucosal damage. **Gastroenterology**, v. 75, n. 5, p. 847-55, 1978.
- WHEATON, R. M.; BAUMAN, W. C. Ion exclusion - a unit operation utilizing ion exchange materials. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 228-233, 1953a.
- WHEATON, R. M.; BAUMAN, W. C. Non-ionic separations with ion exchange resins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 57, n. 3, p. 159-176, 1953b.
- WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Hydrolysis of lactose using β -d-galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free/low-lactose milk. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 157-164, 2018.
- WOLIN, M. J. Fermentation in the rumen and human large intestine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 213, n. 4515, p. 1463-8, 25 set. 1981.
- WRIGHT, E. M.; HIRAYAMA, B. A.; LOO, D. F. Active sugar transport in health and disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 1, p. 32-43, jan. 2007.
- YAGUCHI, M.; ROSE, D. Chromatographic separation of milk proteins: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 12, p. 1725-1743, 1971.
- YOU, S. et al. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of β -galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1271-1276, 2017.
- YOU, S. et al. Development of a novel integrated process for co-production of β -galactosidase and ethanol using lactose as substrate. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 15-23, 2017.
- YU, R.-J. et al. Anticancer activities of proanthocyanidins from the plant *Urceola huaitingii* and their synergistic effects in combination with chemotherapeutics. **Fitoterapia**, v. 112, p. 175-182, 2016.
- ZADOW, J. G. Lactose hydrolysed dairy products. **Food Technology in Australia**, v. 38, n. 11, p. 460-62, 1986.
- ZHOU, F. et al. Addition of sucrose during the blueberry heating process is good or bad? Evaluating

the changes of anthocyanins/anthocyanidins and the anticancer ability in HepG-2 cells. **Food Research International**, v. 107, p. 509-517, 2018.

ZHOU, H.-X. et al. β -Galactosidase over-production by a mig1 mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 17-24, 2013.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 2001.

SOBRE AS AUTORAS

ADRIANA DANTAS Graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Tocantins (UFT). Mestrado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Grupo de pesquisa: estudos inovadores na área de enzimologia, com destaque para os temas purificação e imobilização de enzimas; desenvolvimento de processos enzimáticos de interesse para a produção de biodiesel; processos enzimáticos para modificação de óleos e gorduras, e atuando ainda na área de ciência e tecnologia de leite e derivados, probióticos e prebióticos (UFSC). E-mail: adrianaengenharia@hotmail.com

SILVANI VERRUCK Graduação em Tecnologia de Alimentos pelo Instituto Federal Catarinense (IFC); Mestrado em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Doutorado em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Grupo de pesquisa: Bioativos em alimentos: inovação, desenvolvimento e caracterização (UFSC); Química e Bioquímica de alimentos (UFSC); Embalagens, Conservação e Ciência dos Alimentos (IFC). E-mail: silvani.verruck@gmail.com

ELANE SCHWINDEN PRUDENCIO Professor da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Membro do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Membro do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Mestrado em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Doutorado em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Pós Doutorado em Engenharia Química pelo Instituto Superior Técnico de Lisboa (IST); Grupo de pesquisa: Bioativos em alimentos: inovação, desenvolvimento e caracterização (UFSC); Química e Bioquímica de alimentos (UFSC); Tecnologia Limpa no Processamento de Alimentos (UFSC); Bolsista Produtividade em Pesquisa do CNPq. E-mail: elane.prudencio@ufsc.br

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-112-1



9 788572 471121