

## PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE ISENTO DE LACTOSE E SUA APLICAÇÃO

### Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se ao processo de desenvolvimento de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose por meio da hidrólise enzimática da lactose, e sua aplicação na indústria alimentícia.

### Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002] Os leites e seus derivados são produtos amplamente consumidos por serem de fácil acesso e, ainda, considerados alimentos com excelentes fontes de nutrientes. Apresentam alta proporção de ácidos graxos saturados, e também, ácido graxo monoinsaturado oléico e ácido graxo linoleico conjugado. O perfil proteico é caracterizado pela presença balanceada de aminoácidos essenciais. Estes produtos podem contribuir para a adequada ingestão diária de nutrientes como cálcio, magnésio, selênio, riboflavina, vitamina A, D e do complexo B, zinco, ácido pantotênico, fósforo e potássio. No entanto, nos últimos anos, os mesmos vêm sendo objetos de restrições no cotidiano alimentar, sobretudo, em função da má-absorção de lactose, principal açúcar presente nestes produtos (MUEHLHOFF; BENETT; MCMAHON, 2013).

[003] A prevalência da má-absorção da lactose na população mundial é de aproximadamente 70 % (MUEHLHOFF; BENETT; MCMAHON, 2013). Devido a variações genéticas ocorridas em algumas populações, a produção de lactase é programada para decrescer com o decorrer do tempo. Asiáticos, sul-africanos e americanos nativos do Sul apresentam as maiores prevalências de produção reduzida de lactase. Populações pertencentes à Europa Central e do Norte apresentam prevalências extremamente baixas, havendo o favorecimento de produção contínua de lactase para a grande maioria destes (ENATTAH et al., 2002).

[004] No Brasil, a prevalência de deficiência da enzima lactase é de, aproximadamente, 56% em brancos e morenos, 80% em negros e 100% em japoneses (MATTAR et al., 2009). O estudo conduzido por Friedrich et al. (2012), identificou que 48,6 % das pessoas avaliadas pertencentes à região Sul do Brasil com ancestralidade europeia apresentaram genes associados à não

persistência da enzima lactase; as pessoas avaliadas nesta mesma região com ascendência africana apresentaram a frequência de 68,1%. No Norte este valor foi igual a 69% e no Nordeste do Brasil 63,4%.

**[005]** A diminuição ou isenção no consumo de leite e seus derivados devido à má-absorção da lactose faz com que o acesso a alimentos processados que atendam às necessidades desta restrição alimentar - produtos lácteos com teores reduzidos/isentos de lactose - venham a contribuir, complementando a alimentação de uma parcela significativa da população (HAUG; HOSTMARK; HARSTAD, 2007).

**[006]** Neste sentido, relaciona-se a utilização e consumo do soro de leite por intolerantes à lactose, visto que, o soro é a parte que possui a maior concentração da lactose presente no leite. É considerado um subproduto da indústria de laticínios e é caracterizado por ser o líquido remanescente originado através da coagulação do leite destinado a elaboração de queijos ou caseína. O soro é um dos grandes poluentes do setor, pois, muitas vezes as empresas difundem em cursos de água seus efluentes líquidos sem utilizar um adequado tratamento, e devido ao alto conteúdo de matéria orgânica presente no soro, exige-se uma elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) para oxidar estes compostos (TEIXEIRA, 2011).

**[007]** As proteínas de soro de leite apresentam todos os aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 2004). Incluindo os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), sendo reconhecidas como proteínas de alto valor biológico e de rápida absorção (HULMI; LOCKWOOD; STOUT, 2010). Estas proteínas possuem ainda propriedades funcionais que permitem modificações sensoriais desejadas quando utilizadas como ingredientes em alimentos (SGARBIERI, 1996). A funcionalidade das proteínas do soro de leite está relacionada com sua alta solubilidade, capacidade de dispersão, ligação de água, formação de espuma, emulsificação, geleificação e poder tamponante. Estas funções podem proporcionar benefícios como: manutenção da umidade, melhora na textura e sensação tátil bucal, prevenção da sedimentação, criação de emulsões estáveis, realçador de sabor (CÂNDIDO; KRUGER, 2012).

**[008]** Em razão da atratividade de suas propriedades nutricionais e funcionais, várias técnicas foram desenvolvidas a fim de fracionar, de maneira seletiva, seus nutrientes. Através do processamento desse subproduto, podem ser elaborados concentrados ou isolados proteicos de soro de leite com alto teor de proteínas, sendo uma alternativa de uso racional e sustentável (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

**[009]** Para a produção comercial de frações do soro de leite, existem duas principais categorias de métodos: separação por membranas e cromatografia de troca iônica (EL-SAYED; CHASE, 2011).

**[0010]** O uso de membranas, em especial a ultrafiltração, é um método atrativo para recuperação comercial de proteínas a partir do soro. Devido ao tamanho de suas moléculas, estas são retidas, enquanto a lactose e as cinzas, de baixa massa molar, são capazes de passar através da membrana, entretanto, concentrações razoáveis de lactose podem permanecer no retentado. Este retentado é evaporado a vácuo e alimentado em secadores *spray dryers* para produção de soro de leite em pó, concentrados proteicos de soro de leite em pó e isolados proteicos de soro de leite em pó. A diafiltração é um processo que pode ser realizado adicionalmente à ultrafiltração a fim de aumentar a concentração de proteínas do produto final e, conseqüentemente, reduzir a lactose do mesmo (YEE; WILEY; BAO, 2007).

**[0011]** O método cromatográfico consiste na troca iônica realizada quando o soro percorre a coluna contendo substâncias que interagem com a amostra, adsorvendo grande parte da proteína presente, que posteriormente, é eluída com adição de solução tampão (EL-SAYED; CHASE, 2011).

**[0012]** Com o objetivo de desenvolver produtos destinados aos intolerantes à lactose, mais especificamente concentrado proteico de soro de leite isento de lactose, pode-se utilizar, principalmente, dois tipos de tecnologias: enzimática e de membranas. Dá-se destaque à hidrólise enzimática da lactose, onde por meio desta, originam-se dois monossacarídeos: glicose e galactose. Este processo pode ser utilizado em escala industrial e com relativa viabilidade econômica e os açúcares resultantes possuem poder edulcorante e solubilidade superiores ao da lactose (GANZLE; HAASE; JELEN, 2008).

### **Descrição da abordagem do problema técnico**

**[0013]**A realização da hidrólise completa da lactose é um resultado difícil de ser alcançado. Isto se deve a fatores que são inerentes ao processo de hidrólise enzimática, como por exemplo, limitações na transferência de massa, quando se trata de enzima imobilizada e produção de galactose que desempenha um papel inibitório sobre a atividade da enzima (HUSAIN, 2010). Além disso, custos relacionados à enzima e ao tempo do processo também podem ser significativos. Por isso, a realização do processo com as condições otimizadas visa a redução nos gastos com enzima e demais itens importantes para o processo (tempo, temperatura). Além disso, realizar o processo em um produto contendo elevadas concentrações de lactose (acima de 20%), cerca de quatro vezes mais que no leite propriamente dito, promove a inclusão deste ingrediente e similares em diversos outros alimentos.

**[0014]**Existem patentes que reivindicam o processo de hidrólise enzimática da lactose, porém, com uso de metodologias diferentes ou aplicação das mesmas em produtos distintos. Seguem abaixo as patentes encontradas que realizam o processo de hidrólise utilizando a enzima livre, que é o caso da presente invenção:

**[0015]**Por exemplo, US 9167824 (27 de outubro de 2015) e US 6881428 (19 de abril de 2005) aplicam o processo de hidrólise enzimática apenas ao leite, que possui concentração de lactose aproximadamente quatro vezes inferior ao concentrado proteico de soro de leite, produto utilizado nesta invenção. A primeira patente mencionada realiza o processo no tempo mínimo de 2 horas e máximo de 36 horas. A segunda patente realiza o processo no intervalo de tempo de 24 a 48 horas. Os processos aplicados permitem a obtenção de leites isentos de lactose. A presente invenção se diferencia por otimizar o tempo de reação de hidrólise enzimática (tempo mínimo 101,71 e tempo máximo 158,28 min).

**[0016]**A patente JPH10262549 (06 de outubro de 1998) realiza o processo de hidrólise enzimática da lactose, porém, o processo não isenta o produto do dissacarídeo em questão (pelo menos 80% da lactose pode ser hidrolisada) e a fonte de lactose estudada foi o leite desnatado.

**[0017]** Em RU2308196 (20 de outubro de 2007), o processo de hidrólise enzimática promove a isenção de lactose do leite, porém, ocorre após a aplicação de filtração com membranas, ou seja, há o uso de duas tecnologias para a remoção da lactose.

**[0018]** No pedido US 8986768 (24 de março de 2015), o processo de hidrólise enzimática promove a isenção de lactose do leite, porém, ocorre antes da aplicação de filtração com membranas, ou seja, há o uso de duas tecnologias para a remoção da lactose. A presente invenção trata apenas do processo de hidrólise enzimática e possui capacidade de hidrolisar totalmente a lactose do produto, sem a necessidade de adição de outro processo.

**[0019]** Está disponível no mercado internacional um concentrado proteico de soro de leite com 80% de proteína e com residual de 0,15% de lactose. Este produto difere do da presente invenção no teor de proteína e no residual de lactose. Seu nome comercial é *Whey protein concentrate lactose-free 8500* da marca Hilmar™. Não foi possível obter informações sobre a tecnologia de informação.

### **Vantagens da Invenção**

**[0020]** As vantagens da invenção estão relacionadas, portanto, com o processo de obtenção de um produto isento de lactose por meio da aplicação de enzima e tempo em condições já otimizadas, ou seja, menores tempos de reação e menores concentrações de enzima necessários para promover a isenção de lactose em produtos que apresentam este açúcar. O método é rápido pois ocorre em temperatura de maior atividade da enzima, de fácil reprodução e ainda, seguro no quesito microbiológico.

**[0021]** Além disso, a aplicação deste produto em iogurte, nas concentrações estudadas, possui a capacidade de aumentar a viscosidade, firmeza e ainda reduzir a sinérese de iogurtes, dando origem ao tipo de iogurte denominado concentrado, produto que possui estas características de maneira evidenciada. Além disso, o produto pode ser utilizado como complemento/substituto de qualquer outro preparado alimentar em pó, colaborando com o aporte de nutrientes como cálcio e proteína.

**[0022]** Verifica-se a necessidade de explorar e desenvolver alternativas tecnológicas que promovam a inclusão destes alimentos na dieta de indivíduos com restrições à ingestão de lactose.

### **Descrição detalhada da Invenção e das figuras**

**[0023]** A invenção será descrita a seguir através da apresentação de figuras que contribuem para a compreensão do método do desenvolvimento de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose.

**[0024]** A hidrólise da lactose presente no concentrado proteico de soro de leite (CPS) pode ser realizada com utilização de enzimas  $\beta$ -galactosidases comerciais. Na presente invenção utilizou-se a enzima Maxilact LGX 5000 (DSM Globalfood®) e a Lactozym Pure 6500 L (Novozymes®), sendo as duas provenientes da levedura *Kluyveromyces lactis*.

**[0025]** A partir de uma solução de CPS a 20%, as enzimas podem ser aplicadas em diferentes níveis de concentração (0,15 a 0,30%) e tempo (101,71 a 158,28 min). Este processo pode ser realizado à temperatura de 36°C-40°C e pH na faixa de 6 a 7.

**[0026]** Ao término do experimento, a retirada de alíquotas para contagem de micro-organismos mesófilos permite verificar que a contagem destes se mantém inferior a  $1.10^5$  (UFC/g<sup>-1</sup>), comprovando a inocuidade do produto.

**[0027]** Os gráficos de superfície de resposta tridimensionais permitem realizar a determinação da resposta máxima, ou seja, a completa hidrólise da lactose presente no CPS. As curvas de nível auxiliam na visualização de uma região ótima para a atividade enzimática, onde se encontra uma faixa de combinações de concentração de enzima e tempo. As Figuras 1 e 2 apresentam as superfícies de resposta e curvas de contorno para o grau de hidrólise (%) com a enzima Lactozym Pure 6500 L e Maxilact LGX 5000 em função da concentração de enzima (%) e tempo (min).

**[0028]** Para a enzima Lactozym Pure 6500 L a variação de concentração de enzima na faixa ótima é de 0,25 a 0,30% e tempo de 125 a 150 min. No que se refere à enzima Maxilact LGX 5000, a faixa de concentração de enzima na faixa ótima é de 0,23 a 0,28 % e tempo de 125 a 150 min. Estas faixas ótimas de concentração de enzima e tempo são de grande valia pois admite-se que valores

que se encontram dentro destas variações ainda mantém o processo na região otimizada.

**[0029]** A partir de valores compreendidos dentre as faixas de concentração de enzima e tempo mencionadas acima é possível promover um grau de hidrólise superior a 100%.

**[0030]** Após este processo, o concentrado proteico de soro de leite isento de lactose deve ser seco em *spray dryer*. O ar de entrada pode ser aquecido entre 190-195°C e o ar de saída entre 88-103°C. A pressão pode ser mantida a, aproximadamente, 1,5-2,0 bar. A vazão de entrada pode oscilar entre 37-38 g de amostra por minuto.

### **Exemplos**

**[0031]** A seguir, encontram-se alguns exemplos e utilizações da presente invenção, salientando-se que as utilizações ultrapassam os exemplos fornecidos.

**[0032]** Como exemplo de aplicação do processo de desenvolvimento de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose, pode-se citar a hidrólise da lactose de concentrados proteicos de soro de leite 80% de proteína, considerando que sua concentração de lactose seja igual a 10%. A partir de uma solução de CPS a 20 %, as enzimas lactases provenientes do micro-organismo *Kluyveromyces lactis* podem ser aplicadas em diferentes níveis de concentração (0,075 a 0,15%) e tempo (50,85 a 79,14 min). Este processo pode ser realizado à temperatura de 36°C-40°C e pH na faixa de 6 a 7. Este processo possui a capacidade de promover 100% da hidrólise da lactose do produto utilizando a quantidade mínima de enzima e tempo.

**[0027]** Como exemplo de aplicação do concentrado proteico de soro de leite, pode-se citar o iogurte concentrado prebiótico isento de lactose, adicionado de concentrado proteico de soro de leite, fonte de cálcio e rico em vitamina D: (a) No recipiente de mistura, dissolver, com leite isento de lactose, os ingredientes sólidos: leite em pó isento de lactose 4 a 5,5 %; concentrado proteico de soro de leite isento de lactose 4 a 5,5 %; frutooligossacarídeo > 3 %; gelatina e goma guar 0,6 %; carbonato de cálcio > 375 mg; vitamina D<sub>3</sub> > 2 ug ; (b) Agitar a mistura até obter um produto homogêneo; (c) Pasteurizar (60°C – 70°C) por trinta

minutos; (d) Adicionar fermento lácteo na faixa de temperatura de 40°C a 45°C (ver recomendação do fabricante); (e) A fermentação deve ocorrer na faixa de temperatura dentre 40°C a 45°C (ver recomendação do fabricante) até obtenção de pH adequado (4,4-4,6); (f) Manter os produtos refrigerados (5°C-10°C) após o término da fermentação para estabilização do gel.

### **Referências bibliográficas**

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1, p. 381–386, 2011.

BRASIL. Lei 11.346 de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. (Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 179, 15 set. 2006. Seção 1, p.1.

CANDIDO, L. M. B.; KRUGER, C. C. H. Proteínas do soro de leite bovino. Composição, propriedades nutritivas e funcionais tecnológicas, aplicações. In: **Inovação nos processos de obtenção, purificação e aplicação de components do leite bovino**. São Paulo: Editora Atheneu, 2012. 121-154.

EL-SAYED, M. M. H.; CHASE, H. A. Trends in whey protein fractionation. **Biotechnology letters**, v.33, n. 8, p. 1501-1511, 2011.

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

FRIEDRICH, D. C. et al. Several different lactase persistence associated alleles and high diversity of the lactase gene in the admixed brazilian population. **Plos One**, v. 7, n. 9, 2012.

GANZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v.18, n. 7, p. 685– 694, 2008.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition. **Lipids in Health Disease**, v. 6, p. 1-16, 2007.

HULMI, J. J.; LOCKWOOD, C. M.; STOUT, J. R. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. **Nutrition and Metabolism**, v. 7, n. 51, p. 2-11, 2010.



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

MATTAR, R. et al. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. **Nutrition Journal**, v. 46, n.8, p. 1-3, 2009.

MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; MCMAHON, D. **Food and agriculture organization of the united nations (FAO): Milk and dairy products in human nutrition**. Rome, 2013.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. Tradução Fátima Murad. Porto Alegre: Artmed, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Ed. Varela, 1996.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 387-409, out./dez., 2004.

TEIXEIRA, C. O. **Efluentes de laticínios, enquadramento legal e a representação dos técnicos e gerentes**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

YEE, W. K.; WILEY, D. E.; BAO, J. Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: operability under constant operating conditions. **Journal of Membrane Science**, v. 290, p. 125-137, 2007.