



www.arvoredoleite.org

Esta é uma cópia digital de um documento que foi preservado para inúmeras gerações nas prateleiras da biblioteca *Otto Frensel* do Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), antes de ter sido cuidadosamente digitalizada pela Arvoredoleite.org como parte de um projeto de parceria entre a Arvoredoleite.org e a Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes para tornarem seus exemplares online. A Revista do ILCT é uma publicação técnico-científica criada em 1946, originalmente com o nome **FELCTIANO**. Em setembro de 1958, o seu nome foi alterado para o atual.

Este exemplar sobreviveu e é um dos nossos portais para o passado, o que representa uma riqueza de história, cultura e conhecimento. Marcas e anotações no volume original aparecerão neste arquivo, um lembrete da longa jornada desta REVISTA, desde a sua publicação, permanecendo por um longo tempo na biblioteca, e finalmente chegando até você.

Diretrizes de uso

A Arvoredoleite.org se orgulha da parceria com a Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes da EPAMIG para digitalizar estes materiais e torná-los amplamente acessíveis. No entanto, este trabalho é dispendioso, por isso, a fim de continuar a oferecer este recurso, tomamos medidas para evitar o abuso por partes comerciais.

Também pedimos que você:

- Faça uso não comercial dos arquivos. Projetamos a digitalização para uso por indivíduos e ou instituições e solicitamos que você use estes arquivos para fins profissionais e não comerciais.
- Mantenha a atribuição Arvoredoleite.org como marca d'água e a identificação do ILCT/EPAMIG. Esta atitude é essencial para informar as pessoas sobre este projeto e ajudá-las a encontrar materiais adicionais no site. Não removê-las.
- Mantenha-o legal. Seja qual for o seu uso, lembre-se que você é responsável por garantir que o que você está fazendo é legal. O fato do documento estar disponível eletronicamente sem restrições, não significa que pode ser usado de qualquer forma e/ou em qualquer lugar. Reiteramos que as penalidades sobre violação de propriedade intelectual podem ser bastante graves.

Sobre a Arvoredoleite.org

A missão da Arvoredoleite.org é organizar as informações técnicas e torná-las acessíveis e úteis. Você pode pesquisar outros assuntos correlatos através da web em <http://arvoredoleite.org>.

REVISTA
do
INSTITUTO
DE
LATICÍNIOS
"CÂNDIDO
TOSTES"

DAIRY JOURNAL Bimonthly
Published By THE "CÂNDIDO
TOSTES" DAIRY INSTITUTE

Nº 365 JUIZ DE FORA, NOV/DEZ DE 2008. VOL. 63

GOVERNO do Estado de Minas Gerais
SECRETARIA de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
EMPRESA de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
CENTRO Tecnológico
INSTITUTO de Laticínios "Cândido Tostes"

REVISTADO INSTITUTO DE LATICÍNIOS
"CÂNDIDO TOSTES"

DAIRY JOURNAL
BIMONTHLY PUBLISHED BY THE
"CÂNDIDO TOSTES" - DAIRY INSTITUTE

ÍNDICE - CONTENT

1 Produção de massa de células permeabilizadas de *kluveromyces lactis* e atividade catalítica da β -galactosidase na hidrólise de lactose. Edimar A. F. Fontes, Flávia M. L. Passos, Frederico J. V. Passos, Paulo Rogério Fontes 3

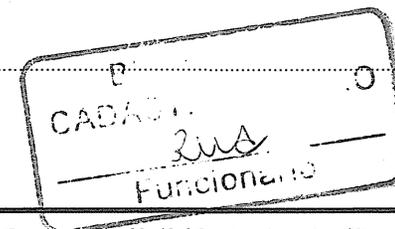
2 Cinética de inibição por galactose e glicose na hidrólise de lactose por β -galactosidase em massa de células permeabilizadas de *kluveromyces lactis*. Edimar A. F. Fontes, Flávia M. L. Passos, Frederico J. V. Passos, Paulo Rogério Fontes 9

3 Validade e análise de sensibilidade dos coeficientes cinéticos do modelo matemático mecanístico proposto para prever a cinética de hidrólise de lactose por β -galactosidase de células permeabilizadas de *kluveromyces lactis*. Edimar A. F. Fontes, Flávia M. L. Passos, Frederico J. V. Passos, Paulo Rogério Fontes 16

4 Tratamento térmico do soro de queijo para determinação de condições ideais para produção de β -galactosidase por fermentação com *kluveromyces marxianus*. Sara Hott, Lorena Machado Amaral, Raúl J. H. Castro-Gómez, Cláudia E. C. Bravo-Martins 22

5 Desenvolvimento e avaliação de filme ativo incorporado com óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) no crescimento de *Listeria innocua* em queijo Minas frescal. Nilda de Fátima F. Soares, Paula Santiago-Silva, Washington Azevedo da Silva 26

6 Normas de Publicação 41



Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes" - Juiz de Fora - Vol. 63 (365); 1-50 - Nov/Dez de 2008

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS
Centro de Pesquisa e Ensino
Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"
Revista Bimestral

Endereço: Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"
Rua Tenente Freitas, 116 - Santa Terezinha
36.045-560 - Juiz de Fora - Minas Gerais - Brasil
Tel.: 3224-3116 - DDD: 32 / Fax: 3224-3113 - DDD 32



Governo do Estado de Minas Gerais

Aécio Neves da Cunha

Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento Gerais

Gilman Viana Rodrigues

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

Baldonado Arthur Napoleão - Presidente

Luiz Carlos Gomes Guerra - Diretor de Administração e Finanças

Enilson Abrahão - Diretor de operações Técnicas

Centro Tecnológico - Instituto de Laticínios Cândido Tostes**Comitê Gerencial**

Gerson Occhi - Chefe do CT/ILCT

Fernando Antônio Resplande Magalhães - Ger. Est. do Prog. de Pesquisa Processamento Agroindustrial

Adaauto de Matos Lemos - Coordenador de Prospecção de Demandas

Paulo Henrique Fonseca da Silva - Coordenador de Pesquisa

Luiza Carvalhaes Albuquerque - Coordenadora de Transferência e Difusão de Tecnologia

Danielle Braga Chelini Pereira - Coord. do Programa Ensino Leite e Derivados

José Lourenço Pereira Russi - Supervisor do Núcleo de Administração e Finanças

Nelson Tenchini Macedo - Supervisor do Núcleo de Indústria e Comércio

Edição Eletrônica
e impressão**Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**

Luiza Carvalhaes Albuquerque

Especialista em Marketing e Qualidade Total

Jornalista Responsável

Ana Cristina Oliveira Ajud

Reg. Prof.MTB. 4410

Corpo Revisor da Revista do ILCT

Adaauto de Matos Lemos

Antonio Fernandes de Carvalho

Ariene Gimenes Fernandes Van Dender

Célia Lucia Luces Fortes Ferreira

Celso José de Moura

Daise Aparecida Rossi

Danielle Braga Cheini Pereira

Edna Froeder Arcuri

Fernando Antônio Resplande Magalhães

Ítalo Tuler Perroni

Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior

Luiza Carvalhaes de Albuquerque

Luiz Ronaldo de Abreu

Miriam Aparecida Oliveira Pinto

Nélio José de Andrade

Paulo Henrique Fonseca da Silva

Os trabalhos apresentados são de inteira responsabilidade de seus autores.

Juiz de Fora, julho de 2007

**EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS
- EPAMIG -**

Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", n. 1 - 1946 - Juiz de Fora. Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", 1946.

v. ilust. 23 cm

n. 1-19 (1946-48), 27 cm, com nome de Felctiano, n. 20-73 (1948-57), 23 cm, com o nome de Felctiano.

A partir de setembro de 1958, com o nome de Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes".

1. Zootecnia - Brasil - Periódicos. 2. Laticínios - Brasil - Periódicos
1. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Juiz de Fora, MG, ed.

ISSN 0100-3674

CDU 636/637(81)(50)

ANAIS DO XXIV CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS VOLUME II

Este número especial da Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes" traz em seu conteúdo os cinco trabalhos que não foram publicados nos Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios, realizado em 2007 pelo CT / ILCT / EPAMIG. Nesta edição do Congresso Nacional de Laticínios, os Anais faziam parte integrante da Revista do ILCT. Na edição do CNL 2008 em diante houve a desvinculação da revista com os anais de congressos.

Comissão Editorial

XXIV CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS
"Tecnologias: alternativas e tendências para o setor lácteo"

COMISSÃO ORGANIZADORA

Coordenação Geral

Artur Fernandes Gonçalves Filho – ASRI
 Gerson Occhi – EPAMIG-CT/ILCT

Comissão Administrativa Financeira

José Roberto Enoque – APC
 José Lourenço Pereira Russi – EPAMIG-CT/ILCT
 Silene Santos de Mendonça – EPAMIG-CT/ILCT

Comissão de Organização e Comercialização

Cristina Barbosa de Assis – DPTD
 Ana Carolina Valente – DPTD
 Luíza Carvalhaes Albuquerque – EPAMIG-CT/ILCT
 Alex Sander Geovane Solano – DPTD

Comissão de Imprensa

Roseney Mariade Oliveira – ASCOM
 Eduardo Hargreaves Surerus – EPAMIG-CT/ILCT
 Mariana Penaforte de Assis – ASCOM

Comissão Científica

Adauto de Matos Lemos – EPAMIG-CT/ILCT
 Paulo Henrique Fonseca da Silva – EPAMIG-CT/ILCT
 Fernando Antônio Resplande Magalhães – EPAMIG-CT/ILCT
 Danielle Braga Chelini Pereira – EPAMIG-CT/ILCT
 Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior – EPAMIG-CT/ILCT
 Braz dos Santos Neves – EPAMIG-CT/ILCT

Comissão EXPOMAQ

Luiz Fernando Drummond Alves – DPOT
 Sônia Maria Borges – EPAMIG-CT/ILCT
 Alex Sander Geovane Solano – DPTD

Comissão EXPOLAC

Nelson Luiz Tenchini de Macedo – EPAMIG-CT/ILCT
 Fernando Antonio Resplande Magalhães – EPAMIG-CT/ILCT
 Luíza Carvalhaes Albuquerque – EPAMIG-CT/ILCT

COMISSÃO JULGADORA DOS TRABALHOS CIENTIFICOS

Adauto de Matos Lemos – EPAMIG/CT/ILCT
 Antonio Fernandes de Carvalho – UFV/DPTA
 Braz dos Santos Neves – EPAMIG/CT/ILCT
 Celso José de Moura – AGRO/UFG
 Cláudia Eugênia Castro Bravo Martins – UFLA/CNPq
 Cristina Thielmann – CEFET – RIO POMBA
 Denise Sobral – EPAMIG/CT/ILCT
 Edna Froeder Arcuri – Embrapa Gado de Leite
 Elisângela Michele Miguel – EPAMIG/CT/ILCT
 Fernando Antônio Resplande Magalhães – EPAMIG-CT/ILCT
 Ítalo Tuler Perroni – EPAMIG/CT/ILCT
 José Alberto Bastos Portugal – CES JF/CBQL
 José Francisco Pereira Martins – UFRRJ
 José Roberto Ferreira – Embrapa Gado de Leite
 Júnio César Jacinto de Paula – EPAMIG/CT/ILCT
 Leorges Moraes da Fonseca – EMV/UFMG
 Luiz Carlos Gonçalves Costa Junior – EPAMIG/CT/ILCT
 Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA
 Maximiliano Soares Pinto – EPAMIG/CT/ILCT
 Mônica Maria de Oliveira Pinho Cerqueira – EMV/UFMG
 Paulo Henrique Fonseca da Silva – EPAMIG/CT/ILCT
 Sandra Maria Pinto – UFLA
 Sílvio Luiz de Oliveira Soglia – UFBA
 Vanessa Aglaê M. Teodoro – EPAMIG/CT/ILCT

COMISSÃO CIENTIFICA DO CT/ILCT – EPAMIG

Adauto de Matos Lemos	Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior
Adbeel de Lima Santos	Márcia Aparecida Crivelari Porto
Braz dos Santos Neves	Maximiliano Soares Pinto
Claudety Barbosa Saraiva	Paulo Henrique Costa Paiva
Danielle Braga Chelini Pereira	Paulo Henrique Fonseca da Silva
Denise Sobral	Pedro Henrique B. de Oliveira
Fernando Antônio Resplande Magalhães	Raquel Almeida
Gisela de Magalhães Machado	Vanessa Silva Antonelli
Ítalo Tuler Perrone	Vanessa Aglaê M. Teodoro
Júnio César Jacinto de Paula	

ESTAGIÁRIOS

Acauã Cezar Tibiriçá
 Bernardo Ferraz Ribeiro
 Bernardo Hallack Hollanda
 Fabrina Martins de Oliveira
 Maryna Gama Fernandes Simões
 Marcelo Cerqueira dos Santos
 Nathali de Souza Dulço
 Rômulo Soares Souza
 Silvano Carvalho Junior

A Comissão Organizadora agradece a todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para a realização do **24º Congresso Nacional de Laticínios.**

O Congresso Nacional de Laticínios tem como tradição ser realizado na terceira semana do mês de julho e neste ano o tema central será: "Lácteos: contribuições e desafios para a nutrição". A Comissão Científica julgou pertinente a discussão deste tema tendo em vista uma ampla consulta a clientes de anos anteriores e outros especialistas colaboradores tradicionais da equipe organizadora do Congresso.

Aspectos ligados a nutrição, sabemos, tem potencial para se firmar ainda mais em uma grande oportunidade de negócios dentro de pouco tempo e dada a agilidade e competência do empresariado nacional esperamos que ocorra. Assim sendo, as novas tecnologias deverão ser aprofundadas em nível de discussão pelo setor produtivo e gerador de conhecimento, acompanhando as tendências e as alternativas pertinentes ao momento por que atravessa o setor do agronegócio do leite.

O tema central será amplamente debatido por representantes do Governo, Entidades Empresariais, Universidades e Empresas de Pesquisa, com moderação da EPAMIG - CT/ILCT e a participação do público. São esperados a apresentação de 08 palestras de tecnologias, 14 comunicações técnicas, 148 pôsteres, 05 míni cursos e um painel temático com três especialistas discutindo o tema central do evento. Os conferencistas são "notórios saber" de Universidades, Centros de Pesquisa e Iniciativa Privada, provenientes de várias partes do mundo. Paralelamente, ocorrerão a XXXV EXPOMAQ, a XXXIV EXPOLAC e o XXXIV Concurso Nacional de Produtos Lácteos, neste ano com premiação para onze diferentes categorias.

Novamente agradecemos todos que colaboraram com a realização deste evento que a Epamig tem orgulho de coordenar com toda a comunidade científica e técnica que trabalha em prol do leite e seus derivados.

CONTEÚDO DOS ANAIS DO XXIV CNL

PALESTRA

FERMENTAÇÃO PROPIONICA EM QUEIJOS: CONHECIMENTOS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE OLHADURAS

COMUNICAÇÕES TÉCNICAS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE PSEUDOMONAS FLUORESCENS ISOLADA DE LEITE CRU REFRIGERADO

ESTUDO SOBRE A CRISTALIZAÇÃO DA LACTOSE EM DOCE DE LEITE PASTOSO ELABORADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO DE QUEIJO E AMIDO DE MILHO MODIFICADO

ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA) DE QUEIJOS PRODUZIDOS COM LEITES DE CABRA E DE VACA

CRESCIMENTO E ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA DE *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* PD 6.9 EM SORO DE QUEIJO DESPROTEINADO

TERMOESTABILIDADE DO LEITE INTEGRAL INOCULADO COM BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS PROTEOLÍTICAS

A INSERÇÃO BRASILEIRA NO MERCADO INTERNACIONAL DE PRODUTOS LÁCTEOS: EVOLUÇÃO E EXPECTATIVAS

PARTIÇÃO DA CASEÍNA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR POLIETILENOGLICOL, MALTODEXTRINA E ÁGUA

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA

INFLUÊNCIA DE FONTES DE NITROGÊNIO NA DIETA DE CABRAS LEITEIRAS SOBRE A COMPOSIÇÃO E RENDIMENTO DO LEITE EM QUEIJOS "TIPO *BOURSIN*"

AVALIAÇÃO DOS BENEFÍCIOS E CUSTOS DE UM PROGRAMA DE CONTROLE DA MASTITE BOVINA

PERFIL SENSORIAL DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FILME ATIVO AROMATIZADO NA AROMATIZAÇÃO DE MANTEIGA

COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS PARA CONTAGEM DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS EM LEITE CRU

ACEITABILIDADE DE REQUEIJÃO CREMOSO SEM GORDURA COM ADIÇÃO DE FIBRA ALIMENTAR

POSTERES

DESENVOLVIMENTO DO PERFIL SENSORIAL E ACEITAÇÃO DE BEBIDA LÁCTEA ACHOCOLATADA

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PÃO DE FORMA ELABORADO COM SORO DE LEITE DE CABRA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES ANTI-SÉPTICOS USADOS NAS MÃOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO DE *BUTTERMILK* PROBIÓTICO DE DIVERSOS SABORES POR TESTE SENSORIAL COM ESCALA DO IDEAL

DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DE PARÂMETROS QUALITATIVOS DE QUEIJO TIPO COTTAGE SIMBIÓTICO

VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* UFV H2B20 EM LEITE FERMENTADO E QUEIJO TIPO COTTAGE APÓS CONDIÇÕES DE ESTRESSE

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU E EFICIÊNCIA DE HIGIENIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS DE ORDENHA MECÂNICA DE PEQUENAS PROPRIEDADES LEITEIRAS DO MUNICÍPIO DE CAMPO BELO – MG

PERFIL FÍSICO-QUÍMICO DE DOCES DE LEITE PASTOSOS COMERCIALIZADOS EM FORTALEZA/CE

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAS DOS QUEIJOS MINAS FRESAL FABRICADOS POR TECNOLOGIA TRADICIONAL E POR ULTRAFILTRAÇÃO, ADQUIRIDOS NO MERCADO DE UBERABA – MG

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE UHT DURANTE SUA VIDA DE PRATELEIRA

TEXTURE PROFILE ANALYSIS (TPA) DE REQUEIJÃO CREMOSO TRADICIONAL E REQUEIJÃO CREMOSO *LIGHT*

ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES, FUNGOS FILAMENOTOSOS E LEVEDURAS DO QUEIJO PRATO COMERCIALIZADO EM SALVADOR-BA

GERAÇÃO E TRIAGEM DE IDÉIAS PARA NOVOS PRODUTOS EM MICROEMPRESAS DO SETOR DE LATICÍNIOS: UM ESTUDO DE CASO NA MICRORREGIÃO DE VIÇOSA, MG

ADESÃO DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EM DIFERENTES SUPERFÍCIES ADOTADAS EM UNIDADES DE PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

ADIÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO NA FORMULAÇÃO DE PÃO DE FORMA

ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL DE PÃO DE FORMA COM SORO DE LEITE EM PÓ

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE BEBIDA LÁCTEA ADICIONADA DE FARINHA DE ARROZ

PERFIL SENSORIAL DE QUEIJO MINAS PADRÃO

AVALIAÇÃO SENSORIAL E PERFIL DOS CONSUMIDORES DE MUSSARELA

UTILIZAÇÃO DO AMIDO DO CAROÇO DE JACA NA ESTABILIZAÇÃO DE BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS ADICIONADAS DE POLPA DE CUPUAÇU

EFEITO DA TEMPERATURA E TEOR DE UMIDADE NA MASSA ESPECÍFICA E VISCOSIDADE DO LEITE

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE REVESTIMENTO COMESTÍVEL ANTIMICROBIANO PARA QUEIJO PRATO FATIADO

INFLUÊNCIA DO USO DE CULTURAS ADJUNTAS COMERCIAIS NA COMPOSIÇÃO, PROTEÓLISE E CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DE QUEIJO PRATO COM REDUZIDO TEOR DE GORDURA

AS INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS NO BRASIL E A RESPONSABILIDADE SOCIAL

A EMPRESA JÚNIOR COMO FERRAMENTA DE APLICAÇÃO DO APRENDIZADO TEÓRICO: CASO ESPECÍFICO DA MINAS LÁCTEOS ASSESSORIA, EMPRESA JÚNIOR DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LATICÍNIOS – UFV

TRATAMENTO DE EFLUENTE SINTÉTICO DE LATICÍNIO POR UM SISTEMA FLOT-UASB

ESTUDO DA VIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO DE UMA BEBIDA A BASE DE SORO DE LEITE PREBIÓTICA NAS VERSÕES COM AÇÚCAR, E SEM AÇÚCAR

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS INDIRETOS CALIFÓRNIA MASTITIS TEST, WHITESIDE E PROVA QUALITATIVA DO TEOR DE CLORETOS COMO INDICADORES DE DIAGNÓSTICO DA MASTITE CLÍNICA EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS

PARTIÇÃO DA CASEÍNA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR POLIETILENOGLICOL, MALTODEXTRINA E ÁGUA

QUALIDADE SENSORIAL DE LEITE UAT E PERFIL DE SEUS CONSUMIDORES

DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DESOXIGENAÇÃO (K1) DAS ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE LATICÍNIOS

EFICIÊNCIA DO EXTRATO DE SEMENTES DE MORINGA NA REMOÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE LATICÍNIOS

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE AS PROPRIEDADES TERMOFÍSICAS DE BEBIDA LÁCTEA ACHOCOLATADA

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE AS PROPRIEDADES TERMOFÍSICAS DE REQUEIJÃO CREMOSO

SUCO DE MARACUJÁ A BASE DE SORO

INFLUÊNCIA DO TEOR DE GORDURA E TEMPERATURA NAS PROPRIEDADES TERMOFÍSICAS DO LEITE DE BÚFALA

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE POLPA E ESTABILIZANTE NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E NA ESTABILIDADE DE BEBIDA LÁCTEA DE MANGABA (*HANCORNIA SPECIOSA*)

DIVULGAÇÃO: A CIÊNCIA DO FATO

ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA, MESÓFILOS PROTEOLÍTICOS E LACTOFERMENTADORES DO LEITE CRU COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE IPATINGA, MINAS GERAIS

ACEITABILIDADE DE PAZINHAS AROMATIZADAS PARA SORVETE

AUMENTO O VALOR NUTRICIONAL DE LEITES FERMENTADOS ATRAVÉS DO INCREMENTO DO CONTEÚDO DE ÁCIDO FÓLICO

GESTÃO ESTRATÉGICA DE INFORMAÇÕES PARA O AUMENTO DO CONSUMO DE LEITE LONGA VIDA EM JUIZ DE FORA – MG: DESAFIOS E CONTRIBUIÇÕES PARA A NUTRIÇÃO DO CIDADÃO

A PRODUÇÃO DE QUEIJO E A CONSCIÊNCIA AMBIENTAL DO CONSUMIDOR

REQUEIJÃO CREMOSO *LIGHT* E SEM GORDURA COM ADIÇÃO FIBRAS: ANÁLISE DE CUSTOS E VIABILIDADE ECONÔMICA

CARACTERÍSTICAS DE FUSÃO DE QUEIJO DE COALHO FABRICADO COM LEITE DE BÚFALA FABRICAÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO *LIGHT* UHT (LONGA VIDA) COM CARACTERÍSTICAS SEMELHANTES AO REQUEIJÃO CREMOSO *LIGHT*

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE LEITE DE CABRA EM ITAPETINGA, SP

DIAGNÓSTICO SOBRE INADEQUAÇÕES NA COMERCIALIZAÇÃO DE QUEIJOS MINAS

EFEITO DOS HIDROCOLÓIDES NA ESTABILIDADE FÍSICA DE BEBIDA LÁCTEA À BASE DE SORO DE QUEIJO DE LEITE DE CABRA

VIABILIDADE DA FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESAL POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA UTILIZANDO RETENTADO DE ULTRAFILTRAÇÃO

EFEITO DA FORTIFICAÇÃO DE CÁLCIO NA ESTABILIDADE DE EMULSÕES LÁCTEAS E NA ESTRUTURA DOS SORVETES

PROPRIEDADES TÉRMICAS DE UMA MISTURA TERNÁRIA COM SUCOS DE MANGA, LARANJA E SORO DE QUEIJO

SELEÇÃO DE CULTURAS LÁCTICAS COM BASE NO POTENCIAL AUTOLÍTICO VISANDO A MELHORIA DA QUALIDADE DE QUEIJOS BRASILEIROS

ADEQUAÇÃO DA INFORMAÇÃO NUTRICIONAL EM RÓTULOS DE PRODUTOS LÁCTEOS COMERCIALIZADOS EM JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOQUÍMICA DA ÁGUA DE INFILTRAÇÃO DE EFLUENTE DE LATICÍNIO

CONTROLE DA EFICIÊNCIA DA PASTEURIZAÇÃO DE LEITE DE CABRA EM SEIS MINI-USINAS DO CARIRI PARAIBANO

QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *AEROMONAS HYDROPHILA* DE ÁGUAS UTILIZADAS EM PEQUENAS PROPRIEDADES LEITEIRAS

PERFIL DOS CONSUMIDORES DE LEITE ORGÂNICO DA CIDADE DE VIÇOSA

SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *LACTOBACILLUS* SPP. POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS ISOLADOS DE RECÊM NASCIDOS

AValiação DA PRESENÇA DE GENES PARA ENTEROTOXINAS, PELA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX, EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA NA ZONA DA MATA MINEIRA

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS ANTIBIÓTICOS EM LEITES PASTEURIZADO TIPO "C" E ESTERILIZADO, COMERCIALIZADO NA CIDADE DE SALVADOR-BA

ESTUDO DOS ASPECTOS DO CONSUMO DE LEITE EM RELAÇÃO A FATORES NUTRICIONAIS, HÁBITOS ALIMENTARES E CARACTERÍSTICAS DOS CONSUMIDORES

UTILIZAÇÃO DE ELETROFORESE PARA CARACTERIZAÇÃO DE LEITE UHT, SORO DE QUEIJO E SUAS MISTURAS

QUALIDADE DO LEITE DE CABRA *IN NATURA* PROCESSADO EM MINI-USINAS DO MÉDIO SERTÃO E CARIRI PARAIBANO – ESTUDO COMPARATIVO

PESQUISA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE DE CABRA CRU NAS MINI-USINAS DO CARIRI PARAIBANO

AValiação FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E SENSORIAL DE REQUEIJÃO CREMOSO COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE RIO POMBA – MG

EVOLUÇÃO DA PROTEÓLISE DURANTE A MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DA REGIÃO DA SERRA DA CANASTRA – MG

CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE LEITE DOS PRODUTORES LIGADOS À ASSOCIAÇÃO DE PRODUTORES DE LEITE DE ITAGIBA, BAHIA

DESENVOLVIMENTO REGIONAL: UMA ANÁLISE DAS POLÍTICAS PÚBLICAS PARA AS AGROINDÚSTRIAS LEITEIRAS DO ESTADO DA BAHIA – UM OLHAR SOBRE O MUNICÍPIO DE VITÓRIA DA CONQUISTA

PERFIL DOS CONSUMIDORES DE LEITE BOVINO E CAPRINO DA CIDADE DE NITERÓI/RJ

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE TANQUES DE REFRIGERAÇÃO POR EXPANSÃO

APLICAÇÃO DA MICROFILTRAÇÃO NA MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE FLUIDO

PARÂMETROS DE QUALIDADE DE DOCES DE LEITE COMERCIAIS

AValiação OBJETIVA DA COR DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE REQUEIJÃO E ESPECIALIDADE LÁCTEA

HÁBITOS DE CONSUMO E PERFIL DO CONSUMIDOR DE IOGURTES EM BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA UTILIZADA EM PEQUENAS PROPRIEDADES LEITEIRAS DA REGIÃO DE LAVRAS – MG

TANQUES DE RESFRIAMENTO DE LEITE: PROCESSO DE HIGIENIZAÇÃO

DESENVOLVIMENTO E AValiação DE FILME INCORPORADO COM TRICLOSAN PARA INIBIÇÃO DE *SATPHYLOCOCCUS* SP. EM QUEIJO MUSSARELA FATIADO

VALENÇA – RJ, MUNICÍPIO DE MAIOR PRODUÇÃO DE LEITE DO ESTADO: ADEQUAÇÃO DA INFRAESTRUTURA DE PRODUÇÃO À IN51

AValiação DO CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS E COLIFORMES EM LEITE DE CABRA CRU E PASTEURIZADO

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE IPATINGA, MINAS GERAIS

AValiação DE BANCOS DE LEITE HUMANO QUANTO A ADEQUAÇÃO ÀS BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

AValiação DO CONSUMO E VISÃO DOS PRODUTOS LÁCTEOS ENTRE ESTUDANTES DO ENSINO FUNDAMENTAL

SENSORY PROFILE OF THE GORGONZOLA TYPE CHEESE THROUGH BOOTSTRAP CONFIDENCE REGIONS IN GENERALIZED PROCRUSTES ANALYSIS

REQUEIJÕES CULINÁRIOS ANÁLOGOS

AValiação DA ACEITABILIDADE DE LEITE DE CABRA POR CRIANÇAS

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ACEITAÇÃO SENSORIAL DE SOBREMESA LÁCTEA AERADA SABOR MANGABA (*HANCORNIA SPECIOSA* GOMES) PRODUZIDO A PARTIR DE LEITE DE CABRA E VACA



EXPOMAQ 2007 (16 a 19 de julho) 24º Congresso Nacional de Laticínios

Neste grande encontro do mercado lácteo, a Danisco estará promovendo dois novos produtos da divisão de culturas.

Além disso Múcio M. Furtado estará lançando o livro "Queijos com Olhaduras" e também ministrará curso sobre o assunto no 24º Congresso Nacional de Laticínios e palestra "Fermentação propiônica em queijos: conhecimentos recentes sobre a produção de olhaduras". Ainda no evento Marcelo Pedras e Leandro Teixeira ministram mini-curso de "Alimentos Funcionais".

Divulgaremos também a nossa nova campanha "Família Leite & Cia." onde serão resgatados os valores da tradição esculpida pelas primeiras famílias queijeiras rurais, que não raras tornaram-se grandes marcas do setor, conferindo muito orgulho à indústria nacional. E aproveitar para ilustrar o exemplo de que as histórias de sucesso são construídas através de muita união, carinho, amor à profissão e tradição que passa de pai para filho.

Não perca esta grande oportunidade de conhecer os mais recentes lançamentos da tecnologia em laticínios.

Contamos com a sua presença !



DISTRIBUIDOR DE PRODUTOS

DANISCO

First you add knowledge...

fermentech

Central de Atendimento

11 6193 4900 | www.fermentech.com.br

PRODUÇÃO DE MASSA DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *KLUYVEROMYCES LACTIS* E ATIVIDADE CATALÍTICA DA B-GALACTOSIDASE NA HIDRÓLISE DE LACTOSE

PRODUCTION PERMEABILIZED CELL MASS OF *Kluyveromyces lactis* AND CATALYTIC ACTIVITY OF β -GALACTOSIDASE IN LACTOSE HYDROLYSIS

Edimar A. F. Fontes¹
Flávia M. L. Passos²
Frederico J. V. Passos³
Paulo Rogério Fontes¹

RESUMO

A produção de massa de célula permeabilizada de *Kluyveromyces lactis* contendo a enzima galactosidase e sua atividade catalítica na hidrólise de lactose foi realizada. Para obtenção da massa de célula permeabilizada, células foram produzidas, crescendo em soro de leite UF estéril. Para promover a permeabilização da membrana, células foram tratadas com uma solução etanol 50% para facilitar o contato entre a enzima e o substrato no processo de hidrólise da lactose. A atividade catalítica da enzima na hidrólise de lactose foi obtida pela relação linear entre a velocidade de reação e peso seco em mg de célula permeabilizada. A massa de 1mg de células permeabilizadas equivaleu a 0,32 unidades de atividade de enzima. O efeito da suspensão de célula permeabilizada na velocidade inicial de reação foi estudado utilizando diferentes concentrações de lactose (1, 40, 100 e 140 mM) e suspensões de células permeabilizadas que variaram de 0,1 a 3 mg/ml. As reações foram acompanhadas no espectrofotômetro DU em 510nm, que forneceu uma curva da variação de absorvância com o tempo de reação. A inclinação da reta apresentada por cada curva correspondeu as velocidades iniciais para cada concentração de célula permeabilizada e de lactose. Foi utilizado nessa análise um reagente colorimétrico GOP-PAP que reagiu especificamente com a glicose presente no meio. Para conversão da leitura de absorvância em unidades de mM glicose, foi feita uma curva padrão de glicose. A concentração de 1mg/ml de célula permeabilizada adicionada à mistura de reação, foi selecionada pela sua relação linear com a velocidade de reação para concentrações mínimas (1 mM) e extremas (140 mM) de lactose. Valores abaixo de 1mg/ml foram apropriados para a reação linear entre velocidade e concentração inicial de enzima.

Palavras-chaves: β -galactosidase; hidrólise de lactose; *Kluyveromyces lactis*.

1 INTRODUÇÃO

A hidrólise de lactose em glicose e galactose pela enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) continua merecendo atenção da indústria de alimentos por razões nutricionais, ecológicas e tecnológicas. O leite com baixo teor de lactose atende às necessidades da população deficiente de lactase, permitindo que elas se beneficiem das qualidades nutricionais dessa fonte primária da dieta humana (FONTES, 1998). Uma das fontes comerciais de β -galactosidase para processamento de leite e soro hidrolisados são as leveduras *Kluyveromyces* (MAHONEY e WILDER, 1988). O uso dessas leveduras é permitido na indústria de

alimentos (JOSHI et al., 1987) e o soro do leite como meio de cultura é adequado para crescimento e indução da síntese para a produção da enzima por *K. lactis* (SISO, 1993 e BECERRA, 1996). Entretanto, como α -galactosidase de levedura é uma enzima intracelular e a sua extração com aceitável rendimento é difícil e onerosa, o uso de células permeabilizadas como agentes catalíticos é uma alternativa viável em relação ao uso da enzima purificada (FONTES, 2001). Estudos demonstraram que existe uma baixa atividade da enzima em células viáveis, isso devido a baixa permeabilidade de sua membrana a qual constitui uma barreira para difusão do substrato (JOSHI et al., 1989). Embora a ocorrência de um sistema de

1 Professores DS, Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba, Rio Pomba-MG;
2 Professora PhD, Departamento de Microbiologia, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG;
3 Professor PhD - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

transporte indutível de lactose nessa membrana tenha sido descrito por DICKSON e BAAR, (1983). A permeabilidade dessa membrana pode ser alterada sem a total destruição de sua integridade, por meio de um tratamento conhecido como permeabilização da membrana celular. Dependendo da intensidade de exposição ao solvente este tratamento pode ser utilizado no preparo de células não viáveis utilizadas como biocatalizadores ou na extração da enzima intracelular (FENDON, 1982 e JOSHI, 1989). O uso de etanol como agente de permeabilização apresenta, dentre outras, vantagens como a sua disponibilidade, seu baixo preço, o fato de ser o componente de muitos alimentos fermentados e bebidas e ser admitido o seu uso na permeabilização de células na indústria de alimentos (SISO et al., 1992). A enzima como massa de célula permeabilizada é uma preparação conveniente para a indústria regional de leite e derivados que poderia adquirir a um preço mais acessível ou mesmo obtê-la em suas próprias instalações (FONTES, 2001 e FONTES, 1998). O objetivo deste trabalho foi caracterizar a atividade enzimática de células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*, utilizadas como biocatalisador na hidrólise de lactose. Para a obtenção do biocatalisador, células de *Kluyveromyces lactis* foram cultivadas em soro ultrafiltrado, concentradas e tratadas com etanol para permeabilização.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Fisiologia de Microrganismo do Departamento de Microbiologia (DMB), instalado no Núcleo de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

2.1 Cultura

O organismo utilizado neste trabalho foi a levedura *Kluyveromyces lactis* uma linhagem selvagem da coleção de culturas do DMB -UFV. A cultura foi mantida em estoque com adição de 20% de glicerol -80 °C. Antes de ser utilizada como inóculo para produção de célula, a cultura foi ativada em 50 ml de soro estéril ultrafiltrado e incubada a 30°C sob agitação de 150 rpm em incubadora (Controlled Environment Incubator Shaker - série 25) por 24 horas.

2.2 Meio de cultivo

Utilizou-se como meio de cultura o soro de queijo, tipo mozzarella submetido a um sistema de ultrafiltração (Reginox) com membrana tipo

Desalination System Inc., de corte de 10.000 daltons (poros de 0,03µm) Modelo FW3840C. Obteve-se então duas frações: o soro UF permeado e o retido ou concentrado. O soro UF foi congelado a -20 °C em embalagens de 1 litro. Imediatamente antes de sua utilização este soro foi descongelado, aquecido por 15 minutos no microondas na potência alta e resfriado à temperatura ambiente. Ao sobrenadante, utilizado como meio de cultura, foi acrescido citrato de sódio (ECIBRA) em uma concentração de 4g/L e esterilizado por calor, a 121 °C por 10 minutos.

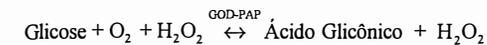
2.3 Obtenção da massa de célula permeabilizada.

Aliquotas de 3 ml da cultura pré-ativada foram transferidas para *fernabacks* de 2800 ml contendo 1 litro de soro estéril UF. Após aproximadamente 16-18 horas de crescimento a 30 °C sob agitação a 150 rpm, que correspondeu ao início da fase estacionária, fase de máxima atividade de enzima por célula, obteve-se as células de *Kluyveromyces lactis* com Densidade Ótica a 600 nm (DO_{600}) da cultura nessa fase que correspondeu a 3,45. As células de *Kluyveromyces lactis* foram centrifugadas a 4060 x g por 10 minutos (RC5C Sorvall Instruments) sob refrigeração (5-7°C). O precipitado foi ressuspenso em 100ml de etanol 50 % (Merck) e agitado por 15 minutos em agitador magnético (Wheaton Biostir 4) para permitir um maior contato das células com o etanol. Novamente, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada para retirada do excesso de álcool. O precipitado obtido foi submetido à secagem a uma temperatura de aproximadamente 30 °C, por cerca de 1 hora, sob ventilação, até se obter uma massa de células secas. Esta massa de células permeabilizadas, após ser macerada, foi colocada dentro de um frasco de vidro e armazenada sob refrigeração (4 °C).

2.4 Efeito da concentração da massa de células permeabilizadas na hidrólise de lactose

Preparou-se uma solução estoque de lactose (Sigma) de 600 mM e uma suspensão estoque de células permeabilizadas de 12mg/ml em tampão fosfato. O Tampão fosfato foi constituído de 0,06 M de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 0,04M de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 0,01M de KCl e 0,001M de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, (Tampão Z) segundo Miller (1972) citado por SHEETZ e DICKSON (1979). Não foi acrescentado 50mM de 2-mercaptoetanol por afetar a enzima do sistema de reação GOD-PAP® (Glicose Oxidase e Peroxidase) (Merck) usada na medida de atividade de β-galactosidase. O efeito da concentração do biocatalizador na velocidade inicial da reação foi estudado

em diferentes concentrações de lactose: 1, 40, 100 e 140 mM. As suspensões de célula permeabilizada para cada uma das concentrações de lactose foram: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg/ml. Ao volume da mistura de reação (500µl) foi adicionado 2ml de reagente GOD-PAP® para análise espectrofotométrica de glicose produzida durante reação. Na análise espectrofotométrica o GOD (Glicose Oxidase) oxida a glicose, que foi liberada da hidrólise da lactose, para ácido glicônico resultando num produto de cor violeta com a intensidade de cor proporcional à concentração de glicose no meio. O princípio da reação é:



As reações foram acompanhadas em espectrofotômetro (Beckman DU® 640), comprimento de onda de 510nm, que forneceu uma curva da variação de absorvância com o tempo de reação. No início da curva, temos a adaptação das enzimas envolvidas no sistema de reação (GOD-PAP e β-galactosidase) que logo em seguida atinge o steady-state, ou seja, velocidade constante de reação. A inclinação da reta apresentada para cada curva correspondeu as velocidades iniciais para cada combinação de célula permeabilizada e de lactose. A conversão de absorvância em unidades de mM de glicose, foi feita a partir de uma curva padrão. Preparou-se uma solução padrão de 1% de glicose, que foi diluída 100 vezes. Desta solução, obteve-se soluções contendo diferentes concentrações de glicose de: 0,5; 0,33; 0,25; 0,167; 0,0833; 0,0167 mM. O volume de reação de 1,5 ml constituiu-se de 500µL de solução devidamente diluída de glicose e 1,0mL de reagente GOD-PAP®. Após o tempo de reação (15 minutos), obteve-se as leituras das absorvâncias a 510 nm. A curva de calibração para glicose foi construída, relacionando as leituras das absorvâncias a 510 nm com as concentrações conhecidas de glicose em mM.

2.5 Relação densidade ótica a 600nm e peso seco

Para definir a faixa de relação linear entre a leitura de densidade ótica da cultura e o peso seco da massa celular, preparou-se uma suspensão de células permeabilizadas em água destilada de 12mg/ml. Dentro de cadinhos de porcelana, previamente secos em estufa a 105°C/ 24 horas, foi colocado 1ml dessa solução. Essas amostras foram submetidas a temperatura de 105°C em estufa, até peso constante. A partir da suspensão inicial de células permeabilizadas de 12mg/ml, foram feitas diluições de 1:2 até 1:2000. Em cada uma das suspensões preparadas foram feitas duas determinações de densidade ótica: a primeira

obtida pela leitura direta da densidade ótica da suspensão (definida como D_{medida}) e a segunda determinada a partir da diluição da suspensão de modo a permitir leitura de densidade ótica na faixa de 0,1 - 0,4, que após multiplicada pelo fator de diluição foi definida como D_{real} . Todas as leituras de densidade ótica das amostras foram feitas no espectrofotômetro Beckman DU® 640 a 600nm. O gráfico relacionando os valores de D_{medida} e D_{real} foi traçado e a região dessa curva que apresentou um comportamento linear foi usada para a construção da curva de peso seco que relaciona a D_{medida} e a massa seca de célula permeabilizada (mg). Uma equação foi deduzida para converter D_{medida} para seu valor correspondente em matéria seca.

2.6 Determinação da unidade de atividade de β-galactosidase

A unidade de atividade de β-galactosidase foi determinada em termos de mM de glicose, utilizando as velocidades iniciais de reação para as suspensões de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/ml de célula permeabilizada. A inclinação da reta no gráfico velocidade de reação versus mg de célula permeabilizada, representou a atividade de β-galactosidase. Uma unidade enzimática (UE) foi definida como a massa de enzima que catalisa a produção de 1mM de glicose a partir da lactose por minuto sob as condições experimentais (temperatura ambiente e pH=7,1). UE foi expressa por mg de massa seca de célula permeabilizada.

2.7 Estabilidade da β-galactosidase em solução.

Determinou-se a estabilidade da enzima na célula permeabilizada suspensa em água. Em diferentes intervalos de tempo retirou-se alíquotas de 500µl da suspensão estoque de células permeabilizadas de 6mg/ml que foram adicionadas em uma cubeta de 4ml contendo 500µl de lactose (Sigma) retirada da solução estoque de 300 mM e 2ml de reagente GOD-PAP. Na mistura de reação, foi estabelecido que células permeabilizadas e lactose tivessem no volume final de reação uma concentração de 1mg/ml e 50 mM respectivamente. Esse procedimento foi repetido em intervalos de tempo por um período total de 9 horas. A variação de absorvância com o tempo foi acompanhada no espectrofotômetro (Beckman DU® 640) a 510nm para cada amostra; para determinação da velocidade inicial da reação. Determinou-se também a estabilidade da enzima na célula permeabilizada em tampão fosfato, seguindo o mesmo procedimento acima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da Concentração da Massa de Célula Permeabilizada na Hidrólise de Lactose

A Figura 1 representa o efeito da concentração de massa de célula permeabilizada na velocidade da reação, para diferentes concentrações de lactose. A partir da equação da curva de calibração de glicose (Figura 2), a unidade da velocidade inicial foi transformada em mM de glicose/min. Pelos resultados apresentados na Figura 1, verificou-se que para concentrações de célula permeabilizada até 1mg/ml, a equação de Michael-Menten pode ser aplicada. Valores superiores a 1mg/ml extrapolam a relação linear do modelo entre velocidade e concentração inicial de enzima. Segundo BAILEY e OLLIS, 1986 esta relação mesmo aplicável no início das reações, pode se tornar imprópria no final do processo, quando a relação enzima/substrato é alta. De acordo com os resultados do presente trabalho, para concentrações de substrato de até 1mM o modelo é válido. Os resultados obtidos por SABIONI et al. (1984), indicaram que adição de 400 a 800 mg/litro de células permeabilizadas em leite em 2,5 a 3,5h de incubação a 35°C, resultaram em 45 a 69% de lactose hidrolisada. Nas presentes condições experimentais foi mais conveniente trabalhar com uma concentração de 1mg/ml. Os perfis das curvas de 40, 100 e 140 mM de lactose foram o mesmo, isso porque a concentração de lactose é alta no meio.

3. 2 relação de densidade ótica a 600nm e peso seco

Para uma suspensão de células permeabilizadas de 12mg/ml de densidade ótica inicial de 2,66; foi obtido 9,8 mg de massa seca de células permeabilizadas. A curva da Figura 3 mostra que valores de leitura de densidade ótica até próximo a 0,5 coincidem com a região linear da curva. Essa faixa foi então utilizada para a construção da curva de peso seco e para a obtenção de uma equação linear da densidade ótica a 600nm (D.O. medida) com matéria seca, conforme mostrado na Figura 4.

3.3 Determinação da unidade de atividade de β-Galactosidase

Foram feitas leituras de D.O a 600nm das suspensões de 0,1; 0,5 e 1 mg/ml para suas respectivas conversões em matéria seca utilizando para isso a equação de curva de peso seco. Pela análise da Figura 5, podemos observar que um mg de massa seca de célula permeabilizada produz 0,31 mM de glicose da hidrólise de lactose em solução aquosa por minuto a temperatura ambiente. Sendo uma unidade de enzima

a massa de células permeabilizadas capaz de produzir 1 mM de glicose nas condições definidas, deduz que existe na preparação enzimática estudada 1 unidade de enzima correspondente a 3,2 mg de células permeabilizadas.

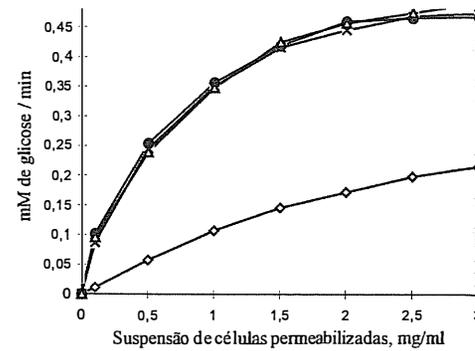


Figura 1 - Efeito da concentração da massa de células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis* na cinética de hidrólise de lactose. (○) lactose=1mM, (●) lactose = 40mM, (Δ) lactose=100mM e (x) lactose =140 mM.

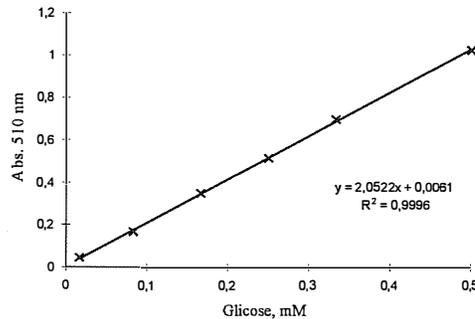


Figura 2 - Curva de calibração de glicose pelo método GOD-PAP.

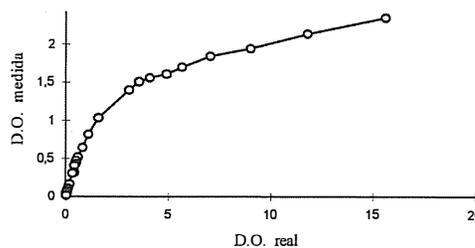


Figura 3 - Relação das leituras de densidade ótica D.O. medida e D.O. real da suspensão de 12mg/ml da massa de célula permeabilizada de *K. lactis*.

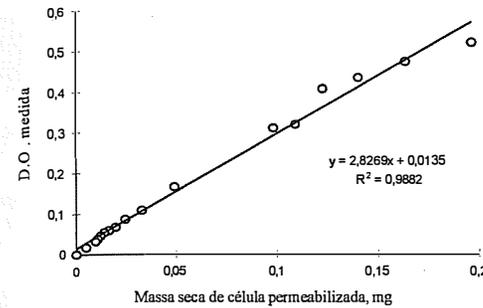


Figura 4 - Curva de peso seco para massa de células permeabilizadas de *K. lactis*.

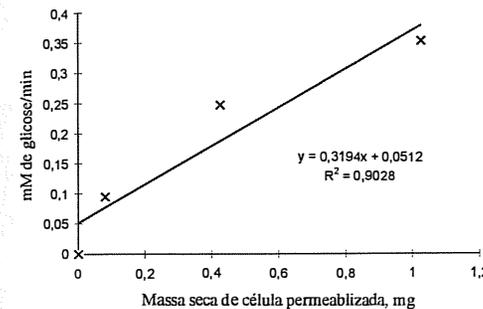


Figura 5 - Medida de unidade de atividade de β-galactosidase pela relação linear entre a velocidade de reação com o peso seco de células permeabilizadas.

3. 4 Estabilidade da β-galactosidase em solução

A atividade de β-galactosidase da célula permeabilizada em água e no tampão fosfato, está ilustrada na Figura 6. As unidades das velocidades, foram convertidos em mM de glicose/min, utilizando para isso a equação da curva de calibração de glicose (Figura 2). Pelos resultados, verifica-se que há perda de atividade da enzima em solução aquosa. Observa-se que a atividade da enzima é menor quando suspensa a massa de células permeabilizadas em água. Quando a enzima foi suspensa no tampão fosfato (pH=7,1), a atividade foi mais alta. Segundo VOGET et al., 1994, íons Mn⁺⁺ e Mg⁺⁺ mostram um importante papel estrutural na enzima β-galactosidase em razão de estarem diretamente envolvidos no processo catalítico e, além disso, protegem a enzima contra desativação térmica e a presença de K⁺ é importante para a estabilidade da enzima. DICKSON

et al. (1979) demonstraram que a atividade máxima da lactase de *Kluyveromyces lactis* (em ONPG a 30°C) foi obtida na presença de Mn⁺⁺ ou combinação de Mg⁺⁺ e β-mercaptoetanol. Conforme os resultados de OHMIYA et al. (1976) a curva de pH para a β-galactosidase de *K. lactis* mostra uma alta atividade relativa da enzima em valores de pH próximos da neutralidade. Resultados obtidos por CLAMPLUVEIR et al. (1988), indicaram que a atividade de lactase de *Kluyveromyces lactis* foi estável em pH 6,55 e 6,98 quando estocada em temperatura de 37°C na presença de Mn⁺⁺.

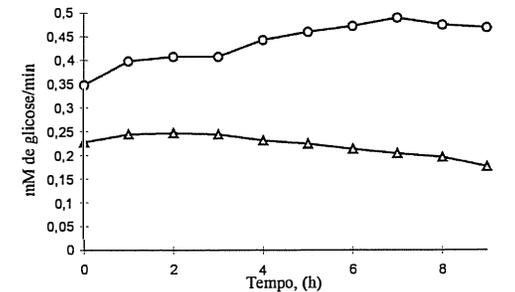


Figura 6 - Atividade de β-galactosidase em células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis* e estabilidade do em função do tempo de estocagem a 25°C. (○) tampão fosfato e (Δ) água destilada.

4 CONCLUSÕES

A cinética de hidrólise de lactose por β-galactosidase contida numa preparação de células de *Kluyveromyces lactis* permeabilizada em etanol 50%, foi avaliada na presença da lactose. A massa de 1mg de células permeabilizadas equivaleu a 0,32 unidades de atividade de enzimas. A concentração de 1mg/ml de células permeabilizadas adicionada à mistura de reação, foi selecionada pela sua relação linear com a velocidade de reação para as concentrações mínimas(1mM) e extremas(140mM) de lactose. Valores abaixo de 1mg/ml foram apropriados para a reação linear entre velocidade e concentração inicial de enzima. No estudo feito sobre a estabilidade da β-galactosidase em solução foi verificado que a enzima mantém sua atividade constante no tampão fosfato por um período de 9h. Atividade da enzima em água inicialmente foi menor e ocorreu a perda de atividade com o tempo.

ABSTRACT

The production permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis* containing the enzyme β-galactosidase and her catalytic activity in the

lactose hydrolysis was accomplished. For obtaining of the permeabilized cell mass, cells were produced, growing in serum of UF sterile milk. To promote the permeabilization of the membrane, cells were treated with ethanol solution 50% to facilitate the contact between the enzyme and the substratum in the process lactose hydrolysis. The catalytic activity of the enzyme in the lactose hydrolysis was obtained by the lineal relationship between the reaction speed and dry weight in mg of permeabilized cell. The mass of 1mg of permeabilized cells was equal to 0.32 units of enzyme activity. The effect of the suspension of permeabilized cell in the initial speed of reaction was studied using different lactose concentrations (1, 40, 100 and 140 mM) and suspensions of permeabilized cells that varied from 0.1 to 3 mg/ml. The reactions were accompanied in the spectrophotometer DU in 510nm, that it supplied a curve of the absorbance variation with the time of reaction. The inclination of the straight line presented by each curve corresponded the initial speeds for each concentration of permeabilized cell and lactose. It was used in that analysis a reagent colorimeter GOP-PAP that specifically reacted with the present glucose in the middle. For conversion of the absorbance reading in units of mM glucose, it was made a curve standard of glucose. The suspension of 1mg/ml of permeabilized cell added to the reaction mixture, it was selected by her lineal relationship with the reaction speed for minimum concentrations (1mM) and extreme (140 mM) of lactose. Values below 1mg/ml were appropriate for the lineal reaction between speed and initial concentration of enzyme.

Keywords: β -galactosidase; lactose hydrolysis; *Kluyveromyces lactis*

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York: McGraw, 1986. 567p.

BECERRA, M., SISO, M. I. G. Yeast β -galactosidase in solid-state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**. 1996. 19:39-44.

CLAMPLUVIER, B., KAMP, B., ROUXHET, P. G. Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp.* **Enzyme Microb. Technol.**, 1988, 10:611-617.

DECLÉIRE, M., DE CAT, W., VAN HUYNH, N. Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining *in situ* β -galactosidase activity. **Enzyme Microb. Technol.**, 1987, 9: 300-302.

DICKSON, R. C., DICKSON, L. R., MARKIN, J. S. Purification and properties of inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**. 1979. Volume 137, No 1. 51-61.

DICKSON, R. C., BAAR, K. Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**. 1983. Volume 154, No 3. 1245-1251.

FENTON, D. M. Solvent treatment for β -D-galactosidase release from yeast cells. **Enzyme Microb. Technol.**, 1982, 4:229-232.

FLORES, M. V., VOGET, C. E., ERTOLA, R. J. J. Permeabilization of Yeast Cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.** 1994. 16: 340-346.

FONTES, E. A. F.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V. A mechanical mathematical model to predict lactose hydrolysis by β -galactosidase in a permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis*: validity and sensitivity analysis. **Process Biochemistry**. 2001. 37:267-274.

FONTES, E. A. F. **Cinética de hidrólise de lactose utilizando células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*: um modelo matemático mecanístico**, MG:UFV, 1998. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

HANSRUEDI, F. Review: Permeabilized cells. **Analytical Biochemistry**. 1982. 120:211-234.

JOSHI, M. S., GOWDA, L. R., KATWA, L. C., BHAT, S. G., Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. **Enzyme Microb. Technol.** 1989. 11:439-443.

LEE, J. M. **Enzyme Kinetics**, New Jersey: A Simon & Schuster Company. Englewood Cliffs. 1992. 51p.

MAHONEY, R. R., ADAMCHUK, C. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of food science**. 1980. 45: 962-964.

OHMIYA K., OHASHI, H., KOBAYASHI, T., SHIMIZU, S. Hydrolysis of lactose by immobilized microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. 1977. 33:137-145.

PASSOS, L. M. L. **Produção de Células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 em soro de queijo ultrafiltrado e suplementado**. Viçosa, MG:UFV, 1996. 48p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.

SABIONI, J. G., PINHEIRO, A. J. R., SILVA, D. O et al. Control of lactose crystallization from permeabilized *Kluyveromyces lactis* cells. **Dairy Sci**. 1984. 67: 2210-2215.

SHEETZ, R. M., DICKSON, R. C. Mutations affecting synthesis of β -galactosidase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. 1980. **Genetics** 93: 877-890.

SISO, M. I. G. β -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey: batch versus fed-batch cultures. **Process Biochemistry**. 1994. 29:565-568.

SISO, M. I. G., CERDÁN, E., PICOS, M. A. F., et al. Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for Different Treatments. **Biotechnology Techniques**. 1992. volume 6, No.4. 289-292.

CINÉTICA DE INIBIÇÃO POR GALACTOSE E GLICOSE NA HIDRÓLISE DE LACTOSE POR B-GALACTOSIDASE EM MASSA DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Galactose and glucose inhibition kinetics of lactose hydrolysis by β -galactosidase in permeabilized cell mass of *kluyveromyces lactis*

Edimar A. F. Fontes¹
Flávia M. L. Passos²
Frederico J. V. Passos³
Paulo Rogério Fontes¹

RESUMO

O efeito de diferentes concentrações de galactose, glicose e de mistura de galactose e glicose na cinética de hidrólise de lactose por β -galactosidase utilizando células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis* como biocatalisador foi realizado. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25°C), utilizando uma suspensão de 1mg/ml de células permeabilizadas em tampão fosfato na mistura de reação. Para o efeito de galactose na atividade da enzima, foram combinadas diferentes concentrações de lactose (0, 1, 5, 10, 20, 30 e 40 mM) com diferentes concentrações de galactose (0, 1, 5, 10, 20, 30 e 40 mM). A reação foi acompanhada em espectrofotômetro DU em 510 nm pela medida de glicose liberada. As unidades de absorvâncias foram transformadas em mM de glicose, através de uma curva de calibração apropriada. Durante os estudos do efeito de galactose sobre a atividade da β -galactosidase, foi utilizado um programa estatístico de computador que auxiliou no cálculo dos coeficientes cinéticos (V_{max} , K_m e K_i) de forma precisa e correta e também ajudou na escolha e definição de um modelo matemático mecanístico aplicável no entendimento do processo de hidrólise de lactose levando em consideração a forma de inibição causada pela presença de galactose. O tipo de inibição competitiva ou não-competitiva foi definido pelo menor valor apresentado pela soma de quadrados do resíduo pelo programa SAS-NILN. Os coeficientes cinéticos V_{max} , K_m e K_i também estimadas pelo mesmo programa, corresponderam respectivamente a $0,291 \pm 0,01$ mM/min; $2,536 \pm 0,412$ mM e $10,88 \pm 8,86$ mM no intervalo de confiança de 95%. O tipo de inibição causado pela presença de galactose foi competitiva para β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*.

Palavras-chave: Cinética de inibição; galactose; hidrólise de lactose

1 INTRODUÇÃO

Lactases microbianas têm sido intensamente aplicadas na hidrólise de lactose do leite e do soro de queijo. Lactases neutras (atividade ótima em pH 6,0 a 7,0) originam-se de leveduras, principalmente *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis*, que são mais adequadas para hidrólise da lactose do leite e de soros neutros segundo Holsinger et al., 1991 citados por VOGET et al. (1994). A hidrólise enzimática de lactose em glicose e galactose pela β -galactosidase tem várias vantagens: i) nutricionais - no preparo de

leite com lactose hidrolisada, sem alterar as características físicas e nutricionais do leite para ser consumido por pessoas que são incapazes de digerir a lactose; ii) tecnológicas - no processamento de derivados de leite concentrado ou congelado. A glicose e a galactose são mais solúveis que a lactose e o poder adoçante da mistura dos dois açúcares obtido pela hidrólise da lactose corresponde a 70% do poder adoçante da sacarose, contra 40% da lactose, fazendo os produtos concentrados mais aceitáveis e o soro de leite um adoçante que pode ser usado em sorvetes, iogurtes, e outros produtos; iii) ecológico - no

- 1 Professores DS, Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba, Rio Pomba-MG;
- 2 Professora PhD, Departamento de Microbiologia, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG;
- 3 Professor PhD - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

aproveitamento do soro de leite, um subproduto da fabricação de queijos, cujo o efluente constitui um grande problema de poluição ambiental (DBO de 30.000 - 50.000 ppm). Comercialmente importante é o fato de poucos microrganismos crescerem em lactose, enquanto que a grande maioria utiliza de preferência os açúcares da hidrólise e consequentemente aumentam a produção de álcool e ácido em produtos fermentados (SISO et al., 1994). A eficiência do processo de hidrólise de lactose depende da cinética de reação e esta pode ser influenciada por vários fatores químicos e físicos tais como a concentração de substratos, produtos, enzimas, cofatores, pH, temperatura, e cisalhamento. Um ativador ou *modulador* positivo que pode combinar com a enzima alterando sua atividade catalítica. Um *inibidor* ou um *modulador* negativo diminui a atividade da enzima (LEE, 1992). Dependendo de como o inibidor se liga à enzima, dos complexos formados e das constantes das etapas das reações, o modelo de inibição pode ser classificado como: competitivo, não-competitivo e misto (BAILEY e OLLIS, 1986). Os inibidores competitivos têm uma forte semelhança estrutural com o substrato, e ambos inibidor e substrato competem pelo sítio ativo da enzima. A formação de um complexo inibidor-enzima reduz a quantidade da enzima disponível para interação com o substrato, e como resultado, a velocidade da reação diminui. Um inibidor competitivo, normalmente combina reversivelmente com a enzima. Portanto, o efeito do inibidor pode ser minimizado pelo aumento da concentração de substrato, a não ser que o próprio aumento da concentração de substrato iniba a reação. Inibidores não-competitivos interagem com enzima em várias maneiras diferentes. Eles podem se ligar reversivelmente e irreversivelmente no sítio ativo ou em algumas outras regiões na enzima. Em qualquer caso, o complexo resultante é inativo. Variações no mecanismo de inibição não-competitiva são possíveis. Um dos casos é quando complexo substrato-inibidor-enzima pode ser decomposto para produzir um produto e um complexo inibidor-enzima. Nesse caso, é conhecido como inibição parcialmente competitiva (LEE, 1992). Há evidências de que a β -galactosidase seja uma enzima alostérica, regulada por um processo de retroinibição, ou seja, o produto final da reação inibe a enzima catalizadora. Assim, à medida que a concentração dos produtos finais da reação aumenta, a atividade dessa enzima diminui (FONTES, 1998; FONTES, 2001). O modelo cinético que tem sido mais usado para descrever a hidrólise enzimática da lactose é o modelo da inibição competitiva por galactose (SCOOT et al., 1985):

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{S + K_m \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)}$$

No presente trabalho foi estudado o efeito de diferentes concentrações de galactose, glicose bem como os efeitos combinados de galactose e glicose sobre a velocidade de hidrólise da lactose. Uma equação matemática mecanística foi proposta para hidrólise de lactose utilizando células de *Kluyveromyces lactis* permeabilizadas como biocatalisador.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Fisiologia de Microorganismo do Departamento de Microbiologia (DMB), instalados no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Computação do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa.

2.1 Nomenclatura

Os seguintes termos foram usados:

[S] = concentração de lactose em milimolar (mM);

[I] = concentração do inibidor (galactose) em milimolar (mM);

V = velocidade de reação em milimolar de glicose/minuto;

Os seguintes coeficientes foram usados:

V_{\max} = velocidade máxima de reação em milimolar de glicose/minuto;

K_m = constante de Michaelis-Menten em milimolar (mM);

K_i = constante de inibição em milimolar (mM);

2.2 Células permeabilizadas

Aliquotas de 3 ml da cultura pré-ativada foram transferidas para *fernabacks* de 2800 ml contendo 1 litro de soro estéril UF. Após aproximadamente 16-18 horas de crescimento a 30 °C sob agitação a 150 rpm, que correspondeu ao início da fase estacionária, fase de máxima atividade de enzima por célula, obtiveram-se as células de *Kluyveromyces lactis* com Densidade Óptica a 600 nm (DO_{600}) da cultura nessa fase que correspondeu a 3,45. As células de *Kluyveromyces lactis* foram centrifugadas a 4060 x g por 10 minutos (RC5C Sorvall Instruments) sob refrigeração (5-7°C). O precipitado foi ressuscitado em 100ml de etanol 50 % (Merck) e agitado por 15 minutos em agitador magnético (Wheaton Biostir 4) para permitir um maior contato das células com o etanol. Novamente, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada para retirada do excesso de álcool. O precipitado obtido foi submetido à secagem a uma temperatura de aproximadamente 30 °C, por cerca de 1 hora, sob ventilação, até se obter uma massa de células secas. Esta massa de células permeabilizadas,

após ser macerada, foi colocada dentro de um frasco de vidro e armazenada sob refrigeração (4 °C).

2.3 Efeito da Galactose na atividade de β -Galactosidase

Preparou-se uma suspensão estoque de 6mg/ml de células permeabilizadas em tampão fosfato. Soluções de lactose (Sigma) e galactose (Sigma), a partir das soluções estoques de 480 mM, foram preparadas de forma que as concentrações no volume final da reação fossem iguais à 0; 1; 5; 10; 20; 30; 40 mM de lactose ou galactose em todas as combinações possíveis dessa. Como reator, foi utilizado a própria cubeta do espectrofotômetro, onde o volume final da reação foi de 3,0 ml: 0,5 ml da solução de célula permeabilizada; 0,25 ml de lactose; 0,25 ml de galactose; 2ml do reagente GOD-FAE[®]. As reações foram acompanhadas em espectrofotômetro Beckman DU[®]. Um gráfico da absorvância a 510nm com o tempo, para cada combinação, foi obtido. A inclinação da reta apresentada por cada curva correspondia as velocidades iniciais para cada combinação de lactose e galactose. Partindo da curva de calibração de glicose as unidades de absorvâncias foram transformadas em mM de glicose.

2.4 Estimativas dos Coeficientes Cinéticos

Para análise e estimativa dos coeficientes cinéticos (V_{\max} , K_m e K_i) os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (Statistical Analysis System), através do procedimento NLIN (Regressão Não-Linear) utilizando o método iterativo Marquart. As seguintes equações foram utilizadas no programa : Michaelis-Menten (1) e suas equações derivadas para inibição competitiva (2) e inibição não-competitiva (3):

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad (1)$$

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{S + K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)} \quad (2)$$

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{\left(1 + \frac{I}{K_i} \right) (K_m + S)} \quad (3)$$

A melhor estimativa dos coeficientes cinéticos e do tipo de inibição causado pela

presença de galactose foi definida pelo menor valor apresentado pela soma de quadrados do resíduo da regressão.

2.5 Efeito de Glicose na Atividade de β -Galactosidase.

Foram testados ausência e presença de 3 níveis de glicose (0; 10; 30 e 50mM), totalizando 4 reatores com uma concentração fixa de lactose de 100 mM. Os volumes de lactose e glicose para o preparo dessas reações foram retiradas de uma solução estoque de 300 mM de lactose e 300 mM de glicose diluídos em tampão fosfato. Adicionou-se em cada reator 30 mg de massa de células permeabilizadas, com uma concentração no volume final de reação de 1mg/ml. Completou-se o volume de reação com tampão fosfato. Foram utilizados 4 frascos erlenmeyers de 50 ml como reatores contendo cada um 30 ml de mistura de reação. As reações foram conduzidas à temperatura ambiente (25°C), sob agitação. Foram retiradas 500µl de amostra de cada reator a cada intervalo de 15 min até 3 horas de reação. A reação foi paralisada com 500µl de TCA (ácido tricloroacético) 4,5%. As amostras foram armazenadas sob congelamento para posterior análise. No momento da análise, as amostras foram descongeladas, centrifugadas (Marathon micro A) a 9000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante diluído em água ultrapura. As concentrações de glicose, lactose e galactose foram Cromatografia Líquida de Alto Desempenho no equipamento HP 1050M (Hewlett Packard) utilizando coluna HPX 87 H(Bio Rad) e detector de índice de refração. Os carboidratos foram eluídos da coluna com H₂SO₄ 0,005M num fluxo de 0,7 ml/min e temperatura de 60 °C.

2.5 Efeito combinado de Galactose e Glicose na Atividade da β -Galactosidase

Foram testados 3 níveis de glicose e de galactose (10; 30 e 50mM), totalizando 9 combinações. A concentração de lactose de 100 mM foi a mesma em todas as combinações. Os volumes de lactose, glicose e galactose para o preparo dessas reações, foram retirados de uma solução estoque de 300 mM de cada açúcar diluídos em tampão fosfato. Adicionou-se em cada reator 30mg de massa de células permeabilizadas, com uma concentração no volume final de reação de 1mg/ml. Completou-se o volume de reação com tampão fosfato. Foram utilizados 9 frascos erlenmeyers de 50 ml como reatores contendo cada um 30 ml de mistura de reação sob agitação. As reações foram conduzidas à temperatura ambiente

(25°C). Foram retiradas 500µl de amostra de cada reator a cada intervalo de 15 min até 3 horas de reação. A reação foi paralisada com adição de 500µl de TCA 4,5% e pH = 1,0. As amostras foram armazenadas sob congelamento para posterior análise. Para a análise dos conteúdos de lactose, glicose e galactose, foi utilizado o procedimento descrito no item 2.4.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da Galactose na atividade de β-Galactosidase

O efeito de diferentes concentrações de galactose na atividade de β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* está representado na Figura 1. Os símbolos representam as velocidades iniciais para cada combinação lactose e galactose e as linhas foram calculadas a partir do modelo de inibição competitiva

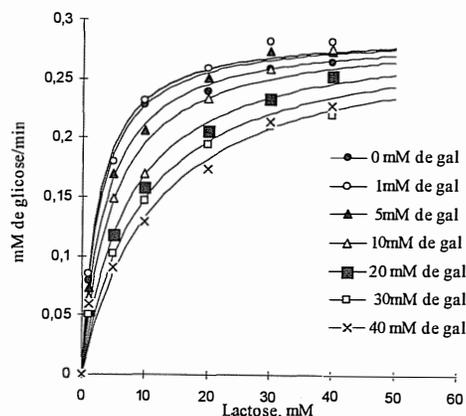


Figura 1 - Efeito da concentração de substrato na Cinética de hidrólise de lactose por β-galactosidase na presença de diferentes níveis de galactose. Dados experimentais (●) e ajuste (¾) ao modelo de Inibição Competitiva (Regressão não-linear SAS).

Tabela 1 - Valores estimados dos coeficientes cinéticos pelas equações de linearização dos modelos tradicionais e regressão não-linear pelo procedimento NLIN do Sistema SAS (método iterativo Marquardt).

	V _{máx.} (mM/min)	K _m , mM	K _i , mM	SQ do Resíduo da regressão
Modelo de Michaelis-Menten				
Lineawear-Burk	0,278	2,525	-	0,0081
Langmuir	0,281	2,721	-	0,0074
Eadie-Hofstee	0,275	2,551	-	0,0079
Regressão não-linear	0,280	2,609	-	0,0006
Competitiva	0,291	2,536	10,88	0,0256
Não-Competitiva	0,320	4,538	91,393	0,0479

(Figura 1). Os valores dos coeficientes cinéticos estimados V_{máx.}, K_m e K_i, estão apresentados na Tabela 1. Foi verificado que a presença de galactose no meio afetou a atividade de β-galactosidase na hidrólise da lactose. A definição do tipo de inibição causada pela galactose foi baseada no menor valor apresentado pela soma de quadrados do resíduo da regressão. A galactose foi um inibidor competitivo da reação como verificado por outros autores. Segundo BORGLUN e STERNBERG (1972), 20,8 mM de galactose reduziu em 37% a atividade hidrolítica da lactase de *Aspergillus foetidus*. GREENBERG e MAHONEY (1982) verificaram que a atividade da β-galactosidase de *Streptococcus thermophilus* foi afetada pela galactose de forma competitiva e o valor de K_i foi igual a 60 mM. O método utilizado para estimar os coeficientes cinéticos foi a linearização da equação cinética originando o gráfico de Lineweaver-Burk de 1/v versus 1/s.

Segundo DICKSON et al. (1979) o valor de

K_m para *Kluyveromyces lactis* foi 1,6 mM quando o substrato foi ONPG e 16,8 mM quando o substrato foi lactose. Segundo OHMIYA et al. (1977) os coeficientes cinéticos V_{máx.} e K_m foram 0,33mM/min e 30mM respectivamente estimados pelo gráfico de Lineweaver-Burk e o tipo de inibição causado pela galactose sobre a enzima de *Kluyveromyces lactis* foi competitiva. CHAMPLUVIER et al. (1988) estimaram os valores de K_m e V_{máx.} para lactase de *K. lactis* em 4,2 ± 0,2 mM e 3,8 ± 0,1 U_{ONPG}.mg⁻¹ peso seco respectivamente pelo gráfico de Eadie-Hofstee. Através do método iterativo, e um procedimento de regressão não-linear descrito por Barlow (1983) os mesmos autores estimaram K_m em 4,2 ± 0,1 mM e V_{máx.} em 3,71 ± 0,02 U_{ONPG}.mg⁻¹ peso seco. SAITO et al., 1994 utilizando um mutante de *Escherichia coli* com uma enzima termoestável, estimaram o valor de K_m em 2mM e K_i em 14,7 mM (pH 6,0 e 78°C) pelo gráfico de Dixon e o mesmo tipo de inibição competitiva, causado pelo galactose. Também foi observado no trabalho de HENG et al. (1994) esse tipo de inibição causado pela galactose sobre a enzima imobilizada de *Escherichia coli* e os coeficientes cinéticos foram determinados pela equação de Michaelis-Menten com inibição competitiva. Os valores variam entre 0,309 a 0,263 µmol/min para V_{máx.}; 4,34 a 2,98 µmol/ml para K_m e 34 a 82 µmol/ml para K_i. De acordo com os resultados reportados, verifica-se a ampla faixa de variações dos coeficientes. No presente trabalho, nas condições descritas, foram estimados valores de 0,291mM/min; 2,536 mM e 10,88mM para V_{máx.}, K_m e K_i, respectivamente. A vantagem da utilização de programas de computadores tem sido vista como uma melhor forma na estimativa dos coeficientes cinéticos (V_{máx.}, K_m e K_i) em comparação com os métodos tradicionais de linearização propostos para a equação de Michaelis-Menten e suas equações derivadas (FONTES, 2001 e 1998). Com o uso de programas estatísticos, como SAS, podemos determinar os valores mais prováveis e precisos das constantes de reação e ao mesmo tempo definir o modelo que mais se ajusta aos dados experimentais. Segundo SHUKLA et al. (1993) no planejamento de reatores de enzimas, o tipo de inibição por produto deve ser levado em consideração. No caso de modelos baseados em inibição competitiva, o aumento na concentração de substrato pela pré-concentração ou adição de substrato fresco nos reatores de bateladas ou contínuo poderá aumentar a hidrólise da lactose. Conforme representado na Figura 2, a atividade da enzima não foi afetada pela glicose nas concentrações testadas.

3. 3 Efeito combinado de Galactose e Glicose na Atividade da β-Galactosidase.

A Tabela 2, mostra a influência da presença da mistura de galactose com glicose em várias

concentrações, na velocidade de hidrólise de lactose. Assumindo,

$$V = f(\text{Galactose}) \cdot f(\text{Glicose})$$

e o modelo proposto no presente trabalho para estimar o efeito da presença de galactose na velocidade da reação (f(galactose)), é possível estimar o efeito independente da glicose:

$$f(\text{Glicose}) = \frac{V_{ab}}{f(\text{Galactose})}$$

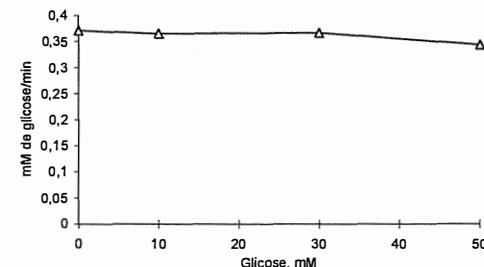


Figura 2 - Efeito da concentração de glicose na cinética de hidrólise de lactose por β-galactosidase (Concentração de lactose de 100mM).

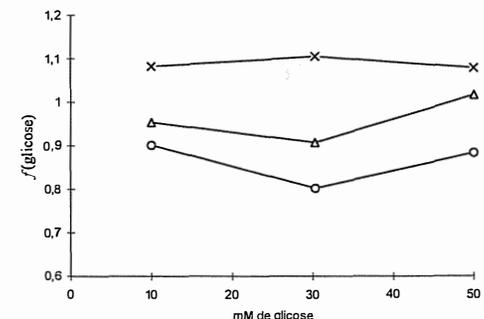


Figura 3 - Efeito dos valores de f(glicose) para as diferentes condições iniciais de reação na presença de galactose. (x) galactose = 10 mM, (Δ) galactose = 30 mM e (o) galactose = 50 mM.

A Figura 3 apresenta os valores f(glicose) para as diferentes condições iniciais de reações. Não é possível se observar nenhuma tendência de efeito inibidor na velocidade da reação devido a presença de glicose. A presença de galactose na mistura de reação afeta a velocidade de hidrólise da lactose.

Estes resultados comprovaram os resultados anteriores, no qual concentrações de glicose na faixa de 10 a 50 Mm não tem efeito inibidor.

4 CONCLUSÃO

A influência dos produtos (glicose e galactose) sobre a velocidade de hidrólise de lactose por uma massa de células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis* e as estimativas dos coeficientes cinéticos V_{max} , K_m e K_i utilizando um programa estatístico foram realizados. O efeito de inibição competitiva por galactose foi observado e a glicose não afetou a velocidade de hidrólise da lactose nas concentrações testadas. Com o objetivo de definir uma equação matemática mecanística capaz de descrever a hidrólise de lactose, sugerimos que:

$$\frac{d(Lactose)}{dt} = -f(Galactose), \text{ ou seja}$$

$$\frac{d(Lactose)}{dt} = - \frac{V_{max} \cdot S}{S + K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

Os valores de V_{max} , K_m e K_i utilizados para esse modelo foram respectivamente a $0,291 \pm 0,01$ mM/min; $2,536 \pm 0,412$ mM e $10,88 \pm 8,86$ mM.

ABSTRACT

The effect of different galactose concentrations, glucose and of galactose mixture and glucose in the kinetics of lactose hydrolysis for β -galactosidase using permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis* as biocatalisador was accomplished. The experiments were accomplished in room temperature (25°C), using a suspension of 1mg/ml of permeabilized cell mass in phosphate buffer in the reaction mixture. For the galactose effect in the activity of the enzyme, they were different combined lactose concentrations (0, 1, 5,

10, 20, 30 and 40 mM) with different galactose concentrations (0, 1, 5, 10, 20, 30 and 40 mM). The reaction was accompanied in spectrophotometer DU in 510 nm for the measure of liberated glucose. The units of absorbance were transformed in glucose (mM), through a curve of appropriate calibration. During the studies of the galactose effect about the activity of the β -galactosidase, was used a statistical program of computer that aided in the calculation of the kinetic coefficients (V_{max} , K_m and K_i) in a necessary and correct way and it also helped in the choice and definition of a model mechanistical mathematical applicable in the understanding of the process of lactose hydrolysis taking into consideration the inhibition form caused by the galactose presence. The inhibition competitive or no-competitive was defined by the smallest value presented by the residual sum of squares using the Marquardt iterative method of non-linear regression (NLIN) program of the statistical analysis system (SAS). The kinetic coefficients V_{max} , K_m and K_i also dear for the same program, corresponded respectively to 0.291 ± 0.01 mM/min; 2.536 ± 0.412 mM and 10.88 ± 8.86 mM in the interval of trust of 95%. The inhibition type caused by the galactose presence was competitive for β -galactosidase of *Kluyveromyces lactis*.

Keywords: Inhibition kinetics; galactose, lactose hydrolysis.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York: McGraw, 1986. 567p.
 BORGLUM, G. B., STERNBERG, M. Z. Properties of a fungal lactase. **Journal of Food Science**. 1972. 37:619-622.

Tabela 2 - Influência das concentrações de glicose e galactose na velocidade de hidrólise de lactose.

glicose, mM	galactose, mM	V_{ob} (mM/min)	f (galactose)*	f (glicose)**
10	10	0,3005	0,2775	1,083
30	10	0,3066	0,2775	1,105
50	10	0,2994	0,2775	1,079
10	30	0,2534	0,2656	0,954
30	30	0,2411	0,2656	0,908
50	30	0,2702	0,2656	1,017
10	50	0,2298	0,2548	0,9019
30	50	0,2044	0,2548	0,8022
50	50	0,2253	0,2548	0,8843

* $f(Galactose) = (V_{max} \cdot S \cdot K_i) / (K_i \cdot S + K_m \cdot K_i + I \cdot K_m)$ Assumiu-se os valores dos coeficientes cinéticos para inibição competitiva da Tabela 1 e $S = 100$ mM.

** $f(Glicose) = V_{ob} / f(Galactose)$

CHEN, K-C., J-H HOUNG, LING, A. C. Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose. **Enzyme Microb. Technol.** 1985. 7: 510- 514.

CLAMPLUVIER, B., KAMP, B., ROUXHET, P. G. Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp.* **Enzyme Microb. Technol.**, 1988, 10:611-617.

DICKSON, R. C., DICKSON, L. R., MARKIN, J. S. Purification and properties of inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**. 1979. Volume 137, No 1. 51-61.

FONTES, E. A. F.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V. A mechanistical mathematical model to predict lactose hydrolysis by β -galactosidase in a permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis*: validity and sensitivity analysis. **Process Biochemistry**. 2001. 37:267-274.

FONTES, E. A. F. **Cinética de hidrólise de lactose utilizando células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*: um modelo matemático mecanístico**, MG:UFV, 1998.79p. Dissertação (Mestrato em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

GREENBERG, N. A., MAHONEY, R. R. Production and Characterization of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. **Journal Food Science**. 1982. 47:1824-1835.

HENG, M. H., GLATZ, C. E. Ion Exchange Immobilization of Charged β -galactosidase Fusions for Lactose Hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**. 44. 745-752. 1994.

LEE, J. M., 1992. Enzyme Kinetics. Chapter 2.

In: Simple Enzyme Kinetics. Simon & Schuster Company. Englewood Cliffs, New Jersey 07632. p. 51.

OHMIYA K., OHASHI, H., KOBAYASHI, T., SHIMIZU, S. Hydrolysis of lactose by immobilized microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. 1977.33:137-145.

POMERANZ, Y. Lactase (beta-D-galactosidase). I. Occurrence and properties. **Food Technology**. 1964. 88-92.

SAITO, T. Y. Y., KAWASHIMA, K., LIN, et al. Immobilization and Characterization of thermostable β -galactosidase from thermophilic anaerobe on a porous ceramic support. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 1994. 40: 618- 621.

SAS Intitute Inc. **SAS/STAT™ User's Guide**, Release 6.03 Edition. Cary, NC:SAS Institute Inc., 1988. 1028 p.

SCOTT, T. C., JR., HILL C. G., AMUNDSON, C. H. Determination of steady-state behavior of immobilized β -galactosidase utilizing na integral reactor scheme. **Biotechnology and Bioengineering**. 15:432-445.

SISO, M. I. G., FREIRE, A., RAMIL, E., et al., Covalent Immobilization of β -galactosidase on Corn Grits. A System for Lactose Hydrolysis Without Diffusional Resistance. **Process Biochemistry**. 29 (1994) 7-12.

VOGET, C. E., FLORES, M. V., FALOCI, M. M., ERTOLA, R. J. J. Effects of the Ionic Environment on the Stability of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. 1994. **Lebensm-Wiss. u- Technol**. 27. 324-330.

VALIDADE E ANÁLISE DE SENSIBILIDADE DOS COEFICIENTES CINÉTICOS DO MODELO MATEMÁTICO MECANÍSTICO PROPOSTO PARA PREDIZER A CINÉTICA DE HIDRÓLISE DE LACTOSE POR B-GALACTOSIDASE DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Validity and sensitivity analysis of the kinetic coefficients of a mechanistical mathematical model proposed to predict lactose hydrolysis by β -galactosidase in permeabilized cell mass of *kluveromyces lactis*

Edimar A. F. Fontes¹
Flávia M. L. Passos²
Frederico J. V. Passos³
Paulo Rogério Fontes¹

RESUMO

Um modelo matemático mecanístico foi desenvolvido para descrever a hidrólise de lactose, levando em consideração o efeito de inibição por galactose. Foi utilizado um sistema dinâmico de equações diferenciais ordinárias da variação de lactose, glicose e galactose com o tempo. Essas equações foram resolvidas no programa Fortran 90 que gerou uma tabela de dados simulados de lactose, glicose e galactose ao longo do tempo. A análise de sensibilidade dos coeficientes do modelo foi realizada variando em $\pm 20\%$ os valores dos coeficientes cinéticos. As concentrações de glicose e galactose não foram influenciadas pelas variações nos coeficientes K_m e K_i , sendo que um aumento no valor de V_{max} em 20% observou-se um melhor ajuste do modelo com os dados experimentais. Para a validação do modelo, foram realizados testes de hidrólise em solução tampão fosfato contendo 5% de lactose e em leite desnatado com teor de lactose de 4,8%. O modelo representou satisfatoriamente o processo de hidrólise em solução tampão fosfato com 5% de lactose. Para esta solução a variação entre o valor medido e o predito de glicose foi de 4%, quando 75% de hidrólise foi atingida, alterando o valor de V_{max} em 30%. No caso da hidrólise da lactose do leite, verificou-se uma variação entre as concentrações de glicose medida e predita de 13% quando 85% da hidrólise foi atingida. Os dados simulados pelo modelo apresentaram boa correlação com os dados experimentais originados da hidrólise de lactose em tampão fosfato contendo 5% de lactose e em leite desnatado.

1 INTRODUÇÃO

Estudos cinéticos em processos enzimáticos têm sido amplamente considerados no projeto de reatores e controle de processos fornecendo informações sobre mecanismos básicos de reação e outros fatores que caracterizam as propriedades o sistema (FONTES, 2001). A utilização de programas computacionais tem uma grande aplicação em princípios cinéticos na determinação dos valores mais prováveis e da precisão dos coeficientes cinéticos (FONTES, 1998). A definição de um

modelo matemático mecanístico que descreva a cinética de hidrólise de lactose é de grande importância no planejamento de um bioreator adequado. Um modelo matemático de um processo particular consiste de uma ou de um conjunto de equações que descrevem o processo. Os modelos matemáticos podem ser classificados como empíricos ou mecanísticos. Modelos empíricos descrevem meramente o comportamento do sistema com base nos dados experimentais, não refletindo o completo entendimento do sistema. Assim, um modelo empírico possui apenas uma função descritiva. Tal

1 Professores DS, Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba, Rio Pomba-MG;
2 Professora PhD, Departamento de Microbiologia, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG;
3 Professor PhD - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

modelo vem sendo usado em alimentos para prever a vida de prateleira dos produtos, detectar pontos críticos na produção e distribuição (ZWIETERING et al., 1990). Quando o objetivo do modelo é o entendimento global do sistema, é necessário a utilização de um modelo mecanístico (BAILEY e OLLIS, 1986 e PARULEKAR, 1985). Exemplos de modelos mecanísticos podemos citar a equação de Michaelis-Menten e suas derivadas utilizadas para descrever a cinética de enzima; a equação de Arrhenius e outras mais. Segundo REKLAITIS, (1983) uma vez definida a equação, o seu ótimo ainda não está completo. De fato, a equação vai servir como uma base nos estudos de validação e análise de sensibilidades para as mudanças ocorridas nos parâmetros da equação. Para a equação ser válida, ela terá que representar o ótimo e satisfatoriamente as condições reais do sistema para determinadas condições. A próxima fase de avaliação do sistema é determinar a sensibilidade da solução para as mudanças ocorridas nos parâmetros do modelo. Isso é chamado de análise de sensibilidade. Há várias razões para executar uma análise de sensibilidade: 1) Achar um ou mais parâmetros com correlação a qual o ótimo da solução é muito sensível; 2) Extrair informações sobre adição ou modificações no sistema para melhorar a operação como um todo; 3) Esclarecer o efeito no sistema das variações na imprecisão dos parâmetros conhecidos; 4) Sugerir os efeitos prováveis de variação nos extremos dos parâmetros que são incontroláveis. Pelo fato deste tipo de informação ser tão importante na implantação de uma solução num sistema real, uma análise de sensibilidade detalhada é, em muitos casos, mais valiosa que a própria solução ótima atual. O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo sobre as variações nos coeficientes cinéticos do modelo matemático proposto para a hidrólise de lactose, assumindo galactose como inibidor e verificar a aplicação do modelo em um meio sintético com 5% de lactose e em leite.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os dados utilizados nessa análise foram obtidos nos Laboratórios de Fisiologia de Microrganismo do Departamento de Microbiologia (DMB), instalados no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e analisados no Laboratório de Computação do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa.

2.1 Nomenclatura

Os seguintes termos foram usados:
[S] = concentração de lactose em milimolar;
[I] = concentração do inibidor (galactose) em milimolar;
V = velocidade de reação em milimolar/minuto;

Os seguintes coeficientes foram usados:
 V_{max} = velocidade máxima de reação em milimolar/minuto;
 K_m = constante de Michaelis-Menten em milimolar;
 K_i = constante de inibição em milimolar;
K = taxa de desvio de galactose para reação de transferase em mM/min;

2.2 Estimativa da constante K

Para estimar a constante K foram utilizados os dados de concentrações de glicose e galactose, produzidos na hidrólise de 100 mM de lactose, durante 3h de reação, em temperatura ambiente, contendo 1mg/mL de massa de célula permeabilizada de *Kluveromyces lactis* contendo a enzima β -galactosidase. Foram retiradas 500 μ l de amostra a cada intervalo de 15 min até 3 horas de reação. A reação foi paralisada com adição de 500 μ l de TCA 4,5%. Foi assumido uma reação equimolar de um milimolar de lactose para cada milimolar de glicose e galactose produzida. Os conteúdos de glicose foram determinados por HPLC, conforme descrito no item 2.4. A constante K foi estimada a partir da inclinação da reta do gráfico de galactose utilizada na reação de transferase em mM em função do tempo de reação.

2.3 Solução numérica e análise de sensibilidade dos coeficientes do modelo

O sistema dinâmico de equações diferenciais ordinárias foi resolvido por meio do método Runge-Kutta Fehlberg 4^o ordem, escrito por Hien T. Tran, com variação no tamanho do passo (PASSOS et al., 1994) utilizando um computador pentium 100 e linguagem Fortran 90 trabalhando em ambiente Windows. As equações diferenciais ordinárias foram:

$$\frac{d(Lactose)}{dt} = - \frac{V_{max} \cdot S}{S + K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

$$\frac{d(Glicose)}{dt} = - \frac{d(Lactose)}{dt}$$

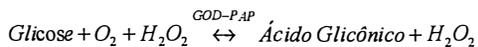
$$\frac{d(Galactose)}{dt} = - \frac{d(Lactose)}{dt} - K \cdot [I]$$

Uma subrotina foi desenvolvida, usando-se como variáveis de entrada os valores iniciais de lactose, glicose, galactose, constante K e tempo de reação, com a geração de tabelas com as variações ao longo do tempo de lactose, glicose e galactose. Para ilustrar o efeito das variações nos coeficientes cinéticos do modelo, foram realizadas simulações, alterando em $\pm 20\%$ os valores estimados por FONTES (1998) dos coeficientes do modelo V_{max} , K_m e K_i que corresponderam a $0,291 \pm 0,01$ mM/min;

2,536 ± 0,412 mM e 10,88 ± 8,86 mM no intervalo de confiança de 95%, respectivamente.

2.4. Verificação da Validade do Modelo

Para avaliar a validade do modelo foram realizados testes de hidrólise em solução 5% lactose (lactose foi diluída no tampão fosfato) e em leite desnatado contendo 4,8g/L de lactose. Foi utilizado como reator 2 erlenmeyers de 125 ml contendo cada um 50ml de leite e 50 ml de solução de lactose 5% . Foi adicionado 50 mg de massa de células permeabilizadas em cada erlenmyer para obter no final uma concentração 1mg/ml. Foram retirados 500µl de amostra do reator em intervalos de tempo de 15 minutos, no total de 450 minutos (7,5 horas) e a reação foi paralisada com 500µl TCA (ácido tricloroacético) 4,5%. As amostras foram congeladas para que posteriormente fossem analisadas. Após serem descongeladas, foram centrifugadas em uma microcentrifuga a 9000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e diluído em água ultrapura. Os conteúdos de glicose foram determinados em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho no equipamento HP 1050M (Hewlett Packard) utilizando coluna HPX 87 H(Bio Rad) e detector de índice de refração. Os carboidratos foram eluídos da coluna com H₂SO₄ 0,005M num fluxo de 0,7 ml/min e temperatura de 60 °C. Também os conteúdos de glicose foram determinados por espectrofotometria utilizando sendo que ao volume da mistura de reação (500 µl) foi adicionado 2ml de reagente GOD-PAP® para análise espectrofotométrica de glicose produzida durante reação. Na análise espectrofotométrica o GOD (Glicose Oxidase) oxida a glicose, que foi liberada da hidrólise da lactose, para ácido glicônico resultando num produto de cor violeta com a intensidade de cor proporcional à concentração de glicose no meio. O princípio da reação é:



As reações foram acompanhadas em espectrofotômetro (Beckman DU® 640), comprimento de onda de 510nm, que forneceu uma curva da variação de absorvância com o tempo de reação. No início da curva, temos a adaptação das enzimas envolvidas no sistema de reação (GOD-PAP e β-galactosidase) que logo em seguida atinge o steady-state, ou seja, velocidade constante de reação. A inclinação da reta apresentada para cada curva correspondeu as velocidades iniciais para cada combinação de célula permeabilizada e de lactose. A conversão de absorvância em unidades de mM de glicose, foi feita a partir de uma curva padrão. Os dados estimados pelo modelo foram comparados com os dados experimentais da hidrólise de lactose em leite desnatado e solução de 5% de lactose.

3 RESULTADOS E DICUSSÃO

3.1 Estimativa da constante K.

Durante as análises em HPLC, foi assumido uma reação equimolar de um milimolar de lactose para cada milimolar de glicose e galactose produzida, mas foi observado que a reação de hidrólise de lactose não gerava concentrações iguais de glicose e de galactose como era previsto. Uma possível justificativa é o envolvimento da galactose em reações de transferases para formar oligossacarídeos que pode ser observado na Figura 1 indicado pela seta. Outra justificativa que pode fortalecer essa sugestão é que durante as análises em HPLC, foi observado uma relação do pico formado com a concentração de galactose, ou seja, à medida que o pico aumentava, a concentração de galactose foi menor que o valor esperado (Figura 1).

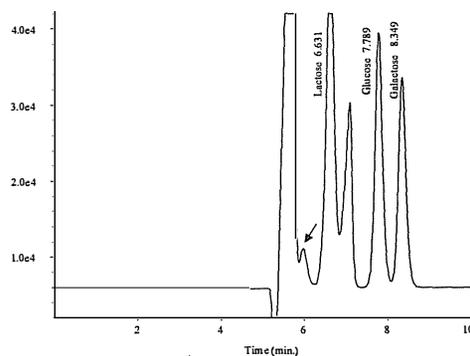


Figura 1 – Cromatograma da hidrólise de lactose em glicose e galactose no tempo de 3 horas de reação.

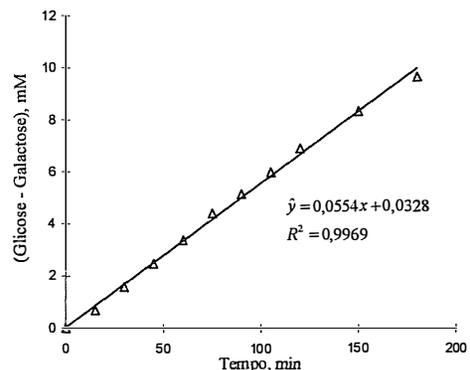


Figura 2 - Determinação da taxa de utilização (K) de galactose utilizada em reação de transferase durante o estudo da hidrólise de lactose.

A Figura 2 ilustra o cálculo do valor de K que foi utilizado para corrigir os valores estimados da concentração de galactose que possivelmente foi desviada para reação de transferase. Pela regressão linear dos dados, estimou-se um valor de K correspondente a 0,0554mM/min.

3. 2 Solução numérica e análise de sensibilidade dos coeficientes do modelo.

As Figuras 3, 4 e 5 mostram a hidrólise de lactose na presença de glicose e galactose. A quantidade de lactose hidrolisada foi calculada a partir da glicose formada. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha o modelo proposto. Variações em 20% nos valores Km e Ki não

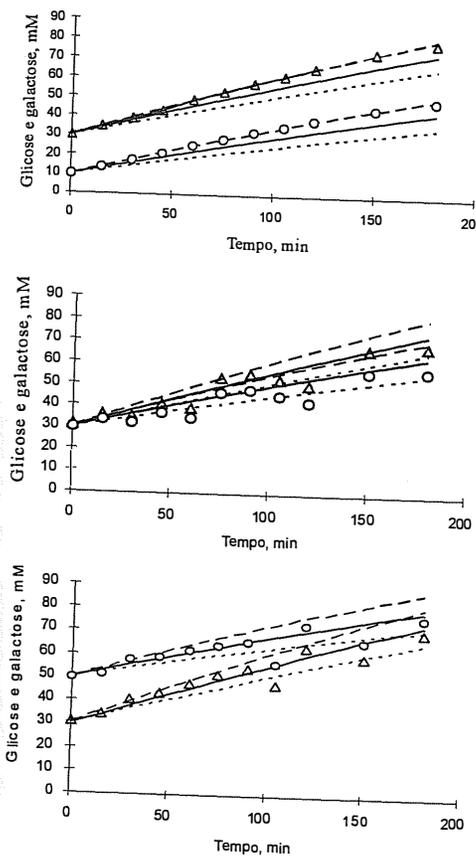


Figura 3 - Efeito das variações em V_{max} sobre a hidrólise de lactose na presença de glicose e galactose (....) V_{max} -20% e (---) V_{max} +20%. Os símbolos representam os dados experimentais (o) galactose e (Δ) glicose

afetaram a hidrólise de lactose. Enquanto que para o valor de V_{max} estimado foi aumentado em 20%, o modelo se adequou melhor aos dados experimentais para as concentrações iniciais de 30 e 10 mM de glicose e galactose respectivamente.

3. 3 Verificação da Validade do Modelo

As Figuras 6 e 7, mostram a hidrólise de lactose numa solução contendo 5% de lactose e em leite respectivamente. Os símbolos representam os dados experimentais e as linhas o modelo proposto para hidrólise de lactose em função da formação de glicose no meio. O modelo representou satisfatoriamente o processo de hidrólise em solução 5% de lactose com o aumento no valor de V_{max}. de 30%. Para essa

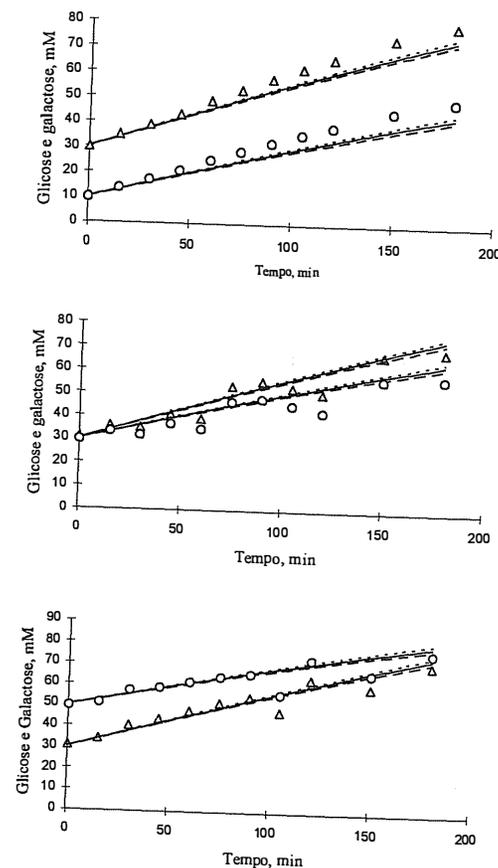


Figura 4 - Efeito das variações em Km sobre a hidrólise de lactose na presença de glicose e galactose (....) K_m -20% e (- - -) K_m +20%. Os símbolos representam os dados experimentais para (o) galactose e (Δ) glicose.

solução a variação entre o valor medido e o valor predito de glicose foi de 4 %, quando aproximadamente 75% da hidrólise de lactose foi atingida. Observa-se na Figura 7, que a taxa de hidrólise de lactose em leite foi ligeiramente maior que a taxa de hidrólise proposto pelo modelo. Para hidrólise no leite, verificou-se uma variação entre as concentrações de glicose medida e predita de 13% quando aproximadamente 85% da hidrólise foi atingida. Resultados de MAHONEY e ADAMCHUCK (1980), indicaram que a atividade de lactase (β -galactosidase) de leveduras possuem maior atividade em leite desnatado que em solução tampão. Os autores sugerem que os componentes do leite, principalmente as proteínas do soro e caseína, foram ativadores dessa enzima em *Kluyveromyces fragilis*.

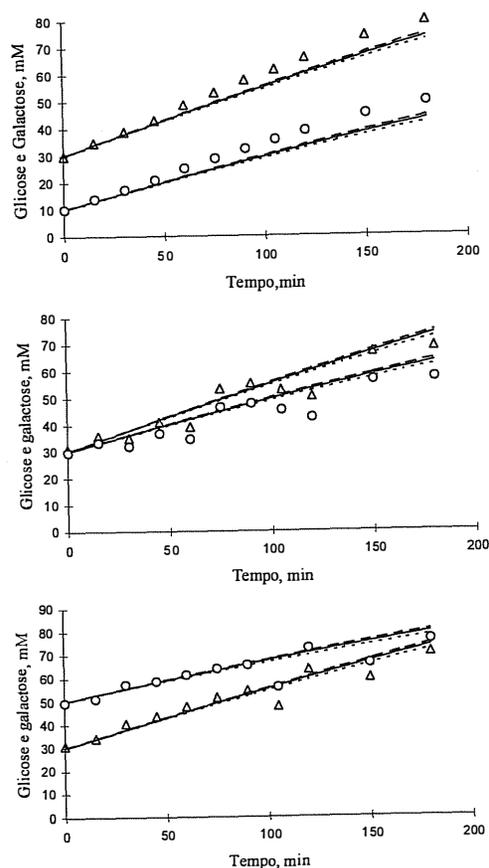


Figura 5 - Efeito das variações em K_i sobre a hidrólise de lactose na presença de glicose e galactose (...) K_i -20% e (---) K_i +20%. Os símbolos representam (o) galactose e (Δ) glicose.

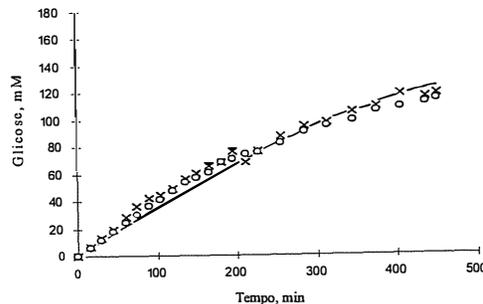


Figura 6 - Hidrólise de lactose em solução de 5% de lactose. Os símbolos (o) representam as concentrações de glicose obtida em HPLC e (x) em espectrofotômetro. A linha representa os valores estimados pelo modelo com $V_{max} + 30%$.

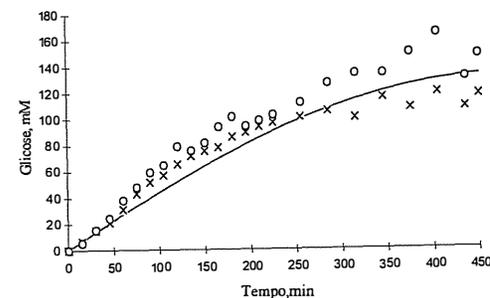


Figura 7 - Hidrólise de lactose em leite. Os símbolos (o) representam as concentrações de glicose obtida em HPLC e (x) em espectrofotômetro. A linha representa os valores estimados pelo modelo com $V_{max} + 62,5%$.

4 CONCLUSÕES

Novas linhas de trabalho podem ser conduzidas a partir dos resultados aqui obtidos. A construção de um bioreator enzimático para produção contínua de leite e/ou soro hidrolisado utilizando para isso um sistema de enzima imobilizada deve-se levar em conta parâmetros cinéticos obtidos com a enzima solúvel.

ABSTRACT

The mechanistical mathematical model was developed to describe the lactose hydrolysis, taking into consideration the inhibition effect for galactose. It was used a dynamic system of ordinary differential equations of the lactose

variation, glucose and galactose with the time. Those equations were resolved in the Fortran 90 program that generated a table of simulated data of lactose, glucose and galactose along the time. The analysis of sensibility of the coefficients of the model was accomplished varying in $\pm 20%$ the values of the kinetic coefficients. The glucose concentrations and galactose were not influenced by the variations in the coefficients K_m and K_i , and an increase in the value of V_{max} in 20% a better adjustment of the model was observed with the experimental data. For the validation of the model, hydrolysis tests were accomplished in solution phosphate buffer containing 5% of lactose and in skimmed milk with of 4.8% lactose. The model represented the hydrolysis process satisfactorily in solution phosphate buffer with 5% of lactose. For this solution the variation among the measured value and predicted of glucose was of 4%, when 75% of hydrolysis were reached, altering the value of V_{max} in 30%. In the case of the lactose hydrolysis of the milk, a variation was verified among the concentrations of measured glucose and predicted of 13% when 85% of lactose hydrolysis was reached. The simulated data for the model presented good correlation with the originated experimental data of the lactose hydrolysis in half synthetic containing 5% of lactose and in skimmed milk.

Keywords: Milk; galactose; inhibition.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York: McGraw-Hill, 1986. 567 p.

BURVALL, A., ASP, N.G. & DAHLQVIST, A. Oligossaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (maxilact®) - part 3: digestibility by human intestinal enzymes *in vitro*. **Food chemistry**. 1980. 5: 189-194.

FONTES, E. A. F.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V. A mechanical mathematical model

to predict lactose hydrolysis by β -galactosidase in a permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis*: validity and sensitivity analysis. **Process Biochemistry**. 2001. 37:267-274.

FONTES, E. A. F. **Cinética de hidrólise de lactose utilizando células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*: um modelo matemático mecanístico**, MG:UFV, 1998. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

IWASAKI, K., NAKAJIMA, M., NAKAO, S. Galacto-oligosaccharide production from lactose by the enzyme batch reaction using β -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 69-76, 1996.

MAHONEY, R. R., ADAMCHUK, C. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of food science**. 1980. 45: 962-964.

SMART, J. B. Transferase Reactions of β -galactosidase - New products opportunities. 1994. Chapter 4. **bulletin of the IDF** 289.16-22.

PARULEKAR, S. J., LIM, H. C. Modelling, optimization and control of semi-batch bioreactors. In: Fietchter, A. **Advances in biochemical - engineering/biotechnology**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Cap. 5, p. 207-219.

PASSOS, F. V., FLEMING, H. P., OLLIS, D. F. et al, Kinetics and Modeling of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Raleigh, v. 60, n. 7, p. 2627-2636, July, 1994. EKLAITIS, G. V., RAVINDRAN, A., RAGSDELL, K., M. **Engineering optimizaton**. USA. 1983. 684 p

ZWIETERING, M. H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F. M., et al. Modeling of bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, June, 1990.

TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO DE QUEIJO PARA DETERMINAÇÃO DE CONDIÇÕES IDEAIS PARA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR FERMENTAÇÃO COM *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*

Thermal treatment of cheese whey for determination of suitable conditions for β -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* fermentation.

Sara Hott¹;
Lorena Machado Amaral¹;
Raúl J. H. Castro-Gómez²;
Claudia E. C. Bravo-Martins^{3*}

RESUMO

Nos últimos anos têm-se estudado aplicações viáveis para o soro do queijo, devido ao grande volume produzido diariamente e da poluição ambiental causada pela ausência de um destino adequado para o mesmo. Dentre as várias pesquisas de aproveitamento biotecnológico do soro de queijo, destaca-se a sua utilização como substrato para fermentação visando à obtenção de vários produtos, dentre eles a β -galactosidase. Este trabalho teve como objetivo tratar o soro de queijo termicamente para extinguir a microbiota contaminante sem alterar a estabilidade da estrutura protéica. O soro de queijo foi tratado termicamente por vapor fluente durante 3, 5, 10 e 15 minutos e por pressão durante 3, 5, 10 e 15 minutos. Após o tratamento térmico, foi feita uma contagem em placas em meio de cultura PCA e a precipitação das proteínas foi verificada visualmente. Os resultados experimentais mostraram que o tratamento sob pressão é eficaz para inviabilizar o crescimento microbiano, entretanto ocorre uma desnaturação protéica bem acentuada. Já o tratamento térmico por vapor fluente foi eficaz na eliminação dos microrganismos e não ocorreu a desnaturação protéica visível. Assim, para a produção de β -galactosidase será empregado o tratamento térmico sob vapor fluente.

Palavras-chave: β -galactosidase, desnaturação protéica, aproveitamento biotecnológico, *Kluyveromyces marxianus*

1 INTRODUÇÃO

O soro, resultante da fabricação de queijos, representa um subproduto da indústria laticínica rico em componentes nutricionais. A utilização industrial desse subproduto vem nas últimas décadas tendo grande desenvolvimento, tomando proporções cada vez maiores, tendo-se em vista a carência alimentar em várias partes do mundo. Além de ser rico em proteína, lactose e sais minerais o seu processamento vem contribuir para o meio ambiente (SOUZA, et al., 2004). Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo-ABIQ, a produção anual de queijos no Brasil tem-se mantido em cerca de 350.000

toneladas nos últimos anos, o que corresponde à produção de cerca de 3,5 milhões de toneladas de soro de queijo utilizado principalmente como alimento animal na sua forma bruta ou processado em pó para a produção de biscoitos e alimentos lácteos (PONSANO; CASTRO-GÓMEZ, 1995). O elevado custo para a desidratação do soro limita sua adoção como prática comum (MORESI, 1994). Conseqüentemente, grande parte do soro de queijo produzido em diversas partes do mundo ainda é incorporado às águas residuais dos laticínios, sendo a principal fonte poluidora do meio ambiente gerada por esse setor (MARWANA; KENNEDY, 1988; PONSANO; CASTRO-GÓMEZ, 1995).

1 Alunas da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.
2 Professor Titular do Departamento de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, PR.
3 Professora da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – PR (*autor para correspondência: claudiacastro@utfpr.edu.br)

De forma a implementar ações de incorporação tecnológica para reduzir os problemas ambientais, agregar valor ao produto e aumentar fontes de renda, são necessários dados sobre o perfil microbiológico deste produto. Assim, desde o momento de pasteurização do leite até a fase de separação da coalhada e do soro, uma série de condições podem influenciar a quantidade de microrganismos do soro, principalmente nessa fase final, quando parte da microbiota permanece na coalhada que dará origem ao queijo e parte permanente do soro (CHIAPPINI et al., 1995a).

A contagem de bactérias aeróbias mesofílicas viáveis serve para indicar as condições de contaminação das matérias-primas e de limpeza e desinfecção durante o processamento. Condições inadequadas de temperatura/tempo durante a produção ou conservação de um alimento, também são indicadas pela presença de grande número de bactérias mesofílicas. Além disso, elevadas contagens de mesófilos podem significar perigo em potencial para o consumidor, uma vez que a maior parte das bactérias patogênicas cresce em temperaturas em torno de 37°C. Mesmo sem apresentar alterações das características sensoriais, alimentos com elevadas contagens destes microrganismos devem ser considerados como inaptos para o consumo (THATCHER, CLARK, 1973).

A utilização de soro de queijo produzido pela indústria de laticínios representa uma importante fonte de matéria-prima barata para a produção de extratos de leveduras e síntese de β -galactosidase, já que o soro muitas vezes é descartado, gerando um efluente de grande potencial poluente (PONSANO, 1992).

A principal importância industrial da β -galactosidase está na sua aplicação na indústria de laticínios, possibilitando a produção de alimentos com baixos teores de lactose, melhorando as propriedades físicas e químicas como solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose.

Esta enzima tem sido usada preferencialmente na forma livre nas indústrias de laticínio em todo o mundo, porém em função de seu custo relativamente elevado, tem havido grande interesse na imobilização de β -galactosidase, porém até o momento não se obteve um catalisador com todas as propriedades desejadas para uso industrial. Outra alternativa é a redução do custo de produção na síntese da enzima, utilizando meios de cultura mais baratos, tais como o soro de queijo (SANTIAGO et al., 2004).

O desenvolvimento de um processo adequado e economicamente viável para geração de um subproduto valorizado pode permitir ao setor de laticínios diversificar seu portfólio de negócios e aumentar a sua receita. Um aspecto relevante na otimização de um meio fermentativo de interesse

industrial não é só conseguir uma formulação racional do meio, senão que também a possível inclusão de matéria-prima de baixo custo que faça o processo rentável. Isto tem levado a busca de subprodutos de baixo valor, que possam substituir componentes de custo elevado do meio fermentativo e que possam ser utilizados como fontes de carbono ou nitrogênio nos meios fermentativos.

Com o crescente uso do soro como fonte de matéria-prima para produtos alimentícios, torna-se necessário o controle higiênico e sanitário desde subproduto da indústria de laticínios, para que ele não se torne, além de um carreador de nutrientes, um veiculador de microrganismos nocivos à saúde do consumidor (CHIAPPINI et al., 1995a).

De acordo com o exposto, o objetivo deste trabalho foi tratar o soro de queijo termicamente para eliminar a microbiota contaminante sem alterar a estrutura protéica para futuramente otimizar parâmetros para a produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O soro de queijo utilizado nos experimentos foi obtido na fabricação de queijo Minas Frescal no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF.

As amostras de soro de queijo foram coletadas logo após a fabricação do queijo e levadas imediatamente ao laboratório de Análise de Microbiologia de Alimentos e Biotecnologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF para realização do tratamento térmico e análises microbiológicas.

Aliquotas de 100 mL de soro de queijo foram tratadas termicamente em autoclave por vapor fluente durante 3, 5, 10 e 15 minutos e sob pressão a 121°C durante 3, 5, 10 e 15 minutos. O delineamento experimental foi realizado com 2 tratamentos térmicos diferentes, com 4 tempos de exposição, 3 repetições e análises microbiológicas em duplicata. A precipitação das proteínas foi verificada visualmente.

Após o tratamento térmico, as amostras foram submetidas a contagens de bactérias mesófilas aeróbicas utilizando-se placas de *Plate Count Agar* (PCA) incubadas invertidas a 36 ± 1°C por 48 horas (BRASIL, 1981). A contagem das colônias nas placas foi feita utilizando-se um contador de colônias. A unidade utilizada foi de UFC mL⁻¹ de soro de queijo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a importância das ações de incorporação tecnológica do soro de queijo *in*

natura para reduzir os problemas ambientais e o seu aproveitamento em processos biotecnológicos, foram realizados testes com diferentes tratamentos térmicos na eliminação da carga microbiana contaminante sem que houvesse alteração visível da estrutura protéica.

Os resultados obtidos da contagem de bactérias mesófilas aeróbicas nas amostras de soro de queijo e a descrição da desnaturação protéica estão apresentados na Tabela 1.

O tratamento térmico por pressão é eficaz para inviabilizar o crescimento microbiano, entretanto os resultados experimentais mostraram uma desnaturação protéica visível bem acentuada, inviabilizando seu uso, neste caso. Já o tratamento térmico por vapor fluente foi eficaz na eliminação dos microrganismos e não ocorreu a desnaturação protéica visível, apresentando contagem de bactérias mesófilas aeróbicas apenas na amostra submetida vapor fluente durante 3 minutos, com uma média $1,78 \times 10^4$ UFC mL⁻¹.

Observou-se que o tratamento térmico por vapor fluente durante 5, 10 e 15 minutos foi eficiente para inativação dos microrganismos presentes no soro de queijo, sendo que a precipitação é menos evidenciada em um tempo menor de exposição ao calor. O tratamento térmico durante 3 minutos por vapor fluente não foi suficiente para eliminar os microrganismos contaminantes.

Do ponto de vista das proteínas, a principal alteração consiste na desnaturação protéica, fenômeno este dependente tanto da intensidade do aquecimento quanto do tempo de aplicação do calor. Os resultados neste experimento demonstram claramente o efeito destas variações. As proteínas do soro de queijo são as mais termolábeis, ao contrário das caseínas, não formam micelas, encontrando-se molecularmente dissolvidas e suscetíveis à desnaturação térmica. Entre estas α -lactoalbumina é a mais resistente, seguida pela β -lactoglobulina, albumina e imunoglobulinas (SGARBIERI, 2005).

Tabela 1 – Tratamento térmico do soro, desnaturação protéica e contagem microbiana

Amostra	Tempo (minutos)	Desnaturação Protéica	Média da Contagem Global (UFC mL ⁻¹)
Pressão 121°C	3	+	-
Pressão 121°C	5	+	-
Pressão 121°C	10	+	-
Pressão 121°C	15	+	-
Vapor Fluente	3	-	+
Vapor Fluente	5	-	-
Vapor Fluente	10	-	-
Vapor Fluente	15	+	-

Legenda: sinal - = ausência; sinal + = presença

Os conhecimentos sobre os mecanismos da ação fisiológica das proteínas do soro de queijo no crescimento microbiano são ainda muito incompletos, porém sabe-se o conjunto das frações protéicas e não protéicas têm sido chamadas de fatores de crescimento (SGARBIERI, 2004). Em pesquisas recentes Saron (2004) demonstrou a eficácia do permeado da ultrafiltração do soro de queijo como fator de crescimento em meios de cultura de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, probióticos utilizados na formulação de alimentos funcionais e Nóbrega et al. (2005) evidenciaram que em meio a base de soro formulado com prebióticos houve um efeito favorável sobre o crescimento de *Bifidobacterium lactis*, podendo ser utilizado como meio alternativo para probiótico.

4 CONCLUSÃO

A utilização de meios de cultivo alternativos de interesse industrial tem sido empregados para o crescimento de vários microrganismos com o objetivo de diminuir custos. Assim, para a produção de β -galactosidase será empregado o soro de queijo *in natura* tratado termicamente sob vapor fluente por 5 minutos.

ABSTRACT

In the last years studies have been made to find viable applications to the cheese whey due to the large volume produced daily and the environment pollution caused by the absence of an appropriate destination for it. Among many researches in biotechnological utilization of cheese whey came of its use as a substrate for fermentation aiming to obtain some products being one of those the β -galactosidase. This study had the objective to heat treat cheese whey to eliminate the contaminant microorganisms without modifying the stability of the protein structure. The cheese whey was heat treated with

flowing steam for 3, 5, 10 and 15 minutes and with pressure for 3, 5, 10 and 15 minutes. After the thermal treatment a counting in plates was made in PCA growth medium and the protein precipitation was verified visually. The experimental results showed that the treatment under pressure is efficient to control de microbiological growth, but a huge protein precipitation happened. However the thermal treatment with flowing steam was efficient in the microorganism's elimination without visible protein denaturation. Thus, for the production of β -galactosidase we will use a thermal treatment with flowing steam.

Keywords: β -galactosidase, protein denaturation, biotechnical use, *Kluyveromyces marxianus*

5 REFERÊNCIAS

BRASIL. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório de Referência Animal. *Métodos Analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes*. Métodos Microbiológicos, 1981.

CHIAPPINI, C. C. J.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação do soro de queijo quanto às bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrófilas viáveis. *Revista ILCT*, n. 292, v. 50(1), p. 22-27, 1995.

MARWANA, S. S.; KENNEDY, J. F. Review: whey pollution problem and potencial. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 23, p. 323-336, 1988.

MORESI, M. Cost/benefit analysis of yeast and yeast autolysate production from cheese whey. *Italian Journal of Food Science*, v. 6, p. 357-370, 1994.

NOBREGA, L. O.; MATSUBARA, S. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.; GARCIA, S. Interações entre prebióticos e *Bifidobacterium lactis* BB-12 em meio a base de soro. Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios, nº 345, vol. 60. Juiz de Fora, jul./ago., 2005

PONSANO, E. H. G.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. Fermentação de soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa para a redução de sua carga poluente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 15, p. 170-173, 1995.

PONSANO, E. H. G.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. Soro de leite- Obtenção, Característica e Aproveitamento: Revisão. *Semina*, v. 13, p. 92-96, 1992.

SANTIAGO, Patrícia A. et al. Synthesis of beta-galactosidase by fermentation of cheese whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 24, n. 4, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000400015&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 13 fev. 2007.

SARON, M. L. G. Aproveitamento do permeado do soro de leite bovino através da transformação da lactose em lactulose e como ingrediente para meios de cultura probióticas. Dissertação. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Braz. J. Food Technol.*, v. 8, n. 1, p. 43-56, jan/mar, 2005.

SGARBIERI, V. C. Propriedades Fisiológicas-funcionais das Proteínas do Leite. *Ver. Nutr.*, Campinas, 17 (4): 397-409, out./dez., 2004.

SOUZA, K. S.; CHEHADI, M. C. G.; VIEIRA, J. A. G. Propriedades térmicas do soro de queijo. Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios, nº 339, vol. 59. Juiz de Fora, jul./ago., 2004

THATCHER, F. S.; CLARCK, D.S. *Análisis microbiológica de los Alimentos*. Zagarosa, Acríbia, 271p., 1973.

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FILME ATIVO INCORPORADO COM ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE* L.) NO CRESCIMENTO DE *LISTERIA INNOCUA* EM QUEIJO MINAS FRESCAL

Development and evaluation of active film incorporated with oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.) on *Listeria innocua* growth in "Minas frescal" cheese

Nilda de Fátima F. Soares¹
Paula Santiago-Silva²
Washington Azevedo da Silva²

RESUMO

Queijo Minas frescal constitui um alimento susceptível ao crescimento de muitos patógenos e tem sido freqüentemente associado a doenças de origem alimentar em vários países. Filmes antimicrobianos constituem uma maneira eficaz de controlar microrganismos deterioradores e patógenos de origem alimentar, aumentando a segurança alimentar e reduzindo a deterioração do produto. No presente estudo, filmes antimicrobianos incorporados com óleo essencial (OE) de orégano (objeto de patente) foram avaliados quanto à sua capacidade de controlar o crescimento de *Listeria innocua* "in vitro" e em contato com o queijo Minas frescal. Filmes incorporados com diferentes concentrações do OE de orégano ocasionaram uma redução variando de 0,5 a 1,0 ciclo log em relação ao tratamento com filme controle (sem adição do antimicrobiano), indicando a sua eficiência em inibir o crescimento de *Listeria innocua* em queijo Minas frescal. Quanto maior a concentração de OE incorporada no filme na faixa testada, maior foi a ação antimicrobiana contra a *Listeria innocua*.

Palavras-chave: orégano, filme antimicrobiano, conservação de alimentos, queijo Minas frescal, *Listeria innocua*

1 INTRODUÇÃO

O queijo Minas frescal é um dos produtos lácteos mais apreciados no Brasil. É um queijo branco, fresco e macio, que não sofre processo de maturação, produzido por coagulação do leite pasteurizado, com alto pH e conteúdo de umidade (>55%) e baixa porcentagem de sal (1,4-1,6%) (CARVALHO et al., 2007). Constitui um queijo para o consumo imediato, de curta vida de prateleira, mesmo sob refrigeração, e muito susceptível a contaminações microbianas (ROCHA et al., 2006).

Devido à simplicidade da tecnologia empregada em sua manufatura, o queijo Minas frescal é largamente produzido de forma artesanal e muitas vezes exposto a condições adversas durante a comercialização, comprometendo a sua qualidade (SOUZA et al., 2007). Assim, constitui

um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar e a contaminação microbiana desse produto assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças veiculadas por alimentos (FEITOSA et al., 2003).

Por constituir um meio favorável ao crescimento de muitos patógenos, o queijo Minas frescal tem sido freqüentemente associado a doenças de origem alimentar e a contaminação por *Listeria monocytogenes* tem recebido atenção especial (CARVALHO et al., 2007). Surto de listeriose resultantes do consumo de queijos contaminados têm levado a preocupação sobre o perigo que essa bactéria representa. Apesar de a *Listeria* ser inativada sob condições normais de pasteurização, problemas podem surgir a partir de contaminação pós-pasteurização e por ser um microrganismo psicrotrófico, que pode crescer a

1 Professora Associada, Laboratório de Embalagens, DTA/UFV. nfoares@ufv.br
2 Doutorandos, Laboratório de Embalagens, DTA/UFV.

baixas temperaturas, o seu crescimento em queijos contaminados pode ocorrer (SILVA et al., 2003).

Produtos perecíveis, como o queijo Minas frescal, requerem proteção contra o crescimento microbiano durante a sua vida de prateleira. Técnicas alternativas de preservação vêm sendo estudadas a fim de assegurar a qualidade e segurança dos alimentos. Uma nova tendência em alimentos consiste em usar as embalagens com o intuito de ampliar esta margem de segurança (APPENDINI & HOTCHKISS, 2002). Embalagens antimicrobianas constituem uma forma de embalagens ativas que atuam de forma a reduzir, inibir ou retardar o crescimento de microrganismos que possam estar presentes no alimento embalado. Algumas formas de embalagens antimicrobianas incluem a adição de sachês contendo agentes antimicrobianos voláteis nas embalagens, aplicação de revestimentos comestíveis contendo a substância antimicrobiana e a incorporação de agentes antimicrobianos diretamente ao material da embalagem.

Compostos antimicrobianos vêm sendo incorporados em materiais de embalagens a fim de se controlar o crescimento microbiano durante a estocagem de alimentos (OUSSALAH et al., 2004). A aplicação de antimicrobianos em filmes plásticos tem se revelado uma tecnologia promissora, uma vez que a maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos apresenta crescimento microbiano em sua superfície. Desta forma, a substância antimicrobiana, ao estabelecer um intenso contato com o alimento, inibe o crescimento dos microrganismos aí presentes (SILVEIRA, 2005).

Os óleos essenciais (OE) de produtos vegetais, por constituírem fontes de compostos biologicamente ativos, vem sendo bastante estudados e o uso destas substâncias como agentes antimicrobianos tem despertado o interesse de pesquisadores em diversos países (LOPEZ et al., 2005).

Diversos relatos na literatura sobre o potencial antimicrobiano de especiarias apresentam o orégano como sendo um potente agente inibidor de bactérias e fungos contaminantes de alimentos. MARINO et al. (2001), citado por SOUZA et al. (2005), ao analisarem o efeito antimicrobiano de várias especiarias encontraram que o OE de orégano foi o mais efetivo na inibição de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, causando um alongamento da fase lag. Ainda, entre as cepas Gram-positivas, *L. monocytogenes* foi a mais sensível. SAHIN et al. (2003), citado por SOUZA et al. (2005), conduziram um estudo pra avaliar a efetividade antibacteriana do OE de orégano sobre uma série de bactérias de interesse em alimentos e observaram que este foi efetivo

na inibição da grande maioria das bactérias ensaiadas.

Algumas frações do OE de orégano têm se revelado eficientes contra uma série de bactérias de interesse em alimentos (OUSSALAH et al., 2004). O OE de orégano é rico em compostos fenólicos, responsáveis por sua intensa atividade antimicrobiana devido à sua capacidade de penetrarem o interior da célula e interagirem com os mecanismos do metabolismo microbiano. Carvacrol e timol são os compostos fenólicos presentes em maior quantidade no OE de orégano e os principais responsáveis pela sua intensa atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2005).

Não existem na literatura relatos sobre a atuação de filmes antimicrobianos sobre a microbiota contaminante de queijo Minas frescal. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência antimicrobiana de filmes incorporados com OE de orégano no crescimento de *Listeria innocua* em queijo Minas frescal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção dos filmes:

Os filmes antimicrobianos (patente requerida) foram produzidos pela incorporação do OE de orégano em duas concentrações: filme 1- menor concentração; filme 2- maior concentração. Os filmes controle foram produzidos sem a adição do OE de orégano.

2.2 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos filmes

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes foi realizada pelo método do halo, segundo metodologia descrita por PIRES (2006), e sua eficiência testada contra *Listeria innocua*.

Uma cultura pura de *Listeria innocua* (ATCC 33090) (Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi ativada até atingir um número aproximado de 10^8 células viáveis/mL, diluída em solução peptonada 0,1% até a concentração de 10^6 células/mL e inoculada em placas de Petri (duplicata) contendo meio de cultura seletivo, ágar Oxford Modificado (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA). Em seguida, os filmes antimicrobianos, medindo 1 cm de diâmetro e previamente esterilizados em câmara com lâmpada ultravioleta (UV), foram colocados sobre as placas inoculadas, as quais foram incubadas a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após o período de incubação, verificou-se a atuação dos filmes sobre o crescimento de *Listeria innocua*. O mesmo procedimento foi realizado com o filme controle (sem a adição do OE de orégano).

2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em queijo Minas frescal

Queijos Minas frescal foram produzidos industrialmente, no laticínio da Universidade Federal de Viçosa, pelo processo tradicional de adição de cultura lática. As bactérias ácido-láticas são adicionadas para produzir ácido lático, o qual oferece proteção microbiana, melhora a coagulação ácida e facilita a remoção do soro do coalho (CARVALHO et al., 2007).

A avaliação da atividade antimicrobiana de filmes contendo OE orégano sobre queijos foi feita mediante um teste de desafio. Para isto, os queijos foram mergulhados em solução peptonada 0,1% contendo, aproximadamente, 10^3 células/mL de *Listeria innocua* durante 10 minutos.

O experimento foi montado cobrindo-se os queijos previamente contaminados, em suas superfícies superior e inferior, com os filmes antimicrobianos e o controle, recortados nas mesmas dimensões da superfície do queijo (10 cm de diâmetro) e submetidos à luz UV. Esses sistemas foram acondicionados em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD), selados (Figura 1) e estocados a $7 \pm 1^\circ\text{C}$, simulando condições de temperaturas em refrigeradores, até o momento das análises.

Os queijos inoculados e em contato com os

filmes foram submetidos a análises microbiológicas, tendo sido efetuadas as contagens de *Listeria innocua* nos tempos 0, 4, 8 e 12 dias de estocagem. As análises foram realizadas conforme metodologia recomendada pela APHA (2004). Ao final do experimento foi feita uma análise descritiva dos resultados obtidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos filmes

Verificou-se total inibição da *Listeria innocua* para os filmes antimicrobianos incorporados com OE de orégano em relação ao filme controle. A ação do OE de orégano, por conter compostos antimicrobianos voláteis, possibilitou a formação de uma atmosfera gasosa deste componente no interior das placas (Figura 2).

LÓPEZ et al. (2005), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de alguns tipos de OE sobre microrganismos de origem alimentar, mediante dois tipos de contato, sólido e difusão do vapor, encontraram que os óleos na fase vapor apresentaram maior atividade antimicrobiana, constituindo uma alternativa promissora no controle do crescimento de microrganismos em alimentos embalados.

Figura 1 - Aplicação dos filmes produzidos sobre queijos Minas frescal embalados em sacos de PEBD.

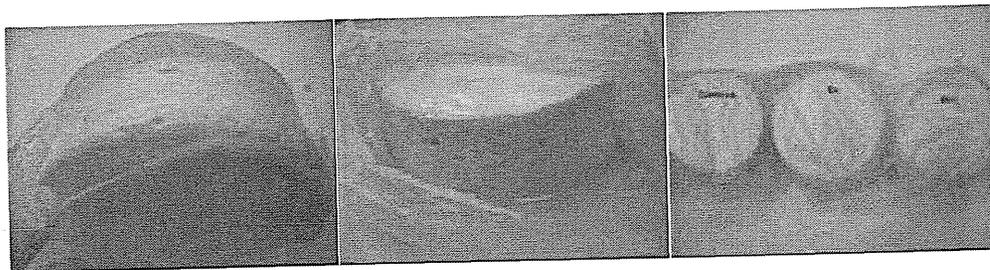
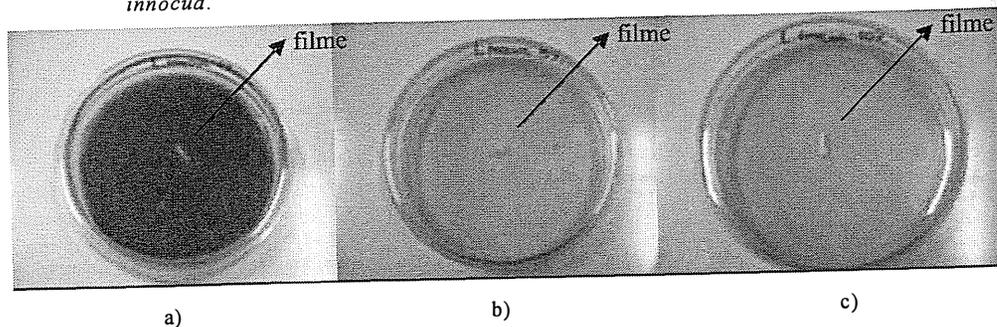


Figura 2 - Atividade dos filmes controle (a), filme 1 (b) e filme 2 (c) sobre o crescimento de *Listeria innocua*.



3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em queijo Minas frescal

Os resultados referentes à ação do filme controle e dos filmes 1 e 2 (com OE de orégano) sobre a microbiota inoculada no queijo Minas frescal encontram-se ilustrados na Figura 3.

Verificou-se um aumento nas contagens de *Listeria innocua* ao longo do período de estocagem para os três tratamentos (controle, filme 1 e filme 2). Estes incrementos na população microbiana devem-se, provavelmente, à capacidade destes microrganismos psicrofílicos desenvolverem-se à temperatura de armazenamento empregada no presente estudo (7°C).

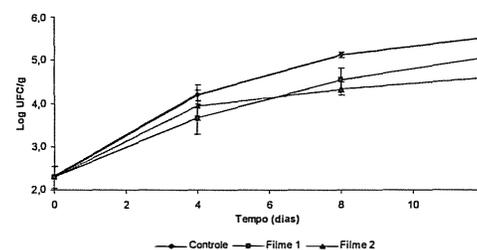


Figura 3 - Efeito da concentração do OE de orégano sobre a contagem de *Listeria innocua* em queijo Minas frescal estocado durante 12 dias à temperatura de 7°C .

Entretanto, contagens menores de *Listeria innocua* foram observadas para os tratamentos com filmes antimicrobianos em relação ao com filme controle em todos os tempos de análise, indicando a atividade antimicrobiana dos filmes produzidos com OE de orégano frente ao crescimento do referido microrganismo.

Ao final do período de estocagem (12º dia), verificou-se uma redução de 0,5 e 1,0 ciclo log nos queijos acondicionados em presença dos filmes 1 e 2 (com OE de orégano), respectivamente, em relação ao controle, confirmando o potencial de utilização do OE de orégano como agente antimicrobiano. A maior ação do filme 2 deveu-se a concentração maior de OE de orégano incorporada e, portanto, maior concentração dos componentes voláteis no 'headspace' da embalagem.

SKANDAMIS et al. (2002), citado por SOUZA et al. (2005), observaram que a adição de OE de orégano em filés de carne bovina, conjuntamente com o uso de embalagens com atmosferas modificadas, resultou em uma redução de 1 a 2 ciclos logarítmicos da população de *Salmonella tiphymurium*, partindo-se de um inóculo de $5 \log_{10}$ UFC/g a uma temperatura de 5°C .

4 CONCLUSÕES

Os filmes incorporados com OE de orégano apresentaram efeito antimicrobiano *in vitro*, tendo ocorrido total inibição do crescimento de *Listeria innocua* na presença desses filmes.

Na avaliação dos filmes antimicrobianos em contato com o queijo Minas frescal, eles foram novamente eficazes na inibição do crescimento de *Listeria innocua*, tendo apresentado uma redução de 0,5 a 1,0 ciclo log em relação à microbiota presente no tratamento controle, ao final dos 12 dias de estocagem a 7°C . Quanto maior a concentração de OE de orégano na faixa incorporada nos filmes, maior foi a ação na inibição da *Listeria innocua*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, FAPEMIG e FINEP, pelos apoios financeiros recebidos.

ABSTRACT

"Minas frescal" cheese constitute a suitable medium for the growth of many pathogens and have frequently been associated with several food-borne diseases in many countries. Antimicrobial films may provide an effective way to control food-borne pathogens and spoilage microorganisms, thus enhance food safety and decrease product spoilage. In this work, antimicrobial films incorporated with oregano essential oil (EO) (patent required) were analyzed by their efficiency to control the growth of *Listeria innocua* "in vitro" and in contact with "Minas frescal" cheese. Films incorporated with different concentrations of oregano EO occasioned a reduction between 0.5 to 1.0 log cycle in relation to treatment with control film (without addition of the antimicrobial), indicating their efficiency in reducing the growth of *Listeria innocua* in "Minas frescal" cheese. As higher the concentration of EO incorporated in the range tested higher was the antimicrobial efficiency against *Listeria innocua*.

Keywords: oregano, antimicrobial film, food preservation, "Minas frescal" cheese, *Listeria innocua*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 3, p. 113-126, 2002.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE,

A.Y. The quality of Minas frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, p. 262-267, 2007.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU R. T.; AZEVEDO E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 (Supl), p. 162-165, dez. 2003.

LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 6939-6946, 2005.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIERI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 5598-5605, 2004.

PIRES, A.C.S. **Desenvolvimento e avaliação de filmes e sachê antimicrobianos na conservação de queijo mussarela fatiado**. Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. 2006. 73 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização

de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 10205-10214, 2006.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 241-248, 2003.

SILVEIRA, M. F. A. **Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**. Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. 2005. 64 p. (Tese, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; BARBOSA-FILHO, J. M. Orégano (*Origanum vulgare* L. lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.

SOUZA, T. B. et al. Microscopic quality indicators of Minas frescal cheese. **Food Control** (2007), doi:10.1016/j.foodcont.2007.02.004.

Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes
ISSN 0100-3674 VERSÃO IMPRESSA

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO E PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS

A **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** publica artigos e comunicações científicas na área de Leite e Derivados. Os trabalhos deverão ser apresentados em português, inglês ou espanhol, devendo observar as disposições normativas relacionadas abaixo.

Os trabalhos serão submetidos à revisão pela **Comissão Editorial**, sendo que cada trabalho será analisado por um membro do **Corpo Revisor**. Em caso de parecer desfavorável do revisor, um segundo e um terceiro relatores serão ouvidos, e somente se esses dois últimos pareceres analisados forem favoráveis é que será tomada a decisão final a cerca da publicação pela **Comissão Editorial**.

O(s) parecer(es) do(s) relator(es) será(o) encaminhado(s) aos autores para que verifiquem as sugestões e procedam às modificações que se fizerem necessárias.

Informações sobre publicações e ou trabalhos deverão ser obtidas via email: revistadoilct@epamig.br ou pelo telefone (32) 3224 3116 com Luiza Carvalhaes Albuquerque (ramal 306).

NORMAS GERAIS

Os artigos e comunicações submetidos para publicação deverão ser apresentados em *meio digital* (disquete, CD ou DVD), utilizando-se o processador de texto **Microsoft Word for Windows** (versão 98, 2000, XP ou 2003), ser escrito em português, inglês ou espanhol. No material em meio digital deverá constar, além do **artigo original**, uma cópia em PDF do mesmo, porém, **omitindo os autores e a chamada de rodapé da primeira página** (para serem enviadas ao revisor científico, e eventualmente, a um segundo).

Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo. Juntamente com o disquete, CD ou DVD, deverão ser enviadas 1 (uma) cópia impressa original com numeração de linhas em todo o texto, com todas as figuras, quadros e tabelas; 1 (uma) cópia omitindo os

autores e a chamada de rodapé da primeira página (para ser enviada ao consultor científico). Todas as cópias impressas deverão ser feitas em papel branco, tipo A4 (21cm x 29,7cm), ou em formulário contínuo em uma só face, fonte: Times New Roman, tamanho: 12, espaçamento 1,5, observada uma margem de 2,5 cm para o lado esquerdo e de 2,5 cm para o direito, 2,5 cm para margem superior e inferior, 2,5 cm para o cabeçalho e 2,5 cm para o rodapé.

Cada trabalho deverá ter no **máximo 16 páginas** e junto do mesmo deverá ser encaminhado **ofício dirigido a Comissão Editorial da REVISTA DO ILCT** solicitando a publicação do artigo. Esse ofício deverá ser assinado por todos os autores, constando:

- nome dos autores sem abreviação;
- data;
- titulação de cada;
- endereço profissional completo (logradouro, número, bairro, caixa postal (se houver), CEP, cidade, estado, país), telefone e e-mail de contato de todos;
- informação da área em que o artigo se enquadra (**Vide tabela anexa**); e
- **Termo de concordância e cessão de direitos de reprodução gráfica**: Os abaixo assinados, autores do artigo intitulado "título", declaram ter lido e aprovado o manuscrito na sua totalidade e concordam em submetê-lo à Revista do ILCT para avaliação e possível publicação como resultados originais. Esta declaração implica que o manuscrito, independente do idioma, não foi submetido a outros periódicos ou revistas com a mesma finalidade. Sendo assim, "Declaro(amos) que aceito(amos) ceder o direito de reprodução gráfica para a Revista do ILCT no caso do artigo com o título descrito acima (ou título que posteriormente chegar a ser adotado, para atender às sugestões de editores e revisores) venha ser publicado na

Revista do ILCT. Em adição (necessário se existir mais que um autor), concordamos em nomear _____ como sendo o autor a quem toda correspondência e 1 (um) exemplar deverão ser enviados."

Qualquer inclusão, exclusão ou alteração na ordem dos autores deverá ser notificada mediante ofício assinado por todos os autores (inclusive do autor excluído).

NORMAS ESPECÍFICAS DO ARTIGO

1) Título e Autores INSTRUÇÕES PARA PREPARAÇÃO E ENCAMINHAMENTO DE TRABALHOS¹

Marciano F. PRIMEIRO²
Júlio E. SECOND²
Denis R. ÚLTIMO²

Endereços para correspondência e dos autores devem constar no rodapé da primeira página.

2) Corpo geral do artigo

O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: a) **TÍTULO**, suficientemente claro, conciso e completo, evitando palavras supérfluas. Recomenda-se começar pelo termo que represente o aspecto mais importante do trabalho, com os demais termos em ordem decrescente de importância. Deve ser apresentada a versão do título para o idioma inglês; b) **NOME(S) DO(S) AUTOR(ES)** com o sobrenome para citações bibliográficas destacado EM LETRAS MAIÚSCULAS, alinhados à direita, em espaçamento simples, um nome abaixo do outro, e no rodapé da primeira página, deverão vir a formação acadêmica e o endereço profissional completo de todos os autores, com e-mail e no máximo com 6 (seis) autores; c) **SUMÁRIO** (de acordo com NBR6028 da ABNT). O sumário não deve ultrapassar a 250 (duzentos e cinquenta) palavras, não deve possuir parágrafos e estar centralizado logo abaixo da lista dos autores. Após o Sumário deve-se incluir TERMOS PARA INDEXAÇÃO, 3 (três) a 6 (seis) palavras-chave que deverão ser apresentadas no idioma deste, separados por ponto e vírgula e evitando-se a repetição de termos já usados no título e sumário.

d) **TÍTULO EM INGLÊS (SUMMARY)** – obrigatório, exceto quando o artigo for escrito na íntegra em língua inglesa – incluindo, em seguida, INDEX TERMS (Keywords) da mesma forma do item c; e) **INTRODUÇÃO** (incluindo a Revisão de Literatura/Referencial Teórico); f) **MATERIALE MÉTODOS**; g) **RESULTADOS E DISCUSSÃO** (podendo conter tabelas, quadros e figuras) podendo ser separados, se necessário; h) **CONCLUSÕES**; i) **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** e j) **AGRADECIMENTOS** (opcional).

A apresentação do texto deverá ser em uma coluna somente. As páginas devem ser numeradas seqüencialmente, bem como as linhas, iniciando-se a numeração destas em cada página.

3) Orientações específicas

A comunicação poderá conter os seguintes tópicos assim apresentados:

1. **TABELAS e QUADROS**: deverão ser feitos no Word e inseridos após citação dos mesmos dentro do próprio texto, salvo em doc.
2. **Caso o artigo contenha FOTOGRAFIAS, GRÁFICOS, FIGURAS, SÍMBOLOS e FÓRMULAS**, essas deverão obedecer às seguintes normas:

- **Fotografias**: deverão ser apresentadas em preto e branco, nítidas e com contraste, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte, salvas em extensão "JPEG" com resolução de 300 dpi;
- **Figuras** deverão ser apresentadas em preto e branco, nítidas e com contraste, inseridas no texto após a citação das mesmas. As figuras deverão ser elaboradas com letra Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas;
- **Gráficos** deverão ser inseridos após citação dos mesmos, dentro do próprio texto, elaborado preferencialmente em Excel, com letra Times New Roman, tamanho 10, sem negrito;
- **Símbolos e Fórmulas Químicas** deverão ser feitas em processador que

possibilite a formatação para o programa Page Maker (ex: Equation), sem perda de suas formas originais.

3. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**: a lista de referências bibliográficas normalizada conforme a NBR6023/2002 da ABNT.

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo.

Orientações gerais:

- Deve-se apresentar todos os autores do documento científico (fonte);
- O nome do periódico deve ser descrito por extenso, não deve ser abreviado;
- Em todas as referências deve-se apresentar o local de publicação (cidade), a ser descrito no lugar adequado para cada tipo de documento;
- As referências devem ser ordenadas alfabeticamente.
- O espaçamento deve ser duplo.

EXEMPLIFICAÇÃO (TIPOS MAIS COMUNS):

ARTIGO DE PERIÓDICO:

NETO, A. R.; PINTO, S. M.; ABREU, L. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; MAGALHÃES, F. A. R. Avaliação físico-química de pão de queijo fabricado com gordura de leite fracionada. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 54, n. 313, p. 46-49, mar./abr. 2000.

LIVRO:

- a) livro no todo:
FURTADO, M. M. *Queijos finos maturados por fungos*. São Paulo: Milkbizz, 2003. 128p.
- b) Parte de livro com autoria específica:
BRITO, J. R.; PINTO, S. M.; BRITO, M. A. V. P. Boas práticas de produção de leite bovino na agricultura familiar. In: NETO, F. N. *Recomendações básicas para a aplicação das boas práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 196-205.
- c) Parte de livro sem autoria específica:

ABREU, L. R. Características e formas de aproveitamento do soro do queijo. In: _____. *Processamento do leite e tecnologia de produtos lácteos*. Lavras: FAEPE, 2005. cap. 5, p. 91-157.

DISSERTAÇÃO E TESE:

RIBEIRO, L.C. *Produção, composição e rendimento em queijos do leite de ovelhas Santa Inês*. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MATIOLI, G. P. *Influência do leite proveniente de vacas mastíticas no rendimento de queijo frescal*. 2000. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

Nota: "A folha é composta de duas páginas: anverso e verso. Alguns trabalhos, como teses e dissertações são impressos apenas no anverso e, neste caso, indica-se f." (ABNT, NBR6023/2002, p. 18).

TRABALHOS DE CONGRESSO E OUTROS EVENTOS:

SOBRAL, D.; VIOTTO, W. H. Requeijões culinários análogos. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 24, 2007, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2007. p. 541-546.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS:

As obras consultadas online são referenciadas conforme normas específicas para cada tipo de documento (monografia no todo e em parte, trabalho apresentado em evento, artigo de periódico, artigo de jornal, etc.), acrescidas de informações sobre o endereço eletrônico apresentado entre braquetes (< >), precedido da expressão "Disponível em:" e da data de acesso ao documento, precedida da expressão "Acesso em:".

Nota: "Não se recomenda referenciar material eletrônico de curta duração nas redes" (ABNT, NBR6023/2000, p. 4). Segundo padrões internacionais, a divisão de endereço eletrônico, no fim da linha, deve ocorrer sempre após barra (/).

MONOGRAFIA (ACESSO ONLINE):

- a) livro no todo
TAKAHASHI, T. (Coord.). *Tecnologia em foco*. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. 90 p. Disponível em: <http://www.socinfo.org.br>.

Acesso em: 22 ago. 2000.

b) parte de livro

TAKAHASHI, T. Mercado, trabalho e oportunidades. In: _____. **Sociedade da informação no Brasil**: livro verde. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. cap. 2, p. 13-24. Disponível em: <<http://www.socinfo.gov.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

c) Parte de congresso, seminário, etc.

GIESBRECHT, H. O. Avaliação de desempenho de institutos de pesquisa tecnológica: a experiência de projeto excelência na pesquisa tecnológica. In: CONGRESSO ABIPTI, 2000, Fortaleza. **Gestão de institutos de pesquisa tecnológica**. Fortaleza: Nutech, 2000. Disponível em: <<http://www.abipti.org.br>>. Acesso em: 01 dez. 2000.

d) Tese

SILVA, E. M. **Arbitrariedade do signo**: a língua brasileira de sinais (LIBRAS). 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Linguística Aplicada e Estudo de Língua) – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 1997. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/virtualbooks/freebook/port/did/teses.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2000.

ARTIGO DE PERÍODICO (ACESSO ON-LINE):

RESENDE, A. M. G. Hipertexto: tramas e trilhas de um conceito contemporâneo. **Informação e Sociedade**, Recife, v. 10, n. 1, 2000. Seção Educação. Disponível em: <<http://www.informacoesociedade.ufpb.br/>>. Acesso em: 30 nov. 2000.

CITAÇÃO: PELO SISTEMA ALFABÉTICO (AUTOR-DATA) (conforme ABNT, NBR10520/2002)

Dois autores - Steel & Torrie (1960) ou (STEEL & TORRIE, 1960).

Três ou mais autores - Valle et al. (1945) ou (VALLE et al., 1945).

Quando forem citados dois autores de uma mesma obra deve-se separá-los pelo sinal & (comercial)

4. A Comissão Editorial da REVISTA do ILCT notificará o autor do recebimento do original e, posteriormente, o informará sobre sua publicação. Os artigos que necessitarem de

modificações serão devolvidos ao autor designado como representante e responsável pela publicação para a devida revisão.

5. Os artigos não aprovados serão devolvidos.

6. Os artigos serão publicados em ordem de **aprovação**.

7. O não-cumprimento dessas normas implicará na devolução do artigo ao autor.

8. Processo para publicação de trabalhos.

Os artigos submetidos à REVISTA do ILCT para publicação são encaminhados a **Comissão Editorial** que fará o registro (protocolo de recebimento) para que seja verificado se está apresentado de acordo com as normas editoriais. Imediatamente após essa verificação, o autor representante do artigo receberá em seu **email um documento de submissão do artigo para fins comprobatórios**.

Posteriormente é encaminhado a 2 (dois) membros do **Corpo Revisor** para emitirem seus pareceres. Se aprovado por ambos, o artigo é reenviado aos autores para as correções (se necessário); depois de corrigido retorna aos consultores para verificarem se as sugestões foram atendidas para emissão do parecer final. O autor representante receberá notificação via **email, de aceite para publicação**.

Finalmente o artigo é encaminhado para correções de Inglês, Referências Bibliográficas e Português. A seguir o artigo é encaminhado para editoração e publicação. Caso o(s) autor(es) não sejam assinantes da REVISTA do ILCT, o autor representante receberá pelos Correios um exemplar do número em que consta o artigo submetido. Demais exemplares deverão ser solicitados à parte mediante pagamento antecipado, incluindo despesas de envio.

9. Os documentos contendo artigos, cópia digital e outros deverão ser enviados em **um único volume para o seguinte endereço**:

Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes

Comissão Editorial A/C Luiza C. Albuquerque

Endereço: Rua Tenente Luiz de Freitas, número 116 – Bairro Santa Terezinha
CEP 36.045-560 – Juiz de Fora – MG

ESTAS NORMAS DE PUBLICAÇÃO ESTARÃO DISPONÍVEIS NO SITE DA EPAMIG: www.epamig.br/revistadoilct

ÁREAS PARA AVALIAÇÃO PELO CORPO EDITORIAL

- *Produção animal, zootecnia, veterinária;*
- *Microbiologia, sanitificação, higienização: • Leites fermentados, culturas lácteas;*
- *Queijos processados, requeijão;*
- *Tecnologia de queijos;*
- *Físico-química, química de lácteos;*
- *Concentrados, desidratados, soro;*
- *Análise sensorial;*
- *Equipamentos, instalações, operações unitárias;*
- *Tecnologia sorvetes e gelados comestíveis;*
- *Tecnologia UHT/UAT;*

- *Tecnologia manteiga;*
- *Desenvolvimento novos produtos;*
- *Legislação, rotulagem;*
- *Economia/ Administração/Gerência/ Inovação;*
- *Qualidade do leite;*
- *Gestão ambiental / tratamento resíduos e efluentes.*

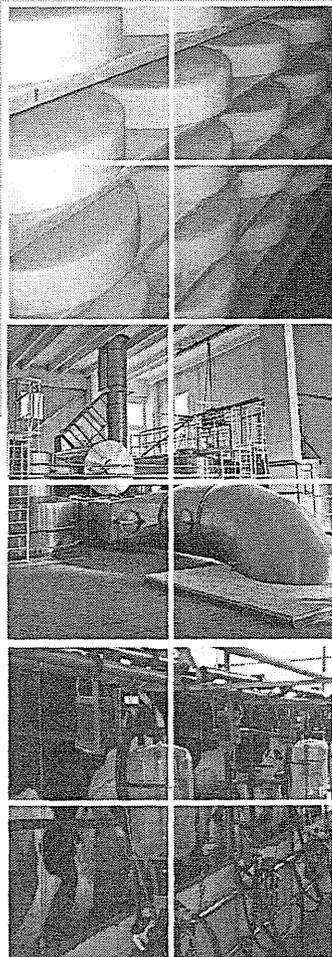
Estamos trabalhando para garantir maior dinâmica nos trâmites para publicação, o que irá contribuir para melhoria na qualidade da REVISTA DO ILCT, e futuramente, é nossa intenção disponibilizar on-line todo o processo de publicação e consulta das edições.

REVISTA do ILCT

ASSINE A REVISTA DO

ILCT

O HIGIENIZANTE ideal para o setor lácteo.



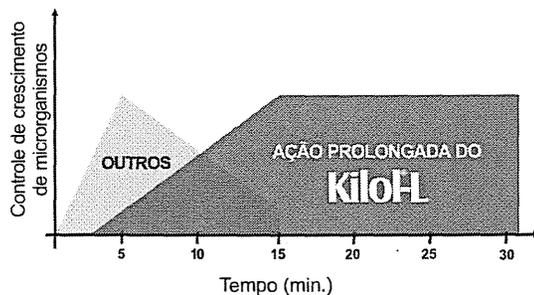
KiloH[®]-L

Higienizante Nobre

Para superfícies e ambientes de fazendas e agroindústrias

CARACTERÍSTICAS BENÉFICAS:

- Não necessita de enxágue
- Não é tóxico
- Ação prolongada
- Produto biodegradável



Química Natural Brasileira Ltda.
 Rua Salviano José da Silva, 225 - Bairro Eldorado
 12238-573 - São José dos Campos/SP - BRASIL
 Tel: (12) 3876-0400 - Fax: (12) 3876-0400
 E-mail: vendas@quinabra.com.br
 Site: www.quinabra.com.br



Quinabra
 Qualidade em Benefício da Natureza.

EMPRESA COM DNA

Evoluir faz parte do cotidiano de qualquer empresa que sabe a importância da profissionalização em todos os setores. Mudar, buscar o novo, inovar para alcançar todo o potencial da empresa é necessário, mas é igualmente fundamental seguir a tradição, os valores que construíram uma história de sucesso no segmento de insumos para laticínios.

Por isso, afirmamos que o Macalé, referência no segmento de insumos para laticínios, é uma Empresa com DNA. Porque evoluímos sempre, mas sem nunca perder o foco no nosso DNA, na nossa essência: produtos de qualidade, atendimento ágil e personalizado e, principalmente, a busca contínua pela sua satisfação.

Macalé
 Produtos para Laticínios

Rua Humberto de Campos, 42 • Santa Terezinha • 36045-450 • Juiz de Fora • MG
 (32) 3224 30 35 • (32) 3224 39 03 • macale@macale.com • www.macale.com



Agregando valor à "vida da gente"

"Temos sempre uma solução inovadora para oferecer a nossos parceiros."

- Aromas
- Conservantes
- Corantes
- Culturas Láticas
- Emulsificantes
- Especialidades
- Espessantes
- Estabilizantes
- Preparações de Frutas
- Sais Fundentes

ISP do Brasil Ltda
Via das Painheiras, 3.864 - Bairro Pinhal
Cabreúva - SP CEP 13315-000
11 4529 8622 - www.ispcorp.com.br

A ISP do Brasil/Germinal tem sempre uma solução técnica e criativa para auxiliar a indústria de laticínios. Suas combinações de ingredientes agregam valores funcionais aos produtos, como estrutura, textura, consistência, brilho, cor e sabor. Além disso, propicia economia e funcionalidade no espessamento, Estabilização e Gelificação de seus produtos. Para isso, os profissionais de sua equipe técnica estão sempre à disposição para auxiliar no desenvolvimento de diversos produtos lácteos: iogurtes, requeijão, queijos, manteiga, sorvetes, sobremesas, entre outros.

Conte com nosso *expertise* e obtenha Vantagem competitiva no mercado.



- ESTABILIZANTES
- EMULSIFICANTES
- MISTURAS EM PÓ AROMATIZADAS
- AROMAS
- CULTURAS LÁTICAS
- CORANTES
- PREPARAÇÕES DE FRUTAS
- CONSERVANTES



Rua Bruno Simill, 380 - Distrito Industrial
CEP 36092-050 - Juiz de Fora - MG
Tel. (32) 3249-7600 - Fax (32) 3249-7610
www.gemacom.com.br
gemacom@gemacom.com.br

33
Bolsão
0310-11-057



**ESPECIALISTA
EM
CULTURAS
LÁCTEAS**

“LYOFAST”

Sacco Brasil, Rua Uruguaiana, 1379, Bosque, 13026-002 Campinas SP
Tel/Fax: 19-3253-5333 E-mail: saccobrasil@saccobrasil.com.br
www.saccosrl.it www.clerici.org