Revisão DOI: 10.14295/2238-6416.v73i3.679

O USO DAS ENZIMAS NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS: UMA BREVE REVISÃO

The use of enzymes in the dairy industry: a condensed review

Marciel Dela Justina[1], Mariléia Buss Dela Justina[2], Everton Skoronski[1]*

RESUMO

O principal objetivo do presente trabalho é fornecer uma visão geral sobre os aspectos técnicos da utilização de enzimas no processamento do leite. Enzimas indicadoras de processo, como a fosfatase alcalina e a lactoperoxidase, são utilizadas na validação do tratamento térmico do leite. Contudo, o desenvolvimento de novas técnicas para controle microbiológico do leite representa um desafio para a manutenção da sua usabilidade. Novas fontes de enzimas coagulantes têm sido estudadas. A imobilização enzimática tem sido estudada com o intuito de aumentar a sua estabilidade, período de estocagem, e número de usos na produção de laticínios. O estudo da imobilização enzimática é realizado visando várias finalidades na indústria de laticínios, entre elas a coagulação e a hidrólise. O uso de enzimas encapsuladas é importante para a maturação de queijos, prevenindo a deterioração de textura ou de sabor durante este período.

Palavras-chave: enzimas do leite; lipólise; proteólise; coagulação do leite; maturação do queijo.

ABSTRACT

The main aim of this paper is to show an overview of the technical aspects of enzymatic action in milk processing. Process indicator enzymes, just as alkaline phosphatase and lactoperoxidase, have widely been employed in dairy factories for thermal treatment validation. However, the development of new strategies for microbiological control in milk represents a challenge for maintaining its usage. New sources of milk clotting enzymes have been studied in order to replace the calves' sourced enzymes and enhance the specificity for milk processing uses. Immobilization

1 Universidade do Estado de Santa Catarina. Avenida Luiz de Camões, n. 2090, Conta Dinheiro, 88.520-000, Lages, SC, Brasil. E-mail: marciel.delajustina@gmail.com.

2 Universidade do Extremo Sul Catarinense, Departamento de Saúde Coletiva. Av. Universitária, 1105, Universitário, 88806-000, Criciúma, SC, Brasil.

* Autor para correspondência.

Recebido / Received: 01/07/2018
Aprovado / Approved: 25/10/2018

of enzymes also has been studied looking for improve usability, storage, and stability of enzymes in dairy products manufacturing. Immobilized enzymes are studied to be employed for several purposes in milk processing, just as clotting or hydrolyzing agents. The use of encapsulated enzymes is important for cheese ripening, avoiding taste or texture depletion along the ripening period.

Keywords: milk enzymes; lipolysis; proteolysis; milk curdling; cheese ripening.

INTRODUÇÃO

O setor de alimentos é o que apresenta maior demanda por enzimas de uso industrial no mundo (GARG et al., 2016). Elas são empregadas em vários segmentos da produção de alimentos, como panificação, bebidas, suplementos dietéticos, entre outros. A alta demanda por enzimas na indústria de alimentos se dá por sua alta especificidade em relação ao substrato, pH, temperatura e pressão, além de alta atividade e graus de conversão em produtos de interesse (FERNANDES, 2010). Especificamente na indústria de laticínios as enzimas desempenham um importante papel tanto para a obtenção de resultados benéficos como para a degradação de produtos de origem láctea. Isto se deve à composição do leite, que proporciona condições ideais para reações biológicas, como as catalisadas por enzimas. O objetivo deste trabalho é apresentar uma breve revisão sobre a utilização de enzimas na produção de laticínios. Serão abordadas tanto as enzimas de ocorrência natural no leite como as adicionadas com objetivos específicos, para fins tecnológicos, como indicadores de processo, para a cura do queijo e enzimas hidrolíticas.

REFERENCIAL TEÓRICO

Fosfatase alcalina e o sistema lactoperoxidase: controle do tratamento térmico e da contaminação microbiana para processamento de leite

O tratamento térmico do leite para indústrialização é um aspecto importante para a manutenção de suas características de qualidade e higiene e para a obtenção de produtos com *shelf life* estendido (WILIŃSKA et al., 2007; TREMONTE et al., 2014; YU et al., 2015; EGGER et al., 2016; SOSNOWSKI et al., 2016). Neste contexto, enzimas de ocorrência natural no leite, como a fosfatase alcalina e a lactoperoxidase, sensíveis ao tratamento térmico, são largamente usadas para monitorar o processo de pasteurização (TRUJILLO et al., 2007; WILIŃSKA et al., 2007; TAYEFI-NASRABADI et al., 2011; DUMITRAŞCU et al., 2012; TREMONTE et al., 2014; YU et al., 2015; EGGER et al., 2016; SOSNOWSKI et al., 2016).

A fosfatase alcalina é uma das mais de sessenta enzimas de ocorrência natural no leite bovino (RANKIN et al., 2010; INNOCENTE et al., 2014). No leite cru a sua maior parte se encontra associada à membrana dos glóbulos de gordura do leite, na interface água/gordura, já que não são solúveis em gordura. Todavia, este fato leva a uma maior atividade de fosfatase alcalina nos produtos ricos em gordura, quando comparado aos produtos com baixo teor de gordura em sua composição (RANKIN et al., 2010). A maior importância da fosfatase alcalina na indústria de laticínios é relacionada à sua termossensibilidade (RANKIN et al., 2010; UPADHYAY; VERMA, 2014; KIM et al., 2016). Isto se deve ao fato de ser a fosfatase alcalina ligeiramente mais resistente ao tratamento térmico do que as bactérias patogênicas sobre as quais os processos de pasteurização são validados (RANKIN et al.,

2010; CENI et al., 2016). O processo de pasteurização deve diminuir a atividade desta enzima em torno de quinhentas vezes, comparando ao leite cru, para garantir que o processo de pasteurização seja efetivo (CENI et al., 2016).

Três métodos principais são empregados para a pesquisa de fosfatase alcalina na indústria de laticínios: colorimétrico, fluorométrico e quimioluminescente (RANKIN et al., 2010; KIM et al., 2016), todavia, o método colorimétrico é o mais largamente empregado. Mesmo sendo rápidos, baratos e convenientes os métodos colorimétricos podem levar a resultados duvidosos, devido à subjetividade na avaliação do desenvolvimento da cor (KIM et al., 2016). Cada método apresenta as suas vantagens e desvantagens, no entanto, esse assunto não será abordado neste trabalho.

Algumas interferências podem ocorrer e influenciar a obtenção de dados confiáveis na avaliação da atividade da fosfatase alcalina para validação dos processos de pasteurização. Estas interferências podem ser devidas a fatores composicionais, como teor de gordura, que aumenta a atividade residual da fosfatase alcalina, presença de inibidores ou potencializadores da atividade enzimática, aspectos metodológicos, presença de fosfatase alcalina de origem microbiana, entre outros (RANKIN et al., 2010).

Os leites obtidos de diferentes fontes, como cabras, ovelhas, vacas ou búfalas, podem apresentar diferentes níveis de fosfatase alcalina, contudo o tratamento térmico diminui a sua atividade de forma semelhante (RANKIN et al., 2010). Comparando a fosfatase alcalina de leite de vaca, ovelha e cabra, a enzima presente no leite de vaca apresenta a menor resistência ao tratamento térmico, enquanto a enzima oriunda do leite de ovelha apresenta a maior termorresistência. Todavia, para todos eles observa-se a diminuição da atividade enzimática em torno de 90% a 75 ºC por 90 segundos (LORENZEN et al., 2010).

Visando evitar a perda de nutrientes ou das propriedades sensoriais dos alimentos, tem surgido uma tendência ao consumo de produtos minimamente processados (TREMONTE et al., 2014; CENI et al., 2016).

Desta forma, tecnologias alternativas à pasteurização convencional têm sido desenvolvidas buscando garantir a segurança microbiológica dos produtos de origem láctea, ao mesmo tempo evitando qualquer alteração em sua composição nutricional ou características sensorais. A fosfatase alcalina tem sido estudada quanto à sua empregabilidade como indicador de efetividade também destas novas técnicas (PINHO et al, 2011; INNOCENTE et al., 2014; CENI et al., 2016).

O uso de CO_2 supercrítico como tratamento não térmico para o leite tem sido estudado. Com a utilização deste processo observou a diminuição na atividade enzimática da fosfatase alcalina em torno de 94,5% nas condições ótimas do experimento, bem como significante redução na contagem de *Escherichia coli* (CENI et al., 2016). Em outro estudo, avaliando a utilização de tratamento com pulsos de luz, observou-se redução de 3,2 $\log.UFC.mL^{-1}$ na contagem bacteriana total e de 94% na atividade da fosfatase alcalina. Os autores também observaram que a fosfatase alcalina foi mais resistente ao tratamento do que as bactérias indicadoras, o que garante margem de segurança para a utilização da enzima como indicador (INNOCENTE et al., 2014). Também no processo de homogeneização por alta pressão, a fosfatase alcalina pode ser utilizada como indicador de processo, uma vez que em pressão acima de 270 MPa (característica do processo) sua atividade é completamente inibida. Todavia, a perda de atividade não se dá propriamente ao emprego de alta pressão, mas ao fato de haver aumento de temperatura do leite, devido ao intenso cisalhamento ao que o mesmo é submetido neste processo.

Considerando, contudo, que grande parte dos processos de homogeneização por alta pressão atinge o nível de 270 MPa para eliminação da atividade bacteriana, a fosfatase alcalina é também um bom indicador para a efetividade deste processo (PINHO et al., 2011).

A pesquisa de fosfatase alcalina é também importante para determinar se produtos lácteos, como o queijo, foram produzidos com leite adequadamente pasteurizado, ou então a ocorrência de contaminação pós pasteurização do leite utilizado (LORENZEN et al., 2010; RANKIN et al., 2010; EGGER et al., 2016). Estudos sugerem que queijos produzidos com leite pasteurizado adequadamente apresentam atividade de fosfatase alcalina não maior que 10 $mU.g^{-1}$ enquanto queijos produzidos a partir de leite cru ou termizado podem atingir níveis de atividade em torno de 300 $mU.g^{-1}$, mesmo depois do período de cura (EGGER et al., 2016). Todavia, existe também a possibilidade da reativação da fosfatase alcalina tanto no leite pasteurizado quanto nos produtos obtidos a partir dele. Esta reativação pode ser relacionada à presença de íons de Mg, Ca e Zn e das condições de pH, aquecimento e armazenamento. Por outro lado, a presença de Co, Cu, Sn, oxigênio dissolvido e EDTA inibem a reativação da atividade enzimática (RANKIN et al., 2010). O leite UHT apresenta uma especial tendência para reativação da atividade da fosfatase alcalina (LORENZEN et al., 2010; RANKIN et al., 2010).

A lactoperoxidase é a segunda enzima mais abundante no leite bovino (CAMPBELL; DRAKE, 2013), ocorrendo em torno de 30 $mg.L^{-1}$ e representando 0,5% do conteúdo proteico total do mesmo (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000). É caracterizada pela presença de um grupo heme no centro da molécula, sendo o seu peso molecular em tordo de 78 kDa (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000; CAMPBELL; DRAKE, 2013). O grupo heme é ligado covalentemente à molécula e um íon Ca age fortemente na manutenção de sua conformação estrutural (BOOTS; FLORIS, 2006; KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000). Estocagem sob condições ácidas causam perda de atividade por desnaturação da enzima, contudo valores de pH bastante altos, até 10,0, não causam perda de atividade à temperatura ambiente. Seu pH ótimo de atividade catalítica é entre 5,0 e 6,0 (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000). É uma das enzimas mais termorresistentes presentes no leite, sendo hábil para manter atividade total ou parcial em condições de pasteurização rápida (72-75 ºC por 15 segundos). Perde sua atividade apenas acima de 80 ºC por mais de 2,5 segundos e, por isso, é empregada para monitorar se o leite foi tratado termicamente em temperatura acima da ideal (LORENZEN et al., 2010).

A exemplo da fosfatase alcalina, a lactoperoxidase apresenta diferentes níveis de termorresistência ao tratamento térmico, de acordo com a origem do leite. Estudos apontam que em temperaturas mais baixas (70-75 ºC) a lactoperoxidase de leite de ovelha e cabra são menos termorresistentes do que a presente no leite bovino. Todavia, em temperaturas mais elevadas (77 ºC), a lactoperoxidase do leite de cabra se mostrou mais termorresistente do que nos outros dois tipos de leite testados (DUMITRAŞCU et al., 2012). Outros autores observaram atividade residual de lactoperoxidase de 39, 53, e 43% para leites de vaca, ovelha e cabra, respectivamente, após tratamento térmico a 75 ºC por 28 segundos (LORENZEN et al., 2010). As diferenças observadas entre os diferentes tipos de leite podem ser devidas tanto à composição do próprio leite (efeito de matriz) quanto às propriedades moleculares das enzimas (DUMITRAŞCU et al., 2012).

Embora apresentem uma importante função como indicadores de processo, a lactoperoxidase apresenta outra importante função na cadeia da produção de laticínios,

agindo como poderoso agente antimicrobiano. Sua maior função original no leite é garantir defesa contra infecções bacterianas em mamíferos na infância (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000; BOOTS; FLORIS, 2006; TAYEFI-NASRABADI et al., 2011; DUMITRAŞCU et al., 2012; CAMPBELL; DRAKE, 2013), pela formação de haletos oxidados reativos ou pseudo-haletos que exercem ação bactericida (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000; TAYEFI-NASRABADI et al., 2011).

Para atingir este objetivo, a lactoperoxidase integra um sistema maior, que envolve a presença de outros componentes, como haletos ou pseudo-haletos (em maior parte SCN^-, mas também Cl^- e Br^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000; BOOTS; FLORIS, 2006; CAMPBELL; DRAKE, 2013). O mecanismo de ação deste sistema complexo é regulado por uma série de etapas que incluem a reação entre o grupo heme com o peróxido de hidrogênio, gerando um radical livre sobre o grupo heme. Este radical livre promove a oxidação do SCN^- (ou dos íons haletos) formando o composto $(SCN)_2$ que, por hidrólise, libera para o meio HOSCN (que se apresenta em equilíbrio com H^+ e $OSCN^-$), SCN^- e H^+ (Figura 1).

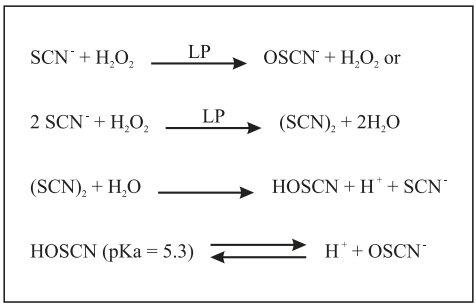

Figura 1 – Representação da oxidação do tiocianato (SCN^-) no sistema lactoperoxidase (SEIFU et al., 2005)

Estas espécies químicas agem nas membranas citoplasmáticas das células microbianas, pela oxidação de grupos proteína-SH (causada pelo HOSCN ou pelo $OSCN^-$), rompendo-as e liberando seu conteúdo interno para o meio exterior, causando sua morte. A oxidação dos grupos proteína-SH pelo HOSCN ou pelo $OSCN^-$ leva à formação de uma estrutura proteína-S-SCN que, por hidrólise, é rompida em proteína-S-OH e SCN^- e H^+, restaurando o pseudo-haleto para novo ciclo oxidativo (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000).

O íon tiocianato (SCN^-) ocorre naturalmente no leite bovino em níveis variando de 1 a 15 ppm. Devido a esta alta variabilidade, o montante presente pode ou não ser suficiente para ativação do sistema lactoperoxidase. Todavia, o *Codex alimentarius* permite a adição de 15 mg $SCN.kg^{-1}$ de leite para garantir a ativação do sistema (CAMPBELL; DRAKE, 2013). Em estudo recente observou-se a presença de SCN^- em níveis variando de 1,0 até 5,3 ppm em leite bovino cru de várias fazendas, abaixo do nível permitido pelo *Codex alimentarius* (YONG et al., 2017). O peróxido de hidrogênio pode ocorrer naturalmente no leite em níveis suficientemente altos para garantir a ativação do sistema lactoperoxidase, advindo da ação bacteriana sob condições aeróbias ou então necessita ser adicionado (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000).

Devido à sua ação bactericida, o sistema lactoperoxidase tem encontrado diversas aplicações na conservação de produtos lácteos, principalmente em países em desenvolvimento que não dispõem de métodos mais adequados para a preservação do leite. Enquanto alguns autores apontam que a ação oxidante do sistema lactoperoxidase não age sobre os constituintes do leite (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000), outros apontam a ocorrência de aromas indesejáveis devido à oxidação de grupos sulfidrilas (-SH) e de gorduras (CAMPBELL; DRAKE, 2013).

Um tratamento combinando a exposição de leite cru à ação do sistema lactoperoxidase e ultrassom atingiu inativação total da microbiota inicial do leite pela aplicação de peróxido: SCN^- na proporção de 10:10 $mg.L^{-1}$ e tempo de exposição de 10 minutos a ultrassom com amplitude de 125 μm. Os autores também citaram que embora atue rapidamente, o tempo de ação do sistema lactoperoxidase é curto (SHAMILA-SYUHADA et al; 2016). Avaliando a ação isolada do sistema lactoperoxidase, com aplicação apenas de peróxido de hidrogênio e íons SCN^-, observou-se diminuição imediata na contagem total de todas as espécies de microorganismos avaliados no estudo: psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* spp., bactérias ácido láticas, bactérias mesofílicas totais e mofo. Os níveis de todas as espécies avaliadas permaneceram abaixo dos níveis iniciais e permaneceram estáveis até o final do período do experimento (12 horas). (AY; BOSTAN, 2017).

A ativação do sistema lactoperoxidase é também relacionada à melhora das características sensoriais e microbiológicas tanto de queijo de leite bovino (BOULARES et al., 2011) quanto de leite de cabra (SEIFU et al., 2004). Os dois autores citados observaram menores contagens de contaminantes bacterianos nos produtos e também menor ocorrência de lipólise e proteólise nos produtos, mesmo após o período de cura.

Enzimas coagulantes do leite: coagulação enzimática tradicional e novas tendências

A caseína representa cerca de 80% do conteúdo protéico do leite. Apresenta-se sob a forma de sistemas estáveis que permanecem em suspensão coloidal no leite: as micelas de caseína. Existem quatro tipos de moléculas de caseína que são espacialmente organizadas nestas micelas: α_{s1}, α_{s2}, β e κ caseína em proporções de cerca de 4:1:3,5:1,5 (DALGLEISH; CORREDIG, 2012). A principal função da estrutura micelar é exatamente promover a solubilização e fluidização das moléculas de caseína, cálcio e fosfato (FARRELL et al., 2006). As quatro formas de caseína são fosforiladas em resíduos específicos de serina e, dentre eles, a κ-caseína apresenta o menor nível de fosforilação: apenas um ou dois fosfatos em sua estrutura, dependendo de variantes genéticos (FARRELL et al., 2006; DALGLEISH; CORREDIG, 2012; O'RIORDAN et al., 2014). As α_{s1}, α_{s2} e β caseínas possuem 8 , 9-11 e 5 resíduos de serina fosforilados respectivamente e, devido a este fator, são precipitados pela ligação do cálcio a estes resíduos. A κ-caseína, devido ao menor nível de fosforilação, não é suscetível à precipitação pelo cálcio, contudo é capaz de interagir com as caseínas insolúveis para dar forma às micelas que compõe o sistema coloidal das proteínas do leite (FARRELL, et al., 2006).

A κ-caseina não participa na formação dos *nanoclusters* de fosfato de cálcio. Devido a isto, permanece disponível para se associar às demais formas de caseína por interações não covalentes e compor a camada superficial da micela, onde a maior parte da κ-caseína é encontrada (DALGLEISH; CORREDIG, 2012). A κ-caseína parece formar uma camada de "pelos" na superfície da micela, que estabiliza a mesma contra a agregação, por efeitos estéricos e eletrostáticos (GAUCHER et al., 2007; DALGLEISH; CORREDIG, 2012; CHEN et al., 2016) (Figura 2). Esta camada de "pelos" é composta pelo caseinomacropeptídeo, um peptídeo com 64 aminoácidos que se estende da superfície da micela para a solução circuncidante. O caseinomacropeptídeo é a fração da κ-caseína que inicia no terminal C da metionina (o resíduo número 106 na cadeia peptídica da κ-caseína) e termina no último resíduo da cadeia, valina, na posição 169 (DALGLEISH; CORREDIG, 2012; O'RIORDAN et al., 2014).

As enzimas coagulantes do leite eram inicialmente extraídas dos estômagos de bezerros, sendo compostas por uma mistura de quimosina e pepsina, proteases aspárticas, em proporções de aproximadamente 80:20. Enquanto a quimosina possui enorme habilidade em clivar o caseinomacropeptídeo da κ-caseína, na ligação entre os resíduos Phe_{105}-Met_{106}, a pepsina possui uma atividade menos específica, clivando qualquer ligação que apresente resíduos de Phe, Tyr, Leu ou Val (JACOB et al., 2011; YEGIN; DEKKER, 2013).

Praticamente todas as enzimas comercializadas para a coagulação do leite são proteases aspárticas, obtidas de diferentes fontes (não apenas estômagos de bezerros) (JACOB et al., 2011). O pH e a temperatura influenciam fortemente a atividade destas proteases para a coagulação do leite. As proteases aspárticas tendem a ter sua atividade aumentada em pH ácido. Especificamente a quimosina possui sua maior estabilidade em pH entre 5,3 e 6,3. A temperatura ótima para coagulação do leite com a utilização de proteases aspárticas é dependente da fonte de onde a enzima é obtida. Para a quimosina bovina, a temperatura ótima se encontra na faixa compreendida entre 30 e 40 ºC. Alta termorresistência de proteases aspárticas pode causar a formação de sabores e aromas indesejáveis nos queijos curados, devido excessiva degradação das caseínas, caso não sejam inativadas durante o processamento. Contudo, a maior parte da atividade enzimática é perdida durante a produção dos queijos, seja no processo de cozimento ou na moldagem de queijos que passam pelo processo de filagem (YEGIN; DEKKER, 2013).

Fontes para a substituição dos coagulantes obtidos a partir de estômagos de bezerros têm sido utilizadas, como fontes microbianas e vegetais (JACOB et al., 2011; YEGIN; DEKKER, 2013; LEMES et al., 2016; SILVA et al., 2017). As enzimas obtidas a partir destas novas fontes necessitam preencher alguns requisitos que permitam seu uso na indústria de laticínios, como alta atividade na coagulação do leite (por exemplo, alta especificidade sobre a κ-caseína) nas temperaturas e pH de produção do queijo, e termossenssibilidade para que não permaneçam ativas nos produtos obtidos (JACOB et al., 2011). Os coagulantes obtidos através de microorganismos são muito interessantes neste sentido, uma vez que possuem alta estabilidade, rápido crescimento dos microorganismos produtores, custo baixo,

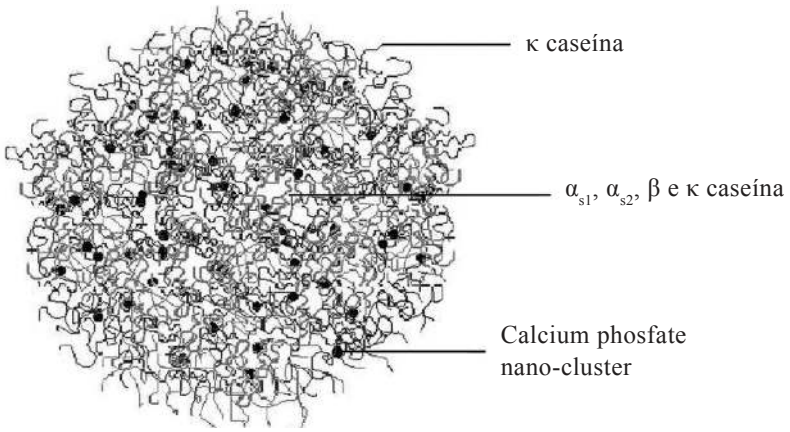

Figura 2 – Estrutura espacial da caseína (HRISTOV et al., 2016)

grande diversidade bioquímica e possibilidade de fácil modificação genética, o que permite a seleção das alternativas mais adequadas para cada aplicação (AHMED et al., 2016).

Técnicas de imobilização de enzimas coagulantes do leite têm sido estudadas e reportadas (ESPOSITO et al., 2016). Celulose tubular, obtida a partir da deslignificação da serragem apresentou-se como uma boa alternativa de suporte para imobilização da quimosina por encapsulamento. Esta alternativa se mostrou promissora, principalmente pelo fato de a enzima imobilizada ter apresentado boa performance até a sétima batelada de coagulação (BAROUNI et al., 2015). Uma enzima coagulante obtidas de *Bacillus subtilis* MTCC 10422 foi imobilizada em matriz de alginato e pectato, e apresentou aumento na faixa de pH ótima de atividade, com atividade residual de 40% (em relação à atividade inicial) após dez bateladas consecutivas (NARWAL et al., 2016). Uma protease alcalina, com atividade coagulante do leite, obtida da folha de *Solanum melongena* (berinjela) foi imobilizada em sílica e na zeólita ZSM-5 por encapsulamento. Os dois suportes apresentaram boa reusabilidade, mesmo após doze bateladas consecutivas. A imobilização também melhorou as propriedades de armazenamento, aumentando o seu ciclo de vida, comparando com a enzima livre (KUMARI et al., 2015).

As enzimas no processamento do leite: produtos livres de lactose e queijo enzimaticamente modificado

A lactose é o principal carboidrato na composição do leite, representando cerca de 5% da sua composição mássica. A maioria das pessoas adultas apresenta algum nível de intolerância à lactose, devido à diminuição dos níveis de atividade da β-galactosidase (lactase) depois dos primeiros anos de desenvolvimento do organismo. A produção de produtos lácteos sem lactose objetiva atender a esta demanda (PANESAR et al., 2010; MATTANNA et al., 2012; PEREIRA et al., 2012).

A utilização da lactase para a hidrólise da lactose é um aspecto importante na indústria de laticínios, visando atender tanto à demanda dos consumidores intolerantes à lactose, quanto aprimorar os processos pelos quais os produtos lácteos são obtidos (PEREIRA et al., 2012). Devido à sua baixa solubilidade, a lactose se cristaliza muito facilmente nos produtos lácteos em que sua concentração relativa seja aumentada, como no doce de leite (KLEIN et al., 2010; PANESAR et al., 2010). A lactase hidrolisa a lactose e leva à formação de dois monossacarídeos: glicose e galactose. Estas moléculas formadas possuem menos tendência à cristalização, devido à sua maior solubilidade, possuem maior poder adoçante que a lactose e são melhor digeríveis pelo trato intestinal humano. Autores afirmam que a hidrólise de 23,16% do conteúdo total de lactose do leite pela lactase, à temperatura de 6 ºC por um período de 5 horas preveniu a cristalização do doce de leite ao longo de todo o seu tempo de vida útil (KLEIN et al., 2010).

Embora o uso da lactase na indústria de laticínios seja feita majoritariamente na sua forma livre, a imobilização desta enzima tem sido proposta como uma boa alternativa. A imobilização tem sido relacionada ao aumento da estabilidade enzimática em relação ao pH e à temperatura, à prevenção da perda de atividade e à possibilidade de ser empregada em processos contínuos (não bateladas). A imobilização da lactase de diferentes fontes (por exemplo, bacterianas e fúngicas) tem sido realizada em diversos suportes como a quitosana, resina fenol-formaldeído, cerâmica porosa, celulose (por adsorção física), alginato de cálcio, hidrogel de álcool polivinílico, gel de poliacrilamida, agarose (encapsulamento), cascas de ovos, gelatina,

sílica gel, grafite e em algodão (imobilização por ligação covalente). A lactase imobilizada tem sido aplicada para os mais diversos fins, como hidrólise da lactose do leite e do soro de queijo e para a síntese de oligossacarídeos. As particularidades de cada processo, relativas ao substrato e à própria enzima, devem ser levadas em conta na escolha da enzima a ser utilizada. As lactases de origem fúngica são mais adequadas a substratos ácidos, como o soro de queijo, por exemplo, enquanto lactases bacterianas são mais adequadas para utilização em meios de pH neutro, como o leite ou na produção de doce de leite (PANESAR et al., 2010).

Mesmo tendo em mente todos os benefícios da utilização da lactase na obtenção de produtos lácteos, sua ação proteolítica secundária pode causar a degradação das características sensoriais e nutricionais do leite armazenado por longos períodos (por exemplo, acima de 60 dias). Este efeito é relacionado à liberação de resíduos de aminoácidos livres do conteúdo proteico do leite. Adicionalmente, produtos da reação de Maillard podem ser formados durante o armazenamento e serem detectados pelos consumidores. Autores têm afirmado que a atividade proteolítica secundária da lactase tem relação direta com o processo de adição direta da enzima à embalagem final do produto, depois do processamento térmico (para leites UHT). O leite que passa pelo processo de hidrólise da lactose antes do processamento UHT não apresenta este efeito de degradação proteica causado pela ação proteolítica secundária da lactase (DARIO et al., 2016). Autores também observaram a liberação de produtos da reação de Maillard, aminoácidos e aminas livres em leite UHT em que se utilizou a lactase para hidrólise da lactose, após nove meses de armazenamento (JANSSON et al., 2014).

A maturação do queijo é um processo biológico/bioquímico complexo que resulta no desenvolvimento de sabores e texturas específicos de cada tipo de queijo. Estas características específicas de cada tipo de queijo são relacionadas principalmente ao metabolismo dos residuais de lactose, lactato e citrato na coalhada, à lipólise e à proteólise. A lipólise no leite leva à liberação de ácidos graxos livres, principalmente os de cadeia curta, durante a maturação e contribui na formação de sabor e aroma. Lipólise em níveis excessivos leva à degradação destas mesmas características, principalmente à formação de rancidez no produto. A lipólise no queijo é devido à presença de agentes lipolíticos de ocorrência natural (lipase lipoproteica) ou adicionados ao longo do processamento, como o coagulante ou a microflora do queijo (advindos de culturas *starter* ou secundárias). Enquanto a lipólise atua principalmente na formação de sabor e aroma, a proteólise tem seu papel primordial na formação da textura do queijo durante a maturação, devido à hidrólise das micelas de caseína. A proteólise também atua na formação de sabor e aroma, pela liberação de peptídeos curtos e aminoácidos que possuem sabor e podem também ser precursores de processos metabólicos que originem compostos que confiram sabor e aroma ao produto final. A principal fonte de agentes proteolíticos que agem durante a maturação do queijo são o coagulante utilizado e as enzimas de origem natural do leite (como a plasmina), que inicialmente quebram as moléculas de caseína em peptídeos de grande e médio peso molecular, e também as culturas *starter* e secundárias que hidrolisam estas moléculas médias e grandes em formas menores (MCSWEENEY, 2004).

Na busca por acelerar os processos de maturação, o uso de enzimas livres é frequentemente preferido em relação ao processo tradicional, que, dependendo do produto, pode levar longos períodos de tempo. Neste contexto, a adição de enzimas proteolíticas e

lipolíticas diretamente ao leite ou à coalhada é boa alternativa para acelerar este processo. Contudo, esta adição direta apresenta algumas desvantagens, como a grande perda de enzimas no soro, má distribuição da enzima na coalhada, entre outros. Além disto, a adição direta de lipases e proteases pode levar à formação de sabor e textura indesejável, devido ao ataque direto excessivo sobre o substrato pelas enzimas. Uma boa forma de eliminar este efeito é a utilização de enzimas encapsuladas ou micro encapsuladas. Desta forma, as enzimas são fisicamente separadas do substrato, o que impede o ataque direto nos estágios iniciais da maturação, sendo gradualmente liberadas ao meio durante o tempo de maturação (GÜLER-AKIN et al., 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As enzimas apresentam um papel de grande importância na indústria de laticínios. Mesmo sendo muito bem conhecida a sua ação sobre o leite e os produtos de laticínios, novas fontes e métodos de utilização têm sido estudados. Processos de imobilização enzimática têm sido sugeridos como boas alternativas para a coagulação e hidrólise, objetivando o aumento da atividade enzimática, da estabilidade frente às condições operacionais e de armazenamento, e também promovendo a sua reusabilidade. Além das enzimas adicionadas para algum fim tecnológico, as enzimas de ocorrência natural no leite também apresentam grande importância na indústria de laticínios, como a fosfatase alcalina e a lactoperoxidase, que são utilizadas como indicadores de processo para validar a eficácia do tratamento térmico. Estas enzimas têm sido estudadas também como indicadoras de garantia da segurança microbiológica do leite em tratamentos alternativas à pasteurização convencional.

REFERÊNCIAS

AHMED, S. A. et al. Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 241-249, 2016.

AY, M.; BOSTAN, K. Effects of Activated Lactoperoxidase System on Microbiological Quality of Raw Milk. **Kafkas universitesi veteriner fakultesidergisi**, v. 23, n. 1, p. 131-136, 2017.

BAROUNI, E. et al. Tubular cellulose/starch gel composite as food enzyme storehouse. **Food Chemistry**, v. 188, p. 106-110, 2015.

BOOTS, J. W.; FLORIS, R. Lactoperoxidase: From catalytic mechanism to practical applications. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1272-1276, 2006.

BOULARES, M.; MANKAI, M.; HASSOUNA, M. Effect of activating lactoperoxidase system in cheese milk on the quality of Saint-Paulin cheese. International **Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 75-83, 2011.

CAMPBELL, R. E.; DRAKE, M. A. Invited review: The effect of native and nonnative enzymes on the flavor of dried dairy ingredients. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 4773-4783, 2013.

CENI, G. et al. Continuous inactivation of alkaline phosphatase and Escherichia coli in milk using compressed carbon dioxide as inactivating agent. **Biochemical Pharmacology**, v. 13, p. 24-28, 2016.

CHEN, Y. C.; CHEN, C. C.; HSIEH, J. F. Propylene glycol alginate-induced coacervation of milk proteins: A proteomics

approach. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 233-238, 2016.

DALGLEISH, D. G.; CORREDIG, M. The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 449-467, 2012.

DARIO, A. et al. The quality of low lactose milk is affected by the side proteolytic activity of the lactase used in the production process. **Food Research International**, v. 89, p. 514-525, 2016.

DUMITRAŞCU, L. et al. Thermal inactivation of lactoperoxidase in goat, sheep and bovine milk – A comparative kinetic and thermodynamic study. **Journal of Food Engineering**, v. 113, n. 1, p. 47-52, 2012.

EGGER, L.; NICOLAS, M.; PELLEGRINO, L. Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk pasteurization. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 963-968, 2016.

ESPOSITO, M. et al. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. **Food Chemistry**, v. 204, p. 115-121, 2016.

FARRELL, H. M. et al. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 2-3, p. 135-147, 2006.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, n. 1, 862537, 2010.

GARG, G.; SEHRAWAT, N.; YADAV, M. Role of Enzymes in Food IndustriesFrontiers in Food Biotechnology. In: SHARMA, C., SHARMA A. K., ANEJA, K. R. **Frontiers in Food Biotechnology**, 1ª ed. New York: Nova Publishers, 2016. cap. 9, p. 219-252.

GAUCHER, I. et al. Physico-chemical characterization of phosphate-added skim milk. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 12, p. 1375-1383, 2007.

GÜLER-AKIN, M. B. et al. Accelerated kashar cheese ripening with encapsulated lipase and protease enzymes. **Italian Journal of Food Science**, v. 24, n. 4, p. 358-366, 2012.

HRISTOV, P. et al. Measurement of Casein Micelle Size in Raw Dairy Cattle Milk by Dynamic Light Scattering. In: **Milk Proteins – From Structure to Biological Properties and Health Aspects.** Published: September 7th, 2016. DOI:10.5772/60465. ISBN: 978-953-51-2537-2.

INNOCENTE, N. et al. Effect of pulsed light on total microbial count and alkaline phosphatase activity of raw milk. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 108-112, 2014.

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 14-33, 2011.

JANSSON, T. et al. Lactose-Hydrolyzed milk is more prone to chemical changes during storage than conventional Ultra-High-Temperature (UHT) Milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 7886-7896, 2014.

KIM, D. et al. Establishing quantitative standards for residual alkaline phosphatase in pasteurized milk. **Korean Journal for Food**

Science of Animal Resources, v. 36, n. 2, p. 194-197, 2016.

KLEIN, M. P.; JONG, E. V. DE; RÉVILLION, J. P. P. Utilização da Beta-galactosidase para prevenção da cristalização em doce de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 34, n. 6, p. 1530-1535, 2010.

KUMARI, A. et al. Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 2, p. 108-114, 2015.

KUSSENDRAGER, K. D.; HOOIJDONK, A. C. M. VAN. Lactoperoxidase: physico-chemical properties , occurrence, mechanism of action and applications. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 19-25, 2000.

LEMES, A. C. et al. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT – Food Science and Technology**, v. 66, p. 217-224, 2016.

LORENZEN, P. C. et al. Activities of alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow , sheep and goat' s milk in relation to heat treatment. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 18-23, 2010.

MATTANNA, P. et al. Parâmetros tecnológicos e sensoriais de requeijões cremosos com baixo teor de lactose. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 387, n. 67, p. 30-37, 2012.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2-3, p. 127-144, 2004.

NARWAL, R. K. et al. Inactivation thermodynamics and iso-kinetic profiling for evaluating operational suitability of milk clotting enzyme immobilized in composite polymer matrix. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 317-328, 2016.

O'RIORDAN, N. et al. Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. **Glycobiology**, v. 24, n. 3, p. 220-236, 2014.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzime Research**, v. 2010, 2010.

PEREIRA, M. C. S. et al. Lácteos com baixo teor de lactose: Uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 389, n. 67, p. 57-65, 2012.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; TRIBST, A. A. L. Effect of ultra high pressure homogenization on alkaline phosphatase and lactoperoxidase activity in raw skim milk. **Italian Oral Surgery**, v. 1, p. 874-878, 2011.

RANKIN, S. A. et al. Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5538-5551, 2010.

SEIFU, E.; BUYS, E. M.; DONKIN, E. F. Quality aspects of Gouda cheese made from goat milk preserved by the lactoperoxidase system. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 581-589, 2004.

SEIFU, E.; BUYS, E. M.; DONKIN, E. F. Significance of the lactoperoxidase

system in the dairy industry and its potential applications: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 137-154, 2005.

SHAMILA-SYUHADA, A. K.; CHUAH, L.; WAN-NADIAH, W. A. Inactivation of microbiota and selected spoilage and pathogenic bacteria in milk by combinations of ultrasound , hydrogen peroxide , and active lactoperoxidase system. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 120-125, 2016.

SILVA, R. R. da et al. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus Phanerochaete chrysosporium. **Food Chemistry**, v. 225, p. 45-54, 2017.

SOSNOWSKI, M.; ROLA, J. G.; OSEK, J. Alkaline phosphatase activity and microbiological quality of heat-treated goat milk and cheeses. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 132-136, 2016.

TAYEFI-NASRABADI, H.; HOSEINPOUR-FAYZI, M. A.; MOHASSELI, M. Effect of heat treatment on lactoperoxidase activity in camel milk: A comparison with bovine lactoperoxidase. **Small Ruminant Research**, v. 99, n. 2-3, p. 187-190, 2011.

TREMONTE, P. et al. Raw milk from vending machines: Effects of boiling , microwave treatment , and refrigeration on microbiological quality. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3314-3320, 2014.

TRUJILLO, A. J.; POZO, P. I.; GUAMIS, B. Effect of heat treatment on lactoperoxidase activity in caprine milk. **Small Ruminant Research**, v. 67, p. 243-246, 2007.

UPADHYAY, L. S. B.; VERMA, N. A three step approach for the purification of alkaline phosphatase from non-pasteurized milk. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. May, p. 3140-3146, 2014.

WILIŃSKA, A. et al. Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 579-586, 2007.

YEGIN, S.; DEKKER, P. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: Structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. **Dairy Science and Technology**, v. 93, n. 6, p. 565-594, 2013.

YONG, L. et al. Investigation of concentration of thiocyanate ion in raw cow's milk from China, New Zealand and the Netherlands. **Food Chemistry**, v. 215, p. 61-66, 2017.

YU, L. et al. Biosensors and Bioelectronics Disposable lateral flow-through strip for smartphone-camera to quantitatively detect alkaline phosphatase activity in milk. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 69, p. 307-315, 2015.