



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS
NA SÍNTESE CONTROLADA DA LACTULOSE
(4-O- β -D-galactopiranosil-D-frutose) EM
LEITE PARA ELABORAÇÃO DE IOGURTE**

ALEXANDRA FABIÓLA BECKER

PINHALZINHO, 2020

ALEXANDRA FABIÓLA BECKER

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS NA SÍNTESE CONTROLADA DA
LACTULOSE (4-O- β -D-galactopiranosil-D-frutose) EM LEITE PARA ELABORAÇÃO
DE IOGURTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dra. Elisandra Rigo

Coorientadora: Dra. Darlene Cavalheiro

Pinhalzinho, SC

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Becker, Alexandra Fabiôla
UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS NA SÍNTESE
CONTROLADA DA LACTULOSE
(4-O-b-D-galactopiranosil-D-frutose) EM LEITE PARA
ELABORAÇÃO DE IOGURTE / Alexandra Fabiôla Becker. --
2020.
110 p.

Orientadora: Elisandra Rigo
Coorientadora: Darlene Cavalheiro
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Chapecó,
2020.


I. Leite Bovino. 2. Leite Ovino. 3. Biocatalisador. 4. Hidrólise.
5. Lactulose. I. Rigo, Elisandra. II. Cavalheiro, Darlene. III.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação
Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS NA SÍNTESE CONTROLADA DA
LACTULOSE (4-O- β -D-galactopiranosil-D-frutose) EM LEITE PARA ELABORAÇÃO DE
IOGURTE**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Banca Examinadora:


Prof. Dra. Elisandra Rigo – Orientadora
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC


Prof. Dr. Alexandre Tadeu Paulino
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC


Prof. Dra. Alline Artigiani Lima Tribst
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP


Prof. Dra. Georgia Ane Raquel Sehn
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Pinhalzinho, 23 de novembro de 2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus pela vida e pelas oportunidades concedidas.

Aos meus pais, João e Isolde, por me incentivar em todos os momentos. Apesar da distância, dos momentos especiais ausentes, tudo ficaria mais difícil sem o apoio de vocês.

Ao meu irmão caçula, Alex, sempre dividindo bons momentos, saiba que estarei sempre disposta a te ajudar quando for preciso, seja nas atividades escolares ou em outros momentos de sua vida.

À minha irmã, Aline, mesmo com a distância pessoal na qual nos encontramos espero um dia voltarmos a conviver como antes.

Ao meu namorado Mateus Pagliarini, pela ajuda no processo de revisão da parte escrita, e apoio sempre que precisei.

E também a minha amiga de infância, Claudia Manzke e afilhada Catarina Manzke Angelin, sempre dando palavras de apoio, e momentos de distração passados juntas.

À minha orientadora, Elisandra Rigo, que me acompanha desde a graduação com palavras de incentivo, e por muitas vezes mostra as diferentes possibilidades que se tem quando as expectativas não são alcançadas.

À minha coorientadora, Darlene Cavalheiro, sempre disponível para auxiliar no que fosse necessário.

As ICs, Letícia e Isadora, auxiliando sempre que preciso, nas inúmeras análises. Um obrigada sem medida.

Aos colegas de Mestrado, Andreia, Micheli, Larissa, Pâmela, Andressa e Dalana pelos ensinamentos, alegrias e frustrações compartilhadas nesse período acadêmico.

Agradeço também à UDESC, FAPESC, ICL e PROZYN por todo apoio e meios concedidos para realização da pesquisa.

Sou grata a todos pelo auxílio seja com palavras ou nas atividades desenvolvidas, enfim demonstro minha gratidão e felicidade, com gostinho de dever cumprido.

Obrigada!

EPIGRAFE

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A utilização de enzimas livre ou imobilizadas na síntese da lactulose (LU) tem sido avaliada com intuito de viabilizar os processos biotecnológicos em lácteos considerando a especificidade e as condições de reação amenas o que tornam o processo mais compatível minimizando a geração de subprodutos. O estudo buscou avaliar a utilização de enzimas para a síntese controlada da LU em leite de diferentes espécies para elaboração de iogurte prebiótico com teor reduzido de lactose. O leite de ovelha (LO) possui maior teor de gordura, proteína e lactose por consequência maior teor de sólidos totais em comparação ao leite bovino (LB). O tempo de hidrólise utilizando enzima livre (EL) e imobilizada (EI) nos leite bovino integral e desnatado (LBI, LBD) e leite ovino integral e desnatado (LOI, LOD) além do meio sintético (MS), apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao obtido com EL e EI. O teor de lactose teve influência sobre o LOI e a gordura em relação ao LBI. A síntese da lactulose foi estudada utilizando duas concentrações diferentes de glicose isomerase (GI) no LBI e LBD, LOI e LOD, seguido de hidrólise da lactose ~60% e adição da enzima GI. A adição de maior concentração de GI (1,7 g GI.100 mL de leite⁻¹) não resultou no aumento da síntese de LU. Para o processo fermentativo foi avaliada a ação da cultura láctica frente a lactulose considerando a composição reduzida de lactose e presença de glicose e galactose. A fermentação do leite bovino integral com lactulose (LBILU) necessitou de menor tempo, 8,5 h, seguido do LBI 9,0 h, leite ovino integral com lactulose (LOILU) 9,5 h e LOI com 10 h. O iogurte ovino (IO – padrão) durante o período de armazenamento (28 dias a 4 °C) e o iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) para acidez com relação ao iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU) e IB. A cor não foi influenciada pela presença de lactulose ($p > 0,05$) para o parâmetro a^* , b^* apresentou diferença de acrodo com a matriz láctea, e L^* teve influência com relação a maior quantidade de sólidos totais, e a variação de cor (ΔE) do IBLU e do IOLU apresentaram diferença perceptível ao olho humano, mais considerável para o 28° dia de armazenamento com relação a amostra padrão IB e IO, respectivamente. A análise microbiológica com relação a Contagem Total de Bactérias Acidófilas Específicas (CTBAE) apresentou pequeno aumento ($p > 0,05$) em relação do 1° ao 28° dia de armazenamento. Para a sinérese comparando todos os iogurtes nos diferentes dias de armazenamento apenas o IO aos 28 dias teve menor sinérese com diferença significativa ($p < 0,05$) e apenas o IOLU teve maior sinérese no 1° dia armazenamento. A textura avaliada em função da adesividade foi maior no IBLU no 1° dia de armazenamento com diferença significativa aos demais ($p < 0,05$). Coesividade apresentou uma pequena diferença significativa ($p < 0,05$) para IBLU em ambos os dias de armazenamento. Em geral, os iogurtes apresentaram um aumento da firmeza durante o armazenamento, IO 28° dia ($p < 0,05$), seguida do IB e IBLU ($p > 0,05$) no 28° dia. Os IBLU e IOLU não apresentaram alteração na elasticidade durante o período de armazenamento. Os IB e IO apresentaram redução da elasticidade durante o armazenamento, especialmente o IO. A gomosidade dos iogurtes se manteve com valores baixos o que mostra uma boa textura do produto. As propriedades bioativas dos iogurtes tiveram bons resultados, maiores para os iogurtes de leite bovino. Assim a utilização de enzimas apresentou potencial aplicação para síntese de LU, apenas necessita de maior síntese para dar ao produto propriedade prebiótica.

Palavras-chave: Biocatalisador. Hidrólise. Síntese. Leite Bovino. Leite Ovino.

ABSTRACT

The use of free or immobilized enzymes in the synthesis of lactulose (LU) has been evaluated in order to enable the biotechnological processes in dairy products considering the specificity and the mild reaction conditions which make the process more compatible, minimizing the generation of by-products. The study sought to evaluate the use of enzymes for the controlled synthesis of LU in milk of different species for the production of prebiotic yogurt with reduced lactose content. Sheep's milk (LO) has a higher fat, protein and lactose content as a result of a higher total solids content compared to bovine milk (LB). The hydrolysis time using free (EL) and immobilized (EI) enzymes in whole and skimmed bovine milk (LBI, LBD) and whole and skimmed sheep milk (LOI, LOD) in addition to the synthetic medium (MS), showed a statistical difference ($p > 0,05$) in relation to that obtained with EL and EI. The lactose content had an influence on LOI and fat in relation to LBI. Lactulose synthesis was studied using two different concentrations of glucose isomerase (GI) in LBI and LBD, LOI and LOD, followed by ~60% lactose hydrolysis and addition of the GI enzyme. The addition of a higher concentration of GI (1,7 g GI 100 mL of milk⁻¹) did not result in an increase in LU synthesis. For the fermentative process, the action of lactic culture against lactulose was evaluated considering the reduced composition of lactose and the presence of glucose and galactose. The fermentation of whole bovine milk with lactulose (LBILU) required less time, 8,5 h, followed by LBI 9,0 h, whole sheep milk with lactulose (LOILU) 9,5 h and LOI with 10 h. Sheep yogurt (IO - standard) during the storage period (28 days at 4 ° C) and whole milk yogurt with lactulose (IOLU) showed no statistical difference ($p > 0,05$) for acidity in relation to yogurt of whole bovine milk with lactulose (IBLU) and IB. The color was not influenced by the presence of lactulose ($p > 0,05$) for the parameter a *, b * showed a difference of acrod with the milk matrix, and L * had influence in relation to the greater amount of total solids, and the variation of color (ΔE) of IBLU and IOLU showed a noticeable difference to the human eye, more considerable for the 28th day of storage in relation to the standard sample IB and IO, respectively. The microbiological analysis in relation to Total Count of Specific Acidophilic Bacteria (CTBAE) showed a small increase ($p > 0,05$) in relation to the 1st to the 28th day of storage. For the syneresis comparing all the yogurts in the different days of storage, only the IO at 28 days had lesser syneresis with significant difference ($p < 0,05$) and only the IOLU had greater syneresis on the 1st day of storage. The texture evaluated as a function of adhesion was higher in the IBLU on the 1st day of storage, with a significant difference from the others ($p < 0,05$). Cohesiveness showed a small significant difference ($p < 0,05$) for IBLU on both days of storage. In general, yogurts showed an increase in firmness during storage, IO 28th day ($p < 0,05$), followed by IB and IBLU ($p > 0,05$) on 28th day. The IBLU and IOLU showed no change in elasticity during the storage period. IB and IO showed reduced elasticity during storage, especially IO. The gumminess of the yogurts remained low, which shows a good texture of the product. The bioactive properties of yogurts had good results, higher for bovine milk yogurts. Thus, the use of enzymes showed potential application for LU synthesis, it only needs greater synthesis to give the product prebiotic property.

Keywords: Biocatalyst. Hydrolysis. Synthesis. Bovine milk. Sheep Milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática de estruturas de oligossacarídeos prebióticos.....	24
Figura 2 – Estrutura molecular da lactulose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ; 4-O-β-D-galactopiranosil- β -D-frutofuranose).....	26
Figura 3 – Fluxograma da síntese enzimática da lactulose a partir da lactose no leite utilizando as enzimas: β- galactosidade na hidrólise da lactose e transgalactosilação e a glicose isomerase na isomerização.....	28
Figura 4 – Fluxograma do estudo da elaboração de iogurte prebiótico através da síntese da lactulose em leite bovino e ovino através de enzimas imobilizadas.....	36
Figura 5 – Comportamento cinético da hidrólise da lactose em (A) meio sintético (LS) e leite bovino desnatado (LBD), com enzimas livre (EL) e imobilizada (EI), (B) leite sintético (LS), leite bovino integral (LBI), com enzima livre (EL) e enzima imobilizada (EI), (C) leite sintético (LS) e leite ovino desnatado (LOD) com enzima livre (EL) e enzima imobilizada (EI), e (D) leite sintético (LS) e leite ovino integral (LOI), com suas respectivas enzimas, enzima livre (EL) e enzima imobilizada (EI).....	51
Figura 6 – Valores de pH e acidez a partir de leite bovino integral (LBI) e leite bovino integral zero lactose (LBIZ) durante o tempo de fermentação a 43 °C.....	58
Figura 7 – Valores de pH e acidez a partir de leite bovino desnatado (LBD) e leite bovino desnatado zero lactose (LBDZ), durante o tempo de fermentação a 43 °C.....	59
Figura 8 – Valores de pH e acidez a partir de leite ovino integral (LOI) e leite ovino desnatado (LOD), durante o tempo de fermentação a 43 °C.....	60
Figura 9 – Valores de pH e acidez a partir de leite sintético (LS), durante o tempo de fermentação a 43 °C.....	61
Figura 10 – Valores de acidez titulável e pH durante a fermentação até pH 4,8 do leite: bovino integral com lactulose (LBILU) (△) acidez e (▲) pH, leite bovino integral (LBI) (⊖) acidez e (■) pH, leite ovino integral com lactulose (LOILU) (◇) acidez e (◆) pH, e leite ovino integral (LOI) (⊖) acidez e (●) pH.....	64
Figura 11 – Valores correspondentes a acidez titulável (A) e valores de pH (B) dos iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), durante o período de 28 dias de armazenamento à 4 °C.....	69
Figura 12 – Representação fotográfica das amostras de leite bovino e ovino utilizadas na produção dos iogurtes.....	72
Figura 13 – Avaliação do perfil de textura A) adesividade, B) coesividade, C) dureza, D) elasticidade e E) gomosidade, para iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), no 1° e 28° dia de armazenamento a 4 °C.....	78
Figura 14 – Propriedades bioativas dos iogurte (A) atividade antidiabética, B) atividade anti-inflamatória, C) atividade antioxidante por ABTS, D) atividade antioxidante por DPPH) e E) compostos fenólicos totais para iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), no 1° e 28° dia de armazenamento a 4 °C.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análises físico-químicas, métodos e referências utilizados para as análises do leite bovino (LB), leite ovino (LO) e seus respectivos iogurtes (I).....	41
Tabela 2 – Análise microbiológica e referências das análises do leite bovino (LB), leite ovino (LO) e seus respectivos iogurtes (I).....	44
Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão das análises físico-químicas do leite bovino integral (LBI) e leite ovino integral (LOI) para elaboração dos iogurtes.....	47
Tabela 4 – Contagem de mesófilos aeróbios viáveis dos leites bovino integral (LBI) e ovino integral (LOI) pasteurizado a 65 °C por 30 min.....	49
Tabela 5 – Valores de Vmax e Km em leite bovino integral (LBI), leite bovino desnatado (LBD), leite ovino integral (LOI), leite ovino desnatado (LOD) e leite sintético (LS), com suas respectivas enzimas, enzima livre (EL) e enzima imobilizada (EI).....	53
Tabela 6 – Determinação da hidrólise da lactose com a β -galactosidase durante 34 h a 10 °C, a isomerização da glicose em frutose pela enzima glicose isomerase durante 36 h a 8 °C e a transgalactolisação para síntese de lactulose no leite bovino integral (LBI) e desnatado (LBD), e leite ovino integral (LOI) e desnatado (LOD).....	55
Tabela 7 – Valores correspondentes ao teor de lactulose presente no leite no início da síntese e após 36 h a 8 °C com enzima imobilizada.....	62
Tabela 8 – Resultado das análises físico-químicas dos iogurtes de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO).....	68
Tabela 9 – Variações no índice de cor para os parâmetros ΔE , L*, a* e b* para iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), durante 28 dias de armazenamento a 4 °C.....	70
Tabela 10 – Concentração de lactulose no iogurte de leite bovino com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino (IB), iogurte de leite ovino com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino (IO) ao 1° e 28° dia de armazenamento a 4 °C.....	73
Tabela 11 – Contagem microbiológica do iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU), iogurte de leite ovino integral (IO) no 1° e 28° dia de armazenamento a 4 °C.....	74
Tabela 12 – Sinérese para iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), durante 28 dias de armazenamento a 4 °C.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Acidez
P	Proteína
G	Gordura
ST	Sólidos Totais
SNG	Sólidos Não Gordurosos
C	Cinzas
GI	Glicose Isomerase
LU	Lactulose
LA	β – galactosidase
BAL	Bactérias ácido-lácticas
LO	Leite Ovino
LB	Leite Bovino
LOI	Leite Ovino Integral
LOD	Leite Ovino Desnatado
LBI	Leite Bovino Integral
LBD	Leite Bovino Desnatado
EL	Enzima Livre
EI	Enzima Imobilizada
MS	Meio Sintético
LS	Leite Sintético
GOS	Galactooligossacarídeos
OS	Oligossacarídeos
LBIZ	Leite Bovino Integral Zero Lactose
LBDZ	Leite Bovino Desnatado Zero Lactose
LOI	Leite Ovino Integral
LOILU	Leite Ovino Integral com Lactulose
LBI	Leite Bovino Integral
LBILU	Leite Bovino Integral com Lactulose
UHT	Ultra High Temperature
I	Iogurte
IBLU	Iogurte de Leite Bovino Integral com Lactulose
IB	Iogurte de Leite Bovino Integral
IOLU	Iogurte de Leite Ovino Integral com Lactulose

IO	Iogurte de Leite Ovino Integral
CMAV	Contagem de Mesófilos Aeróbios Viáveis
CTCT	Contagem Total de Coliformes Termotolerantes
CCT	Contagem de Coliformes Totais
CBL	Contagem de Bolores e Leveduras
CTBAE	Contagem Total de Bactérias Acidófilas Específicas
TPA	Análise do Perfil de Textura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	LEITE	19
3.1.1	Composição do leite bovino	20
3.1.2	Composição do leite ovino	22
3.2	PREBIÓTICOS.....	24
3.2.1	Síntese da lactulose	27
3.2.1.1	<i>Síntese da lactulose via enzimática</i>	27
3.2.2	Condições de reação de síntese	29
3.3	PRODUTOS REDUZIDOS DE LACTOSE	30
3.4	IOGURTE.....	31
3.4.1	Teores de gordura e proteína	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	LEITE.....	36
4.2	IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β – GALACTOSIDASE.....	37
4.3	HIDRÓLISE DA LACTOSE COM ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA	37
4.4	SÍNTESE DA LACTULOSE	38
4.5	PROCESSO FERMENTATIVO COM DIFERENTES TEORES DE GORDURA ...	39
4.6	CULTURA LÁTICA FRENTE A LACTULOSE	39
4.7	ELABORAÇÃO DO IOGURTE PREBIÓTICO	40
4.8	METODOLOGIAS ANALÍTICAS	40
4.8.1	Análises Físico-Químicas	40
4.8.1.1	<i>Determinação do teor de lactose – Método do ácido dinitrossalicílico - DNS</i>	41
4.8.1.2	<i>Determinação de monossacarídeos</i>	42
4.8.1.3	<i>Determinação enzimática de lactulose</i>	42
4.8.2	Análise colorimétrica	42
4.8.3	Sinérese	42
4.8.4	Perfil de textura	43
4.8.5	Avaliação Microbiológica	43
4.8.6	Propriedades bioativas e compostos fenólicos do iogurte	44
4.8.6.1	<i>Compostos Fenólicos Totais</i>	44

4.8.6.2	<i>Atividade anti-inflamatória</i>	45
4.8.6.3	<i>Atividade antidiabética</i>	45
4.8.6.4	<i>Atividade antioxidante – ABTS</i>	46
4.8.6.5	<i>Atividade antioxidante – DPPH</i>	46
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1	LEITE	47
5.2	HIDRÓLISE DA LACTOSE DE DIFERENTES MEIOS COM ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA	50
5.3	SÍNTESE DA LACTULOSE	54
5.4	ANÁLISE DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO FRENTE A DIFERENTES TEORES DE GORDURA E LACTOSE.....	57
5.5	AÇÃO DA CULTURA LÁTICA FRENTE A LACTULOSE	61
5.6	PRODUÇÃO DE IOGURTE PREBIÓTICO REDUZIDO DE LACTOSE	61
5.6.1	Síntese da lactulose no leite	61
5.6.2	Tempo de fermentação para produção do iogurte	63
5.6.3	Iogurte	66
5.6.4	Cor	70
5.6.5	Lactulose no iogurte	72
5.6.6	Análises microbiológicas do iogurte	74
5.6.7	Sinérese	75
5.6.8	Perfil de Textura	77
5.6.9	Propriedades bioativas e compostos fenólicos totais do iogurte	80
6	CONCLUSÃO	844
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
	REFERÊNCIAS	866
	APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR	1077
	APÊNDICE B – DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO	1099

1 INTRODUÇÃO

Os galactooligossacarídeos (GOS) são oligossacarídeos não digeríveis, utilizados como ingredientes alimentares prebióticos (KLEIN et al., 2013). O consumo regular pode promover o crescimento e o metabolismo de bifidobactérias intestinais, estes microorganismos estão associados a efeitos positivos à saúde (como a redução do nível de colesterol e propriedades anticarcinogênicas) (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008).

Entre os GOS, destaca-se a lactulose (4-O- β -D-galactopiranosil- β -D-frutofuranose), conhecida como um produto isomerizado sintético e não digerível da lactose que compreende monômeros de frutose e galactose (AÏT-AISSA; AÏDER, 2014). Usualmente sintetizada através de meio sintético contendo lactose e frutose (PANESAR, KUMARI, 2011; GUERRERO et al., 2015; GUERRERO et al., 2020), lactose de soro de leite (SONG et al. 2013a; WU et al., 2017), e ainda, a lactose do soro de leite e frutose (SCHMIDT; NEDELE; HINRICHS, 2020). A síntese química da lactulose necessita de altas concentrações de catalisador e a reação é pouco específica, gerando produtos indesejados (epilactose, galactose, tagatose) e compostos coloridos, de modo que várias etapas posteriores são necessárias para atingir a pureza (PANESAR; KUMARI, 2011; NOOSHKAM; MADADLOU, 2016), tornando o processo complexo e oneroso (MAYER; KRANZ; FISCHER 2010; TANG et al., 2011; SONG et al., 2013).

A formação de lactulose por catálise enzimática apresenta uma alternativa para diminuir os problemas encontrados pela via química. Para sintetizar a lactulose via enzimática é necessário realizar a hidrólise da lactose em glicose e galactose, a qual ocorre com a β -galactosidase, enzima amplamente utilizada no desenvolvimento de novos produtos com teor reduzido de lactose e ainda para produção de prebióticos. O galactosil da lactose pode ser transferido para uma hidroxila contendo um aceptor (frutose) levando a síntese de lactulose (β -d-galactosil-(1-4) - β -D-frutose) ou outros possíveis isômeros (ponte β -1,4 ou β -1,6), dependendo da seletividade da enzima e condições de reação utilizadas (PANESAR et al., 2011, KLEIN et al., 2013, GUERRERO et al., 2017; BELLÉ et al., 2018).

Outra forma de realizar a síntese da lactulose é através da hidrólise da lactose com a β -galactosidase, com posterior isomerização da glicose à frutose via enzimática usando a glicose isomerase (SHAKOOR; SINGH; SINGH, 2018), sem necessidade de adição da

frutose externa. Assim, é possível sintetizar a lactulose visando a utilização da galactose e frutose por meio da transgalactosilação (WANG et al., 2013) aliando a tecnologia de obtenção de prebióticos com a redução da lactose. No entanto, poucos estudos apresentados na literatura avaliam a imobilização e utilização destas enzimas em leite oriundo de diferentes espécies e com teores variados de gordura e lactose.

A síntese de lactulose catalisada por enzimas tem a vantagem de não requerer substratos puros; soro de leite ou permeado de soro, que são subprodutos da fabricação de queijo podem ser usados como fontes de lactose ou ainda o próprio leite. A seletividade e as condições de reação amenas tornam o processo mais compatível diminuindo a geração de subprodutos.

A lactose presente no leite é relevante para a produção de aditivos e ingredientes, incluindo lactitol, lactulose, ácido lactobiônico e oligossacarídeos (CHEN; GÄNZLE, 2017; CHENG; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, 2018). Visando atender o índice ascendente de portadores de intolerância à lactose, estimado em cerca de 70 % da população adulta no mundo que manifesta alguma deficiência de lactase no organismo (RUEDA et al., 2016), bem como a busca por alimentos funcionais (BALTHAZAR et al., 2017), tecnologias aliadas ao uso de enzimas e técnicas de imobilização são estudados para o aprimoramento da economia e eficiência dos processos biotecnológicos (HETTIARACHCHY et al., 2018). A imobilização da β -galactosidase em quitosana como suporte (BELLÉ et al., 2018; FLORES et al., 2019) e genipina como agente de reticulação e ativação natural, para aplicação em processos de hidrólise de lactose e síntese de prebióticos (GUERRERO et al., 2017) são indicadas como alternativa promissora na área de alimentos.

O iogurte pode ser classificado como um alimento funcional e sua ingestão regular contribuir para redução da ocorrência de doenças cardiovasculares, osteoporose e problemas intestinais (MIOR; NOVELLO; DINON, 2016). Além de agregar valor ao produto, pela produção de prebióticos em leite bovino e leite ovino aliado ao processo fermentativo para redução da lactose conferindo-lhes características particulares. Nesse contexto, faz-se necessário o respaldo científico para afirmação da síntese enzimática da lactulose utilizando as enzimas imobilizadas β -galactosidase e glicose isomerase em diferentes tipos de leite a fim de se obter um iogurte prebiótico com teor reduzido de lactose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização da enzima β -galactosidase para produção de glicose e galactose, e o uso de glicose isomerase para síntese controlada da lactulose em leites de diferentes espécies com teores variados de gordura com finalidade de elaboração de iogurte com característica prebiótico e teor reduzido de lactose (Apêndice B).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Coletar os leites e armazenar em recipientes sob refrigeração;
- B) Pasteurizar os leites coletados;
- C) Caracterizar o leite pasteurizado, ovino e bovino:
 - Parâmetros físico-químicos (acidez, pH, cinzas, umidade, sólidos totais, sólidos não gordurosos e cinzas);
 - Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos;
- D) Determinar a cinética da hidrólise da lactose:
 - Leite bovino com diferentes teores de gordura;
 - Leite ovino com diferentes teores de gordura;
 - Leite sintético;
- C) Quantificar a concentração de lactulose em leite ovino e bovino com diferentes teores de gordura antes e após a síntese;
- D) Estudar a hidrólise de lactose através da utilização da β -galactosidase e isomerização da galactose a frutose através da glicose isomerase, e na sequência síntese da lactulose;
- E) Verificar a influência da lactulose e dos teores de gordura dos leites ovino e bovino no processo fermentativo;
- F) Elaborar iogurte com lactulose produzida “in loco”:
 - Produzir o iogurte prebiótico e determinar as propriedades bioativas do iogurte após digestão “in vitro” (atividades antidiabética, anti-inflamatória, antioxidante por ABTS e DPPH e compostos fenólicos totais), também sinérese, textura e cor instrumentais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEITE

O leite proveniente de glândula mamária contém um conjunto grande e diversificado de proteínas, gorduras, carboidratos e substâncias bioativas que variam em decorrência do estágio da lactação, idade e estado de saúde do animal (MUDALIAR et al., 2016; MAITY; AMBATIPUDI, 2019; DELOSIÈRE et al., 2019). O leite contribui com 8 % da energia, 12 % de gordura e quase 16 % de proteína na dieta norte-americana, com percentuais ainda maiores na Europa (MUEHLHOFF; BENNETT; MCMAHON, 2013). Os lácteos contribuem entre 52 e 67 % da ingestão dietética de referência (IDR) de cálcio para a dieta americana (ROZENBERG et al., 2016). O consumo de leite na América do Sul é de cerca de 140 kg/per capita/ano, com potencial para a adição de prebióticos e culturas probióticas em suas formulações (BALTHAZAR et al., 2017).

A produtividade do leite ovino e de outras espécies, como o leite bovino, é influenciada por fatores que modificam sua composição química ao longo do tempo e pelos animais, principalmente devido a raça, paridade, estação do ano, temperatura ambiente, idade, nutrição ou estágio de lactação (PARK et al., 2007). O leite ovino em especial possui maior interferência quanto a baixa produtividade animal e sazonalidade da produção de leite ao longo do ano e o curto período de lactação (HAENLEIN; WENDORFF, 2006).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (2019) o país com maior produção de leite é a Índia, seguido dos Estados Unidos da América, China, Paquistão e Brasil.

Os dados registrados da fabricação de derivados de leite ovino em escala industrial brasileira indicam sua principal ocorrência em Santa Catarina na região Oeste, Rio Grande do Sul nas regiões da Serra e Metropolitana, Rio de Janeiro no Centro-Sul e no Sul de Minas Gerais (NESPOLO et al., 2012), sendo os principais produtos produzidos são ricotas, queijos, iogurtes, doces de leite e chantilly (DOS SANTOS et al., 2016). Já os produtos produzidos a base de leite bovino, no Brasil são amplamente distribuídos pela região Sul, Sudeste e Centro Oeste, principalmente em Goiás.

A baixa produção nacional de derivados lácteos ovinos tem ganhado lugar nas gôndolas, no entanto, ainda há um grande espaço a ser explorado no quesito de produtos produzidos, gerando oportunidades de um grande mercado consumidor a ser conquistado

(BIANCHI, 2018). O crescimento esperado da produção de leite ovino até 2030 é cerca de 30 a 50 % (PULINA et al., 2018). Dessa forma, produtos lácteos a partir do leite ovino tem tendência a aumentar e agregar valor pela adição de prebióticos e culturas probióticas em suas formulações (BALTHAZAR et al., 2017) e com propriedades sensoriais diferenciadas (RANADHEERA; NAUMOVSKI; AJLOUNI, 2018).

Benéfico à saúde humana, em decorrência de sua composição (THORNING et al., 2017), o leite é o alimento mais completo do ponto de vista nutricional, decorrente do seu elevado valor biológico, alta digestibilidade, fonte de proteína e cálcio (REVERS et al., 2016). As caseínas são responsáveis pela estabilização do fosfato de cálcio, que maximiza a biodisponibilidade e permite maior distribuição e absorção intestinal no qual resulta em um maior tempo de digestão e a biodisponibilidade dos nutrientes encontrados no leite (LAMBERS; VAN DEN BOSCH; DE JONG, 2013; WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2013).

A composição do leite é afetada pelo conteúdo de gordura e de proteína que na aplicação em produtos resulta em propriedades tecnológicas distintas. Decorrente do tipo de espécies e raças, alimentação, período de seca e tempo de lactação dos animais (DOUËLLOU; MONTEL; THEVENOT SERGENTET, 2017). Com isso, a composição dos diferentes tipos de leite influencia diretamente no rendimento dos produtos produzidos.

3.1.1 Composição do leite bovino

O leite bovino pela sua ampla produção no Brasil é destinado para produção de vários derivados: leite UHT, queijos de baixa e alta umidade, iogurte, bebida láctea, nata, manteiga entre outros, principalmente pela alta produção desta matéria-prima comparada a outras espécies.

Segundo Guetouache, Guessas e Medjekal (2014), o leite bovino é composto por 3,7 % de gordura, 3,5 % de proteína total sendo 2,8 % caseína, 4,9 % de lactose, 0,72 % de sais minerais e água. A presença da gordura é responsável pelo sabor específico do leite bovino, pelos glóbulos de gordura ser dispersos e rodeados por uma camada fina composta de um complexo lipídico-proteico e uma pequena quantidade de carboidrato (CHATTERJEE et al., 2015; DOUËLLOU; MONTEL; THEVENOT SERGENTET, 2017).

A gordura do leite é formada por glóbulos de gordura que diferem entre espécies de mamíferos. Cada glóbulo se origina dentro da célula epitelial mamária como uma gotícula

citoplasmática lipídica que é envolvida na secreção com uma porção da membrana plasmática da célula epitelial mamária. A formação dos glóbulos de gordura do leite compreende um núcleo lipídico o qual é cercado por uma membrana de camada dupla, uma gotícula citoplasmática lipídica a qual é formada por um núcleo lipídico neutro contendo principalmente triacilgliceróis rodeado por uma monocamada de fosfolipídios e proteínas (WALTER et al., 2020).

A fusão de gotículas lipídicas demonstra o crescimento mamário da gotícula citoplasmática lipídica, dependendo das composições de lipídios e proteínas polares (MATHER et al., 2019). A diferença dos tamanhos dos glóbulos de gordura do leite bovino e demais espécies implica em termos da composição de ácidos graxos do núcleo dos glóbulos de gordura do leite (WALTER et al., 2020).

A lactose é um dissacarídeo composto de glicose e galactose combinada com uma ligação β -1 \rightarrow 4 glicosídeo. Está presente apenas no leite e produtos lácteos, seu conteúdo no leite bovino é em média de 4,8 % (GÄNZLE et al., 2008). A hidrólise da lactose gera monossacarídeos que são importantes para a elaboração de diversos produtos, como o iogurte e ainda para a síntese de prebióticos.

As proteínas do leite, além de ser uma excelente fonte de nutrientes e aminoácidos essenciais para humanos, têm outras funções como aumentar o sistema imunológico e proteção contra várias doenças (MUDGIL et al., 2018). As proteínas do leite dentro de suas estruturas primárias possuem vários peptídeos bioativos com ampla gama de atividades biológicas. A liberação destes peptídeos bioativos após hidrólise por enzimas intestinais ou a fermentação microbiana pode transmitir uma variedade de efeitos benéficos sobre o hospedeiro (MUDGIL et al., 2018). Peptídeos bioativos de proteínas do leite bovino é a fonte mais amplamente estudada (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2015).

Além dos muitos efeitos benéficos do leite bovino, suas glicoproteínas, glicolipídios e carboidratos têm propriedades anti-adesivas contra vários patógenos intestinais (MILLS et al., 2011), os peptídeos bioativos (DAVOODI et al., 2016) com propriedades anti-carcinogênicas (β -lactoglobulina, lactoferrina, albumina) (PEPE et al., 2013), anti-hipertensivas (α -lactofina, β -lactofina, β -lactosina B e lactotripeptídeos caseinizados) (JÄKÄLÄ; VAPAATALO, 2010), também os lipídios bioativos, como os ácidos linolêicos conjugados (CLAPS et al., 2017).

3.1.2 Composição do leite ovino

A partir do leite ovino é possível a produção de queijos finos, iogurtes, sorvetes, leite congelado, leite UHT, leite em pó (ROHENKOHL et al., 2011). A elevada concentração de gordura e de proteínas no leite ovino o torna interessante para ser utilizado principalmente para a produção de queijos finos e iogurtes.

Produtos produzidos a partir de leite ovino exibem características organolépticas diferenciadas, como sabor azedo e cremoso (KAMINARIDES; STAMOU; MASSOURAS, 2007). No caso do iogurte apresenta firmeza e superfície lisa, com pouca evidência de sinérese (UNAL; AKALIN, 2013), isto está relacionado a espécie e ao teor dos componentes do leite em questão.

O leite ovino contém significativamente maior concentração de proteína, caseína, cálcio, gordura, lactose, ácido linolênico conjugado e vitaminas que o leite bovino (BALTHAZAR et al., 2017).

Entre os ruminantes, a gordura do leite ovino contém não apenas níveis mais elevados de ácido linoleico conjugado (0,65 g CLA/100 g de ácidos graxos), que é muito importante no sentido nutricional e fisiológico (ZAMBERLIN; SAMARŽIJA, 2017), mas também uma grande quantidade de ácido vacênico, precursor do CLA (REVILLA et al., 2017). A gordura de origem ovina é altamente saturada (65 a 75 g/100 g de ácidos graxos) com 11 % de ácidos graxos de cadeia curta e média (REVILLA et al., 2017). Possui maior porcentagem de triacilgliceróis - TAGs de cadeia média (C26-C36) do que o leite bovino e uma proporção menor de TAGs de cadeia longa (C46-C54). Isso impacta no ponto de fusão, TAGs de cadeia média têm ponto de fusão inferior e tamanhos moleculares menores (BALTHAZAR et al., 2017), com isso ocorre uma menor aderência na corrente sanguínea.

O armazenamento pode ser de forma congelada, sem alterar suas características ou separar fases após o descongelamento, sendo assim possível armazenar volumes maiores para a industrialização (BIANCHI, 2018). Esse fator se dá em função do tamanho reduzido das moléculas de gordura (TRIBST et al., 2018) a média desses diâmetros de glóbulos é de aproximadamente 3,6 e 3,0 μm contra 4,0 μm de leite bovino (GANTNER et al., 2015; BALTHAZAR et al., 2017a), os quais após o descongelamento são facilmente homogeneizadas com outros compostos, principalmente com a água. O tamanho e a dispersão dos glóbulos de gordura conferem maior consistência a esses leites, favorecendo o congelamento sem separação de fases (BALTHAZAR et al., 2017a).

A lactose presente na matriz láctea tem bastante variação, pois é dependente da espécie, alimentação e manejo dos animais. Para o leite ovino o teor é em torno de $4,6\pm 0,1$ % (TRIBST et al., 2019). Sua quantidade está relacionada também com a produção pelas células alveolares, pois este constituinte é responsável pela pressão osmótica do leite. No início e fim da lactação apresenta baixo teor de lactose, enquanto no pico da lactação apresenta teores mais elevados (NOBLE et al., 2002).

O leite ovino é fonte de minerais e possui quase duas vezes mais proteína em comparação ao leite bovino (BALTHAZAR et al., 2017). A forma molecular das proteínas do leite ovino e a sequência de aminoácidos tem qualidade nutricional e impacta na digestibilidade e termoestabilidade (CLAEYS et al., 2014). Estas são consideradas importantes fontes de peptídeos bioativos, identificados em hidrolisados de proteína do leite e produtos lácteos fermentados (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2015; EGGER; MÉNARD, 2017). Os níveis de cálcio, fósforo, magnésio, zinco, manganês e cobre são maiores em leite ovino (WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2013). A biodisponibilidade desses minerais faz com que este seja uma fonte importante desses elementos na dieta alimentar (BALTHAZAR et al., 2017). Giroux, Veillette e Britten (2018) relataram valores médios de gordura ($6,42\pm 0,04$ %), sólidos não gordurosos de ($12,4\pm 0,01$ %), proteína ($5,79\pm 0,12$ %), lactose ($4,62\pm 0,03$ %), para o leite ovino.

O leite ovino é considerado um alimento funcional, além de seu objetivo principal de nutrição (MILLS et al., 2011). A bioatividade no leite está associada a proteínas, peptídeos, lipídios e carboidratos (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Em seu estado nativo, muitas das proteínas do leite ovino não são bioativas (KORHONEN; PIHLANTO, 2003). No entanto, os peptídeos bioativos podem ser liberados como resultado de hidrólise de proteínas ou por fermentação com bactérias lácticas (MILLS et al., 2011; MOATSOU; SAKKAS 2019).

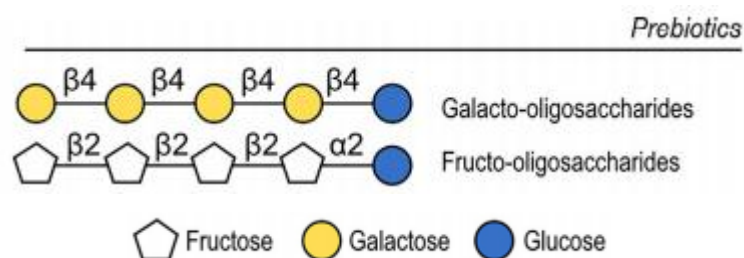
Com isso o leite ovino possui características as quais podem ser utilizadas para a elaboração de diversos produtos com texturas e sabores distintos, empregando propriedades funcionais como a inclusão de prebióticos.

3.2 PREBIÓTICOS

Os prebióticos são definidos como ingrediente alimentar resistente à digestão que afeta benéficamente a saúde do hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento de um número limitado de bactérias no cólon (GIBSON et al., 2017). Ainda, Charalampopoulos e Rastall (2012) relatam como sendo um ingrediente seletivamente fermentável que possibilita modificações na composição e na atividade da microbiota gastrointestinal. Ou seja, os oligossacarídeos não digeríveis podem estimular o crescimento de bifidobactérias benéficas no cólon, agindo como compostos prebióticos (OLIVEIRA et al., 2015).

Os prebióticos são cadeias lineares de oligossacarídeos constituídas por um único monômero de monossacarídeo (WU; JOHNSON-HENRY; SHERMAN, 2019) (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática de estruturas de oligossacarídeos prebióticos.



Fonte: Adaptado de Wu, Johnson-Henry e Sherman (2019).

Seu efeito é definido como a capacidade de estimular seletivamente a composição e/ou atividade de micro-organismos intestinais, como bifidobactérias e lactobacilos, a fim de conferir um benefício à saúde (GIBSON et al., 2017). Como os seres humanos não expressam enzimas necessárias para degradar os prebióticos, mais de 99 % desses oligossacarídeos não são digeridos e atravessam o trato gastrointestinal no intestino grosso (BODE, 2012).

Quando na presença de micro-organismos específicos, os prebióticos são rapidamente metabolizados pela expressão de enzimas de degradação. Assim, essas enzimas de origem prebiótica permitem que espécies bacterianas hidrolisem suas estruturas de oligossacarídeos e, em seguida, utilizam a degradação de mono e dissacarídeos como fontes de energia (WU; JOHNSON-HENRY; SHERMAN, 2019). Entre eles o grupo que se

destaca é as bifidobactérias, que é uma bactéria gram-positiva estritamente anaeróbica, comumente presente no intestino de crianças amamentadas (DAVIS et al., 2016).

Os diferentes tipos de prebióticos (inulina, amido resistente e lactulose) (CHEN; GANZLE, 2017; DELGADO-FERNÁNDEZ et al., 2019), são comumente incorporados a alimentos. Quando consumido em quantidade suficiente, aumentam o volume das fezes, promovem a proliferação celular, diminuem a reabsorção de água e a absorção de sódio, estimulam a secreção de muco, diminuem o pH do cólon, aumentam a função imunológica e, principalmente, aumentam o crescimento de bactérias benéficas no intestino (CHEN; GANZLE, 2017).

A β -galactosidase produzida a partir de *Kluyveromyces lactis* tem sido amplamente empregada na hidrólise de lactose visando a obtenção de produtos zero lactose, com liberação de glicose e galactose (KLEIN et al., 2013). Esta enzima utilizada para a produção de prebióticos como os galacto-oligossacarídeos e a lactulose (GUERRERO et al., 2017).

Os prebióticos como a lactulose (4-O- β -D-galactopiranosil-D-frutose) são constituídos por unidades de galactose e frutose (Figura 2), sintetizados pela primeira vez por Montgomery e Hudson (1930), como um novo açúcar, pelo seu poder dulçor equivale a metade da sacarose (OLIVEIRA, 2009; ZIEGLER; SGARBIERI, 2009), e considerado um promotor da saúde (PANESAR; KUMARI, 2011; SONG et al., 2013; WANG et al., 2013; NATH et al., 2016).

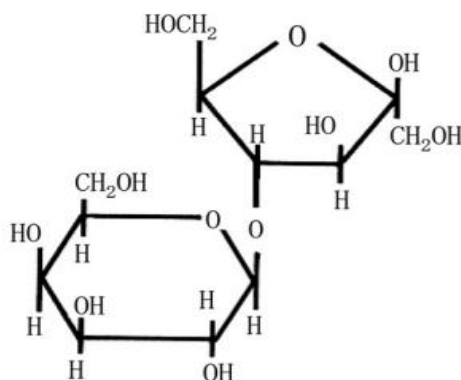
A lactulose apresenta propriedades funcionais que torna sua aplicação em alimentos uma boa alternativa (PANESAR; KUMARI, 2011; AÏT-AISSA; AÏDER, 2014), como para regulação intestinal (PANESAR; KUMARI, 2011; RUSZKOWSKI; WITKOWSKI, 2019), propriedades nutricionais e farmacológicas, baixo conteúdo calórico e baixa carcinogenicidade, previne a adesão e patogenicidade de bactérias e toxinas (ZIMMER et al., 2017).

A evidência de sua eficácia como prebiótico *in vivo* aumentou o uso de lactulose em produtos lácteos (PHILIPPI, 2008; WENDLING; WESCHENFELDER, 2013), principalmente em iogurtes e leites fermentados nos quais o apelo a essa funcionalidade é bem comum ser empregada. A lactulose é também usada pelas indústrias de alimentos para enriquecer produtos devido aos seus benefícios prebióticos para a saúde humana

(GANZLE; HAASE; JELEN, 2008) bem como é estimulado pela aceitação por parte dos consumidores (BALTHAZAR et al., 2017).

A forma comercialmente encontrada apresenta-se como xaropes ricos em lactulose, com outros constituintes presentes, principalmente galactose, lactose e açúcares oriundos do método de obtenção (ZIMMER et al., 2017). Podendo ser químico ou enzimático, através de meios que contenham alta concentração de lactose, como em leite (RENTSCHLER et al., 2015) ou soro de leite em pó (SONG et al., 2013a; WU et al., 2017).

Figura 2 – Estrutura molecular da lactulose ($C_{12}H_{22}O_{11}$; 4-O- β -D-galactopiranosil- β -D-frutofuranose).



Fonte: SEKI; SAITO, 2012.

Nesse sentido, os efeitos da lactulose dependem da dose, 2 g de lactulose administrada aumentariam os níveis de ácidos graxos de cadeia curta do conteúdo intestinal. Além disso, 5 g de lactulose todos os dias já incluiria os efeitos bifidogênicos. Portanto, quando a contagem bacteriana aumentar, posteriormente, ocorre o aumento do acetato, butirato e de lactato com uma diminuição de ácidos graxos de cadeia ramificada. Tendo em vista que alimentos considerados prebióticos devem conter em sua porção no produto pronto para consumo de no mínimo 3 g de lactulose, ou outra fibra alimentar não digerível (BRASIL, 2018).

A ação da enzima β -galactosidase, em suas formas livre ou imobilizada, tem uma aplicação importante na indústria de alimentos para hidrólise de lactose e síntese de GOS (KLEIN et al., 2013). Os GOS contribuem para mudanças na textura, características sensoriais e prazo de validade dos alimentos devido à sua capacidade de retenção de água,

capacidade de formação de gel, texturização e espessamento (RAKHESH; FELLOWS; SISSONS, 2015).

3.2.1 Síntese da lactulose

3.2.1.1 Síntese da lactulose via enzimática

A obtenção da lactulose pode ser realizada através da síntese enzimática em um meio no qual tenha a presença do substrato (lactose) e condições de processo (temperatura, pH e outros) no qual a enzima tenha condições para atuar na hidrólise, isomerização e transgalactosilação da lactose a lactulose.

A síntese enzimática da lactulose gera menos produtos secundários, pela atuação da β -galactosidase e glicose isomerase (MAYER; KRANZ; FISCHER, 2010; ZIMMER et al., 2017), por ser uma reação específica. Duas das enzimas responsáveis por essa síntese são a β -galactosidase, a qual possui grande importância na indústria de lácteos, pois catalisa a conversão de lactose em glicose e galactose (HEMAVATHI; RAGHAVARAO, 2011) e a glicose isomerase que converte glicose a frutose (SHAKOOR; SINGH; SINGH, 2018).

A β -galactosidase, livre ou imobilizada, cliva a ligação glicosídica da lactose produzindo glicose e galactose, resultando em leite com baixo teor de lactose (GUVEN et al., 2011; CAIS-SOKOLIŃSKA; WÓJTOWSKI; PIKUL, 2016; BELLÉ et al., 2018). A partir da lactose e da frutose ocorre a transgalactosilação em lactulose (HUA et al., 2010; PANESAR; KUMARI, 2011; TANG et al., 2011) (Figura 3).

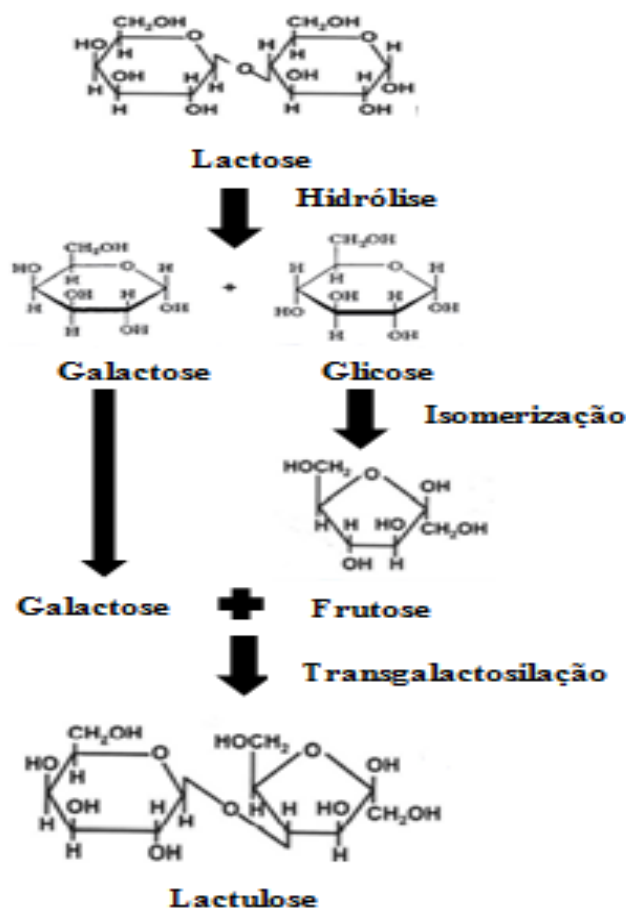
Em estudo realizado por Song et al. (2013), a β -galactosidase imobilizada em condições otimizadas resultou no aumento de 1,6 vezes da concentração da lactulose quando o biocatalizador era reutilizado 10 vezes em operação de bateladas repetitivas.

O uso de enzima imobilizada permite um controle das condições de operação, flexibilidade no projeto do reator e a recuperação de produtos, também aumenta a eficiência do uso de biocatalizadores com operação prolongada (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1998; ILLANES et al., 2006), além disso, a imobilização geralmente aumenta a estabilidade enzimática (GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017).

A imobilização de β -galactosidase como aprisionamento, adsorção, reticulação, ligação covalente e combinações pode alterar as propriedades da enzima drasticamente, por

isso existe a necessidade de uma seleção criteriosa do tipo de imobilização (GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017).

Figura 3 – Fluxograma da síntese enzimática da lactulose a partir da lactose no leite utilizando as enzimas: β - galactosidase na hidrólise da lactose e transgalactosilação e a glicose isomerase na isomerização.



Fonte: Adaptado de Nooshkam; Babazadeh; Jooyandeh (2018).

Em estudo realizado por Wang et al. (2013), a síntese enzimática da lactulose foi realizada tanto em batelada como em contínuo. Em batelada as desvantagens são que exige maiores quantidades de enzima, mas a reação é controlada, e a recuperação deve ser feita quando a concentração do produto é máxima, o que ocorre antes que a hidrólise prevaleça sobre a transgalactosilação (HUA et al., 2013; SITANGGANG, DREWS, KRAUME, 2014; GUERRERO et al., 2015).

A hidrólise da lactose em glicose e galactose pela β -galactosidase já é uma tecnologia difundida nas indústrias de laticínios para reduzir o teor de lactose do leite e de

seus derivados, através de mecanismo específico (KLEIN et al., 2013). Conferem sabor adocicado aos derivados lácteos (SHENDURSE; KHEDKAR, 2016) pelo poder dulçor da glicose, além de atingir um público com problemas de saúde relacionados a intolerância à lactose, aumentando a solubilidade e a digestibilidade dos alimentos lácteos (RICARDI et al., 2018).

3.2.2 Condições de reação de síntese

Em condições de altas concentrações de lactose, a β -galactosidase é capaz de “ativar” o seu outro mecanismo catalítico, o de transgalactosilação. Em altas concentrações desse dissacarídeo no meio reacional a enzima, além da hidrólise da lactose, promove a formação de oligômeros - galacto- oligossacarídeos (GOS) (BELLÉ, 2017). González-Delgado et al. (2016) observaram a otimização da síntese de GOS a partir da lactose utilizando a β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym Pure 6500 L), analisando parâmetros como temperatura, concentração de enzima, pH e tempo de reação constataram que o pH é um parâmetro crítico que afeta a transgalactosilação / hidrólise realizada pela enzima.

Entre os estudos que envolvem a aplicação da β -galactosidase, ressalta-se o uso para a síntese de lactulose. Guerrero et al. (2017), avaliaram a imobilização β -galactosidase em diferentes suportes para obter catalisadores altamente ativos e estáveis para a síntese de lactulose, obtendo resultados satisfatórios com o uso de suportes à base de agarose.

A primeira síntese enzimática de lactulose foi descrita por Vaheri e Kaupinnen (1978), onde observaram a síntese de $8,6 \text{ g L}^{-1}$ de lactulose utilizando a enzima β -galactosidase na presença de lactose e frutose (em pH 7,2 e $37 \text{ }^\circ\text{C}$).

A imobilização de β -galactosidase para a hidrólise/transgalactosilação da lactose é uma estratégia promissora para a indústria de alimentos quando o objetivo é produzir alimentos com teores reduzidos de lactose e com propriedades prebióticas (GUERRERO et al., 2017; FLORES et al., 2019).

Rentschler et al. (2015), realizaram conversões enzimáticas de lactose em leite UHT contendo 1,5% de gordura e lactose inicial de $48,5 \pm 2,1 \text{ g L}^{-1}$ com agitação a $8 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h. O máximo de bioconversão da lactulose obtida foi de $27,5 \text{ g L}^{-1}$ (56,7 % lactulose/lactose) foi atingido após 72 h.

Chockchaisawasdee et al. (2005) realizaram um estudo da síntese de GOS a partir de *Kluyveromyces lactis*, em relação à concentração de lactose e concentração da enzima. Os resultados mostraram que a quantidade de GOS formada dependeu da concentração da lactose, mas não da concentração da enzima, com melhor desempenho utilizando de 40 °C e pH 7.

A fonte da enzima e as condições de operação da reação (concentração de lactose, atividade da água, temperatura, pH e outros) pode influenciar notavelmente o rendimento e a composição de GOS sintetizados (URRUTIA et al., 2013).

Portanto, novas estratégias de operação para aumentar o rendimento, a produtividade e a seletividade de síntese de lactulose são necessárias. Entre elas, a operação em lotes repetidos com enzimas imobilizadas provou ser uma estratégia sólida para aumento de lactulose e oligossacarídeos produzidos por unidade de massa de catalisador (GUERRERO et al., 2020). No entanto, as características do catalisador são determinantes para o desempenho da reação (GUERRERO et al., 2015). Várias estratégias têm sido usadas para imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, nomeadas de aprisionamento, adsorção, ligação covalente, reticulação ou combinações dos mesmos (GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017a).

3.3 PRODUTOS REDUZIDOS DE LACTOSE

A intolerância à lactose é uma condição gastrointestinal comum devido à incapacidade de digerir e absorver a lactose. A lactose requer hidrólise em D-glicose e D-galactose por enzima β -galactosidase no intestino delgado, mas a atividade desta enzima é baixa em aproximadamente 70 % da população adulta em todo o mundo, devido a um declínio gradual geneticamente na expressão de lactase após o desmame (WORTMANN; SIMON; DA SILVEIRA, 2013; SAQIB et al., 2017; CORGNEAU et al., 2017; SKRYPLONEK et al., 2019), por isso o mercado vem investindo em produtos sem lactose (SILVA, 2016), com intuito principal de suprir as necessidades desses indivíduos que não conseguem metabolizar completamente a lactose (MORLOCK; MORLOCK; LEMO, 2014; SITANGGANG; DREWS; KRAUME, 2016).

O mercado brasileiro teve crescimento anual de 15 a 20 % até 2020 com relação a produtos zero lactose, de acordo com pesquisa realizada pela Revista Indústria de Laticínios (2017). É possível alavancar ainda mais o consumo de produtos lácteos

funcionais, com teor reduzido ou zero lactose além da presença de prebióticos, que são facilmente associados. Isso torna um desafio a indústria láctea e ao mesmo tempo oportunidade para desenvolver novos produtos, a fim de atender uma crescente massa de consumidores portadores de má digestão da lactose (PEREIRA et al., 2012).

Já a glicose isomerase de fonte *Streptomyces murinus*, é reconhecida como segura (GRAS), possui capacidade de converter D-glicose em D-frutose *in vitro* (SHAKOOR; SINGH; SINGH, 2018).

A aplicação industrial de biocatalisadores em sua forma livre é muitas vezes inconveniente devido ao alto custo de produção, baixa estabilidade operacional, problema com separação tediosa após a realização da bioconversão e falha na reutilização, entre outros fatores (BEDADE; SUTAR; SINGHAL, 2019). Uma maneira de reduzir custo é através da imobilização da enzima, a mais utilizada é através de ligações covalentes, também aprisionamento e reticulação (MÍGUEZ et al., 2018).

3.4 IOGURTE

A legislação indica que um produto para ser considerado iogurte deve possuir contagem de bactérias lácticas totais (UFC g⁻¹) de no mínimo 10⁷, ou no caso de mencionar o uso de bifidobactérias, a contagem deve ser de no mínimo 10⁶ UFC de bifidobactérias g⁻¹. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, iogurte é o produto incluído na definição cuja fermentação se realiza com cultivos proto-simbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* aos quais podem acompanhar de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que contribuem para a determinação das características do produto acabado.

Os leites fermentados são considerados produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias. Obtido da coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação da lactose e produção de ácido láctico (COSTA et al., 2016). Mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos, conhecidos como bactérias ácido lácticas (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2013).

Os requisitos físico-químicos para leite fermentado integral, parcialmente desnatado e desnatado é teor de matéria gorda láctea (%) de 3,0 a 5,9; 0,6 a 2,9 e máximo 0,5, respectivamente; acidez de 0,6 a 2,0 (g de ácido láctico 100 g de amostra⁻¹) sendo que esta equivale a um nível de pH na faixa de 3,5 a 4,6, após 48 h do processo de fermentação; e mínimo de 2,9 % de proteínas (BRASIL, 2007).

Os leites fermentados são tradicionalmente produzidos pela fermentação espontânea, induzida pelo ácido láctico do leite (WIDYASTUTI; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, 2014), ou por bactérias ácido lácticas (BAL) (SERAFEIMIDOU et al., 2013), que liberam peptídeos bioativos, os quais existem naturalmente nos alimentos ou são formados ou formulados durante o processamento de alimentos (PARK, 2009).

Os peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteínas que possuem impacto nas funções do organismo e podem influenciar a saúde beneficemente (RIZZELLO et al., 2016), como compostos reguladores com atividade semelhante aos hormônios (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2015). Para a saúde, os efeitos benéficos incluem atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensivas e imunomoduladoras (MUNIANDY; SHORIB; BABA, 2016; MUDGIL et al., 2018; AYYASH et al., 2018).

O iogurte é melhor absorvido do que o leite por intolerantes à lactose (WEBB; DONOVAN; MEYDANI, 2014), visto que parte da lactose presente no leite é hidrolisada para acidificação do meio. Nos produtos com reduzido teor de lactose ou zero lactose a fermentação ocorre mais facilmente, e são mais digeríveis, reduzindo o tempo de elaboração necessário para atingir o pH de produtos como iogurtes (FACIN et al., 2015; SAQIB et al., 2017; BELLÉ et al., 2018). Ou seja, clivando a lactose em glicose e galactose antes da ação das bactérias lácticas, processo esse realizado em produtos zero lactose (ZADOW, 1993). Além dos benefícios aos consumidores intolerantes a lactose, ocorre o aumento da doçura e a solubilidade do produto em questão, visto que o grau de doçura desses dois monossacarídeos é quase sete vezes maior que da lactose isolada (VASILEVA et al. 2012), o que leva a indústria a diminuir a adição de açúcares aos produtos com hidrólise da lactose.

Na produção de iogurte, cerca de 20 a 40 % da lactose presente no leite é transformada em ácido láctico (SHIBY; MISHRA, 2013). A cultura láctea composta por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* à 0,1 U L⁻¹, hidrolisa a lactose e realiza a acidificação do meio, diminuindo o pH em temperaturas de 43

°C até o pH desejado (pH~4,8), sendo assim necessário cessar a fermentação através da diminuição da temperatura para 4 °C para que o gel não desestabilize e ocorra sinérese.

No processo da fermentação a pH 4,5, a repulsão eletrostática entre as micelas de caseína diminui, causando sua agregação em uma rede de gel homogêneo (LEE; LUCEY, 2010). Moussier et al. (2019) relatam que com taxas médias de acidificação e pH final de 4,5, forma géis com firmeza inicial quebradiça, que tendem a entrar em colapso posteriormente.

O iogurte é o mais popular dos leites fermentados, considerado uma fonte rica de cálcio e proteínas do leite com maior valor biológico (LOVEDAY; SARKAR; SING, 2013; SIVIERI et al., 2017; KARNOPP et al., 2017).

Propriedades organolépticas, reológicas, textura e microestrutura de iogurte são dependentes e envolvem vários fatores, como processo de fermentação, tipo de leite, culturas iniciais, embalagem e condições de armazenamento (FAZILAH et al., 2018). Contudo, o iogurte constitui-se em um excelente veículo para aplicação funcional (FABERSANI et al., 2018). Também pelas propriedades reológicas e características de textura desempenham um papel importante na avaliação sensorial e na aceitabilidade do consumidor (PELAES VITAL et al., 2015). Em particular, o processamento inovador na elaboração de iogurte inclui a adição de probióticos, prebióticos ou sua combinação, teor reduzido de lactose, com incorporação de componentes bioativos de fontes naturais para melhorar o valor nutricional, perfil sensorial, características físico-químicas e reológicas bem como fornecer propriedades terapêuticas (FAZILAH et al., 2018).

A indústria a fim de garantir uma textura apropriada e evitar defeitos aumentam os teores de sólidos totais do leite, adicionando leite em pó e estabilizantes como as gomas (MATUMOTO-PINTRO et al., 2011). No iogurte tradicional, o gel de proteína é estabilizado principalmente por interações fracas e não covalentes. A introdução de novas ligações covalentes leva à formação de gel com diferentes estruturas e propriedades (DOMAGALA et al., 2013).

A busca por alimentos diferenciados e inovadores cresceu nos últimos anos e essa tendência atrai também os derivados de leite de diversas origens, como o leite ovino, o que colabora é o aumento no consumo de produtos gourmet e funcionais. Esses produtos apresentam um valor de venda maior que os tradicionais, uma ótima oportunidade aos derivados lácteos (BIANCHI, 2018).

3.4.1 Teores de gordura e proteína

O iogurte é formado por uma rede de proteínas, de agregados de micelas de caseína desenvolvidos durante a fermentação, os quais aprisionam soro e glóbulos de gordura, que influenciam diretamente na reologia e textura do produto final (NGUYEN et al., 2013). As propriedades reológicas do iogurte afetam significativamente a qualidade do produto, como a viscosidade e a estrutura do gel, as quais são influenciadas pela composição do leite, especialmente conteúdos de gordura e proteína (LEE; LUCEY, 2010; VIANNA et al., 2017).

No caso de produtos com baixo teor de gordura, o comportamento das proteínas durante o processo de gelificação tem grande importância. Especialmente no iogurte, que aparece como um gel fraco, a redução do teor de gordura causa uma fase de separação e sinérese, diminuindo a capacidade de retenção de água (LAIHO et al., 2017).

Para compensar a redução de gordura, o mais comum é envolver substâncias que substituam a gordura por estabilizantes/espessantes. Muitos substitutos de gordura, como o uso de carboidratos, proteínas, ou substâncias sintéticas foram aplicados para melhorar a qualidade do iogurte com baixo teor de gordura (ARANCIBIA et al., 2011). Apesar desse meio encontrado para substituição da gordura, o produto produzido, em geral, não contém as características sensoriais e textura equivalente.

Outro fator que influencia os teores de gordura e proteína do iogurte refere-se a origem do leite. As diferentes espécies de animais lactantes geram produtos distintos, como o iogurte de leite ovino que possui gel forte e baixa sinérese (MIOCINOVIC et al., 2016) com relação ao iogurte de leite bovino. É necessário levar em consideração que o leite ovino contém mais proteína, caseína, cálcio, gordura, ácido linolênico conjugado e vitaminas do que o leite bovino (BALTHAZAR et al., 2017).

Os glóbulos de gordura do leite ovino possuem menor diâmetro, em torno de 3,5 μm , já o leite bovino apresenta diâmetro de 4 μm (BALTHAZAR et al., 2017). São cercados por uma monocamada fosfolipídica e uma complexa bicamada lipídica, denominada membrana globular da gordura do leite (DEWETTINCK et al. 2008).

Na fabricação de iogurte, os pequenos glóbulos uniformes de gordura do leite ovino asseguram sua homogeneização e dispersão, não havendo a separação do creme no iogurte (KALYANKAR et al., 2016a).

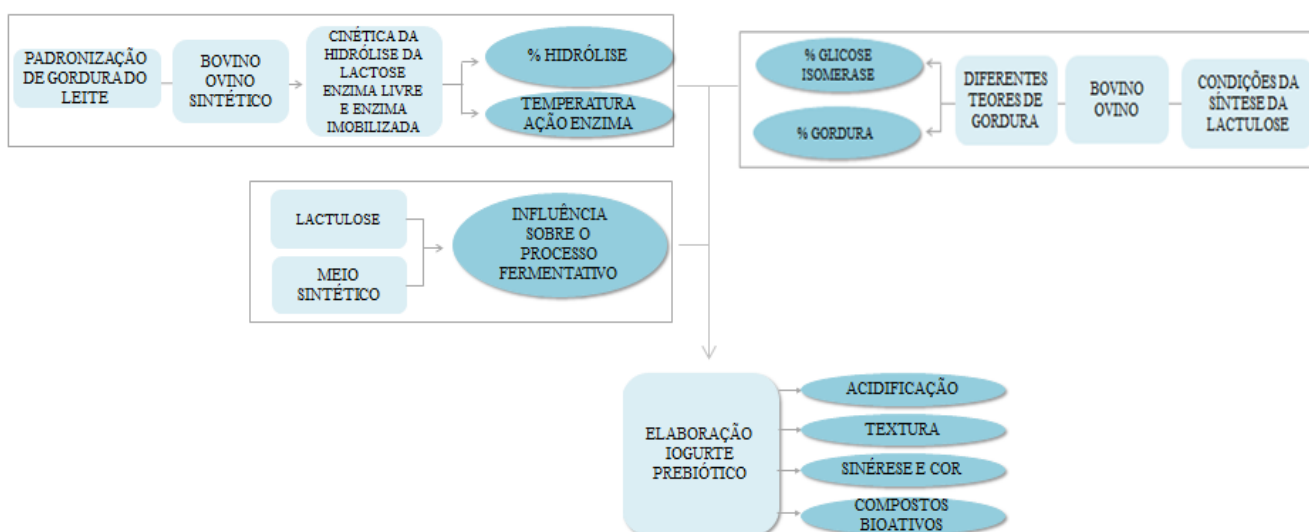
Assim como as proteínas de alto valor nutricional e seus aminoácidos essenciais, a lactose também é fonte de material energético para diversos processos biotecnológicos, matéria-prima importante da indústria alimentícia e farmacêutica (LEIDENS, 2013), por isso da sua importância na produção de iogurtes e demais lácteos.

O objetivo deste estudo foi investigar a síntese enzimática da lactulose em leite bovino e ovino com diferentes teores de gordura para produção de um iogurte com características prebióticas, através de análises físico químicas e reológicas, e ainda fornecer uma comparação sistemática dessas propriedades entre os iogurtes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este item aborda a metodologia utilizada no presente estudo. As análises foram realizadas no Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. As principais etapas realizadas durante o estudo estão sintetizadas na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma do estudo da elaboração de iogurte prebiótico através da síntese da lactulose em leite bovino e ovino através de enzimas imobilizadas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

4.1 LEITE

O leite ovino da raça Lacaune e/ou bovino da raça Jersey foi obtido de uma fazenda localizada no interior de Lajeado Grande/SC, transportados em recipientes de 5 litros em caixa de material isotérmico contendo gelo a fim de manter a temperatura de 4 °C, até a UDESC de Pinhalzinho/SC. Os leites foram coletados em réplicas.

Os leites foram submetidos ao desnate através da centrífuga (Canapatop) com objetivo de padronização da gordura do leite, desnatado ($\sim 0,5 \pm 0,02$ %; LBD e LOD) e integral ($> 3,5 \pm 0,5$ %; LBI e LOI) seguido de pasteurização.

A pasteurização lenta foi realizada em 65 °C por 30 min sob agitação (300 rpm) em Thermomix™ (Vorwerk, modelo Bimby ® 5 (TM5)). Posteriormente, os leites pasteurizados foram resfriados à 10 °C, para realização dos experimentos. O leite ovino pasteurizado foi congelado (-10 °C) em recipientes de polipropileno de 140 mL em freezer

vertical (Consul) até sua utilização. O descongelamento foi realizado sob refrigeração (~10 °C) em geladeira (Brastemp) (TRIBST et al., 2018). A realização das análises físico-químicas e microbiológicas estão descritas nessa seção.

4.2 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β – GALACTOSIDASE

A β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (EC 3.2.1.23) foi cedida pela empresa Prozyn (São Paulo, Brasil) e a quitosana para a produção do suporte adquirido da Polymar (Fortaleza, Brasil). A genipina de grau analítico foi adquirida da Sigma-Aldrich (San Luis, EUA). O suporte de imobilização foi definido com esferas de quitosana preparadas seguindo metodologia proposta por Lima (2020). 0,2 g de quitosana foram solubilizadas em 10 mL de solução de ácido acético 0,35 M e submetidas à sonicação em banho ultrassom (Solidsteel modelo SSBuc 6L) (40 °C) por 1 h e após gotejamento com uma seringa e agulha em solução de coagulação (hidróxido de sódio 1 M e etanol 26 % v v⁻¹) à 10 °C, sob agitação (250 rpm) em um agitador magnético. As esferas permaneceram em repouso por 2 h em geladeira (10 °C), seguida de lavagem com água destilada até sua neutralidade e posterior secagem em filtro (Whatman qualitativo n° 40) com bomba a vácuo (1 h/ 100 mbar).

O processo de ativação foi realizado em concentrações de soluções de genipina 0,5 % em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 (KLEIN et al., 2016). Para a avaliação da ativação foram utilizadas as esferas de 2 mm (0,08 g) as quais foram imersas em solução de genipina (0,4 mL) em tubos de ensaio, tomando o cuidado para que todas as esferas permanecessem imersas na solução de genipina. O tempo de ativação utilizado foi de 1 h à 60 °C em shaker sem agitação (Lucadema modelo LUCA 223).

Após a ativação, as enzimas foram imobilizadas em 2 mL de solução enzimática com concentração de 56 U mL⁻¹ durante 8 h à 25 °C em shaker (Lucadema modelo LUCA 223), com agitação de 200 rpm. As enzimas imobilizadas (EI) foram armazenadas congeladas (-10 °C) por um período máximo de 15 dias (LIMA, 2020).

4.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE COM ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

A hidrólise da lactose no leite foi realizada utilizando enzima livre (EL) (56 U) através da adição da enzima diretamente no leite (LBI, LBD, LOI, LOD todos com EL). A hidrólise da lactose com enzima imobilizada (EI) dos leites (LBI, LBD, LOI, LOD todos com EI) seguiu os mesmos parâmetros de processo com EL.

O meio sintético (MS) é constituído por 9 mL de uma solução de lactose tamponada 3,85 % m v⁻¹ (solução de lactose em tampão fosfato de 0,1 M pH 6,8) e 1 mL de enzima β -galactosidase diluída em tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 (56 U). Para a enzima imobilizada foi produzido a partir de 9 mL de uma solução de lactose tamponada 3,85 % m v⁻¹ (solução de lactose em tampão fosfato de 0,1 M pH 6,8) e 0,0914 g de enzima β -galactosidase imobilizada (56 U).

Os ensaios foram realizados em incubadora BOD a 10 °C e 150 rpm. A alíquota coletada (10 μ L) foi incubada em banho-maria digital SSD 5L (Solidsteel, Brasil) a 90 °C/1 min para cessar a reação de hidrólise. Posteriormente, foi acompanhado o teor de glicose através do Kit de Glicose P-P (Analisa®) com adição de 1 mL de reagente de cor e incubado a 37 °C/10 min (Solidsteel, Brasil), com leitura da absorbância em 505 nm através de espectrofotômetro Cirrus 80 SA (Femto, Brasil), para verificar o grau de hidrólise da lactose do leite pela estequiometria de reação, considerando que para cada molécula de lactose degradada é formada por uma molécula de glicose e uma molécula de galactose (TREVISAN, 2008). A reação foi realizada até obter a hidrólise máxima (~100 %) mantendo as características do leite.

4.4 SÍNTESE DA LACTULOSE

A síntese da lactulose nos leites (LBLU, LBI, LOLU e LOI) foi realizada em três etapas: (a) adição da enzima β -galactosidase imobilizada, adicionada em suporte de poliéster com espessura de 0,15 mm e diâmetro de 42 mm, com área de 160 cm², para a hidrólise da lactose em condições estabelecidas por Lima (2020), 10 \pm 1 °C com 250 rpm por 34 h até hidrolisar em torno de 60 % da lactose determinada pela análise de glicose pelo Kit de Glicose PP (Analisa®); (b) adição da enzima glicose isomerase (EC 5.3.1.5) (Sigma Sigma-Aldrich Co. - Germany) imersa em suporte de poliéster com espessura de 0,15 mm e granulometria de 42 mesh, com área de 160 cm², para realizar a isomerização da glicose durante 36 h a 8 \pm 1 °C e agitação de 200 rpm (RENTSCHLER et al., 2015); (c) transgalactosilação da frutose e galactose para síntese da lactulose, quantificada pelo kit de

enzimas comerciais (K-Lactul; Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Ireland), seguido da análise de espectrofotometria em absorvância de 340 nm (BOITZ; MAYER, 2016).

O teor de glicose mínima para realizar a adição da glicose isomerase foi acompanhado pelo Kit de Glicose P-P (Analisa®), com leitura da absorvância em 505 nm através de espectrofotômetro Femto – Cirrus 80. A alíquota de 10 µL da amostra foi adicionada a 1 mL de reagente de cor, e incubado a 37 °C/10 min (Solidsteel, Brasil), com leitura da absorvância em 505 nm em espectrofotômetro Cirrus 80 SA (Femto, Brasil).

Também foi realizado o estudo de duas concentrações diferentes de glicose isomerase (0,5 e 1,7 g GI 100 mL de leite⁻¹) no leite após 34 h da hidrólise a 10±1 °C, e a adição de glicose isomerase por 36 h a 8±1 °C, ambas com agitação de 200 rpm, a fim de determinar a máxima síntese da lactulose aplicada a leite bovino integral (LBI), leite bovino desnatado (LBD), leite ovino integral (LOI) e leite ovino desnatado (LOD).

O processo de obtenção da lactulose foi controlado pela ação da glicose isomerase, considerando a concentração de lactulose obtida. A concentração mínima de lactulose indicada em alimentos é de 3 g (BRASIL, 2018), sendo esta quantificada pelo Kit de lactulose (K-Lactul; Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Ireland) a fim de controlar o máximo de 5 g dia⁻¹ pelo efeito laxante quando consumido em maiores quantidades.

4.5 PROCESSO FERMENTATIVO COM DIFERENTES TEORES DE GORDURA

Com o intuito de verificar a ação da cultura lática (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) foi realizada a fermentação com o leite bovino integral UHT (LBI), leite bovino desnatado UHT (LBD), leite bovino integral zero lactose UHT (LBIZ), leite bovino desnatado zero lactose UHT (LBDZ), leite ovino integral (LOI) e leite ovino desnatado (LOD) até pH 4,8, para verificar o tempo de fermentação dos leites de diferentes espécies, integral e desnatado.

4.6 CULTURA LÁTICA FRENTE A LACTULOSE

A ação da cultura lática sobre a lactulose é de extrema importância no processo de obtenção do iogurte e manutenção da concentração sintetizada no meio. Para isso, foi utilizado um leite sintético (LS) contendo proteína (caseína), gordura (creme de leite zero lactose - Piracanjuba), solução salina (0,85 %), lactulose (Cobalt – Xarope de Lactulose

667 mg mL⁻¹), buscando simular o leite já sintetizado, ou seja, com presença de lactulose, durante 4,5 h determinando o pH durante a fermentação e seu comportamento frente a presença de lactulose.

4.7 ELABORAÇÃO DO IOGURTE PREBIÓTICO

Após a seleção do leite e concentração de gordura (integral ou desnatado) de acordo com o teor de lactulose produzida, este foi utilizado para o desenvolvimento do iogurte e verificação das suas características e composições. As amostras foram designadas como sendo IB – iogurte de leite bovino integral e IO – iogurte de leite ovino integral, os quais serão os iogurtes controle. Já o IBLU – iogurte de leite bovino integral com lactulose e o IOLU – iogurte de leite ovino integral com lactulose foram provenientes da hidrólise da lactose seguidos da síntese da lactulose.

Após a síntese da lactulose, o leite controle (LBI e LOI) e o leite com lactulose (LBILU e LOILU) foram aquecidos à 43 °C para inoculação direta da cultura láctica comercial (YF-L811, Chr. Hansen) composta por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* na concentração de 0,003% e após distribuídos em embalagens de polietileno com capacidade para 100 mL (6,7 cm de diâmetro e 4,9 cm de altura).

O processo de fermentação foi conduzido à 43 °C em câmara BOD (Solidsteel, Brasil), até o produto atingir pH 4,8±0,05, sendo imediatamente resfriado através da reprogramação da BOD para temperatura de 4±1 °C, permanecendo armazenado nesta temperatura até as análises (1, 14, e 28 dias) (BALTHAZAR et al., 2016; VIANNA et al., 2017; MOSCHOPOULOU et al., 2018; FENG et al., 2019).

4.8 METODOLOGIAS ANALÍTICAS

As análises realizadas no leite e no iogurte são descritas nesta seção: análises físico-químicas, microbiológicas, teor de lactose, monossacarídeos, teor de lactulose, cor instrumental, sinérese, perfil de textura, bioatividades e compostos fenólicos

4.8.1 Análises Físico-Químicas

As análises físico-químicas realizadas foram pH, acidez (A), proteína (P), gordura (G), sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG) e cinzas (C), as quais estão

indicadas na Tabela 1, seguidas dos métodos e referências para o leite e o iogurte produzido.

Tabela 1 – Análises físico-químicas, métodos e referências utilizados para as análises do leite bovino (LB), leite ovino (LO) e seus respectivos iogurtes (I).

Parâmetro	Amostra	Método	Referência
Ph	LB, LO e I	(Potenciométrico)	Medidor de pH de bancada (mPA 210 – MS Tecnoyon)
A	LB, LO	(Titulométrico nº 947.05)	(AOAC, 2016)
	I	(Titulométrico)	INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008)
P	I	(Micro - Kjeldahl para N total, F 6,38) (nº 991.20)	(AOAC, 2016)
G	LB e LO	(Gerber nº 2000.18)	(AOAC, 2016)
U	I	(Evaporação)	(INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008)
ST	LB, LO	(nº 990.20)	(AOAC, 2016)
SNG	LB e LO	(nº 990.21)	(AOAC, 2016)
C	LB, LO e I	(nº 920.153)	(AOAC, 2016)

Acidez (A), proteína (P), gordura (G), umidade (U), sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), cinzas (C), leite bovino (LB), leite ovino (LO), iogurte (I).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

4.8.1.1 Determinação do teor de lactose – Método do ácido dinitrossalicílico - DNS

Para o leite pasteurizado o teor de lactose foi quantificado pelo método do DNS segundo Miller (1959). A curva padrão foi preparada utilizando-se uma solução mãe de glicose com concentração de 2 g L⁻¹. Em seguida foram preparadas soluções com concentrações de 0,6 a 1,5 g L⁻¹. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Femto – Cirrus 80) a 540 nm e luz visível.

4.8.1.2 Determinação de monossacarídeos

Para determinar o grau de hidrólise dos leites (LBI, LBD, LOI e LOD) foi utilizado o Kit Glicose P-P (Analisa ®), o qual determina a glicose pelo método da glicose-oxidase, que se baseia na oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio.

As amostras contendo enzima livre (EL), 10 µL, foram inativadas e após adicionadas 1 mL da solução 2 do Kit de Glicose PP e submetidas à homogeneização e incubação em banho-maria a 37 °C por um período de 10 min. A absorbância foi medida em 505 nm em espectrofotômetro (Femto – Cirrus 80), sendo que a cor é estável por 30 min.

4.8.1.3 Determinação enzimática de lactulose

A determinação enzimática da lactulose nos leites (LBLU, LBI, LOLU e LOI) e nos iogurtes (IBLU, IB, IOLU e IO) foi realizada com uso do kit de enzimas comerciais (K-Lactul; Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Ireland), como descrito no manual, seguido da análise de espectrofotometria em absorbância de 340 nm (BOITZ; MAYER, 2016), para a qual foram retiradas alíquotas de leite durante a síntese. Para o iogurte foram realizadas análises nos tempos 1 e 28 dias de estocagem à 4 °C.

4.8.2 Análise colorimétrica

A cor foi determinada em amostras de iogurte (IBLU, IB, IOLU e IO) pela escala de cores CIELAB, medindo a variação de cor (ΔE) que relaciona à variação da luminosidade L^* (100 = branco; 0 = preto), cromaticidade a^* (+ vermelho; - verde) e cromaticidade b^* (+ amarelo; - azul). As amostras foram colocadas em cápsulas redondas com capacidade de 15 mL, e as leituras realizadas em colorímetro digital modelo CR 300 (Konica Minolta, Chroma Meter CR400), no 1° e 28° dias de armazenamento.

4.8.3 Sinérese

O índice de sinérese dos iogurtes (IBLU, IB, IOLU e IO) foi determinado de acordo com Keogh e O'Kennedy (1998), pela Equação 1. 20 g de amostra foram pesadas e

centrifugados por 10 min a 222 G (1310 rpm) a temperatura ambiente através de centrífuga (Solab, modelo SL - 700). Posterior a isso retirado o sobrenadante através de um pipetador e realizado a pesagem.

$$\text{Sinérese (\%)} = \frac{\text{massa do sobrenadante gerado}}{\text{massa do iogurte}} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

4.8.4 Perfil de textura

A textura é um importante atributo sensorial no desenvolvimento de produtos lácteos sendo percebida de forma diferente pelos consumidores (JERVIS et al., 2014). Para realizar a análise do perfil de textura (TPA) foi utilizado um analisador de textura (CT-3; Brookfield Engineering Laboratories, Inc.). O teste foi executado nos iogurtes (IBLU, IB, IOLU e IO) com distância de penetração de 30 mm, usando uma sonda cilíndrica de acrílico com diâmetro de 25 mm de altura. A amostra foi acondicionada em recipientes de formato cilíndrico, possuindo 20 mm de diâmetro e 60 mm de altura. A carga de *trigger* foi de 0,04 N. A velocidade de teste foi de 1 mm s⁻¹ (KAMAL-ELDIN et al., 2020), em dois ciclos. O perfil de textura dos iogurtes foi determinado utilizados parâmetros como firmeza, adesividade, coesividade, elasticidade e gomosidade. As medidas foram realizadas em quintuplicata e no 1° e 28° dias de armazenamento do produto à temperatura de 4 °C.

4.8.5 Avaliação Microbiológica

As análises microbiológicas do leite pasteurizado e dos iogurtes estão descritas na Tabela 2. As amostras de iogurte foram determinadas no 1° e 28° dia de armazenamento a 4 °C.

Tabela 2 – Análise microbiológica e referências das análises do leite bovino (LB), leite ovino (LO) e seus respectivos iogurtes (I).

Análise	Amostra	Referência
CMAV	LB e LO	(AOAC, 2019)
CTCT	LB, LO e I	(BRASIL, 2019)
CCT	LB, LO e I	(ISO 4832, 2006)
CBL	I	(AOAC, 2019)
CTBAE	I	(ISO 7889, 2003)

Contagem de Mesófilos Aeróbios Viáveis (CMAV), Contagem total de coliformes termotolerantes (CTCT), Contagem de Coliformes Totais (CCT), Contagem de Bolores e Leveduras (CBL), Contagem Total de Bactérias Acidófilas Específicas (CTBAE), leite bovino (LB), leite ovino (LO), iogurte (I).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

4.8.6 Propriedades bioativas e compostos fenólicos do iogurte

O preparo do extrato das amostras (IBLU, IB, IOLU e IO) foi baseado no método de Wang et al. (2019) com modificações. Foram quantificadas 10 g de amostra em tubos Falcon de 50 mL e, posteriormente, centrifugadas por 10 min a 3260 G (4500 rpm) a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados, identificados e armazenados em ultra freezer a -80 °C para posterior análise. As amostras dos iogurtes foram analisadas no 1° e 28° dia de armazenamento.

4.8.6.1 Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados conforme o método descrito por Roesler et al. (2007), com modificações. O volume de 0,5 mL de amostra foi adicionado em um tubo de ensaio e misturado com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:10). A mistura foi mantida em reação durante 5 min ao abrigo de luz. Em seguida foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 7,5 % e as soluções permaneceram em reação por 2 h ao abrigo de luz. Posteriormente, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro Cirrus 80 SA (Femto, Brasil) a 760 nm. Um branco foi preparado realizando o mesmo experimento, substituindo o extrato por água ultrapura. A concentração foi obtida com auxílio da curva-padrão de ácido gálico PA (AG) variando de 10 a 80 mg EAG L⁻¹. Os dados foram expressos como equivalentes de ácido gálico em mg por 100 g de amostra (mg EAG 100 g⁻¹) descrito no Apêndice A.

4.8.6.2 Atividade anti-inflamatória

Baseada no método de Hazra, Biswas e Mandal (2008), em que 1 mL de cada amostra foi misturado com 3 mL de nitroprussiato de sódio 10 mM em tubos de ensaio e mantido a 25 °C em banho-maria digital SSD 5L (Solidsteel, Brasil) por 2 h. Posteriormente, alíquotas de 0,5 mL foram misturadas com 1 mL de sulfonamida 0,33 % e mantidos a 25 °C no mesmo banho por 5 min. Em seguida foram adicionados 1 mL de N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) 0,1 % sobre a amostra e esta mistura foi mantida em banho a 25 °C por 30 min. Finalmente, as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro Cirrus 80 SA (Femto, Brasil) a 540 nm. Para obter a concentração equivalente de trolox foi construída uma curva padrão em que foram realizadas diluições de trolox em álcool etílico em concentrações de 0,02 a 0,2 mg mL⁻¹. Um branco, utilizando álcool etílico foi analisado em paralelo seguindo o mesmo procedimento. Os resultados são com relação a inibição da α amilase, expressos em μ mol de trolox g de amostra úmida⁻¹ descrito no Apêndice A.

4.8.6.3 Atividade antidiabética

Baseada no método de González-Muñoz et al. (2013). 500 μ L de amostra foram misturados com 500 μ L de solução tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH = 6,9) contendo a enzima α -amilase (0,5 mg mL⁻¹), em seguida a mistura foi incubada a 25 °C por 10 min em banho-maria digital SSD 5L (Solidsteel, Brasil). Posteriormente, 500 μ L de uma solução de amido 1 % em tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH = 6,9) foi adicionada à mistura de reação e esta foi incubada novamente a 25 °C durante 10 min em banho. Após, 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) 1,56 % (m v⁻¹), preparado dissolvendo ácido dinitrosalicílico, tartarato de sódio potássio, hidróxido de sódio e bissulfito de sódio em água destilada, foi adicionado e a nova mistura foi incubada em água fervente durante 10 min. Finalmente, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e diluída adicionando 15 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Cirrus 80 SA (Femto, Brasil) a 540 nm. A acarbose foi usada como controle positivo. Para o controle utilizou-se apenas solução tampão pH 6, no lugar do extrato. O branco de cada amostra foi

analisado com a adição da solução tampão pH 6,9 e extrato sem a enzima. A porcentagem de inibição foi calculada conforme Equação 2:

$$Inibição (\%) = \frac{Abs_{controle} - Abs_{(extrato-branco)}}{Abs_{controle}} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

4.8.6.4 Atividade antioxidante – ABTS

Determinada pelo método descrito por Helal e Tagliazucchi (2018). Em ambiente escuro foram transferidos 40 µL de amostra para tubos de ensaio e adicionado 1960 µL do radical ABTS azul-verde. A mistura incubada a 37 °C (Solidsteel modelo SSBuc 6L) por 10 min, a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro Cirrus 80 SA (Femto, Brasil) a 734 nm. E calculados através da curva padrão de trolox (Apêndice A).

4.8.6.5 Atividade antioxidante – DPPH

A atividade antioxidante das amostras de iogurte foi investigada de acordo com Ardabilchi et al. (2019), através da eliminação do radical DPPH. Para isso, extratos de iogurte homogeneizados (250 µL) foram agitados vigorosamente em agitador de tubos Vortex Mixer K45-2810 (Kasvi, Brasil) com 3 mL de DPPH (60 µM em etanol) e colocados no escuro em temperatura ambiente. Uma amostra controle foi preparada da mesma forma, mas usando 250 µL de água em vez de extrato de iogurte. A diminuição da absorvância em 515 nm foi monitorada por espectrofotômetro até que uma leitura constante foi obtida e a porcentagem de inibição foi calculada utilizando a curva padrão de trolox (Apêndice A).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata, exceto a análise do perfil de textura em sextuplicata. Posteriormente, os resultados foram verificados pela análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de média de Tukey com nível de significância de 5 %, através Software R. Ao todo foi realizada réplica de coletas de leite e síntese da lactulose em seguida o iogurte, buscando verificar a repetitividade dos resultados analíticos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 LEITE

Os resultados das análises físico-químicas do leite bovino e ovino estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão das análises físico-químicas do leite bovino integral (LBI) e leite ovino integral (LOI) para elaboração dos iogurtes.

	LBI	LOI
Acidez Titulável (% ácido láctico)	0,14±0,01 ^b	0,21±0,02 ^a
pH	6,88±0,10 ^a	6,70±0,04 ^b
Gordura (%)	4,42±0,24 ^b	5,71±0,09 ^a
Cinzas (%)	0,65±0,05 ^b	0,83±0,11 ^a
ST (%)	12,82±0,26 ^b	15,72±0,33 ^a
SNG (%)	8,53±0,08 ^b	10,03±0,33 ^a
Lactose (%)	4,23±0,15 ^b	4,73±0,06 ^a

Média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes nas linhas para cada análise diferem significativamente ($p < 0,05$). Leite bovino integral (LBI) e leite ovino integral (LOI). Acidez (%) = g ácido láctico 100 g amostra⁻¹. Sólidos Totais (ST). Sólidos Não Gordurosos (SNG).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

O LBI apresentou menor acidez se comparado ao LOI ($p < 0,05$), possivelmente devido a diferença em suas características pela origem animal e a estrutura química de cada leite, principalmente o equilíbrio salino, ou seja, alguns componentes do leite podem contribuir para o aumento da acidez, sem causar alteração na estabilidade da caseína (BRITO et al., 2006). Além dos minerais, a maior concentração de proteína do leite ovino resulta em maior acidez.

A acidez apresentou comportamento inversamente proporcional ao pH como esperado. Kalyankar et al. (2016) demonstram que o valor de acidez titulável para ambos os leites foram maiores que encontrados neste estudo, 0,17 e 0,23 % em termos de ácido láctico para leite bovino e ovino, respectivamente. Tribst et al. (2019) observaram valores 0,22±0,04 % de ácido láctico para o leite ovino. Ou seja, é possível verificar uma tendência, o leite ovino possui maior acidez e menor pH, quando comparado ao bovino.

Estudos relatam que o leite ovino com acidez de 0,3 % ácido láctico apresentou capacidade de processamento de iogurte (REVERS et al., 2016).

Os valores de pH apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), sendo este o responsável pela conformação de proteínas, realiza a dissociação de ácidos do leite e a atividade enzimática, e também pode sofrer variações em virtude da ação bacteriana (valores de pH menores) e, até mesmo, leite mastítico (valores de pH maiores) (KELLY; LEITNER; MERIN, 2011).

O teor de gordura do LOI e do LBI possui diferença significativa ($p < 0,05$), estão de acordo com a espécie (PARK et al., 2007). A gordura tem grande importância no setor lácteo por ser base de diferentes produtos como manteiga e queijos, no iogurte a gordura auxilia na textura, propriedades nutricionais e sensoriais (RANADHEERA; NAUMOVSKI; AJLOUNI, 2018).

As características do leite ovino refletem nos seus derivados como queijos finos e iogurtes (HAENLEIN; WENDORFF, 2006; ALBENZIO et al., 2015), proporcionando textura cremosa devido à presença de pequenos glóbulos de gordura, o que o torna mais facilmente digerível em relação aos leites de outras espécies (PARK et al., 2007; RANADHEERA; NAUMOVSKI; AJLOUNI, 2018).

O LOI possui um maior teor de cinzas, sólidos e sólidos não gordurosos ($p < 0,05$) em relação ao LBI (Tabela 3), totalmente relacionados ao leite de diferentes espécies. A vantagem da utilização de leite ovino na elaboração de produtos lácteos (TRIBST et al., 2018) são referente a altos rendimentos e características diferenciadas obtidas no produto final. Ainda, destaca-se a concentração de vitaminas e minerais em teores mais elevados quando comparado a outras espécies (BALTHAZAR et al., 2017). O leite ovino é facilmente digerido, indicado por possui baixo poder alergênico (FENG et al., 2019), apesar do seu consumo *in natura* ser baixo.

Kanwal, Ahmed e Mirza (2004) relataram que o leite bovino contém aproximadamente 12,5 % de sólidos totais, 3,8 % de gordura, 8,7 % de sólidos não gordurosos, 4,6 % de lactose, 0,8 % de cinza e 3,1 % de proteína. Para o leite ovino os valores correspondentes são, respectivamente, 18,3 %, 6,0 %, 12,3 %, 4,9 %, 0,94 % e 5,2 %. Tribst et al., (2019a) apresentam leite ovino com pH de $6,62 \pm 0,02$, acidez $0,22 \pm 0,04$ % de ácido láctico em 100 mL de leite, gordura $4,8 \pm 0,1$ %, proteína $4,7 \pm 0,1$ %, lactose $4,8 \pm 0,0$ % e conteúdo de sólidos $15,4 \pm 0,3$ %.

Os valores coletados para leite bovino e leite ovino nesta pesquisa e em anteriores, são da mesma ordem de grandeza e as diferenças se devem ao estágio de lactação dos animais, estado nutricional e fatores ambientais e genéticos relacionados pela alimentação e variações sazonais (PARK et al., 2007; BIANCHI, 2018).

A lactose é um dos constituintes essenciais na elaboração de diferentes produtos, ou seja, desempenha um papel importante na característica final do produto. Para o LOI e LBI o teor de lactose difere significativamente ($p < 0,05$). Giroux, Veillette e Britten (2018), encontraram teores similares a este estudo para os leites bovino e ovino, 4,59 % e 4,62 %, respectivamente. É um dos compostos do leite que possui sensibilidade a variação da sazonalidade, no entanto, Fava et al. (2014) observaram modificações quantitativas de lactose de leite ovino ao longo do ano que oscilam entre $4,17 \pm 0,4$ % e $4,60 \pm 0,16$ %. A lactose também apresenta variação ao longo do estágio de lactação para todos os ruminantes, apresentando menores teores no início e final da lactação (PARK et al., 2007).

Na Tabela 4 estão apresentadas as contagens de mesófilos aeróbios viáveis, considerando que estes são fermentadores da lactose, e causam rápida acidificação em leite não refrigerado (MERLIN JUNIOR et al., 2015), ou seja, podem interferir em processos fermentativos pela temperatura corresponder a mesma de sua atuação.

A contagem dos mesófilos (Tabela 4) indica que possivelmente os leites antes da pasteurização apresentavam uma alta contagem inicial, porém bem conservados considerando a acidez apresentada (Tabela 3). Contudo cabe ressaltar que a temperatura de refrigeração utilizada no armazenamento da matéria-prima e, posteriormente, do processo de hidrólise e síntese, apresenta uma limitação para o desenvolvimento dos mesmos. Ainda, na elaboração do iogurte, o leite é aquecido novamente, o que pode contribuir para redução dessa contagem.

Tabela 4 – Contagem de mesófilos aeróbios viáveis dos leites bovino integral (LBI) e ovino integral (LOI) pasteurizado a 65 °C por 30 min.

	LBI	LOI
CMAV (UFC mL ⁻¹)	$1,31 \cdot 10^5 \pm 8,49 \cdot 10^4$	$3,45 \cdot 10^3 \pm 2,68 \cdot 10^3$

Leite bovino integral (LBI) e leite ovino integral (LOI). Contagem de mesófilos aeróbios viáveis (CMAV).
Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

O leite é um alimento altamente nutritivo, também é um excelente meio de cultura e pode ser facilmente contaminado por vários grupos de micro-organismos que nele encontram condições ótimas de multiplicação (NORNBERG et al., 2009). Nesse sentido, é importante considerar a qualidade microbiológica da matéria-prima utilizada no processo de fermentação, visto que para a produção de iogurte não utiliza processos posteriores a fermentação para redução da carga microbiana indesejável.

5.2 HIDRÓLISE DA LACTOSE DE DIFERENTES MEIOS COM ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

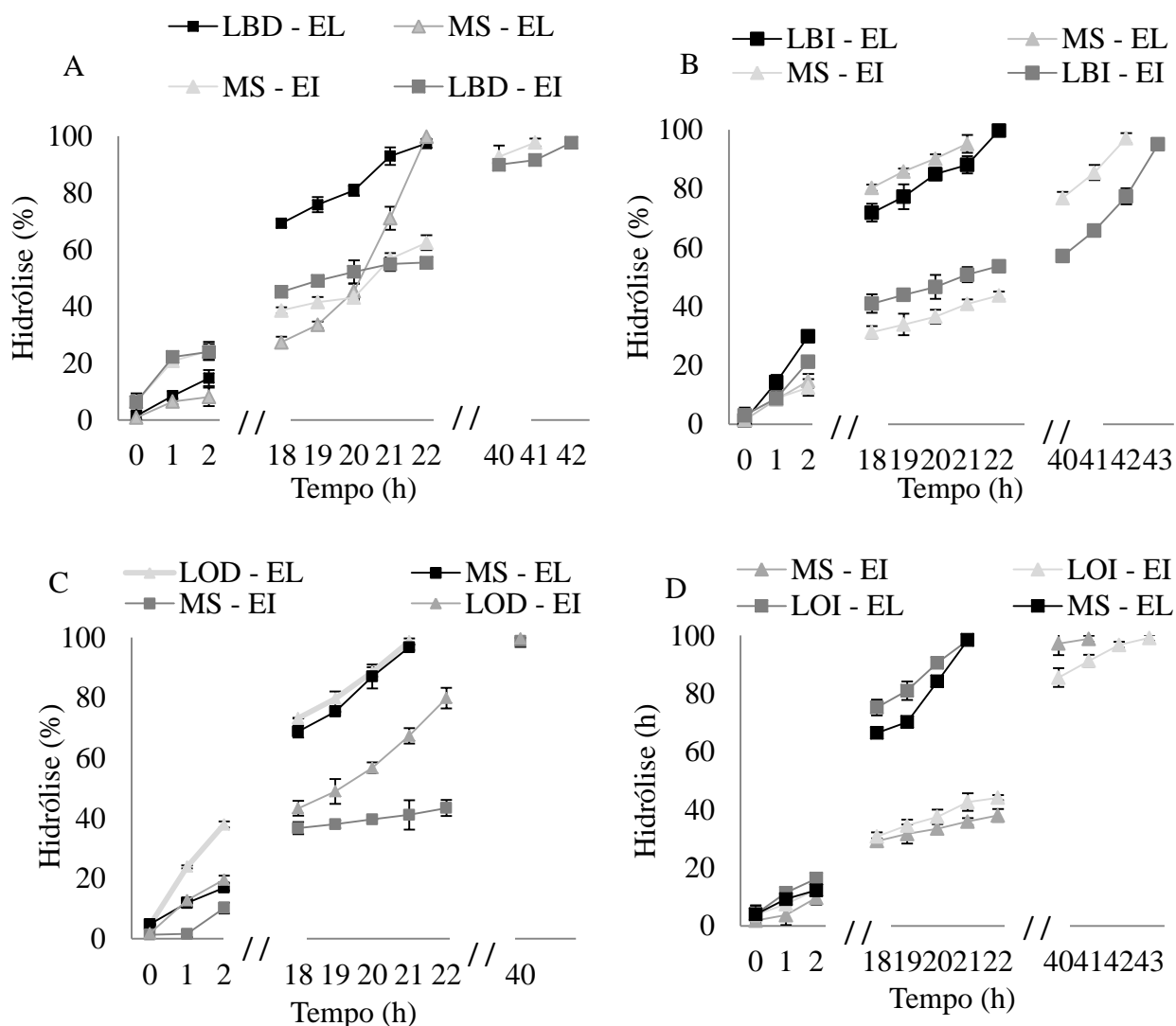
As enzimas são catalisadores eficazes em condições de operação moderadas, usadas em reatores convencionais, com economias consideráveis em termos de custos de investimento e operações sustentáveis (ILLANES; WILSON; VERA, 2018). Com isso é necessário levar em consideração que a temperatura ótima para atuação da enzima β -galactosidase, que neste caso seria de 37 °C (LIMA, 2020), correspondente a sua atividade máxima, na qual alcançará o objetivo inicial que é hidrolisar totalmente a lactose do leite em menor tempo.

Para produção de iogurte zero lactose as características da matéria-prima podem modificar caso a aplicação de hidrólise ocorra a 37 °C, principalmente os parâmetros de qualidade do leite, pelo tempo de atuação da enzima, que interferem no processo de fermentação e nas características do produto final. Para isso foi utilizada a temperatura de 10 °C onde é a segunda temperatura no qual a enzima atua de forma mais eficiente para a hidrólise da lactose (LIMA, 2020).

Os resultados da cinética da hidrólise da lactose de LBI, LBD, LOI, LOD e MS, com a enzima livre e imobilizada, estão apresentados na Figura 5. A hidrólise da lactose utilizando a enzima livre (EL) para o LBD apresentou um tempo menor de hidrólise (22 h) (Figura 5A), comparado a enzima imobilizada (EI), praticamente o dobro de tempo para atingir o mínimo de 95,00 % de hidrólise.

A diferença pode estar relacionada ao processo de troca difusional da enzima e a mobilidade das ligações enzima-substrato, considerando que a imobilização ocorreu por ligação covalente, no qual a enzima pode se ligar aos pequenos espaços vazios do suporte (BARBOSA et al., 2015), o que dificulta a hidrólise da lactose. Já a EL é totalmente livre no meio sem ligação com suporte ou com qualquer outro material.

Figura 5 – Comportamento cinético da hidrólise da lactose em (A) meio sintético (LS) e leite bovino desnatado (LBD), com enzimas livre (EL) e imobilizada (EI), (B) leite sintético (LS), leite bovino integral (LBI), com enzima livre (EL) e enzima imobilizada (EI), (C) leite sintético (LS) e leite ovino desnatado (LOD) com enzima livre (EL) e enzima imobilizada (EI), e (D) leite sintético (LS) e leite ovino integral (LOI), com suas respectivas enzimas, enzima livre (EL) e enzima imobilizada (EI).



Leite bovino desnatado – enzima livre e imobilizada (LBD – EL e EI); leite bovino integral – enzima livre e imobilizada (LBI – EL e EI); leite ovino desnatado – enzima livre e imobilizada (LOD – EL e EI); leite ovino integral – enzima livre e imobilizada (LOI – EL e EI); leite sintético – enzima livre e imobilizada (MS – EL e EI).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Ao utilizar a EL e EI no LBI (Figura 5B), o comportamento foi parecido ao utilizar LBD. Ou seja, o teor de gordura não teve influência sobre a hidrólise da lactose ao usar EL. Para a EI no LBI obteve um tempo total de 43 h. A diferença observada para o LBI e LBD

é possivelmente em função do teor de gordura, e também do teor de lactose. Quando se faz o desnate do leite ocorre também uma pequena diminuição do teor de lactose, visto que esta é incorporada junto a gordura (Tabela 3).

Os glóbulos de gordura no leite são formados por uma parte interna denominada monocamada fosfolipídica e uma complexa bicamada lipídica, denominada membrana globular da gordura do leite (DEWETTINCK et al., 2008), que com a atuação da força centrífuga sucede a separação da gordura do leite quando ocorre o processo de centrifugação, juntamente a gordura pequenas concentrações de outros compostos do leite são carreados pela gordura, como no caso da lactose.

O LOI e LOD não apresentaram diferença no tempo de hidrólise ao utilizar EI (Figura 5C e 5D respectivamente), possivelmente devido este leite apresentar a gordura de forma mais dispersa no meio e com tamanhos menores dos glóbulos de gordura (BALTHAZAR et al., 2017a) não interferindo no processo de hidrólise da lactose.

O LBD, LOD e LOI tiveram o mesmo tempo de hidrólise utilizando a EI em comparação ao MS. Já utilizando a EI no LBD, LBI e LOI tiveram o mesmo tempo de ação que o MS. Evidenciando que o teor de gordura não tem influência sobre o tempo de hidrólise, visto que o MS é composto de uma solução de lactose tamponada e enzima β -galactosidase. O meio sintético foi utilizado de forma a prever o comportamento ideal com menos interferências possíveis do meio. Os leites no geral possuem gordura, minerais, proteína e outros compostos que podem limitar a hidrólise da lactose.

Como podemos observar a EI atuou no aumento do tempo de hidrólise da lactose em todos em ensaios realizados em comparação a EL (Figura 5), contudo foi possível atingir hidrólises superiores a 95 %, o que leva a crer que o seu sítio ativo está disponível, possibilitando assim sua reutilização, sendo esta a principal vantagem do uso da EI. De acordo com os estudos de Lima (2020) a EI apresentou capacidade de reuso acima de 50 % de sua viabilidade por quatro ciclos em leite UHT integral a 37 °C. Neste sentido, na sequência dos trabalhos foi utilizada a EI para realizar a hidrólise da lactose em diferentes leites e teores de gordura a 10 °C.

Estudos realizados por Klein et al. (2013) indicaram que as enzimas imobilizadas podem sofrer uma fixação aleatória de proteínas na superfície das partículas, podendo mudar a conformação da enzima, e diminuir assim a hidrólise da lactose necessitando de um tempo reacional maior. Também, durante o processo de imobilização, a β -galactosidase pode formar ligações covalentes multipontos com seu suporte de imobilização através da

reação com as partes da quitosana reticulada (RODRIGUES et al., 2013), diminuindo a capacidade de estabelecer um complexo enzima-substrato (WAHBA, 2018) e a capacidade de hidrólise.

Cabe ressaltar que a EI é utilizada para melhorar as propriedades da enzima, como atividade, estabilidade, seletividade, especificidade, inibição, resistência a produtos químicos e pureza (BARBOSA et al., 2015), ou seja, está sujeita a menores interferências do meio (pH, proteína, gordura e demais componentes), pois seu centro ativo está menos exposto através da ligação covalente. Também o processo de imobilização enzimática se destaca pela possibilidade de recuperação e reutilização de catalisadores e melhoria de sistemas que utilizam micro-organismos ou enzimas livres (HETTIARACHCHY et al., 2018; ILLANES et al., 2006).

A Tabela 5 apresenta os valores de Km e Vmax no LBI, LBD, LOI, LOD e MS, com suas respectivas enzimas, EL e EI.

Tabela 5 – Valores de Vmax e Km em leite bovino integral (LBI), leite bovino desnatado (LBD), leite ovino integral (LOI), leite ovino desnatado (LOD) e leite sintético (LS), com suas respectivas enzimas, enzima livre (EL) e enzima imobilizada (EI).

	EL		EI	
	V _{máx} (dL mg h ⁻¹)	K _m (mg dL ⁻¹)	V _{máx} (dL mg h ⁻¹)	K _m (mg dL ⁻¹)
LBI	109,89	0,49	97,09	0,76
LBD	121,95	0,52	86,96	0,66
LOI	65,36	0,44	129,53	0,58
LOD	60,24	0,42	112,36	0,51
MS	77,00	0,02	93,93	0,83

Enzima livre (EL), enzima imobilizada (EI), leite bovino integral (LBI), leite bovino desnatado (LBD), leite ovino integral (LOI), leite ovino desnatado (LOD), meio sintético (MS).

Podemos observar um Km relativamente baixo para todas as cinéticas, demonstra assim que possui uma grande afinidade a enzima pelo substrato, sendo para a EL da maior para a menor afinidade LBD>LBI>LOI>LOD>LS, e para EI MS>LBI>LBD>LOI>LOD. As diferenças podem ter relação as especificidades de cada enzima, também a limitação

difusional na enzima imobilizada, devido a menor acessibilidade do substrato ao local catalítico por prováveis alterações conformacional após imobilização (Gennari et al., 2018).

Em conjunto a isso, a EI atuou no aumento do tempo de hidrólise da lactose em todos em ensaios realizados em comparação a EL (Figuras 5 A, B, C e D), contudo foi possível atingir hidrólises superiores a 95 %, o que leva a crer que o seu sítio ativo está disponível, possibilitando assim sua reutilização, sendo esta a principal vantagem do uso da EI. De acordo com os estudos de Lima (2020) a EI apresentou capacidade de reuso acima de 50 % de sua viabilidade por quatro ciclos em leite UHT integral a 37 °C. Neste sentido, na sequência dos trabalhos foi utilizada a EI para realizar a hidrólise da lactose em diferentes leites e teores de gordura a 10 °C.

5.3 SÍNTESE DA LACTULOSE

A síntese da lactulose é um processo no qual distintos parâmetros podem ter influência sobre a concentração gerada em um determinado tempo. Sínteses via enzimática são complexas e menos rentáveis em comparação com processos químicos, apesar de que a principal diferença está nos compostos secundários formados por essas duas vias.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores da síntese da lactulose obtida através da utilização de duas concentrações diferentes de glicose isomerase no leite bovino integral e desnatado (LBI e LBD) e no leite ovino integral e desnatado (LOI e LOD) hidrolisados em torno de 60 %.

A hidrólise da lactose até 60 ± 5 % não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) com relação ao teor de lactose hidrolisado, entre o leite bovino integral (LBI) e desnatado (LBD), ovino integral (LOI) e desnatado (LOD). Anteriormente foi observada diferença entre os leites integrais e desnatados para hidrólises próximas a 95 %, possivelmente devido a interferências do meio, para taxas maiores de produção de glicose e galactose.

Com relação à influência da concentração de GI sobre a síntese da lactulose para os leites integrais e desnatados, não teve diferença significativa ($p > 0,05$) no teor de LU sintetizada para o leite ovino (LOI e LOD). Porém teve diferença entre o leite bovino ($p < 0,05$), LBI e LBD para 0,5 g de GI 100 mL de leite⁻¹, possivelmente devido a diferença da concentração de lactose, em virtude do grau de hidrólise de ambas as amostras ser estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Ou seja, maior concentração de lactose no meio onde após a hidrólise terá maior teor de glicose e galactose, sendo que a glicose é transformada

através da isomerização em frutose, e por fim ocorre a transgalactosilação com maior formação de LU.

Tabela 6 – Determinação da hidrólise da lactose com a β -galactosidase durante 34 h a 10 °C, a isomerização da glicose em frutose pela enzima glicose isomerase durante 36 h a 8 °C e a transgalactosilação para síntese de lactulose no leite bovino integral (LBI) e desnatado (LBD), e leite ovino integral (LOI) e desnatado (LOD).

Leite	Concentração LA (g 100 mL de leite ⁻¹)	% Hidrólise	Concentração GI (g GI 100 mL de leite ⁻¹)	LU (g L ⁻¹)
Leite Bovino				
LBI	0,457	67,30±2,3 ^a	0,5	0,31±0,03 ^a
	0,457	62,09±1,0 ^a	1,7	0,23±0,08 ^{ab}
LBD	0,457	66,68±1,5 ^a	0,5	0,16±0,04 ^b
	0,457	63,10±1,4 ^a	1,7	0,29±0,05 ^{ab}
Leite Ovino				
LOI	0,457	61,22±1,5 ^a	0,5	0,16±0,05 ^a
	0,457	62,81±1,1 ^a	1,7	0,25±0,05 ^a
LOD	0,457	64,00±0,8 ^a	0,5	0,15±0,04 ^a
	0,457	64,20±1,4 ^a	1,7	0,24±0,01 ^a

Média \pm desvio padrão. Valores seguidos por mesma letra minúscula em cada coluna não apresentam diferenças significativas no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) para a % de hidrólise e LU no leite da mesma espécie. Leite bovino integral (LBI), leite bovino desnatado (LBD), leite ovino integral (LOI) e leite ovino desnatado (LOD), β - galactosidase (LA), glicose isomerase (GI), lactulose (LU).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

O teor de gordura nesse caso pode ter influenciado positivamente na síntese de LU, comportamento contrário ao observado na etapa de hidrólise, onde apresentou interferência sobre a ação da enzima.

O mesmo comportamento não é observado para o leite ovino, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras (LOI e LOD) utilizando ambas as concentrações de GI. Neste sentido, as demais etapas do estudo seguiram utilizando-se do LOI pela sua composição de ácidos graxos importantes na dieta alimentar e pela possibilidade em adicionar características interessantes de textura e bioatividade ao produto.

O teor de gordura e a concentração de GI não afetou significativamente a síntese de LU para o LO. O esperado seria que uma maior concentração de GI (1,7 g GI 100 mL de

leite⁻¹) resultasse em maior teor de LU até um nível de inibição, no entanto, essa concentração pode ter ocasionado limitação da síntese pela concentração da enzima no meio, impedindo valores maiores da isomerização enzimática da glicose em frutose utilizando a GI e posterior síntese da LU. Ainda, estudos anteriores indicam que quanto maior o teor de frutose no meio, maior a síntese da lactulose (GUERRERO et al. 2011; ABURTO et al., 2020), ou seja, o teor de frutose no meio pode ter influenciado a produção de lactulose no presente estudo, resultando em baixos teores de LU.

As enzimas β -galactosidases são capazes de catalisar reações hidrolíticas e de transgalactosilação (PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987). A transgalactosilação permite a síntese de oligossacarídeos, como galacto-oligossacarídeos (GOS) e lactulose, sendo a lactose a doadora de galactose transgalactosilatada (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010). Na presença de lactose, a atividade hidrolítica compete com a atividade de transgalactosilação, sendo que esta prevalece no início da reação, quando a concentração de lactose é alta (PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987; VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011), mas conforme a reação segue a atividade hidrolítica se torna predominante, levando à produção de glicose e galactose, de acordo com a cinética estabelecida por Michaelis-Menten, na qual a galactose é geralmente um inibidor competitivo da enzima (PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987; VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011).

As β - galactosidases são bastante inespecíficas em relação aos substratos possibilitando que outros carboidratos, como a frutose ou a sacarose (KIM, PARK; OH, 2006; LI et al., 2009) possam agir na formação de diferentes compostos transgalactosilados. Essa característica permite a síntese da lactulose com β - galactosidase a partir de uma mistura de frutose e lactose, ambos os açúcares atuando como aceitadores de galactose, levando a uma mistura de lactulose e galactooligossacarídeos, entretanto, a reação pode ser conduzida para a maior síntese de lactulose com pouca formação de GOS usando uma alta proporção molar de frutose-lactose (PANESAR, KUMARI, 2011; GUERRERO et al., 2011). Porém no caso da presente pesquisa a frutose pode ter sido insuficiente, considerando que requer duas sequências de reações enzimáticas: primeiro, a hidrólise da lactose em glicose e galactose por uma β -galactosidase e, em seguida, a isomerização de glicose em frutose por uma glicose isomerase (TORRES; BATISTA-VIERA, 2017). Assim, pode ter ocorrido a formação de GOS intermediários a síntese da lactulose, justificando os baixos teores de lactulose obtidos.

Também os parâmetros de processo (temperatura, agitação, pH, entre outros) são fundamentais para maior formação de compostos. Estudos indicam que temperaturas superiores as que foram utilizadas neste trabalho resultam em maiores teores de LU, porém o objetivo principal neste caso é realizar a síntese *in loco* concomitante a redução de lactose e, posteriormente, a elaboração de iogurte com a LU já sintetizada no meio, não sendo necessária a purificação para utilização, como ocorre em sínteses químicas.

Outra situação encontrada nesse estudo foi o fato da lactose presente no leite, apresentar baixa concentração se comparado a outros meios pré-selecionados que obtêm maiores teores de LU. Um exemplo é o soro de leite, que em sua composição possui alto teor de lactose, baixo teor de gordura e tem apresentado bons resultados quanto a obtenção de LU via enzimática com parâmetros de processo diferenciados ao aplicado neste estudo (temperatura e tempo).

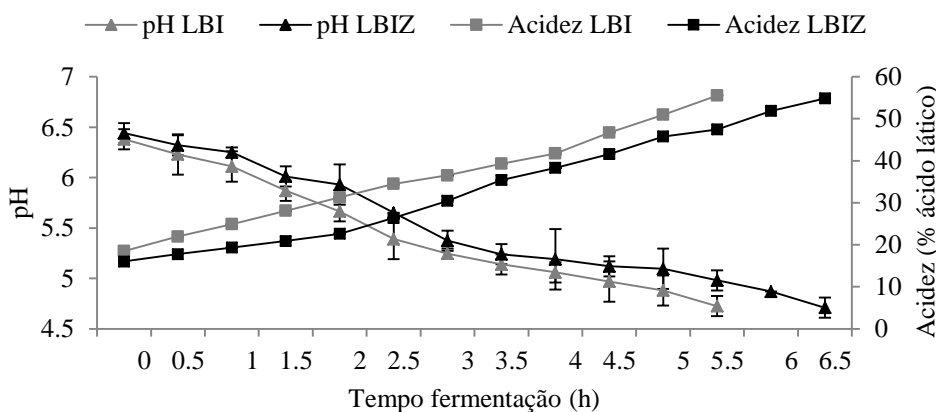
Song et al. (2013a) utilizaram 20 % (p v⁻¹) de lactose, 12 U mL⁻¹ de β -galactosidase imobilizada e 12 U mL⁻¹ de glicose isomerase imobilizada em tampão de fosfato de sódio 50 mM a pH 7,5, variando a temperatura de 45 a 60 °C, obtendo valores máximos de síntese de lactulose de 4.81 g L⁻¹ a 54 °C com tempo de reação de 2,5 h.

Para continuar com a elaboração do iogurte foi definida a utilização de 0,5 g GI 100 mL de leite⁻¹, considerando o custo envolvido com a enzima, visto que o aumento na concentração desta não resultou em maior síntese de lactulose.

5.4 ANÁLISE DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO FRENTE A DIFERENTES TEORES DE GORDURA E LACTOSE

O principal objetivo desta seção foi avaliar o pH e a acidez em LB com diferentes teores de gordura e lactose, LO com diferentes teores de gordura. O estudo da cinética do processo fermentativo para LBI e LBIZ apresentou tempos distintos de fermentação para atingir o pH final do processo (4,8) de 5,5 h e 6,5 h, respectivamente, estão apresentados na Figura 6.

Figura 6 – Valores de pH e acidez a partir de leite bovino integral (LBI) e leite bovino integral zero lactose (LBIZ) durante o tempo de fermentação a 43 °C.



Leite bovino integral (LBI), leite bovino integral zero lactose (LBIZ). Acidez (%) = g ácido láctico 100 g amostra⁻¹.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

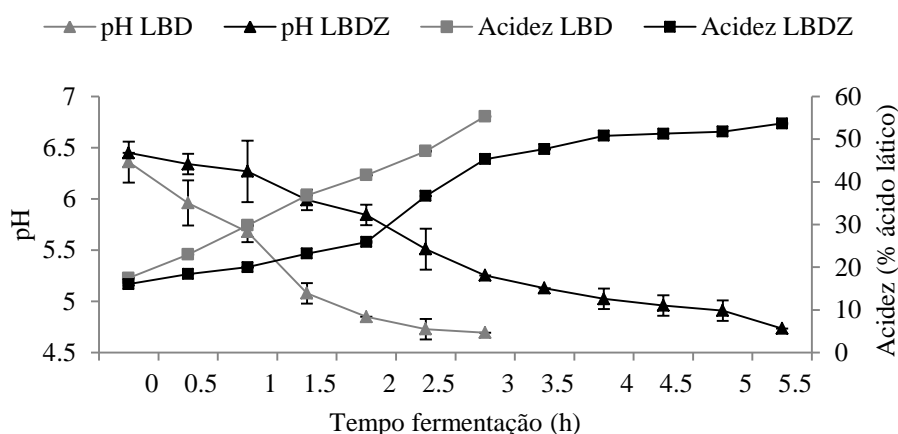
Na Figura 7 estão apresentados os valores de pH e acidez a partir de leite bovino desnatado (LBD) e leite bovino desnatado zero lactose (LBDZ). O mesmo comportamento do LBI e LBIZ foi observado com LBD e LBDZ, 3 h e 5,5 h, respectivamente (Figura 7), ou seja, o maior tempo de fermentação foi obtido para os leites com a lactose hidrolisada e teor de gordura superior ou integral, leite bovino integral zero lactose.

Para o leite bovino com baixo teor de gordura e na presença de lactose, LBD, o tempo de fermentação foi menor quando comparado ao LBDZ, isso mostra que o teor de lactose influencia nos processos fermentativos. Este comportamento também evidencia que a fermentação do leite integral com lactose, LBI, possui um período de fermentação menor até obter pH 4,8 se comparado ao LBIZ (Figura 6), o que pode estar associado aos glóbulos de gordura possuírem uma camada composta por lipoproteínas, a qual durante o processo de desnate apresenta importantes alterações estrutura do leite (MICHALSKI et al., 2006; ARGOV; LEMAY; GERMAN, 2008), aos glóbulos se aglomerarem a estabilidade da caseína diminui, assim, aumentando a conformação caseína-caseína, conforme apresentam as Figuras 6 e 7 com relação aos LBI e LBD.

O declínio do pH ocorreu de forma gradativa o que é esperado num processo de fermentação, no qual inicialmente ocorreu o desenvolvimento do *Streptococcus thermophilus* e posteriormente *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. Para o LBD observou-se uma rápida fermentação (tempo de 3 h, Figura 7) e o comportamento oposto ao LBI (tempo de 5,5 h, Figura 6) possivelmente pela lactose estar disponível para a

fermentação devido a desestabilização da emulsão pela retirada da gordura no processo de centrifugação.

Figura 7 – Valores de pH e acidez a partir de leite bovino desnatado (LBD) e leite bovino desnatado zero lactose (LBDZ), durante o tempo de fermentação a 43 °C.



Leite bovino desnatado (LBD), leite bovino desnatado zero lactose (LBDZ). Acidez (%) = g ácido láctico 100 g amostra⁻¹.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

O comportamento quando da adição da enzima LA também pode ter relação com o tempo de fermentação maior, ou seja, na hidrólise ocorre a formação de outros açúcares, além da glicose e galactose, ocasionando concomitante a rota metabólica da cultura láctica para oligossacarídeos quando há presença de frutose (ABURTO et al., 2020).

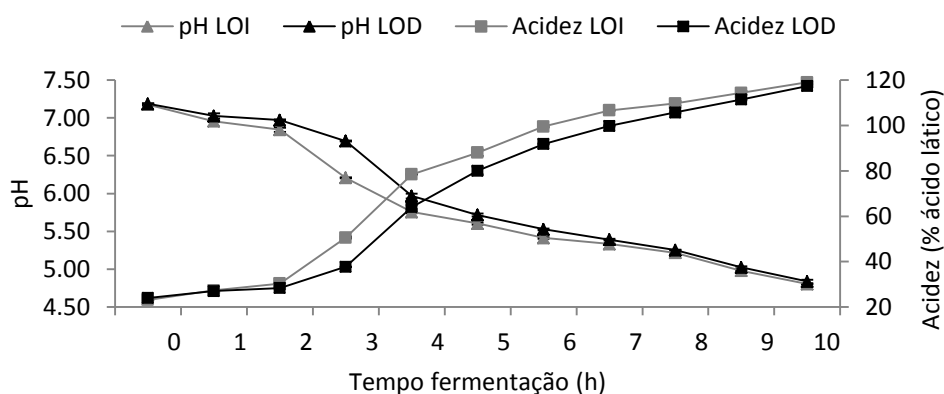
Além disso, para o comportamento do LBDZ (Figura 7), com um aumento de ~55% do tempo de fermentação, se comparado ao LBD, a presença de substância inibitória no meio também pode ter colaborado para esta diferença. Além dos parâmetros de processo como temperatura, o pH e as concentrações de substratos e produtos são relevantes para o crescimento das bactérias ácido-láticas, como concentrações elevadas de glicose que podem inibir as bactérias lácticas, aumentando o tempo de fermentação (KNAKIEWICZ et al., 2019).

Samoylenko et al. (1997) que afirmou que a composição do meio de cultivo com relação à natureza química da fonte de carbono, bem como a concentração e a temperatura de fermentação, são importantes para a produção de ácido láctico. Ainda, cabe ressaltar que iogurtes produzidos com LBD possuem menor extrato seco resultando em um produto com

gel fraco e baixa consistência se comparado a iogurtes de LBI, o mesmo ocorre com o produzido a partir de leite zero lactose, e também de outras espécies.

Na Figura 8 estão apresentados os valores de pH e acidez a partir do leite ovino integral e desnatado durante o tempo de fermentação a 43 °C. No LO o comportamento foi diferente do LB, com maior tempo de fermentação da cultura láctica para pH 4,8, LOI e LOD, respectivamente. O período de adaptação é maior devido, principalmente, a distinta composição em relação ao LB, no que diz respeito a acidificação (pH e acidez) inicial do leite. O pH e a acidez de leite ovino apresentam-se em torno de 6,51–6,85 e 0,22–0,25 % ácido láctico, respectivamente (HAENLEIN; WENDORFF, 2006).

Figura 8 – Valores de pH e acidez a partir de leite ovino integral (LOI) e leite ovino desnatado (LOD), durante o tempo de fermentação a 43 °C.



Leite ovino integral (LOI), leite ovino desnatado (LOD). Acidez (%) = g ácido láctico 100 g amostra⁻¹.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

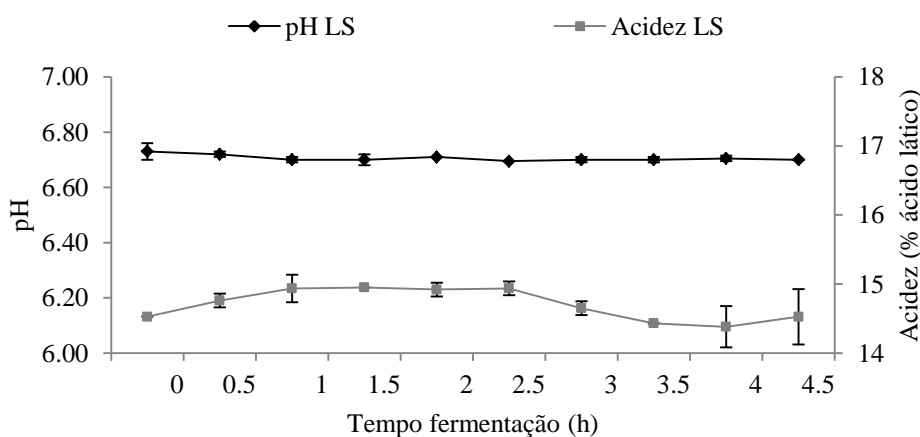
No leite ovino os glóbulos de gordura apresentam-se mais dispersos, visto que é uma característica deste tipo de leite (BALTHAZAR et al., 2017a). Ainda, o teor de gordura não influenciou o processo de fermentação do LO, diferente do que foi observado no LB, possivelmente pela característica diferenciada da gordura presente no LO. O LOI e LOD obtiveram pouca diferença durante a fermentação, com pHs finais de 4,80 e 4,84, respectivamente.

5.5 AÇÃO DA CULTURA LÁTICA FRENTE A LACTULOSE

Na Figura 9 estão apresentados os valores de pH e acidez do leite sintético (LS) durante o período de fermentação. A cultura lática não consumiu a lactulose no período de 4,5 h (Figura 9), visto que este é o principal açúcar disponível no meio para fermentação no LS.

A verificação do comportamento da cultura lática na presença da lactulose é importante, pois inicialmente foi realizada a síntese da lactulose no leite e, posteriormente, a fermentação deste para a elaboração do iogurte, para a qual é preciso garantir que o produto tenha concentrações do prebiótico suficientes para trazer benefícios ao consumidor. Sendo representado através de um meio sintético composto de lactulose e glicose.

Figura 9 – Valores de pH e acidez a partir de leite sintético (LS), durante o tempo de fermentação a 43 °C.



Leite sintético (LS). Acidez (%) = g ácido láctico 100g amostra⁻¹.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

5.6 PRODUÇÃO DE IOGURTE PREBIÓTICO REDUZIDO DE LACTOSE

5.6.1 Síntese da lactulose no leite

Na Tabela 7 estão apresentados os valores de lactulose sintetizada no leite bovino integral (LBI) e leite ovino integral (LOI) após 36 h a 8 °C com enzima imobilizada (EI). O teor de lactulose sintetizado em cada matriz alimentar apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quanto a concentração inicial presente na amostra.

Tabela 7 – Valores correspondentes ao teor de lactulose presente no leite no início da síntese e após 36 h a 8 °C com enzima imobilizada.

	LU (g L ⁻¹)	
	0 h	36 h
LBI	<0,01±0,00 ^b	0,41±0,01 ^a
LOI	<0,01±0,00 ^b	0,38±0,01 ^a

Média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes nas linhas para o leite de cada espécie diferem significativamente ($p < 0,05$) entre os tempos de síntese. Leite bovino integral (LBI) e leite ovino integral (LOI).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Para isso, necessita-se realizar estudos mais aprofundados, a fim de obter o teor de lactulose sintetizada de 3 g 100 g⁻¹ de amostra (BRASIL, 2018), estabelecido como necessário em produto prebiótico. Contudo, estudos indicam que a rota biocatalítica para a síntese de lactulose via transgalactosilação de lactose com frutose catalisada por β -galactosidase apresenta baixos rendimentos quando comparados à síntese química (PANESAR, KUMARI, 2011; GUERRERO et al., 2017a).

Outros estudos obtiveram valores maiores de LU em virtude da diferença de temperatura e matriz láctea utilizada. A síntese enzimática de lactulose descrita por Vaheri e Kaupinnen (1978) apresentou produção de 8,6 g L⁻¹ de lactulose utilizando a enzima β -galactosidase na presença de lactose e frutose (em pH 7,2 e 37 °C).

Song et al. (2013a) avaliaram a produção de lactulose e relataram que a temperatura ótima para a enzima β -galactosidase imobilizada é de 40 °C com estabilidade por um período de 150 min, na reação de transgalactosilação, e isomerização com glicose isomerase na temperatura de 60 °C por um período de 180 min, obtendo valores máximos de síntese de lactulose de 4,81 g L⁻¹ a 54 °C com tempo de reação de 2,5 h utilizando-se de lactose de soro de leite.

Além da hidrólise da lactose, a β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é capaz de catalisar reação de transgalactosilação, na qual a lactose ou outros carboidratos na mistura servem comoceptor de galactosil, produzindo GOS com diferentes graus de polimerização e distintos tempos de ação quando ingeridos (PARK; OH, 2010; TORRES et al., 2010). A fonte de enzima e as condições operacionais da reação (concentração de lactose, atividade de água, temperatura, pH, etc.) influenciam notavelmente o rendimento e a composição do produto sintetizado (GOS) (URRUTIA et al., 2013).

Em geral, o rendimento de GOS aumenta com o aumento da concentração de lactose (VERA et al., 2012). Em condições ideais, os rendimentos de GOS estão entre 30 e 40% (GOSLING et al., 2010). O uso de β -galactosidases geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) para esgotar a lactose do leite é extensivo na indústria de laticínios como uma resposta à intolerância à lactose que é comum. Ainda, o pH do leite (~6,7) é apropriado para a atividade de muitas β -galactosidases.

A formação de GOS durante o tratamento do leite com β -galactosidases foi raramente relatada (RUIZ-MATUTE et al., 2012), provavelmente devido ao fato de que o teor de lactose no leite bovino está em torno de 5 %, um valor significativamente menor em comparação com soluções tamponadas de lactose (15-50 %) empregadas para promover a reação de transgalactosilação (GANZLE; HAASE; JELEN, 2008). O uso de permeado de soro de leite para sintetizar GOS é mais comum (LORENZEN et al., 2013).

5.6.2 Tempo de fermentação para produção do iogurte

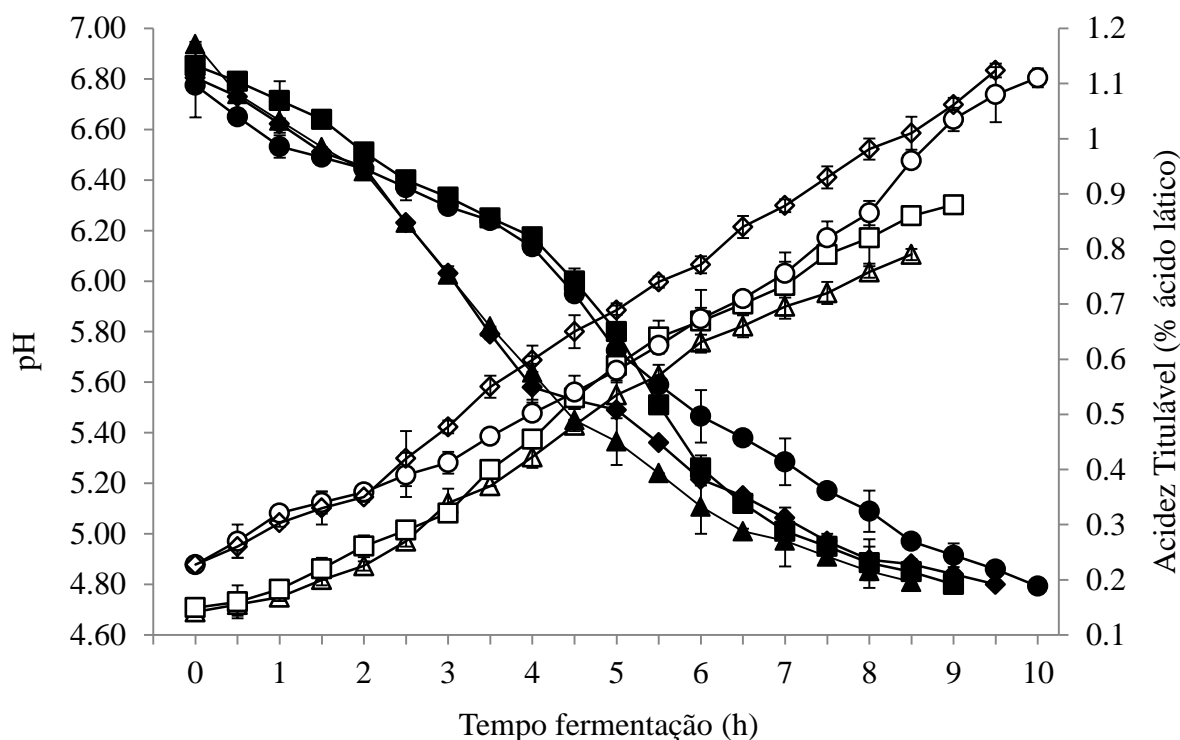
O iogurte é obtido pela fermentação ácida do leite por bactérias ácido-láticas (SERAFEIMIDOU et al., 2013). Para isso, as bactérias ácido-láticas convertem a lactose presente no meio em monossacarídeos, glicose e galactose, os quais são facilmente metabolizados em ácido láctico, com isso ocorre a diminuição do pH e aumento da acidez (SULTAN et al., 2016). O controle da variação do pH é uma das maneiras de monitorar a fermentação, visto que o valor do pH apresenta relação com a acidez e o desenvolvimento microbiológico (BETT et al., 2017).

Na Figura 10 está apresentado o tempo de fermentação, pH e acidez dos leites bovino integral com lactulose (LBILU), bovino integral (LBI), ovino integral com lactulose (LOILU) e ovino integral (LOI). O LBILU necessitou de menor tempo de fermentação em comparação aos demais, 8,5 h, seguido do LBI 9,0 h, na sequência LOILU 9,5 h e LOI com 10 h.

Embora do ponto de vista microbiológico conservar o leite através do congelamento seja a melhor forma, o leite ovino está sujeito a alterações indesejáveis, que afetam suas características físico-químicas e de microestrutura (FAVA et al., 2014; WENDORFF; KALIT, 2017). Os grandes cristais de gelo formados durante o congelamento danificam os glóbulos de gordura irreversivelmente, com a consequente desestabilização da emulsão e coalescência dos glóbulos após o descongelamento (PAZZOLLA et al., 2013; TRIBST et

al., 2019), formando glóbulos de gordura maiores que se separam facilmente (TRIBST et al., 2019).

Figura 10 – Valores de acidez titulável e pH durante a fermentação até pH 4,8 do leite: bovino integral com lactulose (LBILU) (\triangle) acidez e (\blacktriangle) pH, leite bovino integral (LBI) (\square) acidez e (\blacksquare) pH, leite ovino integral com lactulose (LOILU) (\diamond) acidez e (\blacklozenge) pH, e leite ovino integral (LOI) (\ominus) acidez e (\bullet) pH.



Média \pm desvio padrão. Leite bovino integral com lactulose (LBILU), leite bovino integral (LBI), leite ovino integral com lactulose (LOILU) e leite ovino integral (LOI). Acidez (%) = g ácido láctico 100 g amostra⁻¹. Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Quando o leite é descongelado em temperaturas de refrigeração o efeito é mais intenso (TRIBST et al., 2019). Por outro lado, o degelo a temperatura ambiente alta pode resultar em crescimento microbiano indesejável (TRIBST et al., 2019).

Além de alterações na gordura, outros efeitos ocorrem nos constituintes do leite ovino devido ao congelamento, principalmente no balanço salino. Isso é explicado pelo congelamento parcial da água e a formação de uma solução salina supersaturada (KLJAJEVIC et al., 2016) aumentando a força iônica e, conseqüentemente, a pressão osmótica do sistema (HAENLEIN; WENDORFF, 2006). Como consequência, podem ser

observadas mudanças na distribuição mineral nas fases solúvel e coloidal e na capacidade de tamponamento do leite (TRIBST et al., 2019).

No iogurte ovino é possível perceber que ocorreu modificação no leite após o descongelamento pelo tempo elevado de fermentação, o mesmo foi observado por Tribst et al., (2018), um processo de fermentação prolongado e alterações na textura.

Com isso, além do efeito do congelamento da matriz láctea (TRIBST et al., 2018), outros pontos a serem observados nos distintos tempos de fermentação são tipo de espécie que origina o leite (ovino, bovino, caprino e outros) por possuírem distintas concentrações de seus constituintes que tem efeito no processo (RETTEDAL et al., 2019), presença de dissacarídeo ou monossacarídeos no leite, e de modo geral o teor de gordura da amostra.

Tribst et al. (2018) congelaram o leite ovino durante um mês, de forma lenta a -18°C , por aproximadamente 24 h, e, posteriormente, descongelaram porções separadamente, de forma lenta (24 h) e rápida (imediatamente antes do uso), sendo o descongelamento lento indicado como o método de menor impacto no iogurte produzido.

A principal questão seja a diferente capacidade tamponante do leite ovino em comparação ao bovino (TRIBST et al., 2019a), fazendo com que a cultura acidificante tenha que produzir mais ácido para atingir o pH desejado.

Na Figura 10 é possível observar que para o LOI o pH inicial é em torno de 6,85, e para o LBI 6,94, já a acidez, 0,23 e 0,15 % de ácido láctico, respectivamente. Tribst et al., (2019a) utilizaram leite ovino com pH de $6,62 \pm 0,02$ e acidez titulável de $0,22 \pm 0,04$ % de ácido láctico no estudo do impacto do armazenamento de congelamento/descongelamento.

O tempo superior de fermentação também está relacionado a mudança na capacidade tamponante do leite, diferenças na solubilidade de sais e proteínas do leite ovino (TRIBST et al., 2019a). Além de que a capacidade de tamponamento é inversamente proporcional ao declínio da acidificação (TRIBST et al., 2019).

Os glóbulos de gordura de LO possuem menor diâmetro, em torno de $3,5 \mu\text{m}$, já o LB apresenta diâmetro de $4 \mu\text{m}$ (BALTHAZAR et al., 2017). Na fabricação de iogurte, os glóbulos pequenos e uniformes de gordura do LO asseguram sua homogeneização e dispersão, evitando a separação do creme no iogurte (KALYANKAR et al., 2016a).

Quanto ao teor de lactose, em uma amostra que contempla apenas lactose (LBI e LOI), a cultura inicialmente realiza a hidrólise e posterior acidificação em maior velocidade. Já quando a glicose está disponível, o processo de fermentação e acidificação

do meio inicia com maior rapidez (LBILU e LOILU), o que resulta em uma pequena variação no período de fermentação.

A cultura láctica utilizada é composta de dois micro-organismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* que atuam em conjunto. Na fase de fermentação, onde ocorre o crescimento simbiótico de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* em pH, de 5,7 e 5,0 (DE BRABANDERE; DE BAERDEMAEKER, 1999), o consumo inicial de oxigênio, a diminuição do pH e a produção de CO₂ e ácido fórmico por *Streptococcus thermophilus* estimulam o crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (CHANDAN, 2014).

Por outro lado, o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* hidrolisa proteínas em peptídeos e aminoácidos livres, indispensáveis ao crescimento de *Streptococcus thermophilus* (CHANDAN, 2014), atuando assim em conjunto para que ocorra o processo de fermentação do leite até pHs inerentes ao processo. Para iogurtes o pH é de aproximadamente 4,8, sendo necessário cessar a fermentação através da diminuição da temperatura de fermentação (43 °C) até a temperatura de refrigeração (4 °C).

O término da fermentação foi definido em pH 4,8, visto que esta condição contribui para a manutenção das características de textura e sinérese diminuída em comparação ao cessar a fermentação em pHs inferiores a 4,8. Além do que as matrizes lácteas que compõe iogurtes com alto teor de proteína têm alta capacidade de tamponamento, resultando em tempos de fermentação maiores para obter um valor de pH pré-determinado (SALAÜN; MIETTON; GAUCHERON, 2005).

5.6.3 Iogurte

O iogurte é um alimento semi-sólido, produzido pela redução do pH das proteínas do leite ao seu ponto isoelétrico pela fermentação da lactose com bactérias ácido-lácticas, *Lactobacillus delbrueckii* e *Streptococcus thermophilus* (TAMIME; ROBINSON, 2007).

Os iogurtes com alta qualidade são aqueles que possuem uma boa viscosidade, o teor considerado de proteína é importante para formar uma rede proteica compacta que impeça a saída da água/soro do iogurte do coágulo formado. Estudos indicam que a estabilidade do leite é negativamente relacionada à acidez, já que a redução do pH do leite diminui o teor de caseinato de fosfato de cálcio e aumenta a concentração do cálcio iônico,

que por sua vez reduz as forças de repulsão entre caseínas e favorece a coagulação do leite (DE LA VARA et al., 2018).

Em função do período necessário para a amostra atingir como um todo 4 °C após a fermentação, a cultura láctica continua a acidificação, mas em velocidade menor, o que pode gerar ao produto final alta sinérese, por isso da escolha em cessar a fermentação em pH ~4,8. Visto que as caseínas, que são as proteínas em maior quantidade no leite, cerca de 80 % de proteína total do leite perdem sua estabilidade em pHs inferiores a 4,7, em seu ponto isoelétrico (PARK et al., 2007). Nesse ponto as cargas elétricas das partículas coloidais da caseína se neutralizam ou se igualam e a força de repulsão, devido ao excesso de cargas negativas existentes na caseína em um pH próximo da neutralidade, deixa então de existir, permitindo assim, que as partículas coloidais se unam formando o coágulo ou gel.

O tempo necessário para atingir a temperatura de 4 °C foi de 2,5 h para o iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU) com pH de 4,70, para iogurte de leite bovino integral (IB) 2,4 h com pH de 4,74, iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) 2,2 h com pH de 4,75 e iogurte de leite ovino integral (IO) 2,0 h com 4,77.

A Tabela 8 apresenta o teor de proteína do iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO). Os IOLU e IO não obtiveram diferença estatística ($p > 0,05$) entre si, o mesmo ocorreu para o IBLU e IB, visto que se trata da mesma matriz láctea no desenvolvimento do iogurte padrão (LB e/ou LO) e do iogurte com lactulose (LBLU e/ou LOLU).

Vianna et al. (2017) apresentaram esta mesma tendência, ou seja, iogurtes de leite bovino apresentaram menor teor proteico ($3,39 \pm 0,00$ %) quando comparado ao iogurte ovino ($5,25 \pm 0,00$ %).

Já as matrizes lácteas distintas obtiveram diferença significativa ($p < 0,05$) para umidade, sendo que os iogurtes formulados com LO apresentaram valores menores. Esse resultado era esperado, em função do LO ter em sua composição maior teor de proteína do que o LB, ou seja, é diretamente relacionado ao teor contido na matéria-prima, principalmente, por se tratar da elaboração em batelada, tudo o que foi adicionado no processo permanece no produto final.

Tabela 8 – Resultado das análises físico-químicas dos iogurtes de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO).

	IBLU	IB	IOLU	IO
Proteína (%)	6,27±0,19 ^b	6,03±0,26 ^b	7,13±0,14 ^a	7,47±0,26 ^a
Umidade (%)	88,96±0,57 ^a	88,78±0,58 ^a	83,81±1,25 ^b	80,99±1,76 ^c
Cinzas (%)	0,76±0,04 ^b	0,78±0,03 ^b	0,94±0,03 ^a	0,91±0,01 ^a

Média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes nas linhas para cada análise diferem significativamente ($p < 0,05$). Iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO).

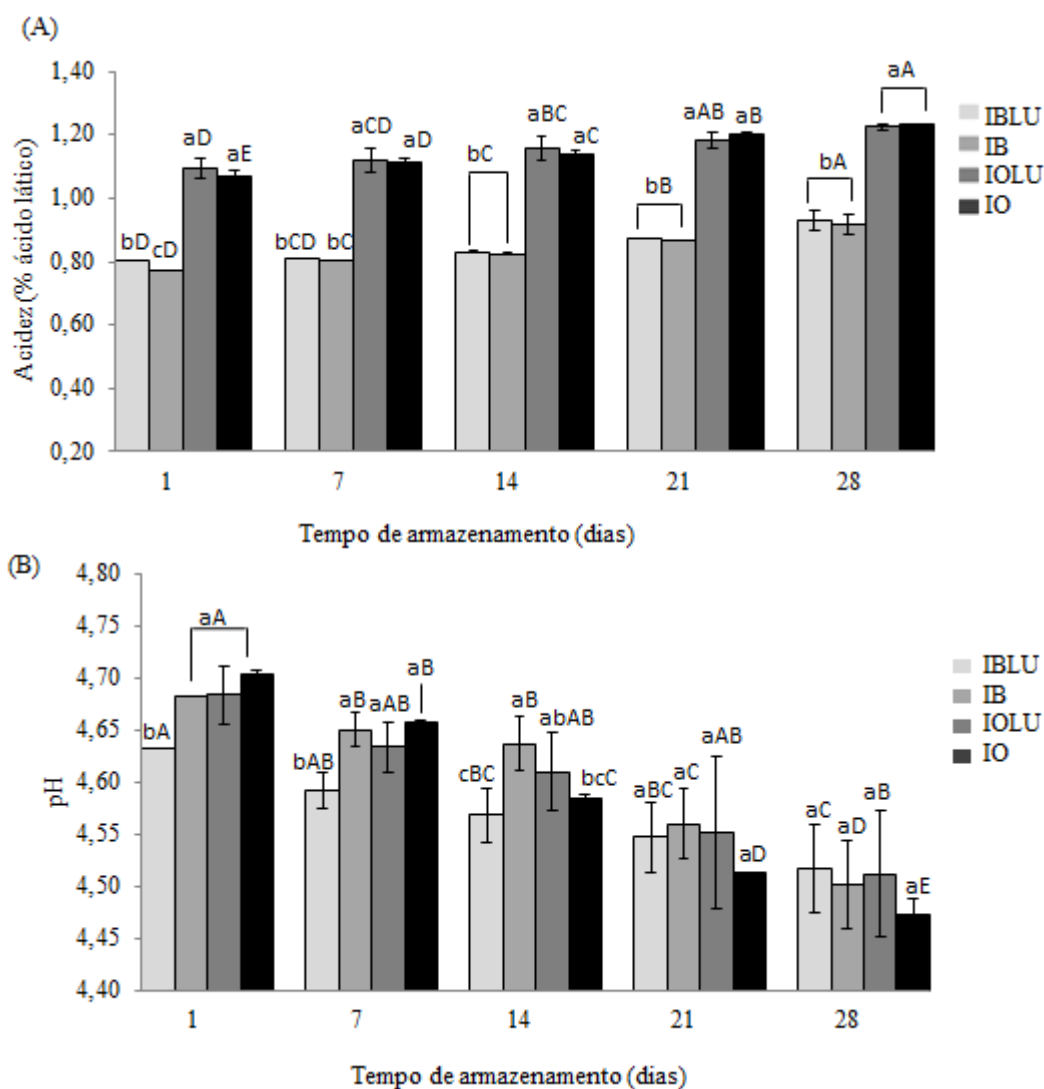
Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

O teor de cinzas seguiu o mesmo padrão dos leites utilizados na elaboração dos iogurtes (Tabela 3 e 8). Vianna et al. (2017) obtiveram teores de cinzas para iogurtes de leite bovino de 0,77±0,00 % e ao iogurte ovino de 0,99±0,00 %, bem como estudos apresentados por Gomes et al. (2013).

A Figura 11 A trata da acidez e a Figura 11 B do pH durante o armazenamento do iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO) por 28 dias sob refrigeração a 4 °C. Durante esse período as amostras de IOLU e IO referente a acidez obtiveram diferença estatística ($p < 0,05$) com relação ao IBLU e IB, pelos distintos valores originais da matriz láctea (LO e LB). Houve um pequeno aumento da acidez dos iogurtes entre o 1° e o 28° dia de armazenamento, pois mesmo em temperaturas de refrigeração as culturas lácteas continuam a acidificar o meio, em níveis baixos, mas é possível perceber a diferença nesse período.

Um comportamento parecido foi observado para o pH dos iogurtes durante o período de armazenamento (Figura 11 B), no qual houve declínio do pH para todos os iogurtes. Também tem relação com o desenvolvimento da cultura láctea do iogurte produzido, conforme pode ser verificado na Tabela 11. Resultado oposto foi observado no estudo de Vianna et al. (2019), pois não encontraram diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de pH para iogurtes de leite ovino e bovino armazenado por 28 dias.

Figura 11 – Valores correspondentes a acidez titulável (A) e valores de pH (B) dos iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), durante o período de 28 dias de armazenamento à 4 °C.



Média \pm desvio padrão. Médias com letras minúsculas diferentes para cada dia de armazenamento diferem significativamente ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas diferentes diferem significativamente para a mesma amostra ao longo do armazenamento ($p < 0,05$). Iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO). Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Para o comportamento da acidez para a mesma amostra ao longo do período de armazenamento, todas obtiveram diferença significativa ($p < 0,05$) do 1° ao 28° dia de ordem crescente. O inverso ocorreu para os valores obtidos de pH ($p < 0,05$). Em razão da temperatura de armazenamento, 4 °C, a ação da cultura láctica não é totalmente inibida.

5.6.4 Cor

A Tabela 9 apresenta os valores dos parâmetros ΔE , L^* , a^* e b^* para os iogurtes produzido, realizadas através do sistema de cores CIELAB, para o qual o parâmetro L^* significa luminosidade, que varia de 0 – preto a 100 – branco, a^* e b^* são coordenadas cromáticas que expressam valores de vermelho positivo e verde negativo, e amarelo positivo e azul negativo, respectivamente.

Tabela 9 – Variações no índice de cor para os parâmetros ΔE , L^* , a^* e b^* para iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), durante 28 dias de armazenamento a 4 °C.

	IB		IBLU	
	1º dia	28º dia	1º dia	28º dia
L^*	65,60±0,75 ^b	68,83±0,50 ^a	65,37±0,16 ^a	64,43±0,26 ^b
a^*	-6,43±0,28 ^a	-6,68±0,19 ^a	-6,43±0,04 ^a	-6,23±0,22 ^a
b^*	12,00±1,61 ^a	13,25±0,70 ^a	12,92±0,68 ^a	12,92±1,07 ^a
ΔE	-	-	1,49	4,62
	IO		IOLU	
	1º dia	28º dia	1º dia	28º dia
L^*	66,67±0,25 ^b	70,12±0,47 ^a	66,46±0,69 ^a	64,92±0,43 ^b
a^*	-6,30±0,17 ^a	-7,06±0,12 ^b	-6,18±0,33 ^a	-5,84±0,08 ^a
b^*	9,07±0,45 ^a	9,85±0,65 ^a	9,70±0,83 ^a	10,06±0,53 ^a
ΔE	-	-	1,18	5,46

Média ± desvio padrão. Valores seguidos por mesma letra minúscula em cada linha não apresentam diferenças significativas no nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento de cada amostra para os parâmetros de cor. Iogurte de leite bovino com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino (IB), iogurte de leite ovino com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino (IO).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

A luminosidade das amostras (L^*) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para todos os iogurtes em diferentes dias de armazenamento, o IO obteve maior índice de luminosidade seguido do IB, ambos aos 28º dia de armazenamento. Os menores valores foram para as amostras de IBLU 1º e 28º dia, IOLU aos 28º dia de armazenamento. Com relação a maior quantidade de sólidos totais (Tabela 3) presente na matriz láctea, nesse caso o LO, pode favorecer a absorção e redução da água livre, com uma menor reflexão de luz (GARCÍA-PÉREZ et al., 2005). Além disso, o leite ovino apresenta-se mais opaco e mais branco que o leite das principais espécies de ruminantes devido ao reflexo da luz sobre as

partículas opacas presentes em suspensão (micelas de caseína, cálcio, fosfato e citrato) (PELLEGRINI et al., 2012).

As amostras de IB e IO tiveram aumento significativo ($p < 0,05$) do parâmetro L^* em relação ao 1° e 28° dia de armazenamento. Os valores de L são correlacionados com a brancura que está associada à refrigeração do iogurte após fermentação (GARCÍA-PÉREZ et al., 2005; PEIXOTO et al., 2016). Esse comportamento não foi observado para o IBLU e IOLU, ou seja, a presença da lactulose interferiu na diminuição significativa ($p < 0,05$) da luminosidade.

O parâmetro a^* não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) para os IBLU, IB, IOLU para os dias de armazenamento avaliados. Apenas o IO teve diferença significativa ($p < 0,05$), indicando uma pequena mudança de verde claro para verde escuro.

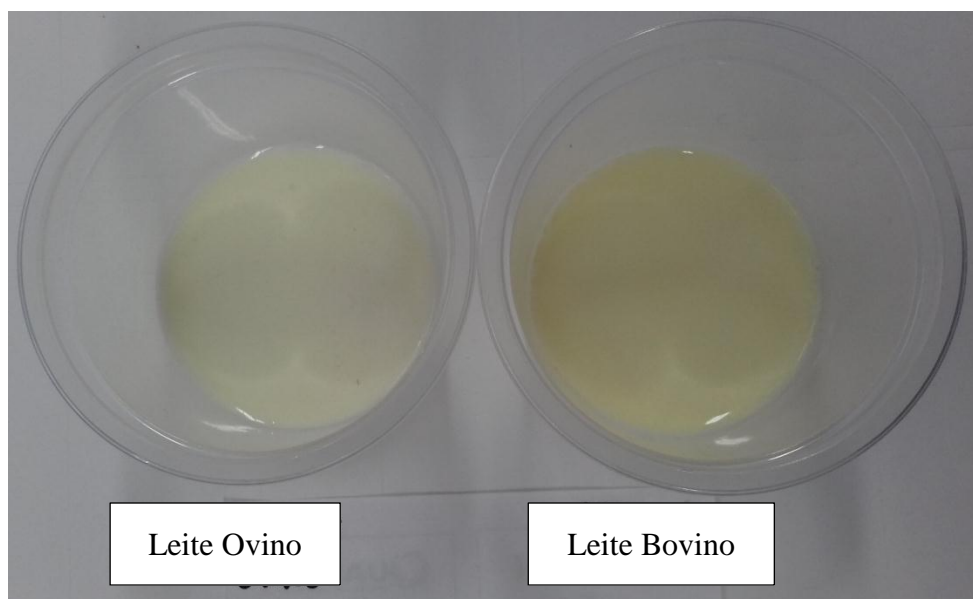
Para o parâmetro a^* , todas as amostras tendem a ter coloração verde, em maior tom a amostra de IO e IB no 28° dia de armazenamento. Ou seja, a ausência da lactulose nesses iogurtes influenciou este parâmetro, visto que a presença de um componente, neste caso a lactulose, diminuiu a coordenada cromática a^* .

O parâmetro b^* não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) para todos os iogurtes em diferentes dias de armazenamento, com valores condizentes para a mesma matriz láctea.

Para o parâmetro b^* , quanto maior valor positivo da amostra mais esta tende a ser amarela, isso pode ser observado nas amostras com LB que apresentaram maior b^* do que os iogurtes produzidos de LO. Essa diferença pode ser observada na matéria-prima utilizada para a elaboração dos iogurtes (Figura 12), na qual é possível perceber uma pequena diferença na tonalidade do amarelo de ambas as amostras, coloração essa mais presente para o LB, visto que o LO possui coloração levemente amarelo claro.

Ovelhas e cabras convertem todo o β -caroteno em retinol no leite que resulta em leites com tons de branco claro (MOHAMMADI-GOURAJI; SOLEIMANIAN-SAD; GHIACI, 2019) ao contrário do que ocorre nos bovinos, onde o leite tem coloração mais amarelada causada pelos carotenóides (BALTHAZAR et al., 2017). Ainda, a presença da lactulose não teve influência sobre coordenada cromática b^* .

Figura 12 – Representação fotográfica das amostras de leite bovino e ovino utilizadas na produção dos iogurtes.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

A variação de cor (ΔE) do IBLU e do IOLU apresentaram diferença perceptível ao olho humano, mais considerável para o 28º dia de armazenamento com relação a amostra padrão IB e IO, respectivamente. De acordo com Francis e Clydesdale (1975), valores de variação de cor (ΔE) próximos de zero indicam que as amostras resultaram em um produto com características semelhantes ao controle. E diferenças iguais ou superiores a dois podem ser consideradas perceptivelmente visíveis ao olho humano.

5.6.5 Lactulose no iogurte

A lactose é um dos constituintes mais importantes do leite, carboidrato chave presente no leite. É um dissacarídeo formado a partir da glicose e da galactose com ligação glicosídica β 1-4 (ANUSHA; BINDHU, 2016). A transformação de lactose em lactulose pode ser realizada através de processos enzimáticos (WU et al., 2017), sendo que no meio no qual é realizada a síntese é necessário a presença de lactose e frutose em concentrações nas quais se sobressaia a síntese da lactulose e baixos níveis de produtos secundários.

A Tabela 10 apresenta a lactulose no iogurte de leite bovino com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino (IB), iogurte de leite ovino com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino (IO) durante o 1º e 28º dia de armazenamento a 4 °C.

Tabela 10 – Concentração de lactulose no iogurte de leite bovino com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino (IB), iogurte de leite ovino com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino (IO) ao 1° e 28° dia de armazenamento a 4 °C.

	Lactulose (g L ⁻¹)	
	1° dia	28° dia
IBLU	0,41±0,01 ^a	0,38±0,02 ^a
IB	<0,01±0,00 ^a	<0,01±0,00 ^a
IOLU	0,38±0,01 ^a	0,39±0,03 ^a
IO	<0,01±0,00 ^a	<0,01±0,00 ^a

Média ± desvio padrão. Valores seguidos por mesma letra em cada linha não apresentam diferenças significativas no nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento para cada amostra. Iogurte de leite bovino com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino (IB), iogurte de leite ovino com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino (IO).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

O processo de hidrólise para síntese de lactulose diminuiu os teores de lactose considerando que os mesmos foram hidrolisados em torno de ~60% (Tabela 6). A lactose contida inicialmente nas amostras de leite foi reduzida pelo processo de fermentação, resultando assim em uma possível redução em torno de 1,69 % e 1,89 % de lactose no IBLU e IOLU, respectivamente. Visto que na produção de iogurte, cerca de 20 a 40 % da lactose presente no leite é transformada em ácido láctico (SHIBY; MISHRA, 2013). Nesse sentido o iogurte ser classificado como produto reduzido de lactose ou ainda zero lactose.

A lactulose tem efeito de estimular seletivamente a atividade de micro-organismos intestinais, como bifidobactérias e lactobacilos, a fim de conferir um benefício à saúde (GIBSON et al., 2017), contribuindo para a evacuação frequente quando consumido cerca de 3 g por dia de prebióticos (BRASIL, 2018).

Quanto ao teor de lactulose, os iogurtes não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) no período de armazenamento de 1° e 28° dia, ou seja, a cultura láctica não consumiu esta substância. Apesar do teor de lactulose sintetizado não ser suficiente para o iogurte ser classificado como prebiótico, sabe-se que se tem a possibilidade de síntese deste composto *in loco*, apenas há necessidade de aumento da concentração mínima de 3 g L⁻¹, para garantir tal benefício a quem consome.

5.6.6 Análises microbiológicas do iogurte

A análise microbiológica é de grande importância não só a quem consome ou para verificar a eficiência da pasteurização, mas também a influência no estudo realizado.

As análises de coliformes totais e termotolerantes não apresentaram alteração das contagens durante o período de armazenamento a 4 °C para todos os iogurtes produzidos (Tabela 11). Já os bolores e leveduras diminuíram a contagem durante o armazenamento somente para o IB.

Para as Bactérias Acidófilas Específicas (CTBAE) que são aquelas adicionadas ao leite para elaboração do iogurte, entre elas o *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) esperava-se que a contagem inicial durante o armazenamento de iogurte diminuísse de 1 a 2 log (BALTHAZAR et al., 2016), porém ocorreu um aumento para todos os iogurtes.

Tabela 11 – Contagem microbiológica do iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU), iogurte de leite ovino integral (IO) no 1° e 28° dia de armazenamento a 4 °C.

Contagem (UFC g ⁻¹)	IBLU		IB	
	1° dia	28° dia	1° dia	28° dia
CTCT	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹
CCT	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹
CBL	3,5x10 ² ±4,8x10 ¹	5,5x10 ² ±1,1x10 ²	2,3x10 ² ±3,2x10 ¹	<1,0x10 ¹
CTBAE	2,3x10 ⁷ ±9,4x10 ⁶	5,7x10 ⁸ ±3,9x10 ⁸	1,5x10 ⁷ ±1,3x10 ⁷	8,2x10 ⁸ ±8,5x10 ⁷
	IOLU		IO	
	1° dia	28° dia	1° dia	28° dia
CTCT	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹
CCT	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹
CBL	3,3x10 ⁰ ±1,8x10 ⁰	1,2x10 ² ±6,6x10 ¹	6,4x10 ² ±5,3x10 ²	2,3x10 ³ ±2,6x10 ²
CTBAE	1,3x10 ⁶ ±1,0x10 ⁶	7,0x10 ⁸ ±2,2x10 ⁸	1,2x10 ⁷ ±1,1x10 ⁷	1,3x10 ⁸ ±7,8x10 ⁷

Contagem total de coliformes termotolerantes (CTCT), Contagem de Coliformes Totais (CCT), Contagem de Bolores e Leveduras (CBL), Contagem Total de Bactérias Acidófilas Específicas (CTBAE), iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU), iogurte de leite ovino integral (IO).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Apesar do iogurte ser considerado um alimento inerentemente seguro porque o pH de um produto fabricado adequadamente (4,3 a 4,6) é abaixo do limiar em que a maioria das bactérias patogênicas está ativa (TAMIME; BRUCE; MUIR, 1993), estudos mais

recentes mostraram que algumas bactérias patogênicas, originárias do leite, podem sobreviver em iogurte de baixo pH.

Para evitar o risco de tratamento térmico de baixa temperatura do leite ovino (60 °C/5 min), que não é capaz de eliminar todos os patógenos, o iogurte deve ser produzido a partir do leite ovino de acordo com as regras estabelecidas pela diretiva 92/46 do Conselho da União Europeia/CEE, cabíveis para países da União Européia. A diretiva estabelece as regras sanitárias para a produção e comercialização de leite cru, leite tratado termicamente e produtos à base de leite ovino.

Ainda, autores citam que a pasteurização é uma das melhores formas de modificar a estrutura do leite, principalmente as proteínas que estão com sua estrutura aberta para ligação, formando uma rede proteica, a qual aprisionam soro e glóbulos de gordura, que influenciam diretamente na reologia e textura do produto final (NGUYEN et al., 2013).

O teor de gordura também pode influenciar na eficiência da pasteurização do leite empregado na elaboração dos iogurtes, visto que os micro-organismos possuem a capacidade de entremear-se entre os glóbulos de gordura e permanecerem ativos.

5.6.7 Sinérese

A Tabela 12 apresenta os valores de sinérese para os iogurtes de leite bovino integral com lactulose (IBLU), leite bovino integral (IB), leite ovino integral com lactulose (IOLU) e leite ovino integral (IO), durante 28 dias de armazenamento a 4 °C.

Tabela 12 – Sinérese para iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), durante 28 dias de armazenamento a 4 °C.

Sinérese (%)	1º dia	28º dia
IBLU	32,51±2,95 ^a	33,45±0,30 ^a
IB	31,97±4,89 ^a	33,80±0,09 ^a
IOLU	30,63±0,60 ^b	33,70±0,02 ^a
IO	29,11±0,60 ^b	30,88±0,66 ^a

Média ± desvio padrão. Os resultados são relatados com a média de duas repetições. Valores seguidos por mesma letra minúscula em cada linha não apresentam diferenças significativas no nível de confiança de 95 % (p<0,05) entre os tempos de armazenamento de cada amostra. Iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO). Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Comparando todos os iogurtes nos diferentes dias de armazenamento apenas o IO aos 28 dias teve menor sinérese com diferença significativa ($p < 0,05$) para o IBLU e o IB. Pelo teor de proteína superior do LO (Tabela 8), possivelmente este teve maior capacidade de retenção de água já no início do armazenamento (1º dia). Já à medida que foi passando o período de armazenamento a sinérese do IOLU e IO foi aumentando passando a ter diferença significativa aos 28º dia, possivelmente em razão da diminuição do pH do iogurte (Figura 11 B).

Os IBLU (1º e 28º dia de armazenamento), IB (1º e 28º dia de armazenamento) e não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). O processo de sinérese pode ser influenciado pelo valor do pH, valores abaixo de 4,7 elevando a sinérese, devido as soroproteínas que estão solúveis, e as caseínas do leite que não permanecem no ponto isoelétrico (PI) (FARRELL JR et al., 2006). A β -lactoglobulina é apresentada em maior quantidade no LO do que outras proteínas do soro do leite (imunoglobulina, lactoferrina, α -lactoalbumina) (SELVAGGI et al., 2014), contribuindo para o valor do pH do leite e também para a propensão do dessoramento do iogurte. De modo geral, a síntese da LU *in loco* não afetou a sinérese visto que está em concentração abaixo do esperado.

A sinérese foi percebida como um defeito indesejável no iogurte, por ser considerada uma expulsão espontânea de soro de leite do coágulo e está relacionada à rede instável (LEE; LUCEY, 2004). Ou seja, quanto maior a sinérese observada menor a capacidade de retenção de água da amostra. A capacidade de retenção de água do iogurte é afetada principalmente pelo conteúdo total de sólidos e de proteínas (FENG et al., 2019).

A separação do soro é um pequeno erro físico que afeta principalmente a aparência do produto, ou seja, do ponto de vista tecnológico, a separação do soro aponta para falhas na tecnologia de produção de iogurte (ZAMBELIN; SAMARŽIJA, 2017). Em particular, quando a temperatura do tratamento térmico do leite é inferior a 85 °C, esta é considerada a principal razão para uma maior predisposição da estrutura do gel de iogurte para a sinérese (LEE et al., 1994), o que pode ter contribuído para a sinérese dos iogurtes produzidos no presente estudo, uma vez que os leites foram pasteurizados a 65 °C.

Ainda, como o leite ovino foi congelado, este processo pode ter contribuído pra a sinérese, pois o congelamento pode induzir a desestabilização da proteína micelar, levando à agregação de caseína (MUIR, 1984) com conseqüente redução da capacidade de retenção de água (WHC) devido à quebra de ligações de hidrogênio entre polipeptídeos (WENDORFF, 2001).

Outros autores como Wang et al. (2019) citam que os diferentes mecanismos entre géis de diferentes espécies podem ser atribuídos ao pH diferente em que ocorre a agregação de micelas de caseína e as diferentes mudanças estruturais nas micelas de caseína após a acidificação. Ou seja, um conteúdo de caseína maior pode resultar em um maior número de ligações cruzadas entre micelas de caseína após acidificação, portanto, levando a uma rede de gel mais forte (LI et al., 2018; NGUYEN; AFSAR; DAY, 2018), evitando a sinérese.

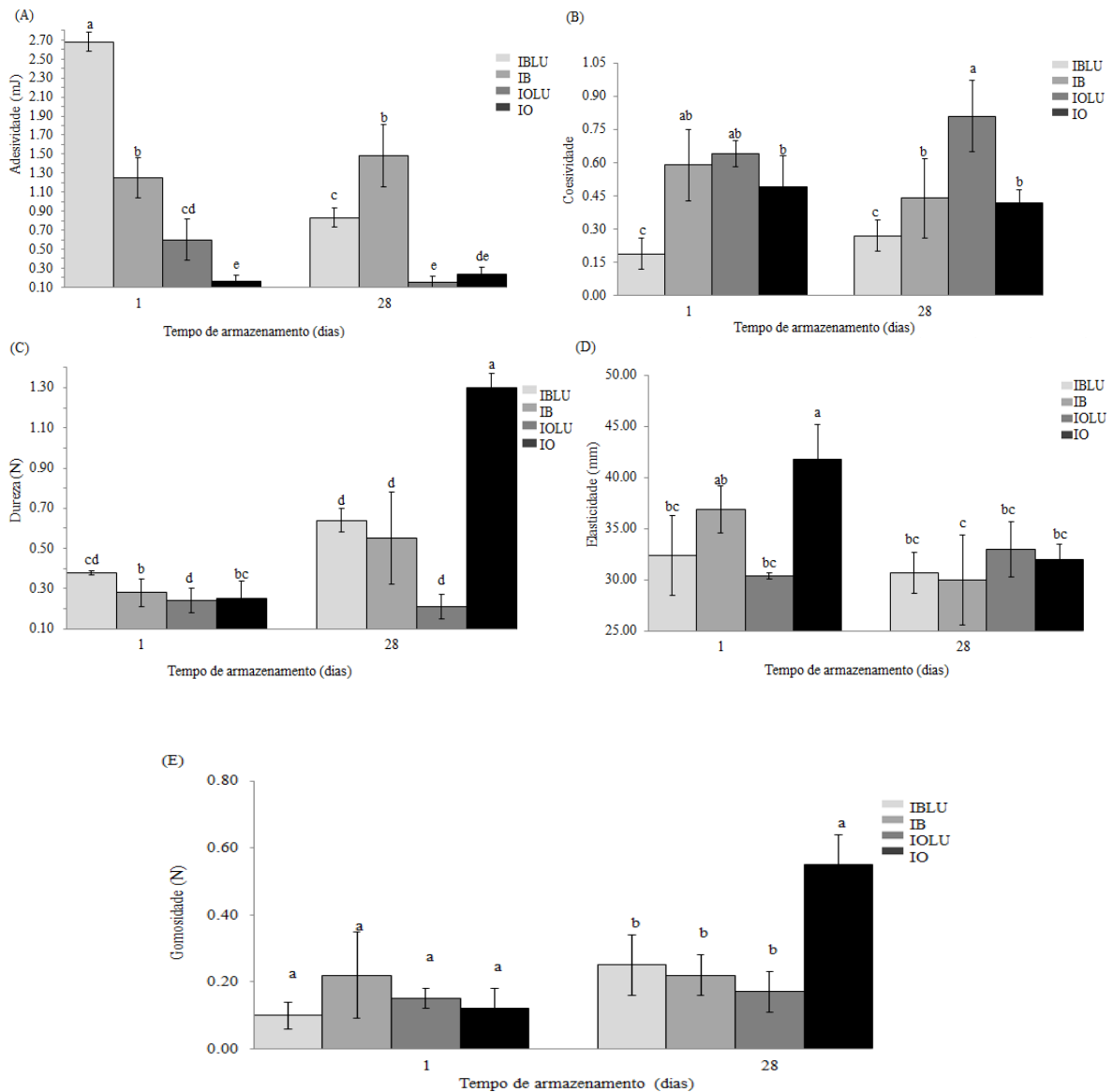
5.6.8 Perfil de Textura

A textura é uma das características sensoriais mais importantes de alimentos, sendo um parâmetro crítico na percepção e apreciação da qualidade dos alimentos e impacta diretamente na escolha do consumidor (GUIMARÃES et al., 2020). A incorporação dos prebióticos e probióticos também pode influenciar a textura (GUIMARÃES et al., 2020).

A Figura 13 demonstra as propriedades de textura do iogurte que foram estudadas através da análise do perfil de textura (TPA) dos iogurtes bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte bovino integral (IB), iogurte ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte ovino integral (IO), durante 28 dias de armazenamento a 4 °C.

O parâmetro de adesividade (Figura 13 A) foi maior no IBLU no 1° dia de armazenamento com diferença significativa aos demais ($p < 0,05$). Dentre os iogurtes ovinos o que obteve maior adesividade foi o IOLU no 1° dia de armazenamento, significativamente igual ($p > 0,05$) ao IBLU no 28° dia de armazenamento, ou seja, a adesividade diminui com tempo de armazenamento para IBLU, assim como para o IOLU. Valores maiores de adesividade são oriundos da energia necessária para superar a força de ligação entre a superfície do coágulo e a superfície do material restante (FADELA; ABDERRAHIM; AHMED, 2009). Os iogurtes IB e IO não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para adesividade entre o 1° e 28° dia de armazenamento, indicando menor força de ligação superfície e coágulo.

Figura 13 – Avaliação do perfil de textura A) adesividade, B) coesividade, C) dureza, D) elasticidade e E) gomosidade, para iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), no 1º e 28º dia de armazenamento a 4 °C.



Coesividade não possui unidade de medida pois é adimensional**Média \pm desvio padrão. Os resultados são relatados com a média de duas repetições. Valores seguidos por mesma letra minúscula em cada coluna não apresentam diferenças significativas no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento de cada amostra para cada parâmetro de textura. Iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Além do que o processo de hidrólise e síntese são processos longos ao qual a matriz láctea permanece sob agitação, esse processo passado algum tempo acaba influenciando negativamente na estabilidade da emulsão que reflete na adesividade e com maior força

para na matriz láctea ovina no qual os glóbulos de gordura já são mais dispersos comparado a bovina.

Coesividade é a força dos vínculos internos que compõem a estrutura de um produto (AZARI-ANPAR et al., 2017). Ou seja, relaciona-se a força do coágulo formado no interior do iogurte, a qual está relacionada ao teor de proteína da amostra, sendo que um maior teor de proteína torna a amostra mais rígida até certo ponto, no qual pode ocorrer a sinérese impedindo que a estrutura se mantenha intacta. Sendo que o IBLU, IB, IOLU e IO não apresentaram diferença significativa entre o 1° e 28° dia de armazenamento.

A firmeza do iogurte é fortemente influenciada pela formação de complexos de proteínas, entre proteínas desnaturadas do soro de leite ligadas à superfície da caseína micelar (JØRGENSEN et al., 2015; MAHOMUD; KATSUNO; NISHIZU, 2017). É considerada a propriedade textural mais importante do iogurte (VIANNA et al., 2019), associada à sensação na boca do produto e à percepção sensorial (NGUYEN; AFSAR; DAY, 2018). Em geral, os iogurtes apresentaram um aumento da firmeza durante o armazenamento, sendo observada diferença significativa para a amostra IO 28° dia ($p < 0,05$), seguida do IB e IBLU ($p > 0,05$) no 28° dia (Figura 13 C).

Além disso, Park et al. (2007) relataram anteriormente que o leite ovino é mais rico em conteúdo de caseína do que o leite bovino, o que pode ter contribuído para a maior firmeza do IO no 28° dia. Amatayakul, Sherkat e Shah (2006) observaram que os iogurtes produzidos com 14 % de sólidos totais exibiram maior firmeza do que os fabricados com 9 %, demonstrando uma relação positiva entre o teor de sólidos totais e a firmeza. Além disso, o conteúdo de lipídios e o tamanho dos glóbulos também são fatores importantes que afetam a firmeza do gel (NGUYEN et al., 2014).

Nesse contexto, o iogurte de leite ovino é apreciado por sua maior firmeza e consistência, em comparação com o iogurte bovino (ZAMBERLIN; SAMARŽIJA, 2017). Isso ocorre devido ao leite ovino ter um maior teor de proteína e gordura, formando uma forte rede tridimensional de proteínas de agregados de micelas de caseína que aprisionam glóbulos de gordura e soro durante a fermentação (TRIBST et al., 2019). Os iogurtes de LO do presente estudo apresentaram maior teor de proteína (Tabela 8).

O mesmo não foi observado para o IOLU, no qual o processo de síntese e hidrólise da lactose pode ter contribuído para não haver diferença significativa ($p > 0,05$) entre o período de armazenamento. Os iogurtes IBLU e IOLU não apresentaram alteração na

elasticidade durante o período de armazenamento (Figura 13 D), indicando que o processo de hidrólise da lactose e síntese da lactulose não influenciou este parâmetro. Os iogurtes LB e LO apresentaram redução da elasticidade durante o armazenamento, especialmente o LO.

Já a gomosidade tem efeito indesejável na aparência e textura de um produto alimentício (AZARI-ANPAR et al., 2017), ou seja, para os iogurtes produzidos este parâmetro se manteve com valores baixos o que mostra uma boa textura do produto (Figura 13 E).

5.6.9 Propriedades bioativas e compostos fenólicos totais do iogurte

As propriedades bioativas dos alimentos tem ganhado cada vez mais atenção seja dos consumidores pelos benefícios que trazem a saúde. Durante a fermentação microbiana, as proteínas do leite são submetidas a divisão conforme o sistema proteolítico dos microorganismos (HAYES et al., 2007). As culturas bacterianas de *Lactobacilos spp.*, *Lactococci spp.* e *Streptococci spp.* são comumente usados para gerar hidrolisados de leite (FITZGERALD; MURRAY, 2006).

As bactérias ácido-lácticas (BAL) requerem aminoácidos e peptídeos livres para seu crescimento, que estas obtêm das proteínas do leite por degradação (HAFEEZ et al., 2014). São os peptídeos ou hidrolisados não utilizados pelas bactérias que podem promover várias bioatividades. Parâmetros de fermentação, como razão enzima/substrato, composição do meio, tratamento térmico, temperatura, pH e relação carbono/nitrogênio influenciam a liberação de hidrolisados das proteínas do leite (MUKHOPADHYA; SWEENEY, 2016).

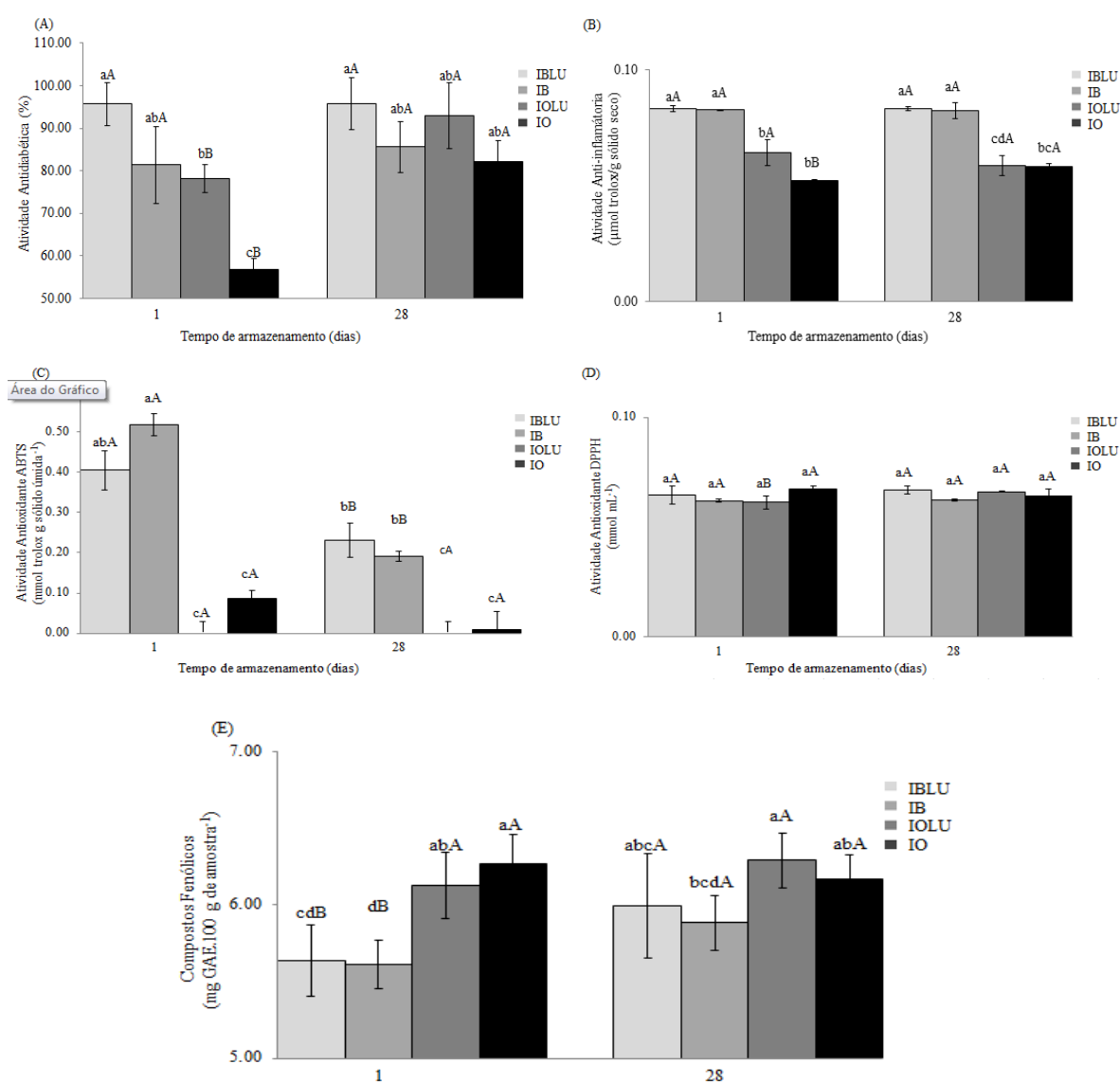
Os peptídeos bioativos foram definidos como proteínas do leite, da estrutura ou fragmentos de proteínas, os quais apresentam propriedades que têm impacto progressivo nas funções ou condições corporais que acabam por influenciar a saúde (ALUKO, 2012). O processo de fermentação por culturas iniciais de bactérias ácido-lácticas, usado na indústria de laticínios, envolve a hidrólise de proteínas do leite (particularmente caseína) em peptídeos e aminoácidos, usados como fontes de nitrogênio necessárias para o crescimento das BAL. Várias bactérias ácido-lácticas são amplamente utilizadas e seu papel pode ser dividido em culturas iniciadoras e não iniciadoras.

Diferentes culturas iniciais e condições de fermentação afetam a composição e natureza dos peptídeos bioativos liberados. Estudos têm demonstrado que as proteases LAB especialmente de *Lactococcus sp.* e *Lactobacillus sp.* poderiam hidrolisar ≥ 40 % das

ligações peptídicas de $\alpha 1$ e β caseínas resultando na liberação de vários oligopeptídeos que são posteriormente hidrolisados por peptidases complexas (CHOI et al., 2012).

Os iogurtes produzidos no presente estudo foram avaliados quanto suas bioatividades e compostos fenólicos totais apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Propriedades bioativas dos iogurte (A) atividade antidiabética, B) atividade anti-inflamatória, C) atividade antioxidante por ABTS, D) atividade antioxidante por DPPH e E) compostos fenólicos totais para iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), no 1º e 28º dia de armazenamento a 4 °C.



Média \pm desvio padrão. Valores seguidos por mesma letra minúscula em cada dia de armazenamento não apresentam diferenças significativas no nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). Valores seguidos por mesma letra maiúscula em cada amostra nos diferentes dias de armazenamento não apresentam diferenças

significativas no nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$) Iogurte de leite bovino com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino (IB), iogurte de leite ovino com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino (IO).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

A atividade antidiabética (Figura 14 A) foi superior para os iogurtes de leite bovino integral e com lactulose (IB e IBLU), ($p > 0,05$) no dia 1º dia, sendo que o armazenamento não modificou a capacidade de inibição da enzima α amilase no período de 28 dias ($p > 0,05$). O mesmo comportamento não foi observado para os iogurtes de leite ovino integral e com lactulose (IO e IOLU) ($p < 0,05$) no 1º dia de armazenamento, pois o IOLU apresentou maior atividade do que o IO. No entanto, para o período de 28 dias de armazenamento ocorreu aumento da inibição ($p < 0,05$) para IOLU e IO, sem diferença significativa. Apesar de inicialmente os iogurtes apresentarem diferentes atividades, a origem do leite e o processo de fermentação contribuíram para as atividades dos iogurtes de leite ovino. Cabe ressaltar que em 28 dias a % de inibição para a atividade antidiabética foi superior a 80 % para todos os iogurtes.

Ayyash et al. (2018) obtiveram inibições da α -amilase maior que 34 % para o leite fermentado bovino. A inibição da atividade de α -amilase pode ser considerada como uma abordagem eficaz para controlar o diabetes por meio da diminuição da hidrólise de carboidratos (DONKOR et al., 2012). A inibição geral de amilase pode ser atribuída a peptídeos bioativos, principalmente os menores (GOMES da CRUZ, et al., 2009).

A atividade anti-inflamatória (Figura 14 B) obteve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras dos iogurtes produzidos com distintos leites, sendo que o IBLU e IB obtiveram valores maiores e não foi possível observar diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos de armazenamento (1º e 28º dia). Para o IOLU não teve diferença significativa ($p > 0,05$) até o 28º dia de armazenamento, já o IO teve aumento ($p < 0,05$) entre o 1º e 28º dia de armazenamento. A atividade anti-inflamatória tem ação no organismo devido à sua composição terpênica, os terpenos são conhecidos como inibidores do complexo proteico - NF- κ B que está envolvido na resposta celular a estímulos como o estresse, citocinas, radicais livres, que são um importante fator de transcrição de citocinas próinflamatórias (BORGES et al., 2019). Ou seja, a ação anti-inflamatória só acontece quando possui terpenos que inibem o complexo NF- κ B, que é o responsável por pequenas inflamações.

A atividade antioxidante pelo radical ABTS teve comportamento diferente de acordo com a matriz láctea (Figura 14 C). O IBLU e IB se mantiveram em maior concentração ao longo dos 28 dias de armazenamento. Diferente do comportamento

observado para o IOLU e IO pode-se perceber uma tendência quando é comparada a espécie utilizada na elaboração dos iogurtes, ou seja, leite bovino possui maior atividade antioxidante ABTS se comparado ao leite ovino. Já a diminuição de atividade ao longo do armazenamento pode estar relacionada com a captura de um elétron da molécula a fim de formar um par e potencial para atividade antioxidante, gerando a instabilidade não sendo possível a formação do radical livre, ou seja, atividade antioxidante reduzida ao longo do armazenamento.

Já a atividade antioxidante pelo radical DPPH não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre todas as amostras (Figura 13 D). Apenas o IOLU apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quanto ao armazenamento, um pequeno aumento no 28° dia.

Os compostos fenólicos totais apresentaram valores superiores no IOLU e IO no 1° dia de armazenamento (Figura 14 E). O IB e IBLU não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) no 1° dia de armazenamento, mas com diferença ($p < 0,05$) em relação ao IO e IOLU. Já no 28° dia de armazenamento as amostras não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Para o IBLU e IB tiveram aumento e diferença significativa ($p < 0,05$) do 1° ao 28° dia de armazenamento, o mesmo não ocorreu ao IOLU e IO. Ou seja, o processo fermentativo possivelmente auxiliou na hidrólise de proteínas que formam os peptídeos bioativos, aumentando assim o teor de compostos fenólicos totais do IBLU e IB. No geral o processo de síntese de lactulose não contribui para o aumento da bioatividade dos iogurtes.

O baixo pH aumenta a estabilidade de compostos fenólicos durante o armazenamento (CHOUCHOULI et al., 2013), enquanto a presença de proteínas ou grandes peptídeos e gordura deve manter a integridade dos compostos fenólicos durante a digestão aumentando sua bioacessibilidade (TAGLIAZUCCHI et al., 2012; LAMOTHE et al., 2014), comportamento inverso ocorreu durante o armazenamento.

6 CONCLUSÃO

A busca por inovação nos processos industriais é uma realidade vivenciada constantemente, com isso novos processos são pesquisados a fim de aumentar a qualidade dos produtos, agregar valor comercial e diminuir custos industriais, como meios de realizar síntese de prebióticos *in loco*. A aplicação das enzimas β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e glicose isomerase para síntese de lactulose em leite bovino e ovino mostrou-se viável. Ainda, neste estudo a síntese de lactulose não apresentou diferença significativa no leite integral das diferentes espécies avaliadas. Para os iogurtes produzidos com diferentes leites, com e sem lactulose, foi possível verificar que a variação de cor (ΔE) teve influência do tempo de armazenamento e da matriz láctea utilizada. Os parâmetros de textura avaliados (adesividade, coesividade, dureza, elasticidade e gomosidade) tiveram distintos valores em iogurtes de diferentes espécies. A diferença de composição do leite ovino em relação ao leite bovino resultou na obtenção de atividades bioativas diferenciadas nos iogurtes. Em virtude dos níveis de lactulose terem sido inferiores à $0,5 \text{ g L}^{-1}$, seus teores não influenciaram as características dos iogurtes produzidos. Estudos de suplementação do meio e das variáveis de processo a fim de aumentar a concentração de lactulose sintetizada por via enzimática ainda são necessários.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudos das variáveis do processo de síntese de lactulose nas matrizes lácteas de diferentes espécies são necessárias, buscando aumentar a produção para no mínimo 3 g L^{-1} de lactulose, possibilitando assim designar o produto como prebiótico;
- Verificar o tempo necessário para a hidrólise da lactose e síntese da lactulose, visto que para aplicação industrial é limitante para o processo;
- Verificar a suplementação do meio para aumentar o processo de síntese;
- Definir o perfil de GOS produzidos na reação.

REFERÊNCIAS

- ABURTO, C.; GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Improvement in yield and selectivity of lactulose synthesis with *Bacillus circulans* β -galactosidase. **LWT**, v.118, 108746, p. 1-7, 2020.
- AÏT-AISSA, A.; AÏDER, M. Lactose electroisomerization into lactulose: Effect of the electrode material, active membrane surface area-to-electrode surface area ratio, and interelectrode-membrane distance. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p.4811–4823, 2014.
- ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; MARINO, R.; DELLA MALVA, A.; CAROPRESE, M.; SEVI, A. Identification of peptides in functional Scamorza ovine milk cheese. **Journal Dairy Science**, v. 98, p. 1-5, 2015.
- ALUKO R. **Bioactive peptides**. In: Functional foods and nutraceuticals. New York: Springer; p. 37–61, 2012.
- AMATAYAKUL, T., SHERKAT, F., SHAH, N.P. Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratio and EPS-producing startercultures at 9 and 14% total solids. **Food Hydrocoll**, v. 20, p. 314–324, 2006.
- ANUSHA, R.; BINDHU, O.S. *Peptídeos bioativos do leite. Proteínas do leite – da estrutura às propriedades biológicas e aspectos de saúde*, 2016.
- AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 920.153; 928.08; 947.05; 950.46. 20 ed. Rockville: 2016.
- AOAC Official Methods of Analysis Microbiological Methods 990.12. 21th ed. 2019.
- AOAC Official Methods of Analysis Microbiological Methods 997.02. 21th ed. 2019.
- ARANCIBIA, C.; JUBLOT, L.; COSTELL, E.; BAYARRI, S. Flavor release and sensory characteristics of o / w emulsions influence of composition, microstructure and rheological behavior. **Food Research International**, v.44, n.6, p.1632-1641, 2011.
- ARDABILCHI, M.; AMJADI, S.; ARDABILCHI, M.; ROUFEGARINEJAD, L.; JAFARI, S.M. Fortification of yogurt with flaxseed powder and evaluation of its fatty acid profile, physicochemical, antioxidant, and sensory properties. **Powder Technology**, v. 359, 2019.
- ARGOV, N.; LEMAY, D.G.; GERMAN, J.B. Milk Fat Globule structure & function; nanoscience comes to milk production. **Trends Food Sci Technol**, v. 19, n. 12, 2008.
- AYYASH, M.; AL-NUAIMI, A.K.; AL-MAHADIN, S.; LIU, S.-Q. In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. **Food Chemistry**, v. 239, p. 588–597, 2018.

AZARI-ANPAR, M.; PAYEINMAHALI, H.; DARAEI GARMAKHANY, A.; SADEGHI MAHOUNAK, A. Physicochemical, microbial, antioxidant, and sensory properties of probiotic stirred yoghurt enriched with Aloe vera foliar gel. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 5, e13209, 2017.

BALTHAZAR, C.F.; CONTE JÚNIOR, C.A.; MORAES, J.; COSTA, M.P.; RAICES, R.S.L.; FRANCO, R.M.; CRUZ, A.G.; SILVA, A.C.O. Physicochemical evaluation of sheep milk yogurts containing different levels of inulin. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p.1-9, 2016.

BALTHAZAR, C.F.; PIMENTEL, T.C.; FERRÃO, L.L.; ALMADA, C.N.; SANTILLO, A.; ALBENZIO, M.; MOLLAKHALILI, N.; MORTAZAVIAN, A.M.; NASCIMENTO, J.S.; SILVA, M.C.; FREITAS, M.Q.; SANT'ANA, A.S.; GRANATO, D.; CRUZ, A.G. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.16, n.2, p. 247-262, 2017.

BALTHAZAR, C.F.; SILVA, H.L.A.; VIEIRA, A.H.; NETO, R.P.C.; CAPPATO, L.P.; COIMBRA, P.T.; MORAES, J.; ANDRADE, M.M.; CALADO, V.M.A.; GRANATO, D.; FREITAS, M.Q.; TAVARES, M.I.B.; RAICES, R.S.L.; SILVA, M.C.; CRUZ, A.G. Evaluation of the effects of different oligosaccharides from the prebiotic diet on sheep's milk ice cream. **Food Research International**, v. 91, p.38 – 46, 2017a.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á; TORRES, R.; RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 435–456, 2015.

BEDADE, D.K.; SUTAR, Y.B.; SINGHAL, R.S. Chitosan coated calcium alginate beads for covalent immobilization of acrylamidase: Process parameters and removal of acrylamide from coffee. **Food chemistry**, v. 275, p. 95-104, 2019.

BELLÉ, A.S.; HACKENHAAR, C.R.; SPOLIDORO, L.S.; RODRIGUES, E.; KLEIN, M.P.; HERTZ, P.F. “Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels”. **Food Chemistry**, v. 246, p. 266–274, 2018.

BELLÉ, A.S. **Extração de genipina a partir do jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus) para imobilização de enzimas**. 2017. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA). Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2017.

BETT, S.C.; PICANÇO, N.F.M.; DE FARIA, R.A.P.G.; NASCIMENTO, E. Elaboração e qualidade de iogurte com polpa de mangaba. **Higiene Alimentar**, v.31, n. 272/273, p. 120-127, 2017.

BIANCHI, A.E.. **Avaliação de sistemas produtivos de ovinos leiteiros em diferentes regiões do Brasil**. 2018. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Curitiba, 2018.

BODE, L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, v. 22, p. 1147–1162, 2012.

BOITZ, L.I.; MAYER, H.K. Analytical evaluation of the intense heat load of whipped cream, coffee cream and condensed milk at retail in Austria and Germany. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 5, p.677-692, 2016.

BORGES, R.S.; ORTIZ, B.L.S.; PEREIRA, A.C.M.; KEITA, H.; CARVALHO, J.C.T. Rosmarinus officinalis essential oil: a review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity and mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 29-45, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Probióticos**. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2864062&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=probioticos&inheritRedirect=true>. Acesso em: 14 out. 2018.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2018. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, DF, 13 jul. 2018. Seção 1, p. 9.

BRASIL. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1, nº 205, p. 4.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – 2. ed. – Brasília : MAPA, 2019.

BRITO, M.A.; GONZÁLEZ, F.D.; RIBEIRO, L.A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P.R.; BERGMANN, R. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, v. 36, p. 942-948, 2006.

CAIS-SOKOLIŃSKA, D.; WÓJTOWSKI, J.; PIKUL, J. Lactose hydrolysis and lactase activity in fermented mixtures containing mare's, cow's, sheep's and goat's milk. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n.9, p. 2140-2148, 2016.

CHANDAN, R.C. Dairy - fermented products. In Clark, S.; Jung, S.; Lamsal, B. (Eds.) , **Food processing: Principles and applications** (2nd edn.). West Sussex: UK. Wiley, 2014.

CHARALAMPOPOULOS, D.; A RASTALL, R. Prebiotics in foods. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 23, v. 2, p. 187-191, 2012.

CHATTERJEE, A.; CHANDRA DAS, P.; PAUL, A.; DEY, R.; PAUL, A.; ADAK, K.; GHOSH, S. The effect of addition of β -carotene on casein, lactose & acidity of whole milk. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 9, n. 5, p. 142-147, 2015.

CHEN, X. Y.; GANZLE, M. G. Lactose and lactose-derived oligosaccharides: More than prebiotics? **International Dairy Journal**, v. 67, p. 61–72, 2017.

CHENG, S.; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S.I. Hydrogenation of lactose for the production of lactitol. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v.14, n.1, e2275, 2018.

CHOI J.; SABIKHI L.; HASSAN A.; ANAND S. Bioactive peptides in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 1–12. 2012.

CHOUCHOULI, V.; KALOGEROPOULOS, N. KONTELES, S.; KARVELLA, E.; MARKIS, D.P.; KARATHANOS, V.T. Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **LWT**, v.53,p. 522-529, 2013.

CHOCKCHASAWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V.I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R.A. Synthesis of Galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on Membrane-Fitted Bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 4, p. 434-443, 2005.

CLAEYS, W.L.; VERRAES, C.; CARDOEN, S.; DE BLOCK, J.; HUYGHEBAERT, A.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different species: an evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, p. 188–201, 2014.

CLAPS, S.; ROSSI, R.; DI TRANA, A.; DI NAPOLI, M.A.; GIORGIO, D.; SEPE, L. Bioactive compounds in goat milk and cheese: the role of feeding system and breed. **Goat Science**, InTech open science/open minds, 2017.

CODA, R.; RIZZELLO, C. G.; PINTO, D.; GOBBETTI, M. Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 1087–1096, 2012.

CORGNEAU, M.; SCHER, J.; RITIE-PERTUSA, L.; LE, D.T.L.; PETIT, J.; NIKOLOVA, Y.; BANON, S.; GAIANI, C. Recent advances on lactose intolerance: Tolerance thresholds and currently available solutions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.56, n.15, p. 3344-3356, 2017.

COSTA, M.P.; SILVA FRASAO, B.; COSTA LIMA, B.R.C.; RODRIGUES, B.L.; CONTE JUNIOR, C.A. Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by

HPLC-DAD-RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. **Talanta**, v. 152, p. 162–170, 2016.

DAVIS, J.C.C.; TOTTEN, S.M.; HUANG, J.O.; NAGSHBANDI, S.; KIRMIZ, N.; GARRIDO, D.A.; LEWIS, Z.T.; WU, L.D.; SMILOWITZ, J.T.; GERMAN, J.B.; MILS, D.A.; LEBRILLA, C.B. Identification of oligosaccharides in feces of breast-fed infants and their correlation with the gut microbial community. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.15, p. 2987–3002, 2016.

DAVOODI, S.H.; SHAHBAZI, R.; ESMAEILI, S.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A.; JAZAYERI, S.; TASLIMI, A. Health-Related Aspects of Milk Proteins. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.15, p. 573–591, 2016.

DE BRABANDERE, A. G.; DE BAERDEMAEKER, J. G. Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. **Journal of Food Engineering**, 41, 221–227, 1999.

DE LA VARA, J. A.; BERRUGA, M. I.; CAPPELLI, J.; LANDETE-CASTILLEJOS, T.; CARMONA, M.; GALLEGO, L.; MOLINA, A. Some aspects of the ethanol stability of red deer milk (*Cervus elaphus hispanicus*): A comparison with other dairy species. **International Dairy Journal**, v. 86, p. 103-109, 2018.

DELGADO-FERNÁNDEZ, P.; CORZO, N.; LIZASOAIN, S.; OLANO, A.; MORENO, F. J. Fermentative properties of starter culture during manufacture of kefir with new prebiotics derived from lactulose. **International Dairy Journal**, v. 93, p. 22–29, 2019.

DELOSIÈRE, M.; PIRES, J.; BERNARD, L.; CASSAR-MALEK, I.; BONNET, M. Milk proteome from in silico data aggregation allows the identification of putative biomarkers of negative energy balance in dairy cows. **Scientific Reports**, v. 9, p. 9718, 2019.

DEWETTINCK, K.; ROMBAUT, R.; THIENPONT, N.; LE, T.T.; MESSENS, K.; CAMP, J. V. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. **International Dairy Journal**, v.18, n.5, p. 436–457, 2008.

DOMAGALA, J.; WSZOLEK, M.; TAMIME, A.Y.; KUPIEC-TEAHAN, B. The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of ser-type goat's milk yogurt during the storage period. **Small Ruminant Research**, v. 112, p. 154-161, 2013.

dos SANTOS, J.C.S.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. **ChemCatChem**, v.7, n.1, p. 2413–2432, 2016.

DOUËLLOU, T.; MONTEL, M.C.; THEVENOT SERGENTET, D. Invited review: Anti adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.5, p.3348-3359, 2017.

DONKOR, O.N.; STOJANOVSKA, L.; GINN, P.; ASHTON, J.; VASILJEVIC, T. Germinated grains - sources of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 135, n.3, p. 950–959, 2012.

EGGER, L.; MÉNARD, O. Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion. **Current Opinion in Food Science**, v.14, p. 116–121, 2017.

FABERSANI, E.; GRANDE, M.V.; COLL ARÁOZ, M.V.; ZANNIER, M.L.; SÁNCHEZ, S.S.; GRAU, A.; OLISZEWSKI, R.; HONORÉ, S.M. Metabolic effects of goat's milk yogurt supplemented with yacon flour in rats on a high-fat diet. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 447–457, 2018.

FACIN, B.R.; MORET, B.; BARETTA, D.; BELFIORE, L.A.; PAULINO, A.T. Immobilization and controlled release of β -galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. **Food Chemistry**, v. 179, p. 44–51, 2015.

FADELA, C.; ABDERRAHIM, C.; AHMED, B. Sensorial and physico-chemical characteristics of yoghurt manufactured with Ewe's and skim milk. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 4, n. 2, p. 136–140, 2009.

FARRELL JR, H. M.; MALIN, E.L.; BROWN, E.M.; QI, P.X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 135-147, 2006.

FAVA, L.W.; KÜLKAMP -GUERREIRO, I.C.; PINTO, A.T. Evaluation of physico-chemical characteristics of fresh, refrigerated and frozen Lacaune ewes' milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, 1924 -1930, 2014.

FAZILAH, N. F.; ARIFF, A. B.; KHAYAT, M. E.; RIOS-SOLIS, L; HALIMA, M. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p.387-399, 2018.

FRANCIS, F.J.; CLYDESDALE, F.M. Food Colorimetry: Theory and Applications. AVI, Wesport, CT, 1975.

FENG, C.; WANG, B.; ZHAO, A.; WEI, L.; SHAO, Y.; WANG, Y.; CAO, B.; ZHANG, F. Quality characteristics and antioxidant activities of goat milk yogurt with added jujube pulp. **Food Chemistry**, v.277, p. 238–245, 2019.

FITZGERALD, R.J.; MURRAY, B.A. Bioactive peptides and lactic fermentations. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, p. 118–125, 2006.

FLORES, E. E. E.; CARDOSO, F.D.; SIQUEIRA, L.B.; RICARDI, N.C.; COSTA, T.H.; RODRIGUES, R.C.; KLEIN, M.P.; HERTZ, P.F. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. **Elsevier, Elsevier Ltd**, v.1, p. 1359-5113, 2019.

GANTNER, V.; MIJIĆ, P.; BABAN, M.; ZORAN, Š.; ALKA T. The overall and fat composition of milk of various species. **Mljekarstvo**, v. 65, p. 223–31, 2015.

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

GARCÍA-PÉREZ, F.J.; LARIO, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS, E.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; SENDRA, E. Effect of orange fiber addition on yogurt color during fermentation and cold storage. **Color Research & Application**, v.30, n.6, p. 457–463, 2005.

GENNARI, A.; MOBAYED, F. H.; VOLPATO, G. V. SOUZA, C. F. V. Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: A potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 303-310, 2018.

GIBSON, G.R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M.E.; PRESCOTT, S.L.; REIMER, R.A.; SALMINEN, S.J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K.S.; CANI, P.D.; VERBEKE, K.; REID, G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**, v. 14, p. 491-502, 2017.

GIROUX, H. J.; VEILLETTE, N.; BRITTEN, M. Use of denatured whey protein in the production of artisanal cheeses from cow, goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 161, p. 34-42, 2018.

GOMES DA CRUZ, A.; BURITI, F.C.A.; BATISTA DE SOUZA, C.H.; FONSECA FARIA, J.A.; ISAY SAAD, S.M. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n.8, p. 344–354, 2009.

GONZÁLEZ-MUÑOZ, A.; QUESILLE-VILLALOBOS, A.M.; FUENTEALBA, C.; SHETTY, K.; GÁLVEZ RANILLA, L. Potential of Chilean native corn (*Zea mays* L.). Accessions as natural sources of phenolic antioxidants and in vitro bioactivity for hyperglycemia and hypertension management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.46, p. 10995-11007, 2013.

GOSLING, A.; STEVENS, G.W.; BARBER, A.R.; KENTISH, S.E.; GRAS, S.L. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, p. 307–318, 2010.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 2008.

GUERRERO, C.; ABURTO, C.; SÚAREZ, S.; VERA, C.; ILLANES, A. Improvements in the production of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase crosslinked aggregates and their use in repeated-batch synthesis of lactulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 452–462, 2020.

- GUERRERO, C.; VERA, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Repeated-batch operation for the synthesis of lactulose with b-galactosidase immobilized by aggregation and crosslinking. **Bioresource Technology**, n.190, p. 122–131, 2015.
- GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Synthesis of lactulose in batch and repeated batch operation with immobilized b-galactosidase in different agarose functionalized supports. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 56–66, 2017.
- GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 53-63, 2017a.
- GUERRERO, C.; VERA, C.; PLOU, F.; ILLANES, A. Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial β -galactosidases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 206–212, 2011.
- GUETOUACHE, M.; GUESSAS, B.; MEDJEKAL, S. Composition and nutritional value of raw milk. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research-IBSPR**, v. 2, n. 10, p. 115 – 122, 2014.
- GUIMARÃES, J.T.; BALTHAZAR, C.F.; SILVA, R.; ROCHA, R.S.; GRAC, J.S.; ESMERINO, E.A.; SILVA, M.C.; SANT'ANA, A.S.; DUARTE, M.C.K.H.; FREITAS, M.Q.; CRUZ, A.G. Impact of probiotics and prebiotics on food texture. **Current Opinion in Food Science**, v. 33, p. 38–44, 2020.
- HAENLEIN, G.F.W.; WENDORFF, W.L. **Sheep Milk**. In: Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals (Editor: Park, Y.W., Haenlein, G.F.W.), Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. p. 137-194, 2006.
- HAFEEZ, Z.; DARY-MOUROT, A.; MICLO, L.; CAKIR-KIEFER, C.; ROUX, E.; PERRIN, C. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. **Food Research International**, n. 63, p. 71–80, 2014.
- HAYES, M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 435–449, 2007.
- HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.8, n.1, p. 63, 2008.
- HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Impact of in vitro gastro-pancreatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antioxidant activity in cinnamon-fortified yogurt. **LWT**, v. 89, p. 164-170, 2018.
- HETTIARACHCHY, N.S.; FELIZ, D.J.; EDWARDS, J.S; HORAX, R. The use of immobilized enzymes to improve functionality. **Proteins in Food Processing**, p. 569-597, 2018.

KELLY, A.L.; LEITNER, G.; MERIN, U. Milk quality and udder health. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 2° ed., p. 894-901, 2011.

HEMAVATHI, A.B.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Membrane processing for purification and concentration of β -glycosidases of Barley (*Hordeum vulgare*). **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 282–290, 2011.

HUA, X.; YANG, R.; SHEN, Q.; YE, F.; ZHANG, W.; ZHAO, W. Production of 1-lactulose and lactulose using commercial b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in the presence of fructose. **Food Chemistry**, n.137, p. 1–7, 2013.

HUA, X.; YANG, R.; ZHANG, W.; FEI, Y.; JUM, Z.; JIANG, B. Dual-enzymatic synthesis of lactulose in organic-aqueous two-phase media. **Food Research International**, n. 43, p. 716–722, 2010.

ILIČIĆ, M.D.; MILANOVIĆ, S.D.; CARIĆ, M.Đ.; VUKIĆ, V.R.; KANURIĆ, K.G.; RANOGAJEC, M.I.; HRNJEZ, D.V. The Effect of Transglutaminase on Rheology and Texture of Fermented Milk Products. **Journal of Texture Studies**, v. 44, n.2, p.160–168, 2013.

ILLANES, A.; WILSON, L.; VERA, C. Chapter 16: Technical Biocatalysis. In: WILLIAMS, G.; HALL, M. *Modern Biocatalysis: Advances Towards Synthetic Biological Systems*. Publisher: **Royal Society of Chemistry**, 2018

ILLANES, A.; WILSON, L.; CABALLERO, E.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Crosslinked penicillin acylase aggregates for synthesis of b-lactam antibiotics in organic medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.133, p. 189–202, 2006.

ISO 4832. Microbiologia de alimentos e rações para animais - Método horizontal para a enumeração de coliformes - Técnica de contagem de colônias, 2006.

ISO 7889. Método para a enumeração de micro-organismos característicos em iogurte por meio da técnica de contagem de colônias a 37°C, 2003.

JÄKÄLÄ, P.; VAPAATALO, H. Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 1, p. 251–272, 2010.

JERVIS, S.M.P.; GERARD, P.; DRAKE, S.; LOPETCHARAT, K.; DRAKE M.A. The perception of creaminess in sour cream. **Journal of Sensory Studies**, v. 29, p. 248-257, 2014.

KALYANKAR, S. D.; KHEDKAR, C. D.; PATIL, A. M.; DEOSARKAR, S. S. **Milk: Sources and Composition**. Encyclopedia of Food and Health. Kidlington: Academic Press, p. 741–747, 2016.

KALYANKAR, S.D.; KHEDKAR, C.D.; PATIL, A.M.; DEOSARKAR, S.S. **Fermented foods: fermented milks**. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P.M.; TOLDRÁ, F. Encyclopedia of food and health. Kidlington: Academic Press, p. 741-747, 2016a.

KAMAL-ELDIN, A., ALHAMMADI, A., GHARSALLAOUI, A., HAMED, F., & GHNIMI, S. Physico-chemical, rheological and microstructural properties of yoghurts produced from mixtures of camel and bovine milk. **NFS Journal**, v. 19, p. 26–33, 2020.

KAMINARIDES, S.; STAMOU, P.; MASSOURAS, T. Comparison of the characteristics of set type yoghurt made from ovine milk of different fat content. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 9, p. 1019–1028, 2007.

KNAKIEWICZ, L.; BECKER, A.F.; CAVALHEIRO, D.; RIGO, E. Avaliação cinética do processo fermentativo em leite com diferentes teores de gordura e lactose. 29º SIC UDESC – Seminário de Iniciação Científica Universidade do Estado de Santa Catarina, v. 1, p. 1-2, 2019.

KANWAL, R.; AHMED, T.; MIRZA, B. Comparative analysis of quality of milk collected from buffalo cow goat and sheep of Rawalpindi /Islamabadregion in Pakistan. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.3, p. 300-305, 2004.

KARNOPP, A.R.; OLIVEIRA, K.G.; ANDRADE, E.F.; POSTINGHER, B.M.; GRANATO, D. Optimization of an organic yogurt based on sensorial, nutritional, and functional perspectives. **Food Chemistry**, v. 233, p. 401–411, 2017.

KEOGH, M. K.; O'KENNEDY, B. T. Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. **Journal of Food Science**, v.63, n.1, p.108-112, 1998.

KIM, Y.S.; PARK, C.S.; OH, D.K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable - galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 903–908, 2006.

KLEIN, M.P.; FALLAVENA, L.P.; SCHÖFFER, J. DA N.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C.; NINOW, J.L.; HERTZ, P.F. High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and synthesis of galactooligosaccharides. **Polímeros de carboidratos**, v.95, n.1, p. 465-470, 2013.

KLEIN, M.P.; HACKENHAAR, C.R.; LORENZONI, A.S.G.; RODRIGUES, R.C.; COSTA, T. M.H.; NINOW, J.L.; HERTZ, P.F. “Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and -d galactosidase immobilization”. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 184–190, 2016.

KLJAJEVIC, N.V.; JOVANOVIC, S.T.; MILORADOVIC, Z.N.; MACEJ, O.D.; VUCIC, T.R.; ZDRAVKOVIC, I.R. Influence of the frozen storage period on the coagulation properties of caprine milk. **International Dairy Journal**, v. 58, p. 36 -38, 2016.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945-960, 2006.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1297-1308, 2003.

LAIHO, S.; WILLIAMS, R.P.W.; POELMAN, A.; APPELQVIST, I.; LOGAN, A. Effect of whey protein phase volume on the tribology, rheology and sensory properties of fat-free stirred yoghurts. **Food Hydrocoll**, v. 67, p. 166–177, 2017.

LAMBERS, T.T.; VAN DEN BOSH, W.G.; DE JONG, S. Fast and slow proteins: Modulations of the gastric behavior of whey and casein in vitro. **Food Digestion**, v. 4, p. 1-6, 2013.

LAMOTHE, S.; AZIMY, L.; BAZINET, N.; COUILLARD, C.; BRITTEN, M. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. **Food & Function**, v. 5, p. 2621–2631, 2014.

LEE, S.P.; KIM, D.S.; WATKINS, S.; BATT, C.A. Reducing whey syneresis in yogurt by addition of a thermolabile variant of β -lactoglobulin. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 309-313, 1994.

LEE, W. J.; LUCEY, J. A. Formation and physical properties of yogurt. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 23, p.1127–1136, 2010.

LEE, W.J.; LUCEY, J.A. Structure and physical properties of yogurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n.10, p. 3153-3164, 2004.

LEIDENS, N. **Concentração das proteínas do soro de leite de ovelha por ultrafiltração e determinação das propriedades funcionais dos concentrados proteicos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2013.

LI, W.; XIANG, X.; TANG, S.; HU, B.; TIAN, L.; SUN, Y.; YE, H.; ZENG, X. Effective enzymatic synthesis of lactosucrose and its analogues by β -galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3927–3933, 2009.

LI, Z.; YANG, Z.; OTTER, D.; REHM, C.; LI, N.; ZHOU, P.; HEMAR, Y. Rheological and structural properties of coagulated milks reconstituted in D2O: Comparison between rennet and a tamarillo enzyme (tamarillin). **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 170–178, 2018.

LIMA, P.C. **Imobilização da enzima β -Galactosidase em suporte de quitosana ativada com genipina para aplicação em lácteos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, 2020.

LORENZEN, P.C.; BREITER, J.; CLAWIN-RÄDECKER, I.; DAU, A. A novel bienzymatic system for lactose conversion. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1396–1403, 2013.

LOVEDAY, S.M.; SARKAR, A.; SING, H. Innovative yoghurts: novel processing technologies for improving acid milk gel texture. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 5-20, 2013.

MAITY, S.; AMBATIPUDI, K. Quantitative proteomics of milk whey reveals breed and season specific variation in protein abundance in Holstein Friesian cow and Murrah buffalo. **Research in Veterinary Science**, v. 125, p. 244–252, 2019.

MATHER, I. H.; MASEDUNSKAS, A.; CHEN, Y.; WEIGERT, R. Symposium review: Intravital imaging of the lactating mammary gland in live mice reveals novel aspects of milk lipid secretion. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 2760–2782, 2019.

MATUMOTO-PINTRO, P.T.; RABIEY, L.; ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M. Use of modified whey protein in yogurt formulations. **International Dairy Journal**, v. 21, n.1, p. 21–26, 2011.

MAYER, J.; KRANZ, B.; FISCHER, L. Continuous production of lactulose by immobilized thermostable β -glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 145, n.4, p. 387-393, 2010.

MERLIN JUNIOR, I. A.; COSTA, R. G.; COSTA, L. G.; LUDOVICO, A.; REGO, F. C. A.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Ovinocultura leiteira no Brasil: aspectos e fatores relacionados à composição, ao consumo e à legislação. In: **Colloquium Agrariae**, v. 11, p. 38-53, 2015.

MICHALSKI, M.C.; LECONTE, N.; BRIARD-BION. V.; FAUQUANT, J.; MAUBOIS, J.L.; GOUDEDRANCHE, H. Microfiltration of raw whole milk to select fractions with different fat globule size distributions: process optimization and analysis. **J Dairy Sci**, v. 89, p. 3778–3790, 2006.

MÍGUEZ, N.; GIMENO-PÉREZ, M.; FERNÁNDEZ-POLO, D.; CERVANTES, F.; BALLESTEROS, A.; FERNÁNDEZ-LOBATO, M.; RIBEIRO, M.; PLOU, F. Immobilization of the β -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* by Entrapment in Polyvinyl Alcohol and Its Application to Neo-Fructo oligosaccharides Production. **Catalysts**, v. 8, n. 5, p. 201, 2018.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MILLS, S.; ROSS, R.P.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 377- 401, 2011.

MIOR, J.; NOVELLO, Z.; DINON, A.Z. Caracterização de iogurte de leite de ovelha in natura e saborizado com mirtilo (*Vaccinium myrtillus*). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 10, n. 1, p. 2004-2022, 2016.

- MOATSOU, G.; SAKKAS, L. Components of sheep's milk: focus on nutritional benefits and biofunctional potential. **Small Ruminant Research**, v. 180, p. 86–99, 2019.
- MOHAMMADI-GOURAJI, E.; SOLEIMANIAN-SAD, S.; GHIACI, M. Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage. **LWT**, v. 102, p. 230-236, 2019.
- MONTGOMERY, E. M.; HUDSON, C. S. Relations between rotating power and structure in the sugar group. Synthesis of new disaccharide ketoses from lactose. **Journal of the American Chemical Society**, v. 52, n. 5, p. 2101-2111, 1930.
- MORLOCK, G. E.; MORLOCK, L. P.; LEMO, C. Streamlined analysis of lactose free dairy products. **Journal of Chromatography**, v. 1324, p. 215-223, 2014.
- MOSCHOPOULOU, E.; SAKKAS, L.; ZOIDOU, E.; THEODOROU, G.; SGOURIDOU, E.; KALATHAKI, C.; LIARAKOU, A.; CHATZIGEORGIOU, A.; POLITIS, I.; MOATSOU, G. Effect of milk kind and storage on the biochemical, textural and biofunctional characteristics of set-type yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 77, p. 47-55, 2018.
- MOUSSIER, M.; HUC-MATHIS, D.; MICHON, C.; BOSC, V. Rational design of a versatile lab-scale stirred milk gel using a reverse engineering logic based on microstructure and textural properties. **Journal of Food Engineering**, v. 249, p. 1–8, 2019.
- MUDALIAR, M.; TASSI, R.; THOMAS, F.C.; MCNEILLY, T.N.; WEIDT, S.K.; MCLAUGHLIN, M.; WILSON, D.; BURCHMORE, R.; HERZYK, P.; ECKERSALL, P.D.; ZADOKS, R.N. Mastitomics, the integrated omics of bovine milk in an experimental model of *Streptococcus uberis* mastitis: 2. Label-free relative quantitative proteomics. **Molecular BioSystems**, v. 12, p. 2748–61, 2016.
- MUDGIL, P., KAMAL, H., YUEN, G.C.; MAQSOOD, S. Characterization and identification of new antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 259, p. 46–54, 2018.
- MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; MCMAHON, D. Milk and Dairy Products in Human Nutrition. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, Rome, 2013.
- MUIR, D.D. Reviews of the progress of Dairy Science: Frozen concentrated milk. **Journal of Dairy Research**, v. 51, n. 4, p. 649-664, 1984.
- MUKHOPADHYA, A.; SWEENEY, T. Proteínas do leite: processamento de frações bioativas e efeitos na saúde intestinal. Proteínas do leite - da estrutura às propriedades biológicas e aspectos de saúde. 2016.
- MUNIANDY, P.; SHORIB, A.B.; BABA, A.S. Influence of green, white and black tea addition on the antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 8, p. 1-8, 2016.

NATH, A.; VERASZTÓ, B.; BASAK, S.; KORIS, A.; KOVÁCS, Z.; VATAI, G. Synthesis of Lactose-Derived Nutraceuticals from Dairy Waste Whey – a Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 1, p. 16-48, 2016.

NESPOLO, C. R.; BIANCHI, A. E.; QUEIRÓS, A. A.; FATINATTI, L. H. E. A produção de leite ovino e seus derivados no oeste catarinense: uma alternativa para o produtor e para o consumidor. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 4º; 2012. Gramado. **Anais...** Gramado: FAURGS, 2012.

NGUYEN, H.T.H.; AFSAR, S.; DAY, L. Differences in the microstructure and rheological properties of low-fat yoghurts from goat, sheep and cow milk. **Food Research International**, n. 108, p. 423-429, 2018.

NGUYEN, H.T.H.; ONG, L.; LEFEVRE, C.; KENTISH, S.E.; GRAS, S.L. Themicrostructure and physicochemical properties of probiotic buffalo yoghurt during fermentation and storage: a comparison with bovine yoghurt. **Food Bioprocess Technol.**, v. 7, p. 937–953, 2014.

NOBLE, M.S.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; COOK, J.B.; BLECK, G.T.; HURLEY, W.L.; WHEELER, M.B. Lactational performance of first-parity transgenic gilts expressing bovine alpha-lactalbumin in their milk. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 4, p. 1090-1096, 2002.

NONGONIERMA, A.B.; FITZGERALD, R.J. Milk proteins as a source of tryptophan containing bioactive peptides. **Food and Function**, v. 6, p. 2115–2127, 2015.

NOOSHKAM, M., MADADLOU, A. Maillard conjugation of lactulose with potentially bioactive peptides. **Food Chemistry**, v. 192, p. 831–836, 2016.

NOOSHKAM, M.; BABAZADEH, A.; JOOYANDEH, H. Lactulose: Properties, techno functional food applications, and food grade delivery system. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 23-34, 2018.

NORNBERG, M.L.B.F.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotóxicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n.2, p. 157-163, 2009.

OLIVEIRA, D.L.; WILBEY, R.A.; GRANDISON, A.S.; ROSEIRO, L.B. Milk oligosaccharides: a review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68. n.3, p. 305-321, 2015.

OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S. Lactulose: production, purification and potential applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 940-948, 2011.

- PANESAR, P.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential applications of immobilized β galactosidase in food processing industries. **Enzyme Research**, v. 2010, 2010.
- PARK, Y.W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminants Research**, v. 68, p. 88 – 113, 2007.
- PAZZOLLA, M.; DETTORI, M.L.; MANCA, F.; NOCE, A.; PIRAS, G.; PIRA, E.; PUGGIONI, O.; VACCA, G.M. The effect of long -term freezing on renneting properties of sarda sheep milk. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 78, n. 3, p. 275 -279, 2013.
- PEIXOTO, A.L.; DA SILVA, M.A.P.; DE MOURA, L.C.; SOUZA, D.G.; PLÁCIDO, G.R.; CALIARI, M. Influência do tempo de estocagem do leite nas características físico-químicas do iogurte natural. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.18, n.4, p.395-403, 2016.
- PELAES VITAL, A. C., P. A. GOTO, L. N. HANAI, S. M. GOMES-DA-COSTA, B. A. DE ABREU FILHO, C. V. NAKAMURA, AND P. T. MATUMOTO-PINTRO. Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p.1028–1035, 2015.
- PELLEGRINI, L.G.; CASSANEGO, D.B.; GUSSO, A.P.; MATTANNA, P.; SILVA, S.V. Características físico-químicas de leite bovino, caprino e ovino. XV Simpósio Paranaense de Ovinocultura. **Synergismus scyentifica UTFPR**, Pato Branco, 07, 1, 2012.
- PEPE, G.; TENORE, G.C.; MASTROCINQUE, R.; STUSIO, P.; CAMPIGLIA, P. Potential anticarcinogenic peptides from bovine milk. **Journal of Amino Acids**, 939804, 2013.
- PEREIRA, M.C.S.; BRUMANO, S.P.; KAMIYAMA, C.M.; PEREIRA, J.P.F.; RODARTE, M.P.; PINTO, M.P.O. Low-lactose dairy: a necessity for people with lactose maldigestion and a niche market. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, n. 389, n.67, p. 57-65, 2012.
- PHILIPPI, S. T. Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição. Barueri: **Manole**, 2008.
- PRASANNA, P.H.P.; GRANDISON, A.S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Microbiological, chemical and rheological properties of low fat set yoghurt produced with exopoly saccharide (EPS) producing *Bifidobacterium* strains. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 15-22, 2013.
- PRENOSIL, J.E.; STUKER E.; BOURNE J.R. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of art. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 9, p. 1019-1025, 1987.
- PULINA, G.; WILAN, J.; LAVÍN, P.; THEODORIDIS, A.; MORIN, E.; CAPOTE, J.; THOMAS, D.L.; FRANCESCONI, A.D.H.; CAJA, G. Current production trends, farm

structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-15, 2018.

RAKHESH, N.; FELLOWS, C.M.; SISSONS, M. Evaluation of the technological and sensory properties of durum wheat spaghetti enriched with different dietary fibres. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 2–11, 2015.

RANADHEERA, C. S.; NAUMOVSKI, N.; AJLOUNI, S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 109-114, 2018.

RENTSCHLER, E.; SCHUH, K.; KREWINKEL, M.; BAUR, C.; CLAABEN, W.; MEYER, S.; KUSCHEL, B.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Enzymatic production of lactulose and epilactose in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 1–9, 2015.

RETTEDAL, E.A.; ALTERMANN, E.; ROY, N.C.; DALZIEL, J.E. The effects of unfermented and fermented cow and sheep milk on the gut microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p.1-12, 2019.

REVERS, L.M.; DANIELLI, A.J.; ILTCHENCO, S.; ZENI, J.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J. Obtenção e caracterização de iogurtes elaborados com leites de ovelha e de vaca. **Revista Ceres**, v. 63, n. 6, p. 747-753, 2016.

REVILLA, I.; ESCUREDO, O.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I.; PALACIOS, C. Fatty acids and fat-soluble vitamins in ewe's milk predicted by near infrared reflectance spectroscopy. Determination of seasonality. **Food Chemistry**, v. 214, p. 468-77, 2017.

REVISTA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS. Embaré lança leite zero lactose Camponesa. **Revista Indústria de Laticínios**, n. 109, 2014.

RICARDI, N.C.; DE MENEZES, E.W.; VALMIR BENVENUTTI, E.; DA NATIVIDADE SCHÖFFER, J.; HACKENHAAR, C.R.; HERTZ, P.F.; COSTA, T.M.H. Highly stable novel silica/chitosan support for β -galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, v.246, p.343–350, 2018.

RIZZELLO, C. G.; TAGLIAZUCCHI, D.; BABINI, E.; RUTELLA, G. S.; TANEYO SAA, D. L.; GIANOTTI, A. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 549–569, 2016.

RODRIGUES, R.C.; ORTIZ, C; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2013.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Food Science and Technology**, v.27, n. 1, p. 53–60, 2007.

ROHENKOHL, J. E.; CORRÊA, G. F.; AZAMBUJA, D. F.; FERREIRA, F. R. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Revista Indicadores Econômicos**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 97-114, 2011.

ROZENBERG, S.; BODY, J.J.; BRUYÈRE, O.; BERGMANN, P.; BRANDI, M.L.; COOPER, C.; DEVOGELAER, J.P.; GIELEN, E.; GOEMAERE, S.; KAUFMAN, J.M.; RIZZOLI, R.; REGINSTER, J.Y. Effects of Dairy Products Consumption on Health: Benefits and Beliefs-A Commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. **Calcif Tissue Int.**, v. 98, n. 1, p. 1-17, 2016.

RUEDA, N.; SANTOS, C.S.; RODRIGUEZ, M.D.; ALBUQUERQUE, T.L.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads : A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 128, p. 10–18, 2016.

RUIZ-MATUTE, A.I.; CORZO-MARTÍNEZ, M.; MONTILLA, A.; OLANO, A.; COPOVI, P.; CORZO, N. Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, p. 164–169, 2012.

RUSZKOWSKI, J.; WITKOWSKI, J. Lactulose: Patient-and dose-dependent prebiotic properties in humans. **Anaerobe**, v. 59, p.100–106, 2019.

SALAÜN, F.; MIETTON, B.; GAUCHERON, F. Buffering capacity of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 95–109, 2005.

SAMOYLENKO, V. A.; YAKSHINA, T. V.; OLEJNIKOV, R. R.; KOSTENKO, Yu. G.; SPICYNA, D. N.; SOLODOVNIKOVA, G. I.; KUZNETSOVA, G. A. Development of Pilot-Scale Production of Dry Bacterial Starter Cultures for Intensive Manufacture of High Quality Meat Products. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 191-194, 1997.

SAQIB, S.; AKRAM, A.; HALIM, S.A.; TASSADUQ, R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v.7, n.1, p. 79-86, 2017.

SCHMIDT, C.M.; NEDELE, A.K.; HINRICHS, J. Enzymatic generation of lactulose in sweet and acid whey: Feasibility study for the scale up towards robust processing. **Food and Bioproducts Processing**, p.1 1 9, 329–336, 2020.

SEKI, N.; SAITO, H. Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 110-115, 2012.

SELVAGGI, M.; LAUDADIO, V.; DARIO, C.; TUFARELLI, V. Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability. **Molecular Biology Reports**, v.41, n.2, p.1035–1048, 2014.

SERAFEIMIDOU, A.; ZLATANOS, S.; KRITIKOS, G.; TOURIANIS, A. Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage

of yogurt made of cow and sheep milk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 1, p.24–30, 2013.

SHAKOOR, S.; SINGH, G.; SINGH, M. Glucose Isomerase Production and Its Application In Various Field. **International Journal of Scientific Research in Science and Technology**, v. 4, n. 5, p. 690-699, 2018.

SHENDURSE, A.M.; KHEDKAR, C.D. **Lactose**. In: CABALLERO, B.; FINGLAS P.; TOLDRA, F. Encyclopedia of Food and Health. San Diego: Elsevier, p. 509-516, 2016.

SHIBY, V.K.; MISHRA, H.N. Fermented milks and milk products as functional foods—a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 53, p. 482–496, 2013.

SILVA, A. C. **Desenvolvimento de doce de leite sem adição de sacarose e sem lactose. Desafios tecnológicos na produção de produtos com baixo teor de lactose**. 2016. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

SITANGGANG, A.B.; DREWS, A.; KRAUME, M. Continuous synthesis of lactulose in an enzymatic membrane reactor reduces lactulose secondary hydrolysis. **Bioresource Technology**, n.167, p. 108–115, 2014.

SITANGGANG, A.B.; DREWS, A.; KRAUME, M. Recent advances on prebiotic lactulose production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 9, p.154-164, 2016.

SIVIERI, K.; FREIRE, F.C.; LOPES, N.P.; SHIRAISHI, C.T.D.; PIRES, A.C.M.S.; LIMA, A.C.D.; ZAVARIZI, A.C.M.; SGARBOSA, L.; BIANCHI, F. Synbiotic Yogurts and the Elderly. Chapter 14 – Yogurt in Health and Disease Prevention, 259–271, 2017.

SKRYPLONEK, K.; HENRIQUES, M.; GOMES, D.; VIEGAS, J.; FONSECA, C.; PEREIRA, C.; DMYTRÓW, I.; MITUNIEWICZ-MAŁEK, A. Características do frozen yogurt sem lactose com κ -carragenina e amido de milho como estabilizantes. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 9, 2019.

SONG, Y.S.; LEE, H.U.; PARK, C.; KIM, S.W. Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized β -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 136, p. 689–694, 2013.

SONG, Y. S.; LEE, H.-U.; PARK, C.; KIM, S.-W. Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized β -galactosidase and glucose isomerase. **Carbohydrate Research**, v. 369, p.1-5, 2013a.

SULTAN, S.; HUMA, N.; BUTT, M.S.; SHAHID, M. Antihypertensive and Antioxidative Potential of Water Soluble Peptide Fraction from Different Yoghurts. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 3, p. 1-7, 2016.

TAGLIAZUCCHI, D.; HELAL, A.; VERZELLONI, E.; CONTE, A. The type and concentration of milk increase the in vitro bioaccessibility of coffee chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 11056–11064, 2012.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: Science and technology**. Boca Raton: CRC Press. Woodhead Publishing. Cambridge: (Chapter 2.9), 2007.

TAMIME, A.Y.; BRUCE, J.; MUIR, D.D. **Ovine milk: 4. Seasonal changes in microbiological quality of raw milk and yoghurt**. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 1993.

TANG, L.; LI, Z.; DONG, X.; YANG, R.; ZHANG, J.; MAO, Z. Lactulose biosynthesis by β galactosidase from a newly isolated *Arthrobacter* sp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 471–476, 2011.

THORNING, T.K.; BERTRAM, H.C.; BONJOUR, J.P.; GROOT, L.; DUPONT, D.; FEENEY, G.; GIVENS, I. Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: Current evidence and knowledge gaps. *The American Journal of Clinical Nutrition*, p. 1033-1045, 2017.

TORRES, D.P.; GONCALVES, M.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Galactooligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438–454, 2010.

TORRES, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilized trienzymatic system with enhanced stabilization for the biotransformation of lactose. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

TREVISAN, A.P. **Influência de diferentes concentrações de enzima lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, 2008.

TRIBST, A.A.L.; FALCADE, L.T.P.; CARVALHO, N.S.; CRISTIANINI, M.; DE CASTRO LEITE JÚNIOR, B.R.; DE OLIVEIRA, M.M. Using physical processes to improve physicochemical and structural characteristics of fresh and frozen/thawed sheep milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 102247, 2019.

TRIBST, A.A.L.; FALCADE, L.T.P.; RIBEIRO, L.R.; LEITE JÚNIOR, B.R.D.C.; OLIVEIRA, M.M.D. Impact of extended refrigerated storage and freezing/thawing storage combination on physicochemical and microstructural characteristics of raw whole and skimmed sheep milk. **International Dairy Journal**, v. 94, p. 29 -37, 2019a.

TRIBST, A.A.L.; RIBEIRO, L.R.; LEITE JUNIOR, B.R.D.C.; DE OLIVEIRA, M.M.; CRISTIANINI, M. Fermentation profile and characteristics of yoghurt manufactured from frozen sheep milk. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 36 -45, 2018.

UNAL, G.; AKALIN, S. Influence of fortification with sodium-calcium caseinate and whey protein concentrate on microbiological, textural and sensory properties of set-type yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, p. 264–272, 2013.

URRUTIA, P.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; ALLESTEROS, A.O.; WILSON, L.; ILLANES, A.; PLOU, F.J. Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with b-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1081–1087, 2013.

VAHERI, M.; KAUPPINEN, V. The formation of lactulose (4-O- β -galactopyranosylfructose) by β -galactosidase. **Acta Pharm Fennicae**, v. 87, p. 75-83, 1978.

VERA, C.; GUERRERO, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Synthesis of galactooligosaccharides by b-galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 88–194, 2012.

VIANNA, F. S.; CANTO, A. C. V. C. S.; DA COSTA-LIMA, B. R. C.; SALIM, A. P. A. A.; COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; SILVA, A. C. O. Development of new probiotic yoghurt with a mixture of cow and sheep milk: effects on physicochemical, textural and sensory analysis. **Small Ruminant Research**, v. 149, p. 154–162, 2017.

WAHBA, M.I. Processed gellan gum beads as covalent immobilization carriers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 270–278, 2018.

WALTER, L.; SHRESTHA, P.; FRY, R.; LEURY, B.J.; LOGAN, A. Lipid metabolic differences in cows producing small or large milk fat globules: Fatty acid origin and degree of saturation. **Journal of Dairy Science**, 2020.

WANG, H.; YANG, R.; HUA, X.; ZHAO, W.; ZHANG, W. Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 6167– 6180, 2013.

WANG, L.; CLARDY, A.; HUI, D.; GAO, A.; WU, Y. Antioxidant and antidiabetic properties of Chinese and Indian bitter melon (*Momordica charantia L.*). **Food Bioscience**, v. 29, p. 73-80, 2019.

WEBB, D.; DONOVAN, S.M.; MEYDANI, S.N. The role of Yogurt in improving the quality of the American diet and meeting dietary guidelines. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 3, p. 180-189, 2014.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probiotics and fermented dairy foods: a review. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.

WENDORFF, W.L.; KALIT, S. **Processing of sheep milk**. In: PARK, Y.W.; HAENLEIN, G.F.W.; WENDORFF, W.L. Handbook of Milk of Non -Bovine Mammals, 2nd Edition, New Jersey: John Wiley & Sons, USA, Chapter 3.2, 210 -221, 2017.

- WIDYASTUTI, Y.; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 435–442, 2014.
- WIJESINHA-BETTONI, R.; BURLINGAME, B.A. Milk and Dairy Products in Human Nutrition. In: Chapter 3: Milk and dairy product composition. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, Rome, p. 41 – 90, 2013.
- WORTMANN, A.C.; SIMON, D.; DA SILVEIRA, T.R. Análise molecular da hipolactasia primária do tipo adulto: uma nova visão do diagnóstico de um problema antigo e frequente. **Revista da AMRIGS**, v. 57, n. 4, p. 335-343, 2013.
- WU, L.; XU, C.; LI, S.; LIANG, J.; XU, H.; XU, Z. Efficient production of lactulose from whey powder by cellobiose 2-epimerase in an enzymatic membrane reactor. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 305–312, 2017.
- WU, R.Y.; JOHNSON-HENRY, K.C.; SHERMAN, P.M. Prebióticos e oligossacarídeos do leite humano. **Módulo de Referência em Ciências Biomédicas**, 2 ed., p. 278 – 286, 2019.
- ZADOW, J.G. Economic considerations related to the production of lactose and lactose by products. In: Lactose Hydrolysis, IDF Dulletin 289. **International Dairy Federation**, Brusseis, p. 10-15, 1993.
- ZAMBERLIN, S.; SAMARŽIJA, D. The effect of non-standard heat treatment of sheep's milk on physico-chemical properties, sensory characteristics, and the bacterial viability of classical and probiotic yogurt. **Food Chemistry**, n. 225, p. 62– 68 2017.
- ZIEGLER, F. L. F.; SGARBIERI, V. C. Chemical-nutritional characterization of a whey protein isolate a bovine collagen hydrolysate and mixtures of the two products. **British Journal of Nutrition**, v. 22, n. 1, p.61-70, 2009.
- ZIMMER, F.C.; GOHARA, A.K.; SOUZA, A.H.P.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; RODRIGUES, A.C. Obtainment, quantification and use of lactulose as a functional food – a review. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 515-521, 2017.

APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR

FIGURA A1 – Curva de concentração de ácido gálico mg por 100 g de amostra para compostos fenólicos totais.

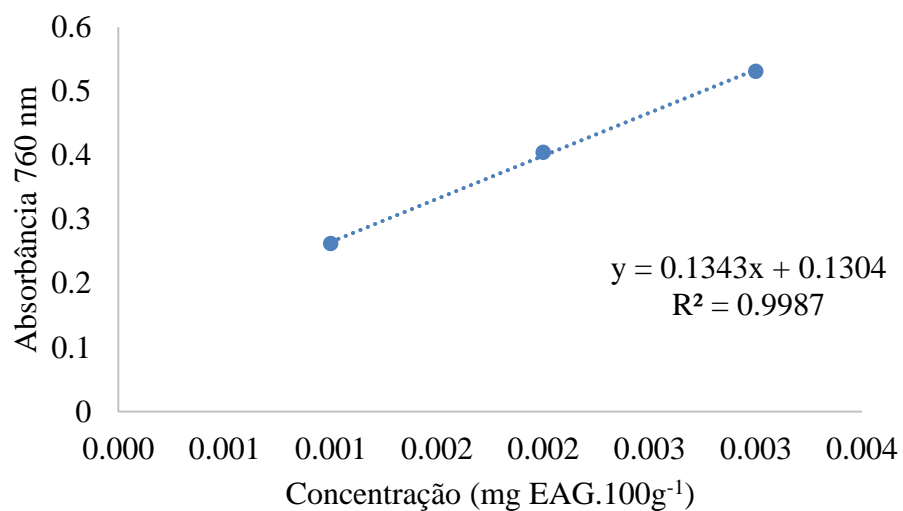


FIGURA A2 – Curva da concentração de trolox para atividade anti-inflamatória.

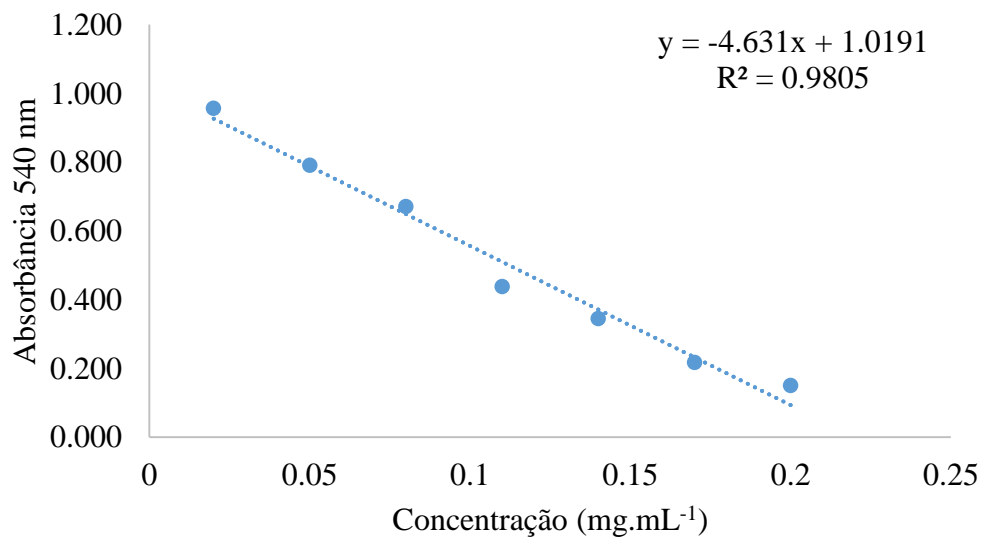


FIGURA A3 – Curva da concentração de trolox para atividade antioxidante - ABTS.

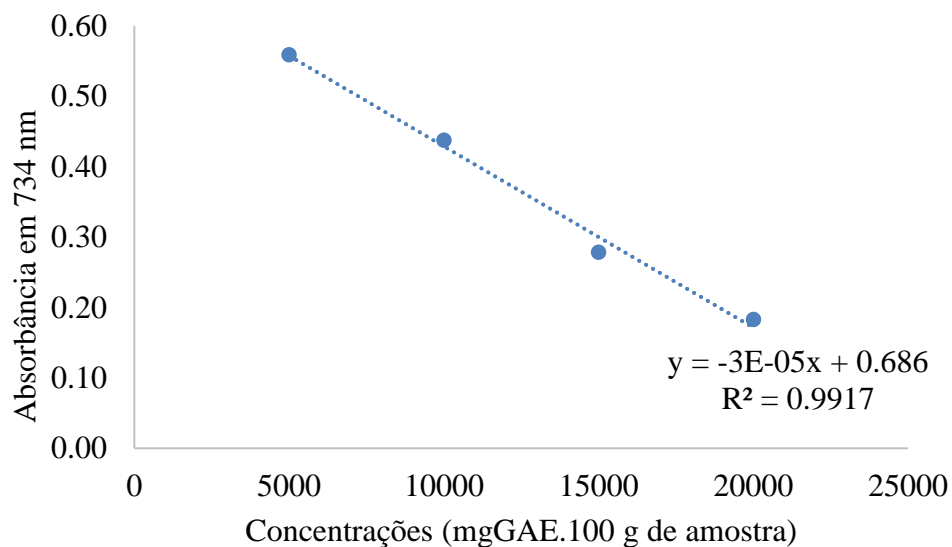
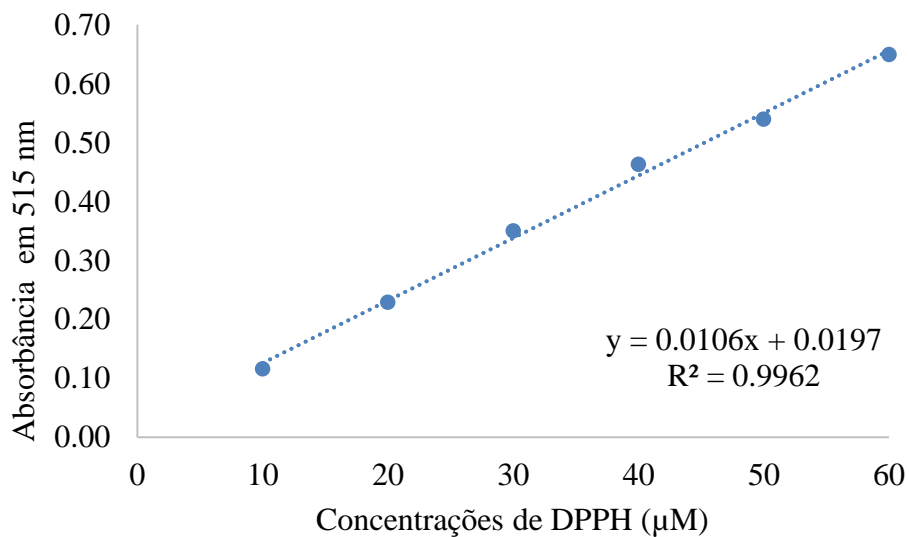


FIGURA A4 – Curva da concentração de reagente de DPPH para atividade antioxidante - DPPH.



APÊNDICE B – DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS NA SÍNTESE CONTROLADA DA LACTULOSE (4-O- β -D-galactopiranosil-D-frutose) EM LEITE PARA ELABORAÇÃO DE IOGURTE PREBIÓTICO

Por quê?

- ✓ A utilização de enzimas imobilizadas visa diminuir custos através de bioprocessos e sua reutilização, garantindo produtos lácteos com funções prebióticas através da síntese da lactulose em leite bovino e ovino com diferentes teores de gordura ou ainda leite reduzido de lactose.
- ✓ O leite é um meio onde é possível desenvolver prebióticos visto que possui glicose da hidrólise da lactose, onde juntamente a isomerização da galactose a frutose através da glicose isomerase são compatíveis na síntese da lactulose, no qual reduz a lactose inicial do leite.
- ✓ O iogurte é um produto consumido mundialmente pelos benefícios nutricionais que envolvem proteínas e minerais essenciais, além das propriedades prebióticas e prebióticas, e produtos zero lactose.

Quem já fez?

- ✓ Rentschler et al. 2015, investigaram a síntese da lactulose a partir de lactose pela celobiose 2-epimerase de *C. saccharolyticus* em 8°C.
- ✓ Guerrero et al. 2015, exploraram como a origem da enzima β – galactosidase determina seu potencial catalítico em relação à transgalactosilação e hidrólise.

Como fazer?

- ✓ Definir parâmetros da síntese da lactulose como temperatura, diferentes proporções de β -galactosidase/glicose isomerase em níveis que considerem o produto como prebiótico;
- ✓ Determinar o teor de lactulose e lactose;
- ✓ Caracterização do produto elaborado pelas análises de cor, textura, sinérese e compostos bioativos;

Hipóteses

- ✓ Os biocatalisadores (β – galactosidase e glicose isomerase) são uma alternativa na síntese da lactulose em leite para produção de iogurte com teor reduzido de lactose ou zero lactose?
- ✓ O teor de hidrólise de 60% é suficiente para produzir lactulose a um nível que o produto seja considerado prebiótico.

Respostas

- ✓ Otimização de parâmetros para bons resultados na síntese da lactulose, necessitando de menores concentrações de enzimas.
- ✓ O teor de gordura e o tipo de leite interfere nas características do produto fabricado bem como na síntese da lactulose.

