



"Processo para a preparação de uma solução isenta de germes de uma enzima que cinde a lactose e sua utilização"

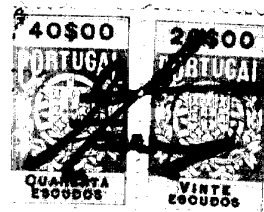
para que

GIST-BROCADES N.V. pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo para a preparação de uma solução de uma enzima que cinde a lactose, isenta de germes, por filtração esterilizadora depois da recuperação e filtração, de uma solução de enzima que cinde a lactose produzida por fermentação, mas antes da formação de produtos de degradação suficientes para entupir o filtro esterilizador.

Esta solução isenta de germes pode ser utilizada na preparação de leite e derivados de leite de baixo teor em lactose.



DESCRIÇÃO DO INVENTO

Este invento refere-se a um processo para a preparação de uma solução, isenta de germes, de uma enzima que cinde a lactose e à sua utilização na preparação de leite e derivados de leite de baixo teor em lactose.

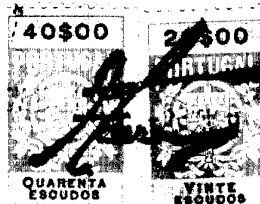
A lactose (açúcar do leite) é um diacárido presente nos laticínios e mais particularmente no leite, leite desnatado, natas e outros derivados do leite. Estes produtos contêm 4 a 5% de lactose. A lactose não absorvível é usualmente cindida, no corpo, dando origem aos monossacáridos absorvíveis, glucose e galactose. Esta cisão é geralmente produzida por um enzima natural, chamado β -galactosidase ou lactase, presente na parede do intestino do homem (e de outros mamíferos).

Em muitas partes do mundo, homens e animais sofrem da chamada intolerância à lactose, que é causada pela ausência total ou parcial, nos seus sistemas digestivos, da lactase necessária para a cisão dos produtos contendo lactose. Assim, a lactose ou não é cindida ou é insuficientemente cindida, em glucose e galactose que podem ser absorvidas: a lactose não absorvida causa então problemas intestinais.

O fenómeno da intolerância à lactose é conhecido há muitos anos. Por causa da sua constituição em aminoácidos, as proteínas do leite têm um grande valor alimentar. Têm sido feitas tentativas para a preparação de leite e derivados de leite pobres em lactose ou mesmo sem lactose, para pessoas com intolerância à lactose, adicionando lactase ao leite e seus derivados. Uma vantagem extra da adição de lactase reside no facto de os produtos tratados deste modo serem mais doces.

É possível adicionar a enzima e deixá-la reagir antes de se proceder à conservação do leite e dos seus derivados por pasteurização e esterilização. No entanto durante a conservação ocorre, a bem conhecida, reacção de Maillard e deteriora-se o sabor do leite e dos seus derivados.

Na especificação 1477087 da patente Britânica é descrito um processo para o tratamento de leite e seus derivados com uma enzima que cinde a lactose, no qual se adiciona a enzima ao leite, previamente pasteurizado ou esterilizado, precisamente antes do empacotamento, após o que o pacote é fechado. A desejada reacção, entre a enzima e a lactose presente, dá-se então no pacote fechado. Como a enzima é adicionada depois da pasteurização ou esterilização, nestas condições a reacção de Maillard não ocorre. É evidente, que a própria enzima tem que ser isenta de germes antes de se



adicionar ao leite esterilizado e que a adição ao leite e/ou produtos derivados tem que ser realizada em condições assépticas e com aparelhagem esterilizada.

No pedido de Patente Sueco 7800137, publicado é descrito um processo para a esterilização da lactose por radiação ou por tratamento químico p.e., com óxido de etileno. De acordo com a descrição, a enzima tanto pode ser esterilizada na forma dissolvida, em pacotes assépticos fechados, como na forma sólida. No último caso, a lactase esterilizada é então dissolvida num solvente previamente esterilizado. O recipiente, contendo a solução esterilizada de lactase, é ligado a um aparelho dosificador através do qual a solução de enzima esterilizada é adicionada ao leite esterilizado, que é então empacotado. Contudo, parece que ambos os métodos de esterilização envolvem uma grande perda de actividade da enzima lactase e que a esterilização necessita de muito tempo.

No jornal Voedingsmiddelentechnologie 13 (1980), 23, o método descrito na especificação 1477087 da Patente Britânica é mais ilustrativo. A lactase pobre em germes, geralmente fornecida à indústria de processamento de lacticínios numa solução aquosa, à qual são adicionados um ou mais agentes estabilizantes p.e., glicerol, é filtrada antes da utilização. A solução de enzima filtrada é bombeada através de um filtro esterilizador e injectada por um aparelho dosificador na linha de produção do leite previamente esterilizado, sendo então misturada com o leite. Finalmente a mistura é dividida e empacotada, sob condições assépticas, em pacotes uniformes.

Contudo, na prática, no sistema descrito, o filtro esterilizador entope frequentemente. O entupimento é geralmente devido à degradação das proteínas e polissacáridos (gomas), que podem ficar na solução de enzima, apesar da purificação. O fenómeno de degradação aumenta geralmente com o tempo que decorre até à utilização da enzima e pode ser favorecido por poder ser grande o tempo que medeia entre a produção da enzima, pelo fabricante da enzima, e a sua utilização pela indústria de processamento de lacticínios. A protease presente na lactase pode também desempenhar um papel no processo de degradação.

É evidente, que a referida substituição ou limpeza dos filtros esterilizadores, impede seriamente a eficiência do processo. Não só o processo tem de parar, para remoção do filtro esterilizador, como todo o



sistema tem que ser de novo esterilizado antes de ser posto em funcionamento.

Desde há muitos anos que têm sido feitas tentativas, para resolver o problema da filtração de germes, de várias maneiras, mas estes esforços ou não deram os resultados desejados ou são muito dispendiosos para um processo económico à escala industrial.

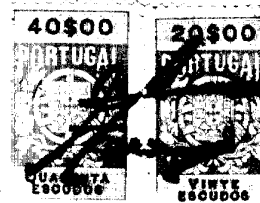
Foi tentada a filtração em cascata, i.e., filtração com a ajuda de uma série de filtros de membrana com os diâmetros dos poros decrescentes, mas surpreendentemente estes filtros também provaram entupir-se pouco tempo depois. Foi também proposta a centrifugação da solução de enzima antes da passagem através do filtro esterilizador, mas este método não deu igualmente resultados óptimos e torna o processo também consideravelmente mais dispendioso. O uso de outros métodos de recuperação, como p.e. a realização adicional duma clarificação de uma solução enzimática, também não resolveu o problema do entupimento dos filtros.

Foi agora descoberto que o problema da filtração acima descrito, pode ser ultrapassado tornando a enzima isenta de germes pouco depois da fermentação e da usual recuperação e purificação e, facultativamente, mantendo-a esterilizada numa solução antes de se adicionar ao leite.

O invento fornece assim o processo para a preparação de uma solução isenta de germes, de uma enzima que cinde a lactose, caracterizado pelo facto de a solução de enzima que cinde a lactose ser isenta de germes por filtração esterilizadora depois da recuperação e purificação, da solução de enzima que cinde a lactose, produzida por fermentação, mas antes da formação de produtos de degradação suficientes para entupir o filtro esterilizador.

O processo, de acordo com o invento, tem a vantagem adicional de poder ser o próprio produtor da enzima a realizar a esterilização da solução de enzima. Até agora cada uma das diferentes indústrias de processamento de lacticínios submetia a solução de enzima, fornecida, a filtração esterilizadora ou esterilizava-a de outro modo.

A solução de enzima pode ser isenta de germes por qualquer dos métodos conhecidos, falhando no entanto, todos eles dentro do âmbito do invento. De preferência, depois da usual recuperação, purificação, autólise e filtração, a solução de enzima é isenta de germes antes de ser sujeita a filtração esterilizadora. É preferível empobrecer em germes, a



solução com um filtro redutor de germes p.e., almofadas de filtro SEITZ Supra EKS. É preferível empobrecer, em germes, a solução, imediatamente após os passos acima mencionados. De preferência, a solução é igualmente sujeita a ultrafiltração, para concentrar a enzima, antes da filtração esterilizadora.

A filtração esterilizadora (filtração de germes) é de preferência realizada com um ou mais filtros de membrana. Um filtro adequado é p. e., um filtro de membrana com um diâmetro de poro de $0,22 \mu m$.

A altura exacta da filtração de germes da solução enzimática não é essencial, mas deverá ser escolhida de modo a não permitir a formação de produtos de degradação em quantidade suficiente para entupir o filtro. É, por isso recomendada a realização da filtração de germes pouco tempo depois da recuperação e purificação. De preferência, a filtração de germes, é realizada no espaço de 14 dias ou melhor ainda, no espaço de 5 dias após a recuperação e purificação.

Antes ou após a esterilização da solução de enzima, por filtração esterilizadora, pode, adicionar-se um ou mais solventes ou outros aditivos, p.e. para levar a actividade da enzima ao nível desejado e para adicionalmente estabilizar a enzima. Solventes adequados são p.e., sorbitol e glicerol. Aditivos adequados, que estabilizam a enzima, são p.e., lactose hidrolizada, glucose, manita e tampões de sal. Podem também adicionar-se aditivos para adoçar mais o leite e seus derivados. Um destes aditivos é p.e., a invertase que pode ser adicionada à solução enzimática ou estar já presente nela. De preferência a adição é realizada depois da esterilização, com os compostos de adição previamente esterilizados. Um solvente privilegiado, que contribui ao mesmo tempo para a estabilização da enzima, é o glicerol. A razão final água-glicerol não é essencial, mas deve estar, de preferência, entre 1:9 e 4:1 (v/v) ou mais precisamente entre 1:3 e 1:1.

Numa representação conveniente, que é ilustrativa do invento, um produto aquoso para fermentação, contendo lactase é sujeito a autólise e é subsequentemente filtrado, de preferência com auxiliares de filtragem. Se necessário, o filtrado é tratado com charcoal activado e filtrado através de um filtro redutor de germes (o chamado filtro de polimento) para empobrecer a solução em germes. Realiza-se então a ultrafiltração, para concentrar a enzima, depois da qual se junta glicerol (cerca de 50% em peso).



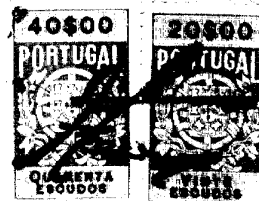
A solução assim obtida é de novo filtrada por um filtro redutor de germes (almofadas de filtro SEITZ Supra EKS) e depois, em linha, passada através de um filtro esterilizador (um filtro de membrana com um diâmetro de poro de $0,22\mu\text{m}$). Finalmente a solução é passada para um recipiente esterilizado que é imediatamente selado.

Noutra representação conveniente, glicerol aproximadamente a 20% (em peso) é adicionado ao filtrado, depois da autólise, da filtração, da filtração de polimento e da ultrafiltração, como foi descrito acima. A solução obtida é então filtrada através dum filtro redutor de germes e subsequentemente através dum filtro esterilizador. A solução é então levada à concentração desejada (cerca de 1:1) com glicerol esterilizado e empacotada sob condições esterilizadas.

Numa representação preferível, glicerol aproximadamente a 50% (em peso) é adicionado depois da prefiltração e dos passos de filtração esterilizadora atrás mencionados. Uma vantagem deste método em relação aos atrás citados, é a de permitir uma filtração mais rápida, uma vez que a solução é menos viscosa antes da filtração esterilizadora.

O invento refere-se ainda, a um processo para a preparação de leite ou derivados de leite de baixo teor em lactose (o que significa também produtos mais doces), por adição de uma solução, isenta de germes, de uma enzima que cinde a lactose, preparada pelo processo do invento.

A solução de enzima esterilizada pode ser conservada num recipiente esterilizado antes de ser usada pela indústria de processamento de lactícinios. Recipientes esterilizados, nos quais os líquidos podem ser conservados, têm sido frequentemente descritos na literatura. De preferência, é usado um recipiente que possa ser facilmente ligado à bomba dosificadora, na linha de produção de leite p.e., como descrito no artigo, já mencionado, do jornal Voedingsmiddelentechnologie. A ligação do recipiente à bomba de dosagem tem evidentemente que ser realizada em condições de isenção de germes. O filtro esterilizador, entre a solução de enzima esterilizada e a linha de produção, como foi descrito nos processos do artigo anterior, pode ser omitido quando é empregada uma solução de enzima, isenta de germes, obtida por um processo de acordo com o invento. O precipitado que pode ocorrer, devido aos processos de degradação, não entope a bomba de dosagem e é de natureza totalmente inofensiva. A concentração de enzima no leite é tão baixa, que a quantidade de precipitado no produto final é insignificante.



-7-

Os exemplos seguintes ilustram o invento.

EXEMPLO 1

Filtração esterilizadora da solução contendo lactase.

Maxilact[®], um produto comercial, aquoso para fermentação, da Gist-Brocades, contendo lactase foi filtrado através de almofadas de filtro SEITZ K5, SEITZ EK e MILLIPORE RAWP (diâmetro do poro 1,2 μ m). Para a filtração final a solução foi passada através de um filtro de membrana MILLIPORE GSWP (diâmetro do poro 0,22 μ m) e recolhida num frasco esterilizado. A solução foi então levada à concentração desejada com glicerol esterilizado. A esterilidade de quatro frascos com diferentes concentrações (e actividade) de glicerol é dada abaixo.

glicerol	concentração (% em peso)	actividade (%)*	contagem de germes/ ml
	0	91	<1
	20	80	<1
	50	49	<0,01
	50	49	<0,01

* relativamente à actividade do produto de partida.

Um teste à coagulação e um teste de quadro de sabor não revelaram nenhum desvio em relação ao produto de partida.

EXEMPLO 2

Uso de esterilizador Maxilact[®] numa instalação fabril de lacticínios.

Uma solução, contendo glicerol a 50% (em peso), foi usada num teste numa instalação fabril de lacticínios. Esta solução foi injectada, através dum aparelho dosificador, numa linha de produção de leite previamente esterilizado e, misturada com o leite num misturador. Finalmente a mistura foi dividida e empacotada, sob condições assépticas, em pacotes de 1 litro.

A esterilidade do leite depois de 7 dias de armazenagem a 30°C, foi de 100%. Mais de 85% da lactose foi hidrolizada.

= R E I V I N D I C A Ç Õ E S =

1. - Processo para a preparação duma solução isenta de germes, duma enzima que cinde a lactose, caracterizado pelo facto de a solução de enzima que cinde a lactose ficar isenta de germes por filtração esterilizadora

-8-

após a recuperação e purificação duma solução de enzima que cinde a lactose, produzida por fermentação, mas antes da formação de produtos de degradação suficientes para entupir o filtro esterilizador.

2. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se proceder ao empobrecimento em germes, da solução enzimática, imediatamente após a recuperação e purificação e antes da filtração esterilizadora.

3. - Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de a filtração esterilizadora ser realizada no espaço de 14 dias após a recuperação e purificação.

4. - Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3 caracterizado pelo facto dum ou mais solventes e/ou aditivos serem adicionados à solução enzimática.

5. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de se adicionar glicerol.

6. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de se adicionar glicerol 50% (em peso) à solução enzimática, após a filtração esterilizada.

7. - Recipiente esterilizado, caracterizado por conter uma solução duma enzima que cinde a lactose, isenta de germes, preparada de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 6.

8. - Processo para a preparação de leite ou derivados de leite de baixo teor em lactose, por adição duma solução de enzima que cinde a lactose, isenta de germes, preparada por um processo de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 7.

Lisboa,

Pela GIST-BROCADES N.V.

O AGENTE OFICIAL

