UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

Reaproveitamento da lactose presente em permeado de soro de leite bovino em pó para estudo da síntese de lactulose.

Fernanda Caspers Zimmer

Medianeira
2015

Fernanda Caspers Zimmer

Reaproveitamento da lactose presente em permeado de soro de leite bovino em pó para estudo da síntese de lactulose.

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Medianeira

2015

Orientadora:

Prof^{a}. Dr^{a}. Angela Cláudia Rodrigues

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Z72r Zimmer, Fernanda Caspers.

Reaproveitamento da lactose presente em permeado de soro de leite bovino em pó para estudo da síntese de lactulose. / Fernanda Caspers Zimmer. – 2015.
35 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Angela Claudia Rodrigues.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2015.
Inclui bibliografias.

1. Prebióticos 2. Reaproveitamento (Tecnologia química). 3. Lactose. 4. Alimentos – Dissertação. I. Rodrigues, Angela Claudia, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664 - Ed. 22
Biblioteca Câmpus UTFPR Medianeira
Marci Lucia Nicodem Fischborn 9/1219

Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS DE SÍNTESE DE LACTULOSE A ARTIR DE PERMEADO DE SORO DE LEITE BOVINO

Por

FERNANDA CASPERS ZIMMER

Essa dissertação foi apresentada às nove horas, do dia vinte de agosto de dois mil e quinze, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Processos Tecnológicos na indústria de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____.

_____

Profa. Dra. Angela Claudia Rodrigues (Orientadora - PPGTA)

_____

Profa. Dra. Michelle Budke Costa (Membro Externo – UTFPR)

_____

Prof. Dr. Aloisio Henrique Pereira de Souza (Membro Externo – IFMS)

A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por ter me dado forças para superar desafios e não me deixar desistir desta caminhada.

A minha família em especial ao meu querido pai Miguel Afonso Zimmer, que infelizmente não está mais presente entre nós para ver está mais esta jornada que se finda, a minha mãe Ivete de Fátima Caspers Zimmer e minha irmã Giliane Zimmer pelo incentivo constante;

Ao meu fiel companheiro, namorado, marido... “namorido”, Fabio Marcílio Weizenmann, que me apoiou do início ao fim, com muito amor, incentivo, companheirismo e paciência;

A minha orientadora, Angela Claudia Rodrigues, meu agradecimento especial pela paciência, incentivo, sabedoria, dedicação e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho;

As minhas colegas e amigas “Fofuxa’s” de batalha, Catiussa Maiara Pazuch, Denise Castagnaro, Leidiane Accordi Menezes, Mariana Manfroi Fuzinatto, e Crislaine Ferrari, pela amizade, por compartilharem seus conhecimentos, e, mais importante, escutar, aconselhar e confortar, com certeza sem elas o trabalho seria mais árduo e menos alegre;

As minhas fiéis e comprometidas companheiras de bancada, Maristela Raupp, Elizandra Rech, e especialmente a Ana Flávia Silveira que aceitou o desafio, aprendeu e se dedicou junto comigo.

A Empresa Sooro Ingredientes, em nome de Afonso Passoto e Hélio Alves Garcia, pelo apoio financeiro, treinamento, doações de amostras e incentivo que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos aqueles que aqui não foram mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO GERAL

O soro lácteo é produzido pela indústria de laticínios durante a fabricação de queijos. Contém aproximadamente 80% da lactose original além de minerais, vitaminas, aminoácidos livres, peptídeos e outros compostos de baixo peso molecular. Porém, muitas indústrias ainda consideram o soro como um efluente, o qual quando não devidamente tratado gera um sério problema ambiental por causa de sua elevada carga orgânica. Estes fatores tornam importante o desenvolvimento de alternativas para um adequado aproveitamento do soro, porque ao mesmo tempo em que a transformação do soro em produtos diversos diminui o problema ambiental, proporciona ganhos às indústrias de laticínios, através do desenvolvimento de novos produtos. Uma técnica bastante vantajosa para reaproveitamento do soro é o processo de ultrafiltração, para a obtenção do concentrado proteico do soro do leite, um produto bastante valorizado na indústria alimentícia. Este processo gera outro coproduto, o permeado do soro do leite, que é rico em lactose, a qual pode ser convertida em lactulose, um prebiótico, capaz de ser metabolizado no intestino grosso por bactérias probióticas. Este trabalho teve como objetivo principal otimizar um método de síntese para a produção de lactulose a partir do permeado do soro de leite bovino. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para investigar o efeito de dois parâmetros (tempo e isomerizante) na isomerização da lactose do permeado de soro para a produção lactulose. A experimentação teve como objetivo definir as faixas ótimas de operação para as variáveis do processo, visando o melhor rendimento da lactose. Os resultados demonstraram que o fator isomerizante foi o mais significativo, e a utilização do ácido bórico para este fim contribuiu positivamente para aumentar o rendimento, enquanto que o efeito tempo não foi significativo, mas indicou que um aumento no tempo de reação influencia negativamente na resposta. A partir da pesquisa, verificou-se ser possível o processo de isomerização do permeado de soro de leite para a obtenção da lactulose, a qual tem uma grande aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica, sendo também uma alternativa viável para a problemática do meio ambiente.

Palavras-chave: Prebióticos, isomerização da lactose, reaproveitamento de coprodutos industriais.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por 02 (dois) artigos científicos.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Fernanda Caspers ZIMMER[a], Aline Kirie GOHARA[b], Aloisio Henrique Pereira de SOUZA[b], Makoto MATSUSHITA[b], Angela Cláudia RODRIGUES[1]. Obtainment, quantification and use of lactulose as a functional food - A review. *Journal of Functional Foods.*

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Fernanda Caspers ZIMMER[a], Ana Flávia Chaves da SILVEIRA[a], Maristela Raupp dos SANTOS[a], Angela Cláudia RODRIGUES[a]. Obtenção de lactulose a partir da lactose presente no permeado de soro de leite: Estudo de aproveitamento e otimização. *Journal of the Brazilian Chemical Society.*

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Obtainment, quantification and use of lactulose as a functional food - A review.

Fernanda Caspers Zimmer[a], Aline Kirie Gohara[b], Aloisio Henrique Pereira de Souza[b], Makoto Matsushita[b], Angela Claudia Rodrigues[a].

[a]Federal Technologic University of Parana, Av. Brasil, 4232, CEP 85884-000 – Medianeira - PR, Brazil.
[b]Maringá State University, Chemistry Department, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900 – Maringá - PR, Brazil.

Abstract: The whey (milk serum) is produced by the dairy industry during the manufacture of cheese. It can provide new potential alternatives to the food technology due to the functional and nutritional properties of its proteins. However, many industries still consider the whey as an effluent, which can cause serious environmental problems when not properly treated. Because of those factors it is important to develop alternatives for the adequate use of whey. The lactose obtained from permeate of whey can be converted into lactulose, a prebiotic which may be metabolized in the intestine by probiotic bacteria, such as Lactobacillus sp. and Bifidobacterium sp. through enzymatic isomeration reaction or by using alkaline catalysts, with minimal secondary reactions and high yielding. This manuscript provides information about various techniques used to produce lactulose, its purification and analysis, as well as its mechanisms of action and potential applications in food and pharmaceutical industries.

Key-words: Prebiotics, lactulose, lactose isomerization, reuse of industrial byproducts, permeate of whey.

1. Lactulose as food ingredient

Lactulose (4-O-ß-D-galactopyranosyl-D-fructose) is a disaccharide consisting of galactose and fructose (Figure 1) that has been synthesized as a new sugar in 1930 (Montgomery and Hudson, 1930; Tamura et al., 1993). It is obtained from lactose and has

about half of sweetness of sucrose and solubility in water of 76.4% at 30 ºC (Ganzle, 2012; Modler et al., 1990).

However, only in 1957 its prebiotic effect was noted (Montgomery and Hudson, 1930; Tamura et al, 1993). And because of that discovery, the use of lactulose has increased considerably in dairy products (Philippi, 2008), as it is an ingredient that make food become functional.

According to Ganzle (2012), this ingredient has specific biological functions, such as cariogenicity, low-calorie, nutritional and pharmacological properties, capability to prevent adhesion and pathogenicity of bacteria and toxins, and application in the food industry due to its prebiotic benefits to human health (Ayder and Halleux 2007).

In addition, prebiotics are non-digestible oligosaccharides, but fermentable which function is to change the activity and composition of the intestinal microbiota aiming to promote the host health. The dietary fibers and non-digestible oligosaccharides are the major growth substrates of the microoganisms in the intestine. The most effective prebiotics will reduce the activity of potentially pathogenic organisms (Roberfroid, 2002). Some effects attributed to prebiotics are the modulation of important physiological functions such as calcium absorption, lipid metabolism, modulation of the composition of the intestinal microbiota, which plays a key role in intestinal physiology, and the colon cancer risk reduction (Roberfroid, 2002; Olano, A .; Corzo, N. 2009).

Thus, due to its prebiotic potential, the lactulose is not absorbed nor metabolized in the small intestine, being available for bacteria in the large intestine where it is metabolized by several microorganisms, including bifidobacteria. This oligosaccharide is used as a food supplement due to the benefits from the increase in the population of bifidobacteria in the colon (Silva; Stamford, 2000; Tamura et al., 1993). These prebiotic properties of lactulose have been known for over 50 years, and numerous studies have confirmed several health benefits when lactulose is used as a food ingredient. Some benefits are selective stimulation of the intestinal flora, laxative effect and calcium absorption improvement. The use of lactulose in the production of fermented milk may reduce the incubation period and promote the growth of bifidobacteria and latobacilli, endogenous groups of microbial population beneficial to human health. The synthesis of oligosaccharides derived from lactulose can provide a new prebiotic group with complementary properties to the native lactulose (Olano and Corzo, 2009).

There is a growing demand for products with specific functional properties in the meat industry. Therefore, the use of prebiotics from whey is promising, since the whey can be

incorporated substituting water in the formulation of meat products, such as hams. According to Okara and Alexhkov (2010), the enrichment of meat products by adding lactulose is an innovation requested by consumers, since it can provide positive effects for health and disease prevention, as well as improve some technological properties such as color and emulsifying capacity. Restructured products such as ham, are often considered less healthy products because of its fat content, additives and spices. In this sense, the addition of prebiotics to these foods may bring benefits to health related to lactic bacteria and contribute to increase the consumption of those products by part of the population concerned to health care (Erkkilã et al., 2001).

Although the process for obtaining lactulose in its pure form is somewhat complex, the "syrup", rich in lactulose, can be obtained in a relatively simple way and it is more easily found from commercial perspective. However, these syrups contain further constituents, particularly carbohydrates (galactose, lactose and sugars), which can modify the product texture since they act as biding agents (Zhang et al., 2010). According to Ramos and Gomide (2007), the texture is an important quality parameter evaluating restructured products, since it contributes to the product quality in the tasting test, determining the acceptability and consumer satisfaction.

2. Whey

The bovine whey, which provides lactose to lactulose synthesis, is a byproduct of cheese production. For a long time its main destination was animal feeding, or even the direct disposal on effluents (Yorgun; Balcioglu; Saygin, 2008), causing serious environmental impacts because of its high biochemical demand of oxygen, resulting in one of the biggest dairy industry concerns.

Whey pollutes a hundred times more than domestic sewage. Therefore, actions should be taken in order to reuse this waste, such as the optimization of processes in the dairy industry and the reuse of whey for product manufacturing.

On the other hand, the bovine whey has aroused interest of many researchers around the world due to its nutritional, functional and economical potential. The whey, a greenish-yellow liquid, has 55% of the solids of full cream milk, and high quantity of lactose, minerals and water soluble vitamins. It is about 80 to 90% of the volume used in the manufacturing of cheese.

The lactose concentration in milk varies widely among species. The lactose content is affected by race, individuality factor and above all the stage of lactation (Fox and Mcsweeney, 2008). The presence of lactose in milk is important because this is the main energy source for microorganism development, considered the main component of dairy products on a dry basis, reaching 70% in powdered whey (Fox and Mcsweeney, 2008; National Dairy Council, 2015). Despite being the most abundant solid in whey, it is little used in food industry due to its low sweetening power and its low solubility (Pelegrine and Carrasqueira, 2008; Oliveira, 2009; Ziegler and Sgarbieri, 2009). But it can be used as a value-added ingredient in many food products, such as meat, breads, pastries, snacks and drinks, especially because of recent discovers about its funcional and bioactive properties (Pelegrine and Carrasqueira, 2008).

The proteins from whey are the most valuable substances in this by product, and some industries are reutilizing them through pre-concentration process using ultrafiltration, followed by spray drying, in order to obtain the concentrate whey protein powder.

Ultrafiltration is a membrane separation operation performed to concentrate or fractionate the liquid, resulting in two solutions of different composition. It is based on selective permeation of one or more components through the membrane. Molecules smaller than the membrane pore pass through it, while the upper size ones are retained by sieve effect or by the repulsive forces on the mambrane surface. The whey (process feeding) is separated into two products: the fluid that cross the membrane, called filtrated or permeate; and the one that remains with the process feeding (concentrate), also called retentate, which contains solutes or suspended solids that were rejected by the membrane (Ordoñez et al., 2005).

The commercial use of membrane technology, including ultrafiltration, diafiltration and ion exchange, resulted in the development of various products with diverse and great functionalities (Fennema; Damodaran, Parkin 2010).

Thus, ultrafiltration allows a variation in the relation of concentration among the various components of whey, due to the selective retention of proteins and other colloidal materials, partial retention of simpler nitrogenous compounds and permeation of lactose and minerals.

According to Ordoñez et al. (2005) the industry where the membrane separation operations are more entrenched is the dairy industry, because it allows processing and reutilizing two by products generated in large quantity: the whey from cheese production and the skimmed milk. The first one used to be discarded, despite the contamination it causes; while the second one was used for animal feed or for milk powder.

After the ultrafiltration, the retentate, which has the whey protein, is spray-dried to produce the whey protein concentrate powder. This is a continuous process where the liquid or paste is transformed into a dry product. It is characterized by a relatively short drying time, and the process basically consists of the liquid atomization in a compartment that receives warm air flow. The quick evaporation of water keeps the low temperature of the particles so that the high temperature of the drying air do not over affect the product (Yee; Wiley; Bao, 2007).

The process of reusing the bovine whey for obtaining the whey protein concentrate powder generates another by product, the permeate of whey, which becomes a concern for these industries due to its polluting potential. This by product, rich in lactose, can be converted in lactose powder through the atomization process and then commercialized. However, the atomization of permeate is unviable for the industry because of low commercial value of lactose. Besides, part of the product is lost due to its caking process during the storage, this happens because part of amorthous lactose is substituted by crystalline lactose (Pereira, et al 2010).

An alternative reuse of dry permeate of whey is to perform the process of isomeration of lactose in order to obtain lactulose, a functional nutrient of high commercial value.

3. Lactulose production

For the lactulose production some processes are deployed to increase the yield of disaccharide synthesized from lactose. These processes can be the isomeration of lactose in alkaline solution by the Lobry de Bruyn – Alberda van Ekenstein transformation (Figure 2), regrouping the glucose residue with the molecule of fructose, or by enzymatic catalytic synthesis. The processes involving the production of this compound are diversified (Schuster-Wolff-Bühring, et al., 2010).

However, some caution should be taken during the extraction and purification of lactulose, because a great number of complexing reagents such as aluminates and borates, alkalis as sodium and calcium hydroxide. Some enzymes such as β-galactosidase used in the transgalactosylation reaction can be used as catalysts for isomeration of lactose into lactulose. Thus, the catalyst should be low cost, and easily removable from the medium, safe and non-toxic (Aider and Halleux, 2007; Schuster-Wolff-Burhing et al., 2010).

The industrial applications using Lobry de Bruyn - Alberda van Ekenstein rearrangement allow a maximum disaccharide yield of only 30%; but the optimizations

performed in a continuous flow process with the presence of complexing agents enable the yield to achieve 88% (Schuster- Bühring Wolff, et al., 2010). This reaction basically transforms an aldehyde group of the reducing sugar in a ketosis group, through enolization improved by high temperature. It is important to note that the lactose should present a high purity, since, coupled with lactulose, it has been used as a starting material in the enzymatic syntesis for the transgalactosylation reaction, allowing the formation of galacto-oligosaccharides using the β- galactosidase enzyme (Olano & Corzo2009).

3.1. Chemical Method

The lactulose production technology is primarily based on the isomerisation reaction of lactose in alkaline medium. The lactulose was produced for the first time by heating a mixture of lactose and cal at 35°C (Montgomery and Hudson, 1930). After that, the calcium hydroxide was used as a catalyst for the isomerisation reaction of lactose into lactulose. A solution with 60% of lactose was blended with 0,1% of calcium hydroxide at 102°C for 15 minutes and then it was demineralized through a combination of electrolysis and ion exchange resines (Matvievsky, 1979).

Besides calcium hydroxide, there are other compounds that can be applied to lactose, such as sodium hydroxide, potassium hydroxide, sodium carbonate (De Harr and Pluim, 1991; Dendene et al, 1994; Takahashi Deyae, 1991;. Zokaee et al, 2002), magnesium oxide (Carobbi et al., 1985), and organic alkaline reagents, such as tertiary amines (Parrish, 1970; Zokaee et al, 2002; Dendene et al, 1994). However, these catalysts provide low yields because some undesirable products are also formed during the process (Hicks et al, 1980; Mizota et al, 1987). The complexing reagents such as sodium borate, minimizes the secondary reactions, resulting in high yields of lactulose, moving the reaction to the product side, through its complexation with lactulose (Dendene et al, 1994; Zokaee et al, 2002).

3.2. Enzymatic Method

The bioproduction of lactulose using enzymes is a desirable strategy to minimize the disadvantages of chemical synthesis, such as a high level of degradation of lactulose and a substantial amount of by products, which are difficult to separate and purify. These factors increase the price and decrease the yielding (Carobbi, 1990; Zokaee et al, 2002).

The enzymatic synthesis of lactulose is commonly performed with β-galactosidase and glucosidase enzyme classes. The β-galactosidase is a biocatalyst known by the transgalactosylation reaction which suggests the possibility of conversion of lactose and fructose into lactulose (Panesar et al., 2011). This enzyme can be obtained from a wide variety of sources, such as microorganisms, plants and animals; however, the properties differ significantly according to its origin. The enzymes from plants and animals have low commercial value but several β-galactosidase microorganisms are of technological interest. In addition, the microorganisms provide many advantages such as easy handling, greater proliferation rate and high production yield when compared to other available sources of this enzyme. The free β-galactosidase, as well as the ones in form of whole cells, can be immobilized and used for the production of lactulose (Panesar et al., 2011).

4. Quantification and purification of lactulose

The quantification of lactulose has been performed by high performance liquid chromatography - HPLC, using the refractive index (RI) detector. Some of the factors that allow the use of these techniques are: high selectivity, efficiency, separation capacity and processing speed.

The first studies for the determination of lactulose were performed about 35 years ago. The HPLC technique improved the chromatographic columns and the carbohydrate detection system, and nowadays, this technique is the most used for identification and quantification of these compounds. Concerning liquid chromatography technique, HPLC-RI is the most used method for identification and quantification of saccharides. Regarding the chromatographic columns, the column with NH_2 as ionic form, uses a mixture acetonitrile and water as eluent (Adamczak et al.2009; Chen et al., 2003). The analytes are retained by ion exchange between the hydroxyls of galacto-oligosaccharides and ionic components of the column.

The HPLC-RI is a low-cost method, but it is also used due to its accuracy and speed (AOAC, 1990). This system is also used to determine the sugars (glucose, fructose and sucrose) in apple juice (Garza et al, 1996); disaccharide of permeate whey (lactose, galactose and lactulose); oligosaccharides (fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose) in cereals, canned vegetables and fruits, and biscuits; and sucrose, glucose and fructose, in samples of fruits and drinks (Casterline et al, 1999).

According to Sharon (2013), the analysis by liquid chromatography is used to confirm the synthesis of lactulose by isomerization reaction, calculate the yielding of the isomerization

reaction, determine the fractions collected in chromatographic column with predominance of lactulose (Figure 3) and verify the purity of these fractions.

High performance liquid chromatography allows monitoring the isomerisation reaction of lactose into lactulose and calculating the yield of the isomerization reaction, which was around 70% in alkaline medium, while the highest hydrolysis level for enzymatic isomerization was 76%, as described by Adamczak (2009).

During the production of lactulose, reaction mixture is typically not pure and contains significant amounts of other substances such as lactose, glucose, galactose, and others. In addition, small amounts of galactose, tagatose, epilactose, and formic acid are also formed in the reaction mixture as a result of the degradation of lactose into lactulose (Schuster-Wolff-Bühring et al., 2010).

The lactose degradation is prevented by reducing the pH and the temperature of the obtained solution. Thereafter, the mixture is processed in order to separate the lactulose from the lactose and remaining catalysts. The lactose is crystallized and then recycled. The recovery of lactulose during processing is a crucial stage because the amount of lactulose is affected by both physical and chemical treatments. The purification of lactulose from a mixture with lactose, has also been carried out using extraction with pressurized liquid at 1500 psi for 30 minutes; and the recovery of lactulose reached up to 84,4% with purity of over 90% (Ruiz -Matute et al., 2007).

5. Conclusion

Because of the increasing production of cheese over the years and a more strict control of effluents disposing, the production of whey is, nowadays, one of the most critical issues for the dairy industry. A very advantageous technique for the reuse of whey is the process of ultrafiltration to obtain whey protein concentrate, a highly valued product in the food industry. This process generates another by product, the permeate of whey which is rich in lactose. An alternative for its reuse is the process of isomerization of the lactose to obtain lactulose, a functional nutrient of high commercial value. Lactulose is a synthetic prebiotic disaccharide with a wide range of application in food and pharmaceutical sectors. Therefore, it is possible to perform the total utilization of the whey, reducing the disposal of industrial by products and improving the nutritional quality of industrialized foods offered to people.

6. Acknowledgements

This research project was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Project No.: 460761/2014-5; Call / public notice: MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 - Faixa A.

7. References

ADAMCZAK M, CHARUBIN D, BEDNARSKI W. Influence of reaction médium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared whey permeate. *Chemical Papers*, 2009; 63:111-6.

AOAC - Official Methods of Analysis of the, 15th ed., Arlington, VA, 1990, p. 789.

AYDER, M.; HALLEUX, D. Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Food Science & Technology*, London, v. 18, n. 2, p. 356-364, Feb. 2007.

BLAUT, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*. v. 41, supplement 1, p.1-16, 2002.

CAROBBI R, INNOCENTI F. Process for preparing lactulose from lactose by epimerization with sodium aluminate. European patent 0320670; 1990.

CASTERLINE, J. L.; OLES, C. J. and KU, Y. In vitro fermentation of various food fiber reactions. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 45:2463– 2467, 1999.

CHEN C, W.; OU-YANG C-C.; YEH C-W. Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. *Enzime and Microbial Technology*, 33: 497-507, 2003.

DE HARR W, T.; PLUIM H. Method of preparing lactulose. *European patent*, 0339749.1991.

DENDENE, K.; GUIHARD, L.; NICOLAS, S.; BARIOU, B. Kinetics of lactose isomerization of lactulose in an alkaline medium. *Journal Chemistry, Technology and Biotechonology*, v.61, p.37-42, 1994.

DEYA E.; TAKAHASHI K. Production process of high purity lactulose syrup. *US Patent* 5034064; 1991.

ERKKILÄ, A. T., et al. Dietary associates of serum total, LDL, and HDL cholesterol and triglycerides in patients with coronary heart disease. *Preventive Medicine*, v. 28, p. 558-565, 1999.

FENNEMA, O. R., DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. Química de Alimentos de Fennema. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FOX, P. F. and MCSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry. Londres: Thomson Science, 1ª. ed, 1998.

GARZA. S, J. Giner, O. Martín, E. Costa, A. Color, Sugars And Hmf Evolution During Thermal-Treatment Of Apple Juice. *Food Science and Technology*, 1996.

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

HICKS, K.B.; PARRISH, F.W. A new method for the preparation of lactulose from lactose. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v.82, p.393-397, 1980.

KOZEMPEL, M.; MCALOON, A.; ROTH, LORIE. Simulated scale-up and cost estimate of a process for alkaline isomerization of lactose to lactulose using boric acid as complexation agent. *Journal Chemistry, Technology and Biotechonology*, v.68, p.229-235, 1997.

MATVIEVSKY, V. Y. Investigation of process for lactose/lactulose syrup production for infantile food. *Master of ScienceThesis*, 252 p, 1979.

MIZOTA, T.; TAMURA, Y.; TOMITA, M.; OKONOGI, S. Lactulose as a sugar with phisiological significance. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Brussels, v.212, p. 69-76, 1987.

MODLER, H.W.; MCKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, Ottawa, v.23, p.29-41, 1990.

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 American Chemical Society*. 52, 2101e2111, 1930.

OKARA, A. I.; ALESHKOV, A. V. Meat containing semi-products enriched in lactulose. *Meat Industry*, Mill Valley, v. 10, n. 1, p. 53-56, Jan. 2010.

OLANO, A. and CORZO, N. Lactulose as a food ingredients. *Journal Science Food Agriculture*, 2009.

OLIVEIRA M.N. Tecnologia de produtos lácteos funcionais. Livro: Ed. Atheneu. São Paulo, 2009.

ORDOÑEZ, J. A. et al. Tecnologia de Alimentos. Componente dos alimentos e processos. vol. 1, São Paulo: Artmed, 2005.

PANESAR, P.S.; KUMARI, S. Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnology Advances*, 29: 940–948, 2011.

PARRISH, F. W., HICKS, K., & DONER, L. Analysis of lactulose preparations by spectrophotometric and high performance liquid chromatographic methods**.** *Journal of Dairy Science*, 63, 1809-1814, 1980.

PARRISH. F, W. Isomerization of glucose, maltose, and lactose with amino compounds. *U.S. Patent* 3514327; 1970.

PELEGRINE, D. H. G., CARRASQUEIRA, R. L., Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. *Brazilian Journal of Food Technology*, dez. 2008.

PEREIRA, J. P. F. Percentual de cristalização da lactose em cristalizador de bancada de soro de leite concentrado. *Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, Maio/Jun, nº 374, 65, 26:32. 2010.

PHILIPPI, S. T. Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição. Barueri: Manole, 2008. 381 p.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias. Viçosa, MG: UFV, 2007. 599 p.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease.* v. 34, Suppl. 2, p. 105-10, 2002.

RUIZ-MATUTE A, L. et al. Purification of lactulose from mixtures with lactose using pressurized liquid extraction with ethanol–water at different temperatures. *Journal Agriculture Food Chemistry,* 55:3346–50, 2007.

SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING, R. et al. Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *International Dairy Journal*, 2010.

SEKI, N., SAITO, H. Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. *International Dairy Journal*, 2012.

SILVA, L. L.; STAMFORD, T. L. M. Alimentos probióticos: uma revisão. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 14, n. 68/69, p. 41-50, 2000.

TAMURA, Y. et al. Lactulose and its application to the food and pharmaceutical industries. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Brussels, v. 289, p. 43-53, 1993.

YEE, K. W.K., WILEY, D. E., BAO, J.: Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: operability under constant operating conditions. *Journal of Membrane Science*, v. 290, n. 2, p. 125–137, mar. 2007.

YORGUN, M, S.; BALCIOGLU, A.; SAYGIN, O. Performance comparison os ultrafiltration, nanofiltration and reverse ormosis on whey treatment. *Desalination*, p. 204-216, 2008.

ZHANG, W. et al. Improving functional value of meat products. *Meat Science*, Barking, v. 86, n. 1, p. 15-31, Jan. 2010.

ZIEGLER, F.L.F.; SGARBIERI, V.C. Caracterização químico-nutricional deum isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. *Revista de Nutrição*, Campinas, 22(1):61-70, jan./fev., 2009.

ZOKAEE, F.; KAGHAZCHI, T.; ZARE, A.; SOLEIMANI, M. Isomerization of lactose to lactulose – study and comparision of three catalytic systems. *Process Biochemistry*, London, v.37, n.6, p.629-635, 2002.

Figure Captions

Figure 1: Molecular structure of lactulose ($C_{12}H_{22}O_{11}$; 4-O-b-D-galactopyranosyl-b-D-fructofuranose).
Source: Seki, N.; Saito, H. (2012).

Figure 2: Lobry de Bruyn - Alberda van Ekenstein rearrangement of lactose.
Source: (Schuster-Wolff-Burhing et al., 2010).

Figure 3: Isomerized permeate of whey, (a) lactulose, (b) lactose.
Source: Adapted, Hicks et al, 1980.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Obtenção de lactulose a partir da lactose presente no permeado de soro de leite: Estudo de aproveitamento e otimização.

Fernanda Caspers Zimmer[a], Ana Flávia Chaves da Silveira[a], Maristela Raupp dos Santos[a], Angela Claudia Rodrigues[a].

[a]Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Av. Brasil, 4232, CEP 85884-000 – Medianeira - PR, Brasil.

O soro lácteo é produzido pela indústria de laticínios durante a fabricação de queijos e contém um alto percentual de lactose original, além de minerais, vitaminas, aminoácidos livres, peptídeos e outros compostos de baixo peso molecular. Porém, muitas indústrias ainda consideram o soro como um efluente, o qual quando não devidamente tratado gera um sério problema ambiental por causa de sua elevada carga orgânica. Estes fatores tornam importante o desenvolvimento de alternativas para um adequado aproveitamento do soro, porque ao mesmo tempo em que a transformação do soro em produtos diversos diminui o problema ambiental, proporciona ganhos às indústrias de laticínios, através do desenvolvimento de novos produtos. Este trabalho teve como objetivo principal otimizar a reação de síntese de lactulose a partir do permeado do soro de leite bovino. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para investigar o efeito de dois parâmetros (tempo e isomerizante) na isomerização da lactose do permeado de soro para a produção lactulose. A experimentação buscou definir as faixas ótimas de operação para as variáveis do processo, visando o melhor rendimento da lactulose. Os resultados demonstraram que o fator isomerizante foi o mais significativo, e a utilização do ácido bórico para este fim, contribuiu positivamente para aumentar o rendimento, enquanto que o efeito tempo não foi significativo, mas indicou que um aumento no tempo de reação influencia negativamente na resposta. De acordo com a superfície de resposta gerada pelo modelo, a faixa ótima de trabalho, onde atingiu-se um maior rendimento de lactulose (40 %), foi com 80 minutos de reação e utilizando-se o ácido bórico como isomerizante. A partir da pesquisa, verificou-se ser possível o processo de isomerização do permeado de soro de leite para a obtenção da lactulose, a qual tem uma grande aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica, sendo também uma alternativa viável para a problemática do meio ambiente.

Palavras-chave: Prebióticos, isomerização da lactose, reaproveitamento de coprodutos industriais.

Introdução

A lactulose (4-O-β-D-galactopiranosil-D-frutose) é um dissacarídeo sintético, formado a partir de molécula de frutose e de uma molécula de galactose. É ligeiramente mais doce do que a lactose e pode ser utilizada como um substituto parcial da sacarose em alguns produtos alimentares (Drakoularakou et al., 2011). Além disso, é um nutriente funcional de grande valor agregado no mercado por ser um dissacarídeo prebiótico sintético, com uma vasta gama de aplicações em setores alimentícios e farmacêuticos.

Atualmente, a lactulose é obtida quimicamente pela isomerização da lactose através do rearranjo Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein, utilizando catalisadores, tais como hidróxido de sódio e cálcio, sulfitos, aluminatos, fosfatos e boratos (Bühring et al., 2010). O processo químico envolve etapas subsequentes de purificação, para remoção do elevado nível de produtos secundários. Uma alternativa na obtenção de lactulose com alto grau de pureza é através de processos de bioconversão. Nesse sentido, processos de bioconversão da lactose à lactoluse têm sido estudados através da ação da enzima β–galactosidase (Wang et al, 2013).

A lactulose apresenta vários campos de aplicação na área médica, incluindo o tratamento de constipação crônica, encefalopatia hepática, carcinogênese do cólon, acidente vascular cerebral isquêmico. Na indústria de alimentos é aplicada em fórmulas para alimentação infantil, iogurte, leite de soja fermentado, leite fermentado desnatado, bem como aditivo alimentar. A Comissão Europeia (n º 575/2011), "*Quality and Safety of Feeds and Food for Europe"* aprovou o uso de lactulose como ingrediente alimentar na produção de alimentação animal, por reduzir o consumo de antibióticos, e também por ter ação prébiotica, aumento da absorção de minerais, efeitos hiperglicêmico e hipocolesterolêmico, auxílio na prevenção e redução de infecção do trato urinário e ainda reduzir o tempo de trânsito intestinal.

O soro de leite é um coproduto da produção de queijo, sendo uma matéria-prima barata que contém uma grande quantidade de lactose. Grande parte do soro de leite produzido pela indústria de laticínios é usada para ração animal, e como ingrediente alimentar (Kassa et al., 2008).

Porém, cerca de 30% da produção anual e mundial de soro continua a ser descartada, sendo este considerado um poluente de águas devido à sua alta demanda química e bioquímica de oxigênio (Abboud et al., 2010; Alonso et al., 2011). Sua disposição e utilização eficaz em termos de custos tornaram-se cada vez mais importante para a indústria de laticínios. Além disso, as preocupações ambientais e econômicas exigem que o soro deva ser convertido em produtos de valor agregado.

As proteínas presentes no soro do leite são as substâncias mais valorizadas neste coproduto, e algumas indústrias as reaproveitam através de processos de pré-concentração utilizando a ultrafiltração, seguida de secagem por atomização, para a obtenção do concentrado proteico de soro de leite em pó (Ordoñez, 2005).

Dessa forma, a ultrafiltração permite uma variação na relação de concentração entre os vários componentes do soro, devido à retenção seletiva de proteínas e outros materiais coloidais, retenção parcial de compostos nitrogenados mais simples e da permeação da lactose e sais minerais.

Entretanto, o processo de reaproveitamento do soro de leite bovino para a obtenção do concentrado proteico de soro de leite em pó gera outro coproduto, o permeado do soro do leite, que acaba sendo uma preocupação para estas indústrias devido ao seu potencial poluidor.

Este coproduto, sendo rico em lactose, pode passar pelo processo de atomização para a obtenção da lactose seca, podendo ser comercializada. Porém, a atomização do permeado torna-se inviável para a indústria devido ao baixo valor comercial que a lactose possui, e à perda do produto devido ao seu empedramento durante o armazenamento pelo processo de substituição de parte da lactose amorfa por lactose cristalina (Pereira, et al. 2010).

Além disso, a lactose é pouco utilizada na indústria alimentícia em virtude de seu baixo poder adoçante e de sua baixa solubilidade (Pelegrine e Carrasqueira, 2008; Oliveira, 2009; Ziegler e Sgarbieri, 2009). Porém, pode ser utilizada como um ingrediente de valor agregado em muitos produtos alimentícios, incluindo produtos lácteos, carnes, pães, doces, aperitivos e bebidas, e também devido às recentes descobertas de suas propriedades funcionais e bioativas (Pelegrine e Carrasqueira, 2008).

Adicionalmente, a concentração de lactose no leite e no soro de leite varia amplamente entre as espécies. Dessa forma, o conteúdo de lactose do leite bovino varia com a raça, fator de individualidade e principalmente à fase de lactação do animal (Fox and Mcsweeney, 2008). Apesar desta variação, a lactose é considerada o componente principal dos produtos lácteos em base seca, e o sólido mais abundante no soro, chegando a 70% no soro de leite em pó (National Dairy Council, 2015).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi propor uma alternativa para o reaproveitamento desta lactose contida no permeado de soro de leite bovino em pó, através da otimização da metodologia de isomerização para a produção de lactulose, evitando assim, o descarte deste coproduto poluidor no meio ambiente.

Material e Métodos

O permeado de soro de leite bovino foi obtido do processo de ultrafiltração do soro, utilizado para produção do concentrado proteico de soro de leite, seguida de secagem por atomização, para a obtenção do permeado de soro de leite em pó, cedido por uma empresa da região.

Reagentes e Padrões

Todos os reagentes utilizados tinham pureza analítica, sendo de procedências comerciais distintas. As fases móveis utilizadas para as análises cromatográficas como a acetonitrila (CH_3CN) grau HPLC e água ultra pura. O padrão de lactulose utilizado para a construção da curva padrão foi adquirido da *Sigma-Aldrich*® ≥95%.

Caracterização do permeado de soro de leite

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Isomerização de lactose por Sulfito de sódio (Na_2SO_3) /Hidróxido de Sódio (NaOH)

Para a síntese de lactulose a partir de lactose utilizando Na_2SO_3 - NaOH 10%, baseou-se na metodologia de Ayder, M.; Halleux, D,(2007) com adaptações. Uma massa de 44,00 g de permeado de soro de leite foi reconstituída em 100 mL de água, e adicionado o Na_2SO_3, seguindo o cálculo:

Cálculo para adição de Sulfito de Sódio:

PA . % ST . % lactose . % fator de concentração de lactose (1)

Em que:

PA: Massa da amostra
ST: Sólidos totais da amostra

A solução foi titulada com NaOH 10% até pH 11, em seguida as amostras foram submetidas a isomerização em banho-maria termostatizado com agitação à 70° C nos tempos de 30, 60, 90, 135 e 180 min. Deixou-se resfriar e para a remoção do NaOH do produto da reação foi utilizado uma coluna cromatográfica empacotada com resina de troca catiônica (PUROLITE SST60) com diâmetro de 10 mm e altura de 30 cm. A solução foi precipitada com 5 mL de solução de Carrez I - ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$) 15 % (m/v) e Carrez II - sulfato de zinco ($ZnSO_4.7H_2O$) a 30 % (m/v), deixada em repouso por 1 hora até a separação das fases, filtrado em papel filtro e transferido para balão volumétrico de 250 mL, adicionou-se 100 mL de álcool etílico e completou-se com CH_3CN até o menisco, filtrado em filtro *Milipore* 0,45 µm e analisados em cromatógrafo à líquido de ultra eficiência.

Isomerização de lactose por Ácido Bórico (H_3BO_3) /Trietilamina ($N(CH_2CH_3)_3$)

Para a preparação de lactulose a partir de lactose com H_3BO_3- $N(CH_2CH_3)_3$ seguiu-se a metodologia de Hicks e Parrish (1980). Um mistura contendo 44,00 g de permeado de soro de leite, 0,8900 g de H_3BO_3 e 100 mL de água foram titulados em erlenmeyers de 250 mL até pH 11 com $N(CH_2CH_3)_3$. As amostras foram imersas em banho-maria termostatizado a 70° C, quando as amostras atingiram a temperatura de reação, retirou-se alíquotas, 10 mL, em intervalos de tempo de 30, 60, 90, 135 e 180 minutos. A amina foi removida por passagem da amostra através de uma coluna cromatográfica empacotada com resina de troca catiônica (PUROLITE SST60) com diâmetro de 10 mm e altura de 30 cm. O H_3BO_3 foi removido com acetato de metila - $C_3H_6O_2$ por evaporação da amostra em rota evaporador até à secura sob pressão reduzida, e lavagem com adição de 40 mL de metanol, também evaporando-o em rota evaporador, repetiu-se o processo de três vezes. O resíduo final foi dissolvido em 10 mL de água ultra pura, 10 mL de CH_3CN, filtrado em filtro *Milipore* 0,45 µm e analisados em cromatógrafo à líquido de ultra eficiência.

Condições cromatográficas para quantificação de lactulose em permeado de soro de leite em pó

As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo à Líquido de Ultra Eficiência (CLUE, em inglês UHPLC: *Ultra High-Pressure Liquid Chromatography*) acoplado ao detector de Índice de Refração (UHPLC-IR) (Dionex Corporation, UltiMate 3000, bomba quartenária, Sunnyvale, Software Chromeleon, EUA). A separação foi realizada com coluna NST - NH_2, (250 mm x 4.6 mm, 05 µm), usando como fase móvel água-acetonitrila (30/70, v/v) para lactose e lactulose. A taxa de fluxo foi de 1,5 mL. min^{-1} e o volume de injeção foi de 20 µL. O tempo de retenção foi de 8,5 minutos para lactulose e 9,5 minutos para lactose. Os

picos foram identificados por comparação com o tempo de retenção com padrões de açúcares. A quantificação foi realizada através do método do padrão externo. As curvas de calibração para cada açúcar foram preparadas em cinco níveis, a partir de 10 a 80 mg. mL^{-1} para a lactose, e lactulose, todos dissolvidos em água ultra pura.

Análise do Planejamento Fatorial

Um planejamento fatorial 2^2 completo (dois fatores em dois níveis) com duplicata no ponto central foi realizado para investigar a influência de dois fatores na reação de isomerização da lactose. Os fatores estudados foram: tempo de isomerização (90, 135 e 180 minutos) e tipo de isomerizante (sulfito de sódio e ácido bórico), como mostrado na Tabela 1. Utilizou-se como resposta o rendimento da reação de isomerização. Os resultados obtidos no delineamento experimental foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa DESIGNER EXPERT versão 6.0.5.

Tabela 1: Fatores investigados e seus respectivos níveis utilizados para a realização do planejamento fatorial 2^2 completo com ponto central.

Fatores	Unidade	Símbolo	Tipo	Níveis	
				-1	+1
Tempo	Minutos	x_1	Numérica	90	180
Isomerizante	-	x_2	Categórica	Ácido bórico	Sulfito de sódio

Inicialmente, obtiveram-se os valores dos efeitos principais, de interação e a análise de variância (ANOVA). Em seguida, todas as variáveis tiveram a sua normalidade e homogeneidade de variância avaliada através dos gráficos dos resíduos. Após esta etapa, a análise da variância (ANOVA) foi realizada para a resposta. Para estudar o efeito das variáveis independentes sobre a resposta, a metodologia de superfície de resposta foi aplicada. A equação do modelo utilizado para ajustar os dados foi:

$$E(y) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (2)$$

Em que: E (y) é a resposta esperada, β_0 é uma constante, β_1, β_2, e β_{12} são os coeficientes de regressão, e x_1, x_2 são os níveis de variáveis independentes (Granato, Bigaski, Castro, e Masson 2010).

Resultados e Discussões

Caracterização do permeado de soro de leite

A Tabela 2 apresenta um comparativo entre os parâmetros físico-químicos do permeado de soro de leite em pó, obtidos pelas análises em laboratórios e os fornecidos pela indústria, relacionando-os com o máximo permitido por Brasil, 2003.

Tabela 2: Comparação das análises físico-químicas do permeado de soro de leite

Análises**	Resultados obtidos*	Indústria	Brasil, 2003
Umidade	2,15 ± 0,304	1,18	5,00
Proteína	1,72 ± 0,344	2,92	9,00
Cinzas	5,66 ± 0,009	5,56	7,00
Lactose	40,00-± 0,003	90,34	61,00

*Média e desvio padrão.
**** % valores expressos em g/100g

O permeado de soro de leite em pó apresentou resultados de umidade, proteína e cinzas, semelhantes aos apresentados pela indústria e dentro dos parâmetros expostos pela normativa. Porém o resultado para lactose foi significativamente inferior ao encontrado pela indústria, mas de acordo com a legislação. Segundo Fox and Mcsweeney (2008), a concentração de lactose no leite e no soro de leite varia amplamente entre as espécies. O conteúdo de lactose do leite bovino varia com a raça, fator de individualidade e principalmente à fase de lactação do animal.

Análise do Planejamento Fatorial

Na Tabela 3 apresentam-se as condições do modelo fatorial 2^2 com ponto central, aplicado nos experimentos, bem como os valores obtidos para a resposta estudada: % de rendimento da reação de isomerização.

Tabela 3: Planejamento fatorial 2^2 completo com duplicata no ponto central, e a resposta obtida nos experimentos.

Ensaios	**Variáveis Independentes**		**Resposta**
	Níveis		
	Tempo (minutos)	**Isomerizante**	**% de Isomerização**
1	90	Sulfito de sódio	30,54
2	180	Sulfito de sódio	11,68
3	90	Ácido bórico	28,14
4	180	Ácido bórico	35,00
5	135	Sulfito de sódio	20,58
6	135	Ácido bórico	39,96
7	135	Sulfito de sódio	20,58
8	135	Ácido bórico	39,96

Na Tabela 4 são mostrados os valores dos efeitos principais e de interação, e na Tabela 5 constam os resultados obtidos pela ANOVA para o planejamento 2^2 completo com ponto central para a resposta estudada.

Tabela 4: Efeitos principais e de interação, calculados para o planejamento fatorial 2^2 apresentado na Tabela 4, e para a resposta estudada.

	Efeitos		
Resposta	x_1=Tempo	x_2=Isomerizante	$x_1 * x_2$
Rendimento	-6,00	21,10	12,86

Tabela 5: Resultados da ANOVA para a resposta estudada na modelagem fatorial 2^2 completa com ponto central.

	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Teste F	P
Regressão	3	646,59	215,53	16,25	0,0233
x_1=Tempo	1	36,00	36,00	2,71	0,1980
x_2=Isomerizante	1	445,21	445,21	33,57	0,0102
$x_1 * x_2$	1	165,38	165,38	12,47	0.0386
Curvatura	1	30,89	30,89	2,33	0,2244
Resíduos	3	39,78	13,26	-	-
*Lack of Fit***	1	39,78	39,78	-	-
Erro puro	2	0,000	0,000	-	-
Total	7	717,27	-	-	-

***Lack of Fit:* Erro devido à falta de ajuste do modelo.

Os gráficos dos resíduos indicou que os dados apresentaram normalidade e homogeneidade de variância muito satisfatória, mostrando o modelo foi significativo, e não mostrando significativa falta de ajuste. Os coeficientes de correlação (R^2 = 94,20) e o valor F para o modelo, obtido pela tabela da ANOVA e apresentados na Tabela 5, indicam também a significância positiva do modelo. Outro dado importante obtido através da Tabela 5 é o valor de "P" para a curvatura. O valor de 2,33 obtido indica que a curvatura (medida pela diferença entre a média dos pontos centrais e a média dos pontos fatoriais) não é significativa, comprovando que o modelo linear é o mais indicado, podendo ser aplicado para este planejamento.

Os dados que pertencem a variáveis independentes e as respostas foram analisados para adquirir a equação de regressão linear (Equação 8), bem como os valores de cada efeito principal e da interação entre estes efeitos, e também porcentagens de contribuição destes efeitos para o modelo, através da ANOVA.

Rendimento **=** 26,34 – 3,00 * T + 7,46 * I +6,43 * T * I (8)

Em que,

T, Tempo = x_1;

I, Isomerizante = x_2.

Na Figura 1 apresenta-se o gráfico normal dos efeitos para a resposta analisada através do planejamento. Foram construídas superfícies de respostas para os níveis e as variáveis independentes, conforme mostra a Figura 5.

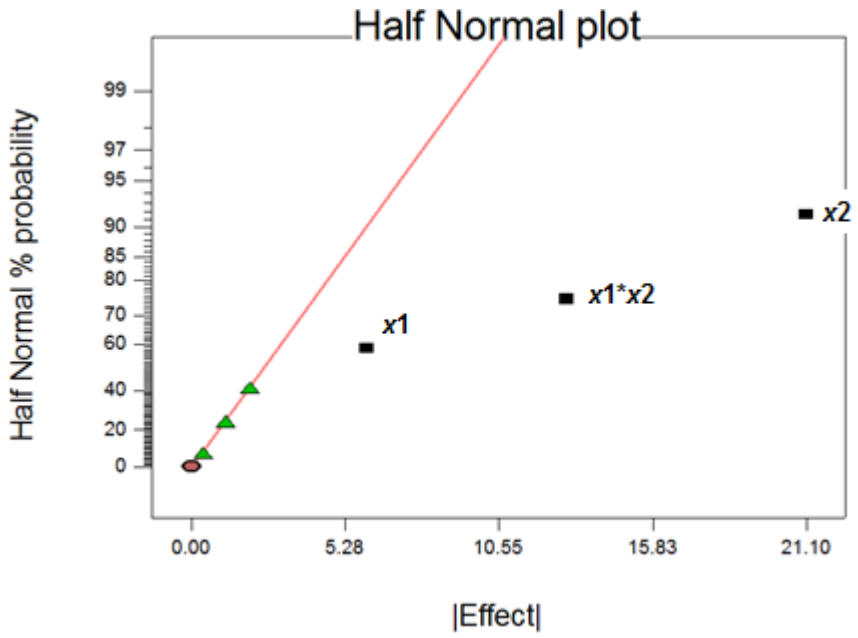

Figura 1: Gráfico normal para os efeitos obtidos no planejamento fatorial 2^2 completo com ponto central apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Na Tabela 5, os valores de "P" menores que 0,0500 indicam os termos do modelo que não são significativos. Neste caso x_2 e x_1*x_2 são termos significativos do modelo. Desta forma, os resultados da ANOVA, mostrada na Tabela 5, indicam que o fator principal isomerizante e o fator de interação foram significativos, e que o fator principal tempo não foi significativo. Este resultado pode ser confirmado pela Figura 1, que mostra o ponto do efeito principal tempo (x_1) bem próximo à reta normal, onde podemos considerar os pontos sem significância.

A Figura 1 e a Tabela 4 deixam evidente que o fator que mais contribuiu para o aumento no rendimento da reação foi o tipo de isomerizante, pois os pontos correspondentes a este efeito principal encontram-se mais afastados da reta normal na Figura 1, e apresentam mais distantes do valor zero (Tabela 4).

Segundo os dados fornecidos pela Tabela da ANOVA (Tabela 5), a porcentagem de contribuição positiva para aumentar o rendimento da reação da variável isomerizante foi de 62,07%. O efeito de interação entre os fatores foi o segundo fator mais importante para estas duas respostas, apresentando uma contribuição positiva de 23,06%. A variável tempo foi o fator que menos influenciou, e a Tabela da ANOVA indicou que houve uma contribuição

negativa para aumentar os valores da resposta, mas pequena (de 6%), deste efeito na resposta.

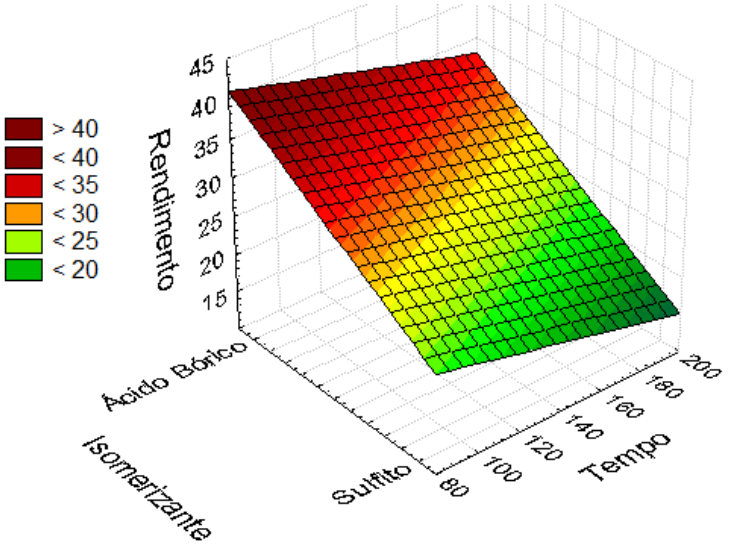

Figura 2: Superfície de resposta para o rendimento da reação de isomerização em função do tipo de isomerizante e do tempo de reação.

A superfície de resposta, disposta na Figura 2, e a Tabela dos efeitos (Tabela 4), evidenciaram que o isomerizante ácido bórico, bem como a diminuição do tempo de reação de 180 para 90 minutos, provocaram um aumento no rendimento da reação. Dessa forma, o aumento do tempo de reação e o isomerizante sulfito de sódio influenciaram negativamente a porcentagem de isomerização da lactose. Além disso, os testes realizados para o ácido bórico com 30 e 60 minutos de reação resultaram em porcentagens de isomerização de, respectivamente, 30,54 e 24,76 %, indicando que a significância de X1 foi contribuinte para a interação.

Portanto, a superfície de resposta (Figura 2), obtida através do planejamento fatorial 2^2 completo com ponto central, indicou que valores menores de tempo de reação e o isomerizante ácido bórico proporcionaram maior eficiência na isomerização da lactose. Além disso, a superfície de resposta gerada pelo modelo mostrou que a faixa ótima de trabalho, onde atingiu-se um maior rendimento de lactulose (40 %), foi com 80 minutos de reação e utilizando-se o ácido bórico como isomerizante.

Conclusão

Através do planejamento fatorial realizado para otimizar a metodologia de síntese da lactulose a partir do permeado do soro de leite bovino, foi possível concluir que o fator isomerizante foi o mais significativo, e a utilização do ácido bórico para este fim, contribui

positivamente para aumentar o rendimento. O efeito tempo não foi significativo, mas indicou que um aumento no tempo de reação influencia negativamente na resposta. A análise da ANOVA e das superfícies de respostas mostrou que o procedimento de isomerização mais eficiente foi obtido com a utilização do ácido bórico e com um tempo de reação reduzido.

Referências

Abboud, M.M.; Aljundi I.H.; Khleifat, K. M. Biodegradation kinetics and modeling of whey lactose by bacterial hemoglobin VHb-expressing *Escherichia coli* strain. *Biochem. Eng. J.*, **2010**, 48: 166-172.

Alonso, S.; Rendueles, M.;vDiaz, M. Efficient lactobionic acid production from whey by Pseudomonas taetrolens under pH-shift conditions. *Bioresour Technol*ogy, **2011**, 102: 9730-9736.

Ayder, M.; Halleux, D. Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Food Science & Technology*, London, **2007**, v. 18, n. 2, p. 356-364,

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 22, de 14 de abril de **2003**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados no Sistema de Laboratório Animal do Departamento de Defesa Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de maio de 2003, Seção I, p. 3-25.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de **2006**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. *Diário Oficial da União*, Brasília, 14 de dezembro de. 2006.

Buhring, R.S.W.; Fischera, L.; Hinrichs, J. Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *International Dairy Journal*., **2010**, 20: 731-741.

Comissão Europeia - nº 575/2011. *Quality and Safety of Feeds and Food for Europe; European Commission,* **2011**.

Drakoularakou, A.; Rastall, R.; Gibson, G. Functional foods for the gut: Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Functional Foods*, **2011**, 449 -470.

Fennema, O. R.; Damodaran, S.; Parkin, K. L. Química de Alimentos de Fennema. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, **2010**.

Fox, P. F.; Mcsweeney, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry. Londres: *Thomson Science*, **1998**.

Granato, D., Bigaski, J., Castro, I. A., Masson, M. L. Sensory evaluation and physicochemical otimisation of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chemistry*, **2010,** 121, 899-906.

Hicks, K. B.; Parrish, F. W. A new method for the preparation of lactulose from lactose. *Carbohydrate Research*, **1980**, Amsterdam, v.82, p.393-397.

Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B.L., Skinner, M.,. Gouli, V., and. Gouli, S.. Whey for mass production of bassiana and Metarhizium anisopliae. *Mycological* Research, **2008**, 102: 583-591.

Oliveira M.N. Tecnologia de produtos lácteos funcionais. Livro: Ed. Atheneu. São Paulo, **2009**.

Ordoñez, J. A. et al. Tecnologia de Alimentos. Componente dos alimentos e processos. vol. 1, São Paulo: Artmed, **2005**.

Pereira, J. P. F. Percentual de cristalização da lactose em cristalizador de bancada de soro de leite concentrado. *Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, **2010**, Maio/Jun, nº 374, 65, 26:32.

Pelegrine, D. H. G.; Carrasqueira, R. L., Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. *Brazilian Journal of Food Technology*, **2008**.

Wang, H. et al. Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2013**, v. 97, 6167-6180.

Ziegler, F.L.F.; Sgarbieri, V.C. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. *Revista de Nutrição*, **2009**, Campinas, 22(1):61-70.