

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS**

Vanessa Albres Botelho da Cunha

**SÍNTESE E FRACIONAMENTO DE OLIGOSSACARÍDEOS A  
PARTIR DA LACTOSE EM REATOR DE MEMBRANA**

Florianópolis

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Vanessa Albres Botelho da Cunha

**SÍNTESE E FRACIONAMENTO DE OLIGOSSACARÍDEOS A  
PARTIR DA LACTOSE EM REATOR DE MEMBRANA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.  
Orientador: Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

Florianópolis

2010



Vanessa Albres Botelho da Cunha

**SÍNTESE E FRACIONAMENTO DE OLIGOSSACARÍDEOS A  
PARTIR DA LACTOSE EM REATOR DE MEMBRANA**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 24 de março de 2010.

---

Prof. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz, Dr<sup>a</sup>.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. José Carlos Cunha Petrus, Dr.  
(Orientador)

---

Prof. José Miguel Müller, Dr.  
(Membro interno)

---

Prof. Jorge Luiz Ninow, Dr.  
(Membro interno)

---

Prof<sup>a</sup>. Andréa Lima dos Santos Schneider, Dra.  
(Membro externo – Univille)

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Norberta de Pinho, Dra.  
(Membro externo – IST/Lisboa-Portugal)



Ao meu avô, Alírio Botelho (*in memoriam*), que despertou meu interesse pela ciência ao me dar uma lupa aos 2 anos de idade e sempre disse que eu seria Doutora.



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Carlos Cunha Petrus, pela orientação, pela amizade e por tudo o que fez por mim.

Ao Programa Alβan, pelos dois anos de bolsa de estudos em Portugal. Foi maravilhoso poder conhecer o Velho e Lindo Mundo.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos por todo o suporte ao longo destes cinco anos. Obrigada Prof<sup>a</sup> Alcilene e obrigada Raquel.

À Professora Maria Norberta Pinho, da Universidade Técnica de Lisboa, que gentilmente me recebeu em seu laboratório, que me ensinou a “pensar em cima de resultados” e que contribuiu de forma decisiva para meu crescimento profissional.

À Professora Marília Mateus, também da Universidade Técnica de Lisboa, que tanto me ouviu. Obrigada pela paciência, pela amizade e por tudo o que me ensinou.

Ao meu marido Daniel, por todo apoio que me deu para que eu pudesse chegar até aqui, por ter embarcado comigo no meu sonho e por ter mantido a nossa família unida.

Ao meu filho Matheus, que “queria que não existisse computador no mundo” para que pudéssemos passar mais tempo juntos. Obrigada por ter sido tão compreensivo apesar de ser ainda tão pequeno. Você é mesmo um presente de Deus.

Aos meus pais, que sempre foram a base de tudo. Serei eternamente grata por tudo o que fizeram para que hoje eu pudesse chegar até aqui. Mãe, muito obrigada pelo apoio diário, por preparar o alimento para o meu corpo e para o meu espírito.

Às minhas irmãs, pela amizade e compreensão dos momentos de ausência. Amanda, viajar com você foi maravilhoso. Sam, Marcão e a Duda, obrigada por tudo o que fizeram por mim e pelo Matheus.

À D. Dilécia, por nos apoiar mesmo sofrendo com a nossa partida. Obrigada também Jean, Gilson, João Felipe, Bruno e Luiza que sempre torceram por mim.

A todos da família Silveira, que foram fundamentais, principalmente nos finais de semana em que distraiam e faziam o Matheus feliz enquanto eu escrevia.

A todos os meus amigos. Brasileiros, que mesmo de longe estiveram sempre presentes e portugueses, que estarão sempre no meu



## **AGRADECIMENTOS-continuação**

coração. “Kista”, vc sempre esteve tão perto e foi preciso atravessar um oceano para te conhecer, agora você já faz parte da família. Déia trabalhar com vocês foi ótimo e tê-la como amiga é melhor ainda.

A toda minha família e a todas as pessoas que passaram pelo meu caminho, que torceram por mim e que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

E finalmente a Deus, por ter me dado força para chegar até aqui e a vontade de sempre seguir a diante.



O valor de praticar com rigor, por algum tempo, uma ciência rigorosa não está propriamente em seus resultados: pois eles sempre serão uma gota ínfima, ante o mar das coisas dignas de saber. Mas isso produz um aumento de energia, de capacidade dedutiva, de tenacidade; aprende-se a alcançar um fim de modo pertinente. Nesse sentido é valioso, em vista de tudo o que se fará depois, ter sido um homem de ciência.

Nietzsche (1878)



## RESUMO

O processo de ultrafiltração do soro de queijo, para a recuperação e concentração de suas proteínas, representa um importante avanço na utilização desse subproduto. O interesse comercial maior está na fração retida pela membrana constituída pelo concentrado. Entretanto, o permeado, que é composto basicamente por água, lactose e sais minerais, ainda representa um problema quando despejado diretamente no meio ambiente, pois a lactose que permanece no mesmo é a principal responsável pelos altos valores da demanda biológica de oxigênio (DBO). Assim, processos que visam à utilização da lactose presente no soro de queijo precisam ser investigados e implementados. Este trabalho teve por objetivo estudar a conversão da lactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase. Tanto a hidrólise, quanto a síntese de galactooligosacarídeos (GOS), foram estudadas em reatores em duas distintas configurações – fluxo perpendicular e fluxo tangencial. Para a hidrólise da lactose foram utilizadas membranas de ultrafiltração preparadas à partir de polifluoreto de vinilideno (PVDF) e polietersulfona (PES). Para a síntese de GOS foram utilizadas membranas de nanofiltração preparadas à partir de acetato de celulose (AC). Para a hidrólise da lactose utilizou-se o permeado obtido da ultrafiltração do soro de queijo. O permeado foi tratado termicamente a 80°C/20min para remoção, por precipitação, das proteínas e peptonas que, devido à baixa massa molar destes compostos, permeiam as membranas de ultrafiltração. A taxa de hidrólise no permeado foi quantificada através da massa de glicose liberada, utilizando-se de técnica colorimétrica. As maiores taxas de hidrólise foram obtidas quando foi utilizado 0.2 g.L<sup>-1</sup> de enzima, tanto no reator com fluxo perpendicular (95%), quanto no reator com fluxo tangencial (78%). O efeito da interferência das proteínas presentes no permeado, no método analítico para determinação da glicose, também foi investigado. Verificou-se que na presença das proteínas, a quantidade de glicose medida é subestimada em até 50%, independentemente da concentração destes compostos presentes no permeado. Através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), constatou-se adsorção da enzima na superfície da membrana. Verificou-se que esta fração adsorvida ainda apresentava atividade enzimática residual. A síntese de GOS foi estudada utilizando-se soluções concentradas de lactose. Inicialmente, a



## RESUMO - Continuação

síntese e o fracionamento de GOS foram estudados separadamente. A enzima foi imobilizada em resina Duolite A-568. Verificou-se que quanto maior a quantidade de enzima utilizada na imobilização, maior quantidade de proteína é adsorvida, mas com maior perda de sua atividade e quantidade de proteína desorvida. A concentração de enzima de  $10 \text{ U.mL}^{-1}$  foi selecionada em reações descontínuas e implementada em reações contínuas, utilizando-se concentração de lactose de  $150 \text{ g.L}^{-1}$  e  $300 \text{ g.L}^{-1}$ , a  $40^\circ\text{C}$ . A concentração total influenciou tanto a síntese, quanto no fracionamento dos GOS. Quanto maior a concentração inicial de lactose, maior foi a quantidade de GOS sintetizada. As misturas de açúcares obtidas destas reações foram fracionadas utilizando-se membranas de acetato de celulose, preparadas pela técnica de inversão de fase. O coeficiente de rejeição ( $R_{obs}$ ) dos açúcares aumentou com o aumento da pressão transmembrana utilizada na filtração e diminuiu com o aumento de sua concentração. Para a menor pressão aplicada, os valores de  $R_{obs}$  obtidos foram 40% para monossacarídeos, 65-80% para os dissacarídeos e 100% para os trissacarídeos. A reação de síntese e fracionamento em simultâneo foi realizada com  $10 \text{ U.mL}^{-1}$  de enzima e  $150 \text{ g.L}^{-1}$  de lactose a  $40^\circ\text{C}$ . O efeito da pressão (20 e 24 bar) e da velocidade de circulação ( $1.7$ ;  $2.0$  e  $2.4 \text{ m.s}^{-1}$ ) foram estudados e a quantificação dos açúcares foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O rendimento da reação e fracionamento em simultâneo foi de 60%, quando comparado com o rendimento da reação nas mesmas condições, mas sem permeação. Os coeficientes de rejeição foram distintos de acordo com as condições operacionais, sendo os monossacarídeos mais afetados que apresentaram rejeição de 40%, a 20 bar e 12% a 24 bar. A baixa rejeição dos monossacarídeos no meio reacional tem um papel fundamental na qualidade do produto final e na reação de hidrólise e síntese, uma vez que a sua presença inibe a atividade enzimática. Os GOS-4 foram totalmente retidos pela membrana e os GOS-3 apresentaram  $R_{obs}$  em torno de 90%. Entre os dissacarídeos lactose, GOS-2 e GOS-2', os valores de  $R_{obs}$  variaram de 41% a 84% de acordo com as condições operacionais utilizadas na filtração. Como esperado, a adsorção da enzima na membrana afeta o transporte dos sacarídeos através de sua estrutura, resultando em menor taxa de permeação.

**Palavras-chave:** reatores de membrana, hidrólise da lactose, síntese de oligossacarídeos, fracionamento de sacarídeos.



## ABSTRACT

The process of cheese whey ultrafiltration for recovery and concentration of whey proteins represents an important step in this byproduct use. However, the commercial interest is on the fraction retained by the membrane and, the permeate rich in lactose and minerals, still represents an environmental problem, because lactose is the main responsible for the high values of biological oxygen demand. Thus, processes focused on the utilization of lactose from whey must be investigated and implemented. This work aimed to study the conversion of lactose by the enzyme  $\beta$ -galactosidase. Both hydrolysis and synthesis of galacto-oligosaccharides (GOS) were studied in reactors with different configurations. For lactose hydrolysis, PVDF and PES ultrafiltration membranes were used and for GOS synthesis were used cellulose acetate nanofiltration membranes. The hydrolysis of lactose was studied using cheese whey permeate, previously heat-treated ( $80^{\circ}\text{C}/20\text{min}$ ) for removal of residual protein fraction. The rate of hydrolysis was quantified by the amount of glucose released measured by an enzymatic colorimetric kit. The effect of this protein fraction on the analytical method was also evaluated and the amount of glucose measured was underestimated until 50% when the protein fraction was present, regardless the amount added. The highest hydrolysis rates were obtained when  $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  enzyme was used in dead-end (95%) and crossflow (78%) filtration. The adsorption of enzyme onto the membrane, which showed a residual activity, was confirmed by FTIR. The synthesis of GOS was studied using solutions of highly concentrated lactose. First, the synthesis and fractionation of GOS were studied separately. The enzyme was immobilized on Duolite A-568 resin. The greater the amount of enzyme used in immobilization, the greater amount of protein loaded, but with greater activity losses and higher amount of protein desorbed. The enzyme concentration of  $10\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  was selected in discontinuous reactions and implemented in continuous reactions, using  $150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  lactose solution concentration at  $40^{\circ}\text{C}$ . The total concentration influences both GOS synthesis and fractionation. The higher the initial lactose concentration, the greater the amount of GOS synthesized. Mixtures of sugars obtained from these reactions were fractionated using cellulose acetate membranes prepared by phase inversion method. The sugars rejection



## ABSTRACT - Continuation

coefficients ( $R_{obs}$ ) increased with effective pressure increasing and decreased with concentration increasing. For the smallest applied pressure, the obtained  $R_{obs}$  values were 40% for mono-, 65-80% for disaccharides and 100% for the trisaccharides. The reaction of synthesis and fractionation was performed simultaneously with  $10 \text{ U.mL}^{-1}$  enzyme and  $150 \text{ g.L}^{-1}$  of lactose at  $40^\circ\text{C}$ . The effect of pressure (20 and 24 bar) and velocity ( $1.7, 2.0$  and  $2.4 \text{ m.s}^{-1}$ ) were studied and quantification of sugars was performed by HPLC. The reaction and simultaneous fractionation yield was 60% higher when compared with reaction yield under the same conditions, but without permeation. The saccharides  $R_{obs}$  changed according to operating conditions; the mono- and disaccharides were the most affected ones. Monosaccharides, which had  $R_{obs}$  around 40% at 20 bar, when the pressure increased to 24 bar, these values decreased to 12%. The low retention of monosaccharides plays an important role in the quality of the final product and in the reaction of hydrolysis and synthesis, since they inhibit the enzyme activity. The GOS-4 were completely retained by the membrane and the GOS-3 showed  $R_{obs}$  around 90%. Among the disaccharides, lactose, GOS-2 and GOS-2', the values of  $R_{obs}$  ranged from 41% to 84% according to operating conditions. The adsorption of the enzyme in the membrane affects the saccharides transport through their structure.

**Keywords:** membrane reactor, lactose hydrolysis, synthesis of oligosaccharides, saccharides fractionation.



## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>51</b>
---	-----------

### CAPÍTULO II – OBJETIVOS

<b>1 Objetivo Geral.....</b>	<b>57</b>
<b>2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>57</b>
2.1 SÍNTESE DE OLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO-SE ENZIMA IMOBILIZADA .....	57
2.2 FRACIONAMENTO DE SOLUÇÕES CONTENDO OLIGOSSACARÍDEOS.....	57
2.3 SÍNTESE E FRACIONAMENTO SIMULTÂNEO DE SOLUÇÕES CONTENDO OLIGOSSACARÍDEOS.....	58
2.4 HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	58

### CAPÍTULO III– REVISÃO IBLIOGRÁFICA

<b>1 Soro de Queijo.....</b>	<b>61</b>
<b>2 Lactose .....</b>	<b>65</b>
2.1 INTOLERÂNCIA À LACTOSE .....	66
2.2 HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	67
<b>3 Oligossacarídeos.....</b>	<b>73</b>
3.1 CINÉTICA DA REAÇÃO .....	77
3.2 PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	80
3.3 SEPARAÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS .....	81
3.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS E APLICAÇÕES .....	82
<b>4 Processos de Separação com Membranas.....</b>	<b>85</b>
4.1 CLASSIFICAÇÃO DOS PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS .....	87
4.2 FUNDAMENTOS DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO .....	88
4.3 ULTRAFILTRAÇÃO E A CONVERSÃO DA LACTOSE.....	92
4.4 NANOFILTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS.....	96
4.5 FATORES QUE AFETAM A NANOFILTRAÇÃO .....	98



## SUMÁRIO - Continuação

### CAPÍTULO IV –MATERIAIS E MÉTODOS

<b>1 Síntese de oligossacarídeos utilizando-se enzima imobilizada.....</b>	<b>103</b>
1.1 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA .....	103
1.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	103
1.3 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA.....	104
1.4 SÍNTESE DE OLIGOSSACARÍDEOS.....	104
1.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES.....	105
<b>2 Fracionamento de oligossacarídeos por nanofiltração.....</b>	<b>107</b>
2.1 UNIDADE DE FILTRAÇÃO.....	107
2.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS .....	108
2.3 FRACIONAMENTO DOS OLIGOSSACARÍDEOS.....	110
<b>3 Síntese e fracionamento simultâneo de oligossacarídeos .....</b>	<b>111</b>
3.1 UNIDADE DE FILTRAÇÃO .....	111
3.2 REAÇÃO E FRACIONAMENTO .....	111
3.3 CÁLCULO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA .....	112
<b>4 Hidrólise da lactose presente no soro de queijo.....</b>	<b>115</b>
4.1 ENZIMA .....	115
4.2 SUBSTRATO.....	115
4.3 MEMBRANAS .....	116
4.4 RETENÇÃO DA ENZIMA .....	116
4.5 UNIDADES DE FILTRAÇÃO.....	117
4.5.1 Filtração com Fluxo Perpendicular .....	117
4.5.2 Filtração com Fluxo Tangencial.....	118
4.6 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE E DO PERCENTUAL DE HIDRÓLISE... 118	
4.6.1 Análise das Amostras .....	119
4.7 EFEITO PROTEÍNA RESIDUAL NA DETERMINAÇÃO DA GLICOSE..... 120	
4.8 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA TAXA DE HIDRÓLISE 121	
4.9 ESTABILIDADE DA ENZIMA.....	122
4.10 INTERAÇÃO ENZIMA-MEMBRANA .....	123
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>125</b>



## SUMÁRIO - Continuação

### CAPÍTULO V – ARTIGOS PREPARADOS PARA PUBLICAÇÃO

#### Artigo 1 - Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration of galacto-oligosacarídeos

<b>Abstract</b> .....	<b>149</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>151</b>
<b>2 Materials and methods</b> .....	<b>153</b>
2.1. BIOLOGICAL AND CHEMICAL MATERIALS.....	153
2.2. CHEMICAL ANALYSIS .....	153
2.2.1. Salts Analysis.....	153
2.2.2. Protein Analysis .....	153
2.2.3. Sugars analysis .....	154
2.3. ENZYME IMMOBILIZATION.....	154
2.4. ENZYME ACTIVITY ASSAY .....	155
2.5. OLIGOSACCHARIDES SYNTHESIS .....	155
2.6. MEMBRANE PREPARATION AND CHARACTERIZATION .....	155
2.7. OLIGOSACCHARIDES FRACTIONATION .....	157
<b>3 Results and discussion</b> .....	<b>159</b>
3.1 ENZYME IMMOBILIZATION .....	159
3.2. OLIGOSACCHARIDES SYNTHESIS .....	160
3.2.1. Batch Operation Mode .....	160
3.2.2. Continuous Operation Mode .....	163
3.3. MEMBRANE CHARACTERIZATION .....	166
3.4. OLIGOSACCHARIDES FRACTIONATION .....	168
<b>4 Conclusion</b> .....	<b>173</b>
<b>Acknowledgements</b> .....	<b>175</b>
<b>References</b> .....	<b>177</b>

#### Artigo 2 - Simultaneous synthesis and fractionation of oligosaccharides in a membrane bioreactor

<b>Abstract</b> .....	<b>183</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>185</b>



## SUMÁRIO - Conclusão

<b>2 Materials and methods</b> .....	<b>187</b>
2.1 BIOLOGICAL AND CHEMICAL MATERIALS .....	187
2.2 ENZYME ACTIVITY ASSAY .....	187
2.3 MEMBRANES .....	187
2.4 MEMBRANE BIOREACTOR .....	188
2.5 OLIGOSACCHARIDES SYNTHESIS .....	188
2.6 MEMBRANE RESISTANCE .....	189
2.7 PROTEIN ANALYSIS .....	190
2.8 SUGARS ANALYSIS .....	190
<b>3 Results and discussion</b> .....	<b>193</b>
<b>4 Conclusions</b> .....	<b>205</b>
<b>Acknowledgments</b> .....	<b>207</b>
<b>References</b> .....	<b>209</b>
<b>Artigo 3 – Lactose hydrolysis in whey permeate on membrane bioreactor – serum proteins interference during glucose determination and enzyme-membrane interactions</b>	
<b>1 Introduction</b> .....	<b>217</b>
<b>2 Material and methods</b> .....	<b>219</b>
2.1 CHEMICAL AND BIOLOGICAL REAGENTS .....	219
2.2 SUBSTRATE .....	219
2.3 MEMBRANES .....	220
2.4 MEMBRANES REACTORS .....	220
2.4.1 Dead-end filtration .....	220
2.4.2 Crossflow filtration .....	221
2.5 EFFECTS OF RESIDUAL PROTEIN ON GLUCOSE DETERMINATION .....	221
2.6 EFFECTS OF ENZYME CONCENTRATION .....	221
2.7 ENZYME ADSORPTION ON THE MEMBRANE .....	222
2.8 ENZYME STABILITY .....	223
<b>3 Results and discussion</b> .....	<b>225</b>
3.1 EFFECTS OF PROTEIN ON GLUCOSE DETERMINATION .....	225
3.2 EFFECTS OF PROTEIN ON LACTOSE HYDROLYSIS .....	228
3.3 EFFECTS OF ENZYME CONCENTRATION ON LACTOSE HYDROLYSIS .....	229
3.4 ENZYME ADSORPTION ON THE MEMBRANE .....	233
<b>4 Conclusion</b> .....	<b>237</b>
<b>References</b> .....	<b>239</b>
<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b> .....	<b>243</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação gráfica a síntese de oligossacarídeos e/ou hidrólise enzimática da lactose (NU: aceptor nucleofílico, E: enzima).....	78
Figura 2 - Características dos processos de separação por membranas que utilizam a diferença de pressão como força motriz. ....	87
Figura 3 – Diferença entre os processos de filtração tangencial e filtração estática. ....	89
Figura 4 - Perfil de concentração de soluto retido na fase fluída adjacente à membrana no estado estacionário ( $C_{ab}$ , $C_{am}$ e $C_{ap}$ são as concentrações de soluto, na alimentação, à superfície da membrana e no permeado, respectivamente, $J_p$ é o fluxo de permeado e $\delta$ é a espessura de uma camada sub-laminar onde se desenvolve este perfil de concentrações de soluto).....	91
Figura 5 - Aplicações da microfiltração (MF), ultrafiltração (UF) e diafiltração (DF) na padronização e fracionamento das proteínas do leite (HE, hidrólise enzimática; T, temperatura).....	93
Figura 6 - Reator utilizado para síntese de oligossacarídeos.....	105
Figura 7 - Reator de membrana utilizado para fracionamento da mistura de mono-, di- e oligossacarídeos.....	107
Figura 8 – Unidade de filtração Celfa P-28 utilizada para a síntese e fracionamento simultâneo de oligossacarídeos. ....	111
Figura 9 - Desenho esquemático da célula de ultrafiltração de bancada com fluxo perpendicular. ....	117
Figura 10 - Desenho esquemático do equipamento de ultrafiltração com fluxo tangencial.....	118
Figura 11 – Ensaios realizados para estudar o efeito das proteínas na hidrólise do permeado.....	121



## LISTA DE FIGURAS - Continuação

### ARTIGO I

Figure 1. Adsorption isotherm of  $\beta$ -galactosidase immobilized on Duolite A-568 at 25°C (symbols:  $\blacklozenge$  experimental data; ----- Langmuir model). 159

Figura 2 - HPLC chromatogram of a sample of the reaction medium at 40 minutes of batch reaction for the 150 g.L<sup>-1</sup> lactose solution processed with 10 U.mL<sup>-1</sup> of  $\beta$ -galactosidase. .... 161

Figure 3 - Lactose conversion by immobilized  $\beta$ -galactosidase in batch mode at 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, 40°C, pH 6.5 (Symbols:  $\blacksquare$ ,  $\square$  monosaccharides;  $\blacktriangle$ ,  $\triangle$  GOS;  $\blacklozenge$ ,  $\lozenge$  lactose; black symbol for enzyme concentration of 10 U.mL<sup>-1</sup> and open symbol for 28 U.mL<sup>-1</sup> of enzyme concentration). .... 162

Figure 4 - Lactose conversion by immobilized  $\beta$ -galactosidase in batch mode at 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, 10 U.mL<sup>-1</sup> enzyme concentration, 40°C, pH 6.5. (Symbols:  $\blacktriangle$  GOS-3,  $\bullet$  GOS -2 and  $\circ$  GOS -2', possibly allolactose). .... 16364

Figure 5 - Lactose conversion by immobilized  $\beta$ -galactosidase in continuous mode at: 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, 10 U.mL<sup>-1</sup> enzyme concentration, residence time of 30 min, 40°C, pH 6.5 (Symbols:  $\blacksquare$  monosaccharides;  $\blacktriangle$  GOS;  $\blacklozenge$  lactose). .... 164

Figure 6 - Residence time and total sugars concentration effects on total GOS synthesis in continuous bioreactor (Symbols for total sugar concentrations:  $\bullet$ /light background – 150 g.L<sup>-1</sup>;  $\delta$ /dark background – 300 g.L<sup>-1</sup>). .... 165

Figure 7 - Evolution of permeate flux with effective transmembrane pressure at 40°C. (Symbols:  $\lozenge$  water,  $\square$  buffer,  $\triangle$  GOS mixture 150 g.L<sup>-1</sup>, x GOS mixture 300 g.L<sup>-1</sup>). .... 167

Figure 8 - NF fractionation of sugars mixture obtained from continuous gos synthesis using an initial lactose concentration of 150 g.L<sup>-1</sup>, at 25°C (Symbols:  $\blacktriangle$  GOS -3,  $\bullet$  GOS -2,  $\blacklozenge$  lactose,  $\square$  glucose, x galactose). ... 16969



## LISTA DE FIGURAS - Continuação

Figure 9: NF fractionation of sugars mixture obtained from continuous gos synthesis using an initial lactose concentration of 150 g.L<sup>-1</sup>, on the left, and 300 g.L<sup>-1</sup>, on the right, at 40°C (Symbols: ▲ GOS -3, ● GOS -2, ◆ lactose, □ glucose, x galactose)..... 170

### ARTIGO II

Figure 1. Evolution of permeate flux with effective transmembrane pressure at 40°C (Symbols: ■ CA and ▲ CA-77.5)..... 193

Figure 2. Lactose conversion by β-galactosidase in batch mode at 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, 40°C, pH 6.5 (Symbols: ■ monosaccharides, ◆ lactose, ▲ GOS, ● enzyme concentration). ..... 194

Figure 3. Permeate flux evolution and  $R_{obs}$  along the reaction time. (Symbols: ■ monosaccharides, ◆ lactose, ▲ GOS and ● permeate flux). 195

Figure 4 - Lactose conversion by β-galactosidase at 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, 40°C, pH 6.5, 20 bar and 1.7 m.s<sup>-1</sup> (Symbols: ■ monosaccharides, ◆ lactose, ▲ GOS and ● permeate flux). ..... 196

Figure 5. Rejections coefficients observed during gos synthesis and fractionation at 150 g.L initial lactose concentration, 40°C, pH 6.5, 20 bar and 1.7 m.s<sup>-1</sup> (Symbols: ● GOS -3, ◇ GOS -2, ▲ GOS -2, ◆ lactose, □ glucose, ■ galactose)..... 197

Figure 6. - Lactose conversion by β-galactosidase at 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, 40°C, pH 6.5, at 20 bar (a; b) and 24 bar (c; d) and different crossflow velocities..... 198

Figure 7. Rejections coefficients observed during gos synthesis and fractionation at 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, 40°C, pH 6.5, at different pressures and crossflow velocities (first group of each division – 20 bar; second group of each division – 24 bar) ..... 200

Figure 8. Resistances of the membrane at different crossflow velocities ( $R_m$ : membrane resistance;  $R_m'$ : modified membrane resistance;  $R_{st}$ : resistance of strongly attached material;  $R_{wk}$ : resistance of weakly attached material).. 201



## LISTA DE FIGURAS - Conclusão

Figure 9. Permeate flux evolution along the gos synthesis and fractionation at different pressures and velocities. .... 203

### ARTIGO III

Figure 1 – Effect of protein addition on glucose standard solutions (on the left: 1 g.L<sup>-1</sup>; on the right: 4 g.L<sup>-1</sup>)..... 226

Figure 2 - Effect of different amounts of protein on 15 g.L<sup>-1</sup> glucose standard solutions..... 227

Figure 3 – Possible sites of interference in the glucose oxidase-peroxidase-o-dianisidine system (sites of interference are indicated by Arabic numerals)..... 228

Figure 4. Hydrolysis rate measured on the presence of different amounts of protein and without protein addition (open symbol: no protein; closed symbol: with protein)..... 228

Figure 5. Effect of enzyme concentration on pwp hydrolysis carried out in glass flasks at 35°C and pH 6.8..... 229

Figure 6. Effect of Maxilact concentration on PTW hydrolysis rate on dead-end filtration (on the left) and PWP hydrolysis rate carried out in crossflow filtration (on the right), at 35°C and pH 6.8..... 230

Figure 7 – Permeate flux evolution along the time (Symbols: ▲, crossflow filtration; ■ dead-end filtration). .... 232

Figure 8 – Enzyme stability along PWP hydrolysis at 35°C, 2 bar and 0.2 g.L<sup>-1</sup> of enzyme concentration. Every 90 minutes the cell was opened and filled with new PWP ..... 233

Figure 9. FTIR spectra of new membrane, one immersed on enzyme solution and one used during pwp hydrolysis reaction for two hours with 0.2 g. L<sup>-1</sup> of enzyme, 2 bar and 35°C..... 234



## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Características das principais proteínas do soro de queijo.....	63
Tabela 2 – Oligossacarídeos comerciais disponíveis no mercado mundial.	75
Tabela 3 – Estruturas de alguns oligossacarídeos formados durante a ação da $\beta$ -galactosidase sobre a lactose.....	79
Tabela 4 – Faixa de pressões e fluxos de permeação nos processos de separação que utilizam gradiente de pressão como força matriz.....	88

### ARTIGO I

Table 1. Adsorption data of $\beta$ -galactosidase immobilization on Duolite A 568 .....	160
Table 2. Permeate fluxes, $J_v$ , and solute retentions coefficients, $R_{obs}$ , for CA, CA-77.5 and CA-80 membranes at 25°C <sup>a</sup> .....	166
Table 3. Osmotic pressures estimated using the van't Hoff equation <sup>a</sup> . ....	168

### ARTIGO II

Table 1 – Casting solutions and conditions used to prepare the membranes. ....	188
Table 2. Permeate fluxes, $J_v$ , and solute retentions coefficients, $R_{obs}$ , for CA and CA-77.5 membranes at 25°C <sup>a</sup> .....	193
Table 3 – Feed tank composition after 120 minutes of reaction and fractionation at different crossflow velocities and pressures. ....	199



## LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

- $\alpha$  - Grau de dissociação de uma molécula de soluto  
 $b$  - Quantidade máxima de enzima adsorvida (mg.mg resina<sup>-1</sup>)  
 $C$  - Concentração de enzima na fase aquosa (mg.mL<sup>-1</sup>)  
 $C_a$  - Concentração de soluto na alimentação  
CA - Membrana de acetato de celulose  
CA-77,5 - Membrana de acetato de celulose tratada termicamente a 77,5°C  
CA-80 - Membrana de acetato de celulose tratada termicamente a 80°C  
 $C_{Ab}$  - Concentração de soluto na alimentação  
 $C_{Am}$  - Concentração de soluto à superfície da membrana  
 $C_{Ap}$  - Concentração de soluto na alimentação no permeado  
 $C_g$  - Quantidade de glicose medida na amostra  
 $C_{gr}$  - Quantidade de glicose que seria formada considerando-se a hidrólise total da lactose presente no substrato  
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência  
COD - *Chemical oxygen demand*, em português: demanda química de oxigênio (mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>)  
 $C_p$  - Concentração de soluto no permeado (g.L<sup>-1</sup>)  
 $D_{AB}$  - Difusividade do soluto A em solução a diluição infinita  
 $-D_{AB}*(\partial C_A/\partial x)$  - Fluxo difusivo de soluto da superfície da membrana para o seio da alimentação  
DBO - Demanda bioquímica de oxigênio (mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>)  
DF - Diafiltração  
DMF - N-N-Dimetilformamida  
 $\Delta M$  - Diferença de molaridade entre a alimentação e o permeado  
 $\Delta\pi$  - Diferença de pressão osmótica entre os dois lados da membrana  
 $\Delta P$  - Diferença de pressão aplicada entre os dois lados da membrana  
FOS - Fluto-oligossacarídeos  
FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier  
GOD - Enzima glicose oxidase  
GOS - Galacto-oligossacarídeos  
GOS-2 - Galacto-oligodissacarídeo  
GOS-3 - Galacto-oligotrissacarídeo  
GOS-4 - Galacto-oligotetrassacarídeo



## LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS- Continuação

HE - Hidrólise enzimática

HPLC - *High performance liquide chromatography*, em português: cromatografia líquida de alta eficiência

$i$  - Fator de van't Hoff

IC - Índice de colmatagem

$j$  - Número de solutos em solução

$J_b, J_v$  - Fluxo de permeação ( $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )

$J_p * C_A$  - Fluxo convectivo de soluto em direção à membrana

$J_{rm}$  - Fluxo de permeação da mistura reacional ( $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )

$J_w$  - Fluxo de permeação de água ( $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )

$J_{w'}$  - Fluxo de permeação de água depois da reação ( $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )

JSTR - *Jacketed stirred-tank reactor*, em português: reator de tanque agitado encamisado

$k$  - Constante de equilíbrio de Langmuir

$L_p$  - Permeabilidade hidráulica ( $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$ )

$\mu$  - Viscosidade (Pa.s)

MF - Microfiltração

MWCO – *Molecular weight cut-off* – ponto de corte da membrana

NF - Nanofiltração

NLU - *Neutral Lactose Units* – Unidade de atividade enzimática

OI - Osmose inversa

POD - Enzima peroxidase

PTW - Permeado obtido da ultrafiltração do soro de queijo pré-tratado (filtrado após congelamento)

PWP - Permeado obtido da ultrafiltração do soro de queijo sem proteína

$q$  - Número de espécies produzidas durante a dissociação por molécula de soluto

$R$  - Constante dos gases perfeitos

$R_{obs}$  - Coeficiente de rejeição observado (%)

RHFB - *Recirculation hollow-fibre bioreactor*, em português: reator de membrana de fibra oca com recirculação

$R_m$  - Resistência da membrana ( $\text{m}^{-1}$ )

$R_{st}$  - Resistência conferida pelo material fortemente aderido à superfície da membrana ( $\text{m}^{-1}$ )

$R_t$  - Resistência total ( $\text{m}^{-1}$ )

RT - Tempo de residência (min)

$R_{wk}$  - Resistência conferida pelo material fracamente aderido à superfície da membrana ( $\text{m}^{-1}$ )



## **LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS- Conclusão**

$\delta$  - Espessura da camada sub-laminar onde se desenvolve o perfil de concentrações de soluto

SCF - *Scientific Committee on Food*, em português: comissão científica para alimentos

T - Temperatura absoluta

U - Unidade de atividade enzimática

W - Quantidade de enzima adsorvida no suporte (mg.mg resina<sup>-1</sup>)



## **ESTRUTURA DA TESE**

Esta tese está estruturada em seis capítulos. No Capítulo I são apresentadas a introdução e justificativa do trabalho. No Capítulo II estão estabelecidos os objetivos, e no Capítulo III apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre os assuntos abordados. No Capítulo IV são apresentados os materiais e métodos. No Capítulo V são apresentados os resultados obtidos através de três artigos. O trabalho desenvolvido em Portugal foi sintetizado nos dois primeiros artigos, e o último é referente ao período inicial, desenvolvido na UFSC. Finalmente, no Capítulo VI é apresentada a conclusão geral do trabalho.



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUÇÃO**



## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na fabricação dos diferentes tipos de queijo, o soro é gerado como subproduto. Este produto é composto basicamente por água, proteínas, lactose, minerais, vitaminas e lipídios. Graças ao advento de novas tecnologias, como os processos de separação por membranas, o soro passou de subproduto com alto grau de impacto ambiental à matéria-prima. O uso de membranas, já bem estabelecido no processamento de soro lácteo, vem ganhando popularidade em outras aplicações na indústria láctea (DAUFIN, 2001).

Nos últimos dez anos a produção nacional de leite cresceu 33%, sendo o Brasil, atualmente, o sexto maior produtor de leite de vaca do mundo. De acordo com estudos realizados sobre o setor leiteiro, a produção de leite no Brasil era de 24,5 bilhões de litros em 2005 e a previsão é atingir 38 bilhões em 2020, com a produção nacional centrada principalmente nas regiões sul e sudeste (MDA, 2009).

A produção de queijos também se encontra em expansão, crescendo em média 4% ao ano. Em 2005, a produção nacional de queijos por estabelecimentos sob Inspeção Federal foi de 545 mil toneladas (ABIQ, 2006). Se considerarmos que para cada dez quilos de queijo são gerados entre 85 e 90 litros de soro, o Brasil deve produzir hoje cerca de 4,5 bilhões de litros de soro por ano. Só no estado de Minas Gerais são produzidos 3,7 bilhões de litros (SEAPA/MG, 2007). Apesar disso, somente dos Estados Unidos foram importadas, nos últimos 5 anos, em média 4,5 mil toneladas de soro por ano (categorias incluídas: soro em pó, concentrado protéico, proteínas do soro modificadas e albumina do leite).

Em 2009, até o mês de outubro, foram gastos aproximadamente 5 milhões de dólares na importação de 2.800 toneladas de soro (USDEC, 2009a e 2009b).

O processo de ultrafiltração do soro de queijo, para a recuperação e concentração de suas proteínas, representa um importante avanço na utilização desde subproduto. Entretanto, como o interesse comercial está na fração retida pela membrana, o permeado que é composto basicamente por lactose e sais minerais, ainda representa um problema ambiental, pois a lactose, que permanece no mesmo, é a principal responsável pelos altos valores da demanda biológica de oxigênio, DBO, que varia de 30.000 a 50.000 mg.L<sup>-1</sup> (GONSALEZ-SISO, 1996).

Além de ser viável a obtenção de lactose a partir do soro lácteo, a sua hidrólise também pode fornecer produtos de grande interesse comercial. A enzima  $\beta$ -D-galactosidase, que catalisa a reação de

hidrólise da lactose, pode também catalisar reações de transgalactosilação. A reação de hidrólise é favorecida em soluções aquosas, mas o equilíbrio da reação pode ser deslocado para a reação de transgalactosilação, responsável pela síntese dos galacto-oligossacarídeos (GOS), alterando-se as condições operacionais, principalmente aumentando-se a concentração inicial de lactose para valores superiores a  $150 \text{ g.L}^{-1}$  (RUSTOM, FODA e LÓPEZ-LEIVA, 1998).

As reações de hidrólise da lactose apresentam vantagens tecnológicas, pois se obtêm um produto com maior poder adoçante, maior solubilidade, e menor ponto de congelamento entre outras (NOVALIN, NEUHAUS e KULBE, 2005) enquanto a reação de transgalactosilação representa um passo importante em direção a uma tendência mundial, que são os alimentos funcionais. Os GOS são carboidratos prebióticos que têm revolucionado a indústria alimentícia e refletem as mudanças dos hábitos alimentares do público consumidor. Nas reações de síntese enzimática de GOS, ainda que no início a reação a transgalactosilação seja favorecida, dada às altas concentrações de lactose inicial, a reação de hidrólise vai se tornando dominante na medida em que a lactose é consumida, hidrolisando inclusive os GOS, previamente sintetizados. Outro aspecto importante a ser considerado é a inibição da enzima pelos monossacarídeos formados (RUSTOM *et al.*, 1998).

Neste aspecto, os reatores de membrana merecem destaque, pois a remoção dos produtos de reação do meio pode aumentar as taxas de conversão do substrato (RUSTOM *et al.*, 1998; GIORNO e DRIOLI, 2000), além de prevenir a hidrólise dos GOS sintetizados (CHEN, HSU e CHIANG, 2002). Outra vantagem dos reatores de membrana é a possibilidade de se explorar ao máximo as propriedades cinéticas da enzima, pois a mesma se encontra na forma livre (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005). A hidrólise da lactose em reatores de membranas de ultrafiltração, com diferentes configurações, tem sido reportada por alguns autores. Nestes trabalhos, a função da membrana é simplesmente reter a enzima e não fracionar os produtos formados (CZERMAK *et al.*, 2004; NOVALIN *et al.*, 2005).

O processo de nanofiltração pode ser uma alternativa aos dispendiosos processos cromatográficos de separação de açúcares e já foi utilizado para purificar ou concentrar oligossacarídeos de extratos de chicória (MATSUBARA *et al.*, 1996; KAMADA *et al.*, 2002), cascas de arroz (VEGAS *et al.*, 2008), xaropes comerciais de galacto- e fruto-oligossacarídeos (GOULAS *et al.*, 2002; LI, *et al.*, 2004), leite de cabra

(MARTÍNEZ-FERREZ *et al.*, 2006) e até mesmo do leite humano (SARNEY *et al.*, 2000). Entretanto, não há até o momento nenhum trabalho publicado onde a síntese com a enzima livre e o fracionamento ocorra de forma simultânea.

Desta forma, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de utilizar a lactose, presente no soro de queijo, como matéria-prima para a síntese de produtos de alto valor agregado, aliando-se a biotecnologia aos processos de separação por membranas, em uma única etapa. A investigação do processo integrado foi realizada na Universidade Técnica de Lisboa – Portugal. Estudos preliminares foram feitos no Brasil onde outros aspectos foram avaliados.



## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**



## 1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi associar o processo de separação por membranas à biotecnologia, desenvolvendo processos que valorizem o soro de queijo como fonte de lactose e através da hidrólise deste dissacarídeo, obter mono- e oligossacarídeos. Assim, a síntese de oligossacarídeos através da  $\beta$ -galactosidase e o fracionamento simultâneo em reatores com membranas de nanofiltração foram estudados.

## 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 2.1 SÍNTESE DE OLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO-SE ENZIMA IMOBILIZADA

- Estudar as taxas de adsorção da enzima  $\beta$ -galactosidase em resina em função das concentrações iniciais de enzima dissolvida em solução;
- Determinar a atividade específica da enzima imobilizada;
- Identificar a melhor concentração de enzima imobilizada a ser utilizada para sintetizar os oligossacarídeos em reator operando em modo descontínuo;
- Investigar os melhores tempos de residência para favorecer a síntese de oligossacarídeos em reator operando em modo contínuo;
- Testar o efeito da concentração de lactose inicial na síntese de oligossacarídeos em reator operando de modo contínuo.

### 2.2 FRACIONAMENTO DE SOLUÇÕES CONTENDO OLIGOSSACARÍDEOS

- Preparar e caracterizar membranas poliméricas de nanofiltração capazes de fracionar compostos com massa molar compreendida entre 180 a 500 g.mol<sup>-1</sup>;
- Estudar o efeito da concentração, pressão e temperatura da solução de alimentação, no fracionamento dos oligossacarídeos;

### 2.3 SÍNTESE E FRACIONAMENTO SIMULTÂNEO DE SOLUÇÕES CONTENDO OLIGOSSACARÍDEOS

- Preparar e caracterizar membranas poliméricas de nanofiltração capazes de fracionar compostos com massa molar compreendida entre 180 a 500 g.mol<sup>-1</sup>;
- Estudar o efeito da pressão transmembrana e da velocidade tangencial na síntese e fracionamento dos oligossacarídeos;

### 2.4 HIDRÓLISE DA LACTOSE

- Preparar e caracterizar membranas poliméricas de ultrafiltração capazes de reter a enzima  $\beta$ -galactosidase;
- Estudar o efeito da concentração de enzima nas taxas de hidrólise em reatores de membrana com diferentes configurações;
- Estudar o efeito das interações entre a enzima e as membranas poliméricas nas taxas de hidrólise e nos fluxos permeados;
- Estudar o efeito das proteínas presentes no permeado do soro ultrafiltrado, sobre as taxas de hidrólise e no método analítico empregado para quantificar a glicose liberada pela reação de hidrólise.

## **CAPÍTULO III**

# **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1 SORO DE QUEIJO

O soro é a fase aquosa que se separa da coalhada, no processo de fabricação de queijos, ou da caseína, geralmente obtida por acidificação ou por coagulação enzimática, utilizando-se a renina. O soro, que representa cerca de 85 a 90% do volume total de leite empregado na produção de queijos, contém lactose (44 a 52 g.L<sup>-1</sup>), proteínas (6 a 8 g.L<sup>-1</sup>), sais minerais (4 a 9 g.L<sup>-1</sup>) e lipídios (GONZALEZ-SISO, 1996; HOSSEINI, SHOJAOSADATI e TOWFIGHI, 2003).

A composição do soro é variável, sendo função da natureza do leite e do processo que lhe deu origem, além das perdas que ocorrem durante a fabricação do queijo. Quando o processo de coagulação da caseína se dá por acidificação do leite, como ocorre na produção de queijos tipo *cottage*, *quark*, requeijão e ricota, o soro é denominado ácido, pois apresenta um pH final em torno de 4,7. Quando a coagulação da caseína se dá pela ação de enzimas, o soro gerado, apresentando um pH entre 6,3 e 6,7 (SGARBIERI, 1996) é denominado doce. Através deste último processo, são fabricados queijos tipo *cheddar*, minas frescal, minas padrão, mussarela, prato e suíço. A concentração de sais minerais varia entre os dois tipos de soro. Quanto maior a acidez, maior a quantidade de cálcio dissolvido no soro, pois a quantidade de cálcio retido pela caseína é menor. O soro doce apresenta ainda maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres resultantes da ação da enzima sobre as caseínas (LUQUET, 1993; GIROTO, 2001).

O soro de queijo, que na Idade Média raramente era utilizado para alimentação humana, foi muito utilizado como componente de unguentos para queimaduras, como bálsamo para pele ou como porção neutralizante para cabelos (KOSIKOWSKI, 1979). O seu uso foi evidenciado em meados do século XIX, na Europa Ocidental, com a criação de mais de 400 das denominadas “casas de soro”. Por volta de 1940, na Europa Central, foi utilizado no tratamento de diversas doenças como dispepsia, uremia, gota, anemia, artrite, doenças hepáticas e até tuberculose, com doses de ingestão recomendadas de cerca de 1.500 g.dia<sup>-1</sup> de soro (HOLSINGER, POSATI e DEVILBISS, 1974).

Os estudos sobre o aproveitamento racional do soro se iniciaram na década de 1960, quando as indústrias começaram a enfrentar problemas para adequar o resíduo industrial às exigências dos órgãos de inspeção e saúde pública (KOSIKOWSKI, 1967; ZIMMER, 2006). Hoje, o soro é utilizado como fonte de proteínas para fabricação de suplementos protéicos em diversos países da Europa e Estado Unidos, onde o aproveitamento deste produto pode chegar a 100% (BIEGER e

LIMA, 2008). Na Comunidade Européia, aproximadamente 45% do soro gerado têm sido utilizados na forma líquida, 30% na forma de soro de leite em pó, 15% como lactose e subprodutos desta, e os 10% restantes, na produção de proteína concentrada em pó (GIROTO e PAWLOWSKY, 2001).

No Brasil, ainda estamos distantes desta realidade. Até pouco tempo este produto era visto como um subproduto e embora as indústrias estejam se preocupando cada vez mais em se adequar às legislações ambientais, muitas empresas produtoras de queijo são de pequeno porte, não dispendo de meios econômicos ou tecnológicos para o aproveitamento do soro (ALMEIDA, 2004). O aproveitamento do soro para consumo humano no país iniciou-se industrialmente em 2002, com o lançamento de bebida láctea, produto que contém soro na sua formulação com características semelhantes ao iogurte. Antes, o soro resultante da fabricação de queijo não era aproveitado pelas empresas, sendo descartado ou utilizado para consumo animal (SEAPA/MG, 2007). Contudo, o aproveitamento desse subproduto atinge apenas 15% do total de soro produzido (NEVES, 2001; NAKAMAE, 2004).

O processo de produção do soro em pó é uma alternativa recomendável, sobretudo porque gera economia, emprego e renda e, ao mesmo tempo, ajuda a preservar o meio ambiente. Por isso, o incentivo para a criação de indústrias com esta finalidade é uma das ações do programa Minas Leite, criado pela Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais, em 2005. O programa, que tem por objetivo modernizar a cadeia produtiva da pecuária leiteira, prevê também o desenvolvimento de novos produtos, e a adequação ambiental dos laticínios. Graças a este programa, várias empresas já estão fazendo a secagem do soro (SEAPA/MG, 2007).

O Brasil busca aumentar o processamento do soro para atender a demanda interna do produto em pó, utilizado nas indústrias de bebidas lácteas, panificação, biscoitos, fármacos, rações, entre outras e, conseqüentemente, diminuir a sua necessidade de importação do produto, que corresponde a 60% da demanda nacional, que é de aproximadamente 30 toneladas por ano (BIEGER e LIMA, 2008).

O soro de queijo possui alto valor nutricional, apresentando os atributos dos alimentos funcionais, graças às proteínas e peptídeos que nele se encontram. As principais são  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, duas pequenas proteínas globulares que representam cerca de 70-80% de proteínas de soro total (ZYDNEY, 1998; CHATTERTON *et al.*, 2006; SUÁREZ *et al.*, 2006). A Tabela 01 apresenta as características das principais proteínas do soro de queijo.

**Tabela 01 – Características das principais proteínas do soro de queijo.**

<b>Proteína</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Massa Molar (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>pH do Ponto Isoelétrico</b>
β-Lactoglobulina (monômero)	2,7	18.362	5,2
α-Lactoalbumina	1,2	14.147	4,5-4,8
Imunoglobulinas	0,65	1.500.000-1.000.000	5,5-8,3
Albumida do soro bovino	0,4	69.000	4,7-4,9
Lactoferrina	0,1	78.000	9,0
Lactoperoxidase	0,02	89.000	9,5
Proteoses- peptonas e proteínas menores	1,4	4.100-40.800	3,3-3,7

Fonte: Adaptado de ZYDNEY, 1998 e CAVALLIERI, 2003.

Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro do leite são reconhecidas pelas suas propriedades funcionais tecnológicas como ingredientes em produtos alimentícios, principalmente por sua elevada solubilidade e capacidade de geleificação. Recentemente, têm sido atribuídas às proteínas do soro propriedades funcionais fisiológicas, capazes de produzir um importante controle na modulação do metabolismo e nos mecanismos de defesa dos organismos animal e humano (SGARBIERI e PACHECO, 1999; MICKE, BEEH e BUHL, 2002; ROSANELI *et al.*, 2002).

Dentre as técnicas de separação e isolamento das frações protéicas do soro estão a cromatografia de troca iônica e catiônica, as precipitações seletiva, conjugada ou não com o efeito da temperatura e os promissores processos de separação por membranas (TULLIO, 2007), que preservam a atividade biológica das proteínas, uma vez que o processo pode ser conduzido à baixa temperatura (CHATERTON *et al.*, 2006).

Para a produção comercial de concentrados protéicos, as membranas são amplamente utilizadas (BUTYLINA, LUQUE e NYSTRÖM, 2006). No entanto, a produção de concentrados protéicos a partir do soro de queijo não resolve integralmente o problema ambiental

enfrentado pelas indústrias de laticínios. Conforme comentado anteriormente, o permeado da ultrafiltração do soro ainda contém sais minerais e apreciáveis quantidades de lactose.

O soro de queijo apresenta uma DBO elevada, entre 40 e 60 g.L<sup>-1</sup>, conferida principalmente pela lactose que nele permanece após o processo de coagulação da caseína. A lactose é a principal responsável por estes altos valores de DBO. Estima-se que a lactose seja responsável por 70-90% da DBO do soro de queijo (GHALY e SINGH, 1989; GONZALES-SISO, 1996; BERRUGA, JASPE e SANJOSE, 1997; BUTYLINA *et al.*, 2006).

A busca de novas alternativas para o processamento da lactose, presente tanto no soro de queijo, quanto no permeado da ultrafiltração deste soro, é necessária para que as indústrias possam se adequar às normas impostas pelas legislações ambientais (ALMEIDA, 2004). A não utilização racional do soro resultante da fabricação de queijo na indústria de laticínios constitui hoje, uma prática poluente, antieconômica e até mesmo anti-social face à carência mundial de alimentos (JULIANO, PETRUS e TORRANO, 1987).

## 2 LACTOSE

A lactose, dissacarídeo com massa molar de  $342,3 \text{ g.mol}^{-1}$ , é o principal açúcar presente no leite de mamíferos com concentração de aproximadamente 4,8% (YANG e SILVA, 1995). É sintetizada a partir de glicose e galactose e, em meios ácidos, sofre hidrólise. A lactose apresenta uma baixa solubilidade quando comparada com outros açúcares, o que condiciona a sua aplicação em alimentos, pois em altas concentrações apresenta a tendência de se cristalizar, desenvolvendo textura arenosa e/ou formação de depósitos (CARRARA e RUBIOLO, 1994; YANG e SILVA, 1995). Além disso, a lactose é um açúcar higroscópico, tem uma forte tendência a absorver sabores e odores (CARRARA e RUBIOLO, 1994) e apresenta um baixo poder adoçante, 16%, quando comparado com a sacarose (ZADOW, 1984).

Entretanto, estas características não são todas negativas sob o ponto de vista tecnológico. A capacidade de absorver aromas faz com que a lactose acentue aromas naturais sem os tornar excessivamente doces, por exemplo. O fato de sofrer reação de Maillard confere a cor acastanhada quando utilizada em produtos de panificação. Na indústria alimentícia a lactose é utilizada em diversos produtos como molhos para salada, condimentos, embutidos, formulações infantis, sobremesas, produtos de confeitaria, bebidas instantâneas, sopas e molhos e derivados lácteos entre outros. Além disso, a lactose é amplamente utilizada na indústria farmacêutica como veículo ou excipientes de medicamentos (YANG e SILVA, 1995).

De acordo com Ogrodowski (2006), a aplicação do processo de hidrólise pode ser uma alternativa para justificar uma maior utilização da lactose na indústria e alimentos. Os monossacarídeos resultantes da hidrólise possuem um alto poder adoçante relativo - glicose 74% e galactose 32% (ZADOW, 1984), além de outras características desejáveis. Além da hidrólise, outras reações utilizando a lactose como substrato pode dar origem a diversos produtos como lactosil uréia, lactitol e lactulose (ANDRADE, 2005). A lactose pode ainda ser utilizada como substrato fermentativo e fornecer vários produtos de acordo com o microrganismo utilizado, como por exemplo: etanol, biomassa, acetona, butanol, ácido láctico, lactato de amônio, ácido cítrico, ácido acético, ácido málico, gomas, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, enzimas e metano (POSANO, PINTO e CASTRO-GÓMEZ, 1992).

Existem três métodos gerais para obtenção de lactose a partir de permeado de soro: cristalização da lactose a partir de uma solução super

saturada, precipitação de lactose com metais alcalinos que formam complexos com açúcares e a utilização de alcoóis ou outros solventes que reduzem a solubilidade da lactose provocando a sua precipitação. A cristalização é o método tradicional de obtenção, enquanto que o método de redução da solubilidade não é utilizado comercialmente (YANG e SILVA, 1995).

No método tradicional de obtenção da lactose a partir do soro, após a remoção das proteínas, o soro passa por evaporadores a vácuo, pelo processo de indução da cristalização por semeadura, centrifugação para retirada dos cristais e finalmente por secadores de leite fluidizado até atingirem a consistência de pó (ZANDOW, 1984; BRANDÃO, 1994). Nem toda a lactose presente no permeado de soro pode ser economicamente recuperada por cristalização. Cerca de 20 a 40% do conteúdo original de lactose permanece no permeado juntamente com os sais (YANG e SILVA, 1995). Este material pode ser comercializado como soro em pó deslactosado (ZANDOW, 1984; BRANDÃO, 1994).

## 2.1 INTOLERÂNCIA À LACTOSE

Intolerância à lactose é um termo usado para descrever a incapacidade de digerir a lactose devido a uma deficiência do sistema digestivo. Esta deficiência é caracterizada pela ausência da enzima  $\beta$ -galactosidase, comumente conhecida como lactase, no intestino delgado, onde a lactose é hidrolisada e os monossacarídeos produzidos são absorvidos (SANTIAGO, 2004).

A intolerância à lactose pode ser permanente por ser congênita ou adquirida após uma inflamação ou algum dano permanente na mucosa intestinal, ou pode ser transitória, quando uma condição temporária causa algum dano à mucosa intestinal. Neste caso, quando o dano é reparado, a mucosa se regenera e passa a produzir lactase novamente (KOCIÁN, 1988; TÉO, 2002; SANTIAGO, 2004).

Estima-se que mais de 50% da população mundial apresente alguma deficiência na síntese de lactase, sendo esta uma das mais comuns desordens genéticas (DURING *et al.* 1998). Além de causar desconforto gastrointestinal, a intolerância à lactose pode comprometer a absorção de outras substâncias como proteínas, vitaminas e sais minerais (NIITTYNEN, KAJANDER e KORPELA, 2007). Segundo Kocián (1988), a capacidade de digerir a lactose se desenvolveu como uma mutação genética, principalmente no norte europeu, devido à introdução do leite de gado na alimentação humana. Há

aproximadamente 10.000 anos a maioria da população era capaz de digerir a lactose nos primeiros meses de vida até que gradativamente na fase adulta todos eram intolerantes à lactose. Estima-se que hoje, aproximadamente 70% dos descendentes de africanos, 95% dos asiáticos e 53% dos hispânicos são intolerantes à lactose, comparados com apenas 10% a 15% dos americanos brancos e descendentes de norte-europeus (SHAH, FEDORAK e JELEN, 1992; TORRES, 2004).

Não existem dados oficiais sobre o percentual de brasileiros que têm restrição à ingestão de lactose. No entanto, estima-se que esta população seja superior a 58 milhões (CUNHA *et al.*, 2007). Um estudo sobre a distribuição de indivíduos com intolerância à lactose na população de Joinville (SC) foi realizado por Pereira Filho e Furlan e publicado em 2004, a partir da distribuição de sexo e faixa etária do censo de 2000. Os autores concluíram que 44,11% dos indivíduos avaliados eram intolerantes, 18,29% eram limítrofes, ou seja, mal absorvedores de lactose, e apenas 37,60% eram normais, ditos capazes de absorver 2 g de lactose por kg de massa corpórea ao dia, sem ultrapassar o limite máximo diário de 50 g de ingestão desse carboidrato. Considerando o somatório entre indivíduos intolerantes e limítrofes, têm-se 62,4% de incidência desse problema em uma cidade com indicadores sócio-econômicos superiores a média do país (STEFE, ALVES e RIBEIRO, 2008).

## 2.2 HIDRÓLISE DA LACTOSE

A hidrólise da lactose é um processo promissor para a indústria de alimentos, pois o produto formado apresenta vantagens tecnológicas em relação ao substrato. Os monossacarídeos resultantes da hidrólise da lactose possuem um alto poder adoçante e são menos suscetíveis à cristalização em produtos lácteos, como doce de leite, leite condensado, leite concentrado congelado, misturas para sorvetes e iogurtes e melhoram as características organolépticas destes alimentos como cor e sabor. A hidrólise deste açúcar também aumenta a facilidade de corte e confere cremosidade às misturas para sorvete, diminui o tempo de maturação dos queijos Manchego e Cheddar, além de aumentar em cerca de 10% a produção dos queijos *Cottage* e *Quark* (FURTADO, KARDEL e NETO, 1995; MAHONEY, 1997). De acordo com Jurado *et al.* (2002), as vantagens de se produzir um derivado lácteo com reduzido teor de lactose são:

- obtenção de produtos aptos ao consumo para grupos populacionais intolerantes à lactose;
- formação de substâncias que favorecem o crescimento da microflora intestinal desejáveis à saúde humana, precisamente os galactooligosacarídeos (GOS);
- obtenção de melhores características tecnológicas em derivados lácteos, tais como melhor solubilidade e redução de riscos de cristalização em sorvetes, doce de leite e leite condensado;
- obtenção de melhores características sensoriais em derivados lácteos, tal como incremento no poder adoçante, implicando em menor adição de sacarose e conseqüente redução no conteúdo calórico;
- obtenção de melhores características reológicas como a melhor textura e a maior cremosidade, em especial na redução do ponto de congelamento de sorvetes;
- formação de monossacarídeos que auxiliam no metabolismo do fermento em produtos fermentados, como iogurtes e bebidas lácteas; e
- redução da probabilidade de ocorrência da reação de Maillard, pois os GOS obtidos não atuam como açúcares redutores.

Contudo, as características de maior viscosidade, doçura e higroscopicidade reduzidas e menor propensão à reação de Maillard, ocorrem quando os açúcares simples são removidos de misturas contendo oligossacarídeos (CRITTENDEN e PLAYNE, 2002)

Existem dois métodos principais para a hidrólise da lactose: o método químico e o método enzimático (LADERO, SANTOS e GARCÍA-OCHOA, 2000). O método químico depende do uso de altas temperaturas, que podem variar de 90°C a 150°C e da adição de ácidos fortes em altas concentrações, levando o pH da solução para valores tão baixos quanto 1,5. Por se tratar de um método muito agressivo, sua utilização não é recomendada na indústria de alimentos (ÖZBEK, SENNER e APAR, 2006).

Realizada sob condições operacionais mais brandas, com pH variando entre 3,5 e 8,0 e temperaturas compreendidas entre 5 e 60°C, a hidrólise enzimática, reduz não só a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, como as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do meio sobre equipamentos e a formação de

subprodutos indesejáveis (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY e OLLIS, 1986).

A enzima responsável pela hidrólise da lactose é  $\beta$ -D-galactosidase. Após hidrólise, a lactose se converte principalmente em glicose e galactose. A enzima rompe a ligação entre o carbono-1 da galactose e o carbono-4 da glicose (ZANDOW, 1984). Esta enzima pode ser encontrada na natureza em frutos (amêndoas, pêssego, damasco, maçã), em órgãos de animais (intestino, cérebro, testículos, placenta) e também são produzidas por grande quantidade de microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos, e leveduras, sendo estes dois últimos as principais fontes para aplicações comerciais (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Os microrganismos mais utilizados para produção desta enzima são *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* (ANDRADE, 2005). As propriedades das  $\beta$ -galactosidases dependem da sua fonte; aquela extraída de *Escherichia coli* possui a maior massa molar (520.000 a 850.000 g.mol<sup>-1</sup>), enquanto aquelas de menor massa molar são extraídas de *Saccharomyces fragilis* (201.000 g.mol<sup>-1</sup>) e *A. oryzae* (90.000 g.mol<sup>-1</sup>) (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Normalmente, as enzimas extraídas de fungos apresentam maior atividade em pH ácido, sendo convenientes para hidrólise de soro ácido. Aquelas obtidas a partir de leveduras e bactérias apresentam melhor condição de operação em pH neutro. Além da fonte, os parâmetros operacionais como a concentração da enzima no meio, pH, temperatura e tempo de hidrólise interferem diretamente na atividade da enzima (ÖZBEK *et al.*, 2006).

A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite ou no soro sem tratamento prévio, sendo que os produtos obtidos preservam as propriedades nutricionais da matéria-prima. Em estudo realizado por Fontes, Passos e Passos (2001), a enzima  $\beta$ -galactosidase obtida de *K. lactis* apresentou uma atividade duas vezes maior no soro desnatado do que em uma solução tampão, comprovando os resultados obtidos por Jiménez-Guzmán *et al.* (2002) que reportaram que os componentes de leite, em especial, as proteínas do soro, podem aumentar a atividade enzimática. Os autores creditaram o aumento da atividade enzimática no soro à liberação dos grupos sulfidrila (-SH) devido a um tratamento térmico aplicado.

Mais recentemente, Jiménez-Guzmán *et al.* (2006) mostraram que a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase obtida de *K. lactis* aumentou

quando esta foi medida na presença de  $\beta$ -lactoglobulina ou de albumina do soro bovino (BSA), enquanto que  $\alpha$ -lactoalbumina não mostrou nenhum efeito sobre a atividade da enzima. Ensaios de cromatografia de afinidade mostraram que a  $\beta$ -lactoglobulina se liga especificamente com a  $\beta$ -galactosidase, resultando em redução significativa da atividade enzimática. Os autores observaram ainda que na presença de calor é possível que ocorra uma reação entre a  $\beta$ -lactoglobulina e a lactose, denominada de lactosilação, que diminuiu a capacidade de ligação entre a lactose e a enzima. Concluiu-se que a  $\beta$ -lactoglobulina pode aumentar a atividade da  $\beta$ -galactosidase através de dois mecanismos diferentes: um que depende da liberação de grupos sulfidrila pelo tratamento térmico da proteína, e o outro que é resultado da capacidade de ligação direta da proteína nativa com a enzima.

Para que o processo de hidrólise seja comercialmente viável, o uso de enzimas imobilizadas deve ser considerado. O uso de enzimas imobilizadas garante que a mesma seja utilizada por um longo período de tempo, pois permite que o sistema opere de modo contínuo. Um suporte de baixo custo, com boa capacidade de imobilização e estável ao longo do tempo de operação, são requisitos necessários para se determinar a viabilidade do sistema (CARRARA e RUBIOLO, 1994).

A imobilização da  $\beta$ -galactosidase tem sido estudada em diversos tipos de suporte e por diferentes métodos, como a adsorção em resinas de fenol-formaldeído, ligação covalente em tecido de algodão, filmes de policloreto de vinila (PVC), esferas magnéticas e microencapsulamento em suportes de alginato e gelatina. A imobilização pode ser conduzida utilizando-se diferentes técnicas de ligações em suportes sólidos, seja por adsorção, ligações covalentes ou ligações iônicas, ou por confinamento em matrizes ou cápsulas (LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN, 1995; TANRISEVEN e DOĞAN, 2002; DI SERIO *et al.*, 2003; BAYRAMOĞLU, TUNALI e ARICA, 2007; HAIDER e HUSAIN, 2007 e CHENG *et al.*, 2006).

Independentemente do método de imobilização, durante a escolha do suporte de imobilização vários aspectos devem ser considerados, como a capacidade de retenção da enzima, estabilidade e durabilidade (TANRISEVEN e DOĞAN, 2002). Dentre as técnicas de imobilização, a adsorção é a mais simples, o que aumenta o seu interesse comercial (BAYRAMOĞLU *et al.*, 2008). Os parâmetros cinéticos obtidos para enzimas imobilizadas podem ser diferentes daqueles obtidos para enzimas livres devido às restrições difusivas, às interações com o

suporte ou ainda devido à desativação durante a própria imobilização (ÖZDURAL *et al.*, 2003).

Quanto aos tipos de reatores, vários deles já foram investigados como os tradicionais reatores descontínuos, reatores de leito fixo, de leito fluidizado e reatores de membrana (ÖZDURAL *et al.*, 2003; CZERMAK *et al.*, 2004; HAIDER e HUSAIN, 2007; LI, ZHOU e CHEN, 2007). Nos reatores de membrana, a enzima pode ou não estar imobilizada na membrana, o que representa uma grande vantagem em relação aos demais sistemas, pois as suas propriedades cinéticas são exploradas ao máximo (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005; CURCIO, CALABRÒ e IORIO, 2006).



### 3 OLIGOSSACARÍDEOS

A preocupação com a saúde e bem estar na escolha dos alimentos tem provocado uma mudança importante no comportamento do público consumidor e aqueles que além de nutrir prometem prevenir o risco de doenças começam a se destacar. Em 1991, a categoria dos “Alimentos Funcionais ou Nutracêuticos” foi regulamentada pelo governo japonês, que já discutia o tema desde a década de 80. Desde então, várias pesquisas têm sido realizadas buscando-se novos alimentos funcionais, bem como o desenvolvimento de novos produtos contendo estes compostos (STEFE *et al.*, 2008). No Brasil, posteriormente, a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, definiu que propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (ANVISA, 1999). Os fruto-oligossacarídeos (FOS) estão incluídos nesta categoria de alimentos, mas nenhuma referência é feita a respeito dos GOS (ANVISA, 2008).

Os oligossacarídeos estão incluídos entre os alimentos funcionais por serem considerados prebióticos. Um prebiótico é um ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente quem o ingere por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon, melhorando assim a sua saúde (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

Com base nas propriedades fisiológicas, os carboidratos podem ser classificados como digeríveis ou não digeríveis. O conceito de não digestível se origina da observação de que o átomo de carbono anomérico (C1 e C2) das unidades de monossacarídeo de alguns oligossacarídeos dietéticos, possui uma configuração que impede que sua ligação glicosídica seja quebrada pelas enzimas digestivas do organismo humano (ROBERFROID e SLAVIN, 2000).

Os carboidratos podem ser classificados de acordo com a sua massa molar ou do grau de polimerização (número de unidades de monossacarídeo combinados), em monossacarídeos, oligossacarídeos ou polissacarídeos. De acordo com a nomenclatura da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), oligossacarídeos são definidos como sacarídeos contendo entre 3 e 10 moléculas de açúcar. De acordo com Mehra e Kelly (2006), os oligossacarídeos são definidos como carboidratos que contêm entre 2 e 10 monossacarídeos, covalentemente ligados através de ligações glicosídicas. Outras autoridades ampliam este limite para 19 moléculas de açúcar. Entretanto, não há uma razão

racional fisiológica ou química, para fixação destes limites (VORAGEN, 1998).

Os oligossacarídeos ocorrem naturalmente em muitos alimentos e em tecidos vegetais e são sintetizados por animais e microrganismos. Assim, podem ser obtidos por extração de tecidos vegetais, por fermentação microbiana, por catálise enzimática ou por reação química (MUSSATO e MANSILHA, 2007).

Dentre os oligossacarídeos estão os galacto-oligossacarídeos (GOS). Os GOS são promissores aditivos alimentares por serem estáveis em condições adversas de pH e temperatura. Resistem a 160°C por 10 min em pH neutro ou a 120°C por igual tempo em pH 3. Em pH 2 suportam até 100°C por 10 min. Nesta condição a degradação da sacarose seria superior a 50%. Assim, os GOS podem ser aplicados em uma grande variedade de alimentos como produtos lácteos fermentados, pães, geléias, confeitos, bebidas, etc. Sugere-se ainda que os GOS apresentem maior estabilidade que os FOS (SAKO, MATSUMOTO e TANAKA, 1999). Um ponto importante para que os GOS ganhem espaço no mercado como aditivos alimentares é a sua matéria-prima. GOS podem ser obtidos pela transgalactosilação da lactose, presente em um abundante subproduto da indústria de laticínios, o soro de queijo (FODA e LÓPEZ-LEIVA, 2000).

Barreteau, Delattre e Michaud (2006) afirmam que os oligossacarídeos poderiam ter uma participação mais expressiva nos 33 bilhões de dólares movimentados anualmente no mercado global de alimentos funcionais incluindo fibras dietéticas, açúcar-álcool, peptídeos, probióticos, ácidos graxos polinsaturados e antioxidantes. Hoje, existem mais de 20 diferentes tipos de oligossacarídeos no mercado mundial produzidos principalmente por empresas japonesas, como mostra a Tabela 2. Os oligossacarídeos comerciais são extraídos de fontes naturais como os oligossacarídeos de soja, obtidos por hidrólise enzimática de polissacarídeos, como os xilo-oligossacarídeos ou produzidos por transgalactosilação enzimática, como os GOS. A comunidade europeia define protocolos de misturas entre GOS e FOS para uso em alimentos infantis formulados desde 2001, através do *Scientific Committee on Food* (SCF), entidade assessora vinculada à União Europeia (MARTINS e BURKERT, 2009).

**Tabela 2 – Oligossacarídeos comerciais disponíveis no mercado mundial - Continua**

<b>Produto</b>	<b>Quantidade oligossacarídeo</b>	<b>Fabricante</b>
<b>Galacto-oligossacarídeos</b>		
TOS-syrup (Xarope)	60% sólidos	Borculo Whey Products, Holanda
Oligomate 55 (Xarope)	> 55% sólidos	Yakult Honsha Co. Ltd, Japão
Oligomate 55P (Pó)	> 55%	
TOS-100 (Pó)	> 99%	
Cup-Oligo H-70 (Xarope)	70% sólidos	Nissin Sugar Manufacturing Co. Ltd, Japão
Cup-Oligo P	70%	
<b>Fruto-oligossacarídeos</b>		
Raftilose L30 (Xarope)	> 30% sólidos	Orafti, Bélgica
Raftilose L60 (Xarope)	> 60% sólidos	
Raftilose L85 (Xarope)	> 85% sólidos	
Raftilose L95 (Xarope)	> 95% sólidos	
Raftilose P95 (Pó)	95%	
Actilight P (Pó)	95%	Beghin-Meiji Industries, França
Actilight G (Xarope)	55% sólidos	
Meiologo P (Pó)	95%	Meiji Seika Kaisha, Japão
Meiologo G (Xarope)	55% sólidos	
NutraFlora (Pó)	95%	Golden Technologies Co., EUA
Oligo-Sugar (Xarope)	60% sólidos	Cheil Foods and Chemicals, Coreia
Oligo-Sugar (Pó)	23%	
<b>Inulina</b>		
Raftiline ST (Pó)	-	Orafti, Bélgica
<b>Oligossacarídeos da soja</b>		
Soya-oligo	35% sólidos	The Calpis Food Industry Co., Japão
<b>Isomalto-oligossacarídeos</b>		
Isomalto-500 (Xarope)	> 50% sólidos	Showa Sangyo Co., Japão
Isomalto-900 (Xarope)	> 80% sólidos	
Isomalto-900P (Pó)	> 85%	
Panorup (Xarope)	≥ 50% sólidos	Hayashibara Shoji Inc., Japão
Panorich (Xarope)	> 50% sólidos	Nihon Shokuhin Kako Co., Japão
Biotose #50 (Xarope)	> 50% sólidos	

**Tabela 2 – Oligossacarídeos comerciais disponíveis no mercado mundial - Conclusão**

<b>Produto</b>	<b>Quantidade oligossacarídeo</b>	<b>Fabricante</b>
<b>Xilo-oligossacarídeos</b>		
Xylo-oligo 20P (Pó)	20%	Suntory Ltd, Japão
Xylo-oligo 35P (Pó)	35%	
Xylo-oligo 95P (Pó)	95%	
Xylo-oligo 70 (Xarope)	75% sólidos	
<b>Lactosacarose</b>		
Nyuka-Origo LS-40L (Xarope)	42% sólidos	Ensuiko Sugar Refining Co., Japão
Nyuka-Origo LS-55L (Xarope)	55% sólidos	
Pet Oligo L55 (Xarope)	57% sólidos	
Nyuka-Origo LS-55P (Pó)	55%	
Newka-Oligo LS-35 (Xarope)	≥ 35% sólidos	Hayashibara Shoji Inc., Japão
Newka-Oligo LS-55L (Xarope)	≥ 55% sólidos	
Newka-Oligo LS-55P (Pó)	≥ 55%	
<b>Gentio-oligossacarídeos</b>		
Gentose #45 (Xarope)	45% sólidos	Nihon Shokuhin Kako Co., Japão
Gentose #80 (Xarope)	90% sólidos	
Gentose #80P (Pó)	90%	

Fonte: PRUKSASRI, 2007.

No caso de produtos nas formas de cápsulas, tabletes, comprimidos e similares, os requisitos acima devem ser atendidos na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Na tabela de informação nutricional deve ser declarada a quantidade de FOS, abaixo do conteúdo de fibras alimentares. O uso do ingrediente não deve ultrapassar 30 g na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante e a seguinte informação, em destaque e em negrito, deve constar no rótulo do produto: “O consumo deste produto deve ser acompanhado da ingestão de líquidos”.

O consumo excessivo de oligossacarídeos pode causar desconforto intestinal, flatulência e até mesmo diarreia, devido ao efeito

osmótico, sendo este efeito inversamente proporcional ao comprimento da cadeia. Entretanto, de acordo com Roberfroid e Slavin (2000) definir uma dose aceitável é difícil, pois cada indivíduo apresenta seus próprios limites do que é aceitável ou não, quanto ao desconforto intestinal (MUSSATTO e MANCILHA, 2007). Dados da literatura indicam que o consumo de doses diárias maiores que 20 g para GOS e maiores que 40 g para FOS estão relacionados com a ocorrência de diarreia (SAKO *et al.*, 1999; SPIEGEL *et al.*, 1994). Alguns autores sugerem que a ingestão diária de 10 g de GOS é suficiente para apresentar o efeito bifidogênico. Quando o número de bactérias no cólon intestinal é baixo, como no caso de pessoas na meia-idade e idosos, a ingestão diária de 2,5 g é suficiente para aumentar a população de bifidobactérias (GIBSON, 2004; SAKO *et al.*, 1999).

A dose necessária para que o efeito bifidogênico seja observado, parece variar de acordo com os diferentes tipos de oligossacarídeos. Entretanto, a maioria tem demonstrado um aumento no número de bifidobactérias no cólon para doses diárias menores que 15 g (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

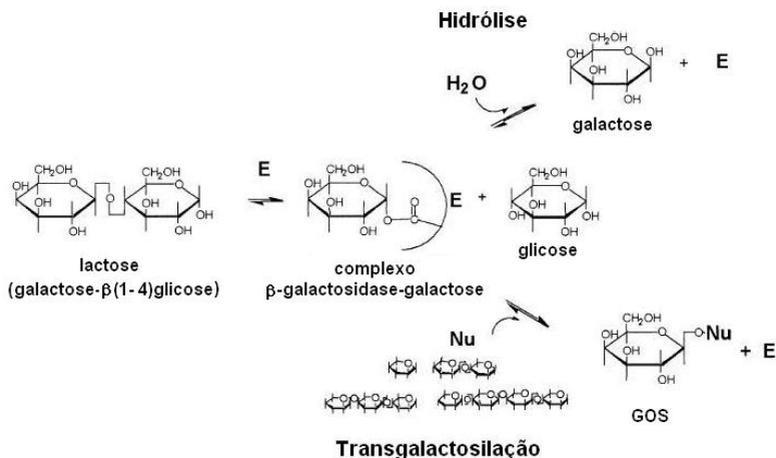
### 3.1 CINÉTICA DA REAÇÃO

O leite humano possui cerca de 7% de carboidratos em sua composição, sendo a lactose responsável por aproximadamente 90% desse total. Uma variedade de 130 diferentes tipos de oligossacarídeos derivados da lactose forma uma complexa mistura de diferentes combinações, com uma concentração que varia entre 5 e 8 g.L<sup>-1</sup>. Nos demais mamíferos, a quantidade de oligossacarídeos presente é menor, variando de 0,02 a 0,04 g.L<sup>-1</sup> nos ovinos, de 0,03 a 0,06 g.L<sup>-1</sup> nos bovinos e de 0,25 a 0,30 g.L<sup>-1</sup> nos caprinos. Os oligossacarídeos poderiam ser obtidos por concentração, principalmente do leite de cabra que apresenta uma concentração cinco vezes maior que o leite de vaca (MARTÍNEZ-FERREZ *et al.*, 2006). Mas ainda assim, os baixos valores encontrados naturalmente fazem com que a síntese enzimática seja o caminho preferencial para a obtenção comercial destes compostos.

A ação hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase tem sido estudada extensivamente nas últimas décadas. A reação de transgalactosilação, responsável pela síntese de GOS que posteriormente são também hidrolisados foi relatada no início dos anos 1950 (ARONSON, 1952; PAZUR, 1953). Nos anos 80, o Departamento de Nutrição Aplicada da

Universidade de *Lund* (Suécia), publicou artigos sobre a síntese e a digestibilidade de GOS (BURVALL, ASP e DAHLQVIST, 1979 e 1980). O papel fundamental da concentração inicial de lactose foi relatado nestes artigos. Mais tarde, os GOS foram incluídos em modelos cinéticos propostos para hidrólise da lactose (PRENOSIL, STUKER e BORNE, 1987).

Mais recentemente, o interesse na reação foi motivado pela observação de que os GOS podem ter efeitos benéficos como estimular o crescimento da microflora intestinal. Além disso, ao reagir como uma transferase, a enzima pode anexar galactose a outros produtos químicos e, conseqüentemente, produzir outros compostos biologicamente ativos com aplicações potenciais na indústria de alimentos e farmacêutica e outros. No mecanismo de reação, a enzima transfere uma molécula de galactose para um aceptor nucleofílico que contém um grupo hidroxila. Se o aceptor for uma molécula de água, a molécula de galactose é liberada; se o aceptor for outro açúcar, moléculas de di-, tri-, tetra- e sacarídeos ainda maiores são formadas, que em conjunto são denominados GOS (MAHONEY, 1998), como mostra a Figura 1.



**Figura 1 – Representação gráfica a síntese de oligossacarídeos e/ou hidrólise enzimática da lactose (Nu: aceptor nucleofílico, E: enzima).**

A taxa de conversão da lactose em GOS aumenta com o incremento da concentração inicial do substrato, tendo em vista o efeito

de redução da atividade de água da solução (PESELLE *et al.*, 2003). Albayrak e Yang (2002) relataram que o aumento da concentração inicial de lactose de 50 g.L<sup>-1</sup> para 500 g.L<sup>-1</sup>, aumentou a síntese máxima de GOS de 10% para 27%. Além disso, a presença de galactose e glicose inibiu a reação e reduziu em 15% a produção de GOS. Estes resultados confirmam os obtidos por Santos, Ladero e García-Ochoa (1998) que propuseram que a cinética da conversão da lactose respondesse a um modelo de inibição competitiva. A partir do início de sua formação a galactose irá competir com a lactose pelos sítios ativos da enzima.

A Tabela 3 apresenta a estrutura de alguns oligossacarídeos que podem ser formados durante a ação da  $\beta$ -galactosidase sobre a lactose.

**Tabela 3 – Estruturas de alguns oligossacarídeos formados durante a ação da  $\beta$ -galactosidase sobre a lactose**

<b>Dissacarídeos</b>	$\beta$ -D-Gal <sup>a</sup> (1→6)-D-Glc <sup>b</sup>	Allolactose
	$\beta$ -D-Gal (1→6)-D-Gal	Galactobiose
	$\beta$ -D-Gal (1→3)-D-Glc	
	$\beta$ -D-Gal (1→2)-D-Glc	
	$\beta$ -D-Gal (1→3)-D-Gal	
<b>Trissacarídeos</b>	$\beta$ -D-Gal (1→6)- $\beta$ -D-Gal(1→6)-D-Glc	6' digalactosil-glucose
	$\beta$ -D-Gal (1→6)- $\beta$ -D-Gal(1→4)-D-Glc	6' galactosil-lactose
	$\beta$ -D-Gal (1→6)- $\beta$ -D-Gal(1→6)-D-Gal	6' galactotriose
	$\beta$ -D-Gal (1→3)- $\beta$ -D-Gal(1→4)-D-Glc	3' galactosil-lactose
	$\beta$ -D-Gal (1→6)- $\beta$ -D-Gal(1→6)-D-Glc	4' galactosil-lactose
<b>Tetrassacarídeos</b>	$\beta$ -D-Gal (1→6)- $\beta$ -D-Gal(1→6) $\beta$ -D-Gal(1→4)-D-Glc	6' digalactosil-lactose
	$\beta$ -D-Gal (1→6)- $\beta$ -D-Gal(1→6) $\beta$ -D-Gal(1→4)-D-Glc	
	$\beta$ -D-Gal (1→6)- $\beta$ -D-Gal(1→6) $\beta$ -D-Gal(1→4)-D-Glc	
<b>Pentassacarídeos</b>	$\beta$ -D-Gal(1→6)- $\beta$ -D-Gal(1→6) $\beta$ -D-Gal(1→6)- $\beta$ -D-Gal(1→4)-D-Glc	6' trigalactosil-lactose

<sup>a</sup>Gal (galactose), <sup>b</sup>Glc (glucose). Fonte: ASP *et al.*, 1980; TOBA *et al.*, 1985 e ONISHI *et al.*, 1995, apud MAHONEY, 1997.

A eficiência da transgalactosilação e os tipos de componentes gerados no produto final dependerão da enzima e das condições de reação (GU, 1999). Os GOS formados pela transgalactosilação da lactose apresentam principalmente estruturas com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). As ligações do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) também podem ocorrer, porém em menor incidência que as  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) (MACFARLENE, G.T.; STEED, H. e MACFARLENE, 2008; MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008).

A produção máxima de GOS normalmente ocorre quando mais de 50% da lactose já foi convertida. De acordo com Boon, van't Riet e Janssen (2000), independente da fonte de enzima, a produção de GOS variou de 20 a 40% dos açúcares totais. A enzima  $\beta$ -galactosidase de *Bacillus circulans* produziu grande quantidade de GOS com maior grau de polimerização (tetra- e pentassacarídeos) enquanto que a  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* e *Kluyveromyces spp.* produziu principalmente dissacarídeos e uma pequena quantidade de tetrassacarídeos.

As misturas comerciais de GOS são compostas por diferentes tipos de oligossacarídeos (aproximadamente 55%), lactose (em torno de 20%), glicose (20%) e uma pequena quantidade de galactose. Normalmente, no máximo hexassacarídeos são encontrados. A baixa efetividade da  $\beta$ -galactosidase em produzir oligossacarídeos de maior massa molar é explicada pela competitividade da transgalactosilação da galactose com a hidrólise da lactose, quando da catálise enzimática em substratos ricos em lactose. A reação de transgalactosilação será menos efetiva quanto maior a massa molar do oligossacarídeo aceptor, o que explicaria a maior formação de di-, tri- e tetrassacarídeos em comparação com oligômeros maiores (MAHONEY, 1998).

### 3.2 PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Desde a observação de que além dos monossacarídeos, outros compostos eram formados durante a hidrólise da lactose, os GOS ganharam destaque e passaram a ser o alvo de muitas pesquisas. A síntese de GOS utilizando  $\beta$ -galactosidase imobilizada é uma alternativa ao tradicional sistema de produção, onde a enzima é inativada após cada reação. Mas estes sistemas também apresentam limitações. Reatores operando em leito fixo podem apresentar altas quedas de pressão, incrustações e entupimento devido a problemas compressão e agregação

das partículas, resultando em uma menor vida útil. Além disso, os rendimentos de GOS podem diminuir de 20 a 30% devido às limitações difusionais (SHEU, *et al.*, 1998; SHIN, PARK e YANG, 1998; ALBAYRAK e YANG, 2002).

Reatores biocatalíticos de membrana apresentam a vantagem de aliar um processo biotecnológico, como uma reação enzimática, a um processo de separação. Czermak *et al.* (2004) estudaram a produção contínua de GOS em um reator de tanque agitado com uma membrana de ultrafiltração operando com fluxo cruzado para reter a enzima. Os resultados mostraram um bom desempenho do reator contínuo acoplado à membrana. A produção máxima de GOS, 40%, ocorreu em menos de 1 hora em uma solução com concentração de lactose de 31%. Um reator contínuo equipado com membrana de ultrafiltração de 10 kDa (celulose regenerada) também foi utilizado para produção de GOS por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* por Chockchaisawasdee *et al.* (2004). A produtividade total depois de 4 horas de processo contínuo variou de 16 a 26 GOS mg.U<sup>-1</sup>. Comparado a um processo descontínuo nas mesmas condições, o processo contínuo permitiu uma produção de GOS máxima de 7,6 mg.U<sup>-1</sup> após 1 hora de processo.

### 3.3 SEPARAÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Após a reação de transgalactosilação, onde monossacarídeos também são formados, é preciso separar os GOS de forma eficiente, pois os açúcares de baixa massa molar não possuem as propriedades benéficas dos GOS. A adsorção em carvão ativado é utilizada nos métodos de purificação convencional, como ocorre no processamento do produto japonês *Oligomate* (Tabela 2). Neste método, a solução de açúcar passa através de uma coluna de carvão ativado que adsorve os sacarídeos. Os monossacarídeos e a lactose são retirados da coluna por eluição com água ou uma solução de baixa concentração de etanol enquanto que os GOS são retirados por eluição com altas concentrações de etanol. Este método apresenta a desvantagem de baixo rendimento e separação ineficaz. Além disso, o custo total aumenta devido aos custos do etanol e de sua recuperação (MATSUMOTO, NATSUKO e TSUNEKAZU, 1988).

A tecnologia de leite móvel simulado (SMB) foi utilizada por Masuda *et al.* (1993) para separar uma mistura de oligossacarídeos, glicose e frutose. Os autores utilizaram uma resina de troca catiônica como adsorvente e água como eluente. O método não foi eficiente para

separar os oligossacarídeos dos monossacarídeos. Geisser *et al.* (2005) utilizaram esta técnica na separação da lactose de uma mistura de oligossacarídeos do leite humano. A separação foi estudada em duas fases estacionárias, uma de gel por exclusão de tamanho e outra de gel de troca iônica. Os resultados mostraram que a cromatografia de exclusão de tamanho com partículas de tamanho entre 50 e 100  $\mu\text{m}$  e porosidade de 50 Å, separou a lactose quase completamente, mas as taxas de fluxo e os rendimentos obtidos foram consideravelmente baixos (24-28  $\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$ ). Segundo Sarney *et al.* (2000), a filtração em gel não é processo adequado para implementação em grande escala dada a limitada vida útil do meio filtrante. Além disso, não há diferença entre oligossacarídeos obtidos a partir de cromatografia de permeação em gel convencional e os obtidos por membranas nanofiltração (SARNEY *et al.*, 2000).

Uma alternativa para separar os GOS sintetizados dos monossacarídeos e da lactose, foi proposta por Maischberger *et al.* (2008). A lactose foi oxidada a ácido lactobiônico utilizando-se celobiose desidrogenase fúngica e, posteriormente, o ácido e os monossacarídeos foram removidos por troca iônica e cromatografia de exclusão. Os GOS recuperados por este método, em uma taxa de 60%, apresentavam menos de 0,3% de lactose e monossacarídeos.

Atualmente, os oligossacarídeos comerciais são purificados por resinas de troca iônica ou por carvão ativado (BOON, JANSSEN e VAN'T RIET, 2000), entretanto, a possibilidade de utilização de membranas de nanofiltração começou a ser investigada (GOULAS *et al.*, 2002; LI, *et al.*, 2004). Os dados obtidos até o momento são promissores e apontam a nanofiltração como um futuro processo para separação de mono- e oligossacarídeos em grande escala.

### 3.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS E APLICAÇÕES

Os GOS podem ser utilizados como aditivo alimentar em uma ampla variedade de alimentos, tais como produtos lácteos fermentados, pães, doces, confeitos, bebidas, etc., pois são mais estáveis que os FOS em condições de temperatura e acidez elevadas (SAKO *et al.*, 1999). Além disso, apresentam características físico-químicas e propriedades fisiológicas importantes e benéficas para a saúde dos consumidores. Entre estas propriedades destacam-se o baixo valor calórico, a atividade anticarcinogênica e a capacidade de estimular o crescimento de bactérias no cólon. Eles também são associados a um menor risco de infecções e

diarréia, e a uma melhoria da resposta do sistema imunológico. Devido à diminuição do pH intestinal causada por sua fermentação, os GOS provocam uma redução dos patógenos da flora, um aumento da população de bifidobactéria e da disponibilidade dos minerais (RIVERO-URGELL, SANTAMARIA-ORLEANS e SEUMA, 2005; MUSSATTO e MANCILHA, 2007). De acordo com Saad (2006), outra vantagem apresentada por estes compostos é o fato de não serem utilizados como substrato por *Streptococcus mutans*, o microrganismo responsável pelo aparecimento das cáries.

A doçura relativamente baixa torna os oligossacarídeos úteis na produção de alimentos, quando um agente de volume com doçura reduzida é desejável para aumentar outros sabores/odores do alimento. No caso de alimentos muito doces, podem ser utilizados como agente de volume em conjunto com edulcorantes artificiais como o aspartame ou sucralose, por exemplo, com a vantagem para disfarçar o sabor residual produzido por alguns edulcorantes. Além disso, quando comparado com mono e dissacarídeos, a maior massa molar dos oligossacarídeos proporciona aumento da viscosidade, produzindo alimentos mais encorpados (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

Diversos alimentos apresentam potencial para a utilização de GOS em sua formulação. Dentre eles podemos citar bebidas diversas, produtos lácteos como leite fermentado, iogurtes probióticos e simbióticos, sobremesas como gelatinas, pudins e sorvetes, confeitos, doces e chocolates, biscoitos e bolachas, cereais, pães e bolos, produtos de carne e tofu (VORAGEN, 1998). Os GOS podem ser utilizados por suas vantagens nutricionais, mas também apresentam propriedades interessantes para muitos alimentos, podendo atuar como substituto de açúcares ou gorduras, fibras, melhoradores de textura ou da resistência térmica (WANG, 2009).



## 4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS

A história destes processos pode ser dividida em dois períodos de desenvolvimento distintos: o desenvolvimento científico e o desenvolvimento comercial. Em meados do século XVIII as propriedades de barreira das membranas foram observadas e estudadas. As primeiras membranas comerciais, utilizadas em escala laboratorial, foram fabricadas pela empresa alemã *Sartorius*, depois da Primeira Guerra Mundial. Nos anos 40 ocorreu a primeira aplicação prática de membranas na hemodiálise, embora o fenômeno já fosse conhecido há muito tempo. No final dos anos 50, devido à preocupação com uma crise energética iminente, o desenvolvimento de novas tecnologias para dessalinizar a água do mar, menos dispendiosas que o processo de evaporação, se fez necessário. Assim, a osmose inversa começou a ser aplicada para dessalinizar a água do mar, mas as membranas existentes na época não permitiam a ampliação do processo para escala industrial. Isto só ocorreu a partir da década de 60, quando Loeb e Sourirajan (1962) desenvolveram as membranas assimétricas de acetato de celulose pelo “método de inversão de fases”. Esta técnica representou um marco decisivo em todo o desenvolvimento tecnológico dos processos de separação com membranas. (MULDER, 2003).

Hoje, os processos de membranas são usados em muitas aplicações cada vez mais crescentes. Um fator fundamental nos processos com membranas é o fato de efetuarem a separação sem mudança de fase e, quase sempre, em processos isotérmicos, o que torna, portanto, estes processos energeticamente mais vantajosos quando comparados a alguns processos clássicos de separação (NOBLE e STERN, 1995).

As membranas obtidas pelo método de inversão de fases são assimétricas. A camada superior, densa e muito fina (espessura  $< 0,5 \mu\text{m}$ ), é a responsável pelo mecanismo de transferência de massa, enquanto a subcamada, porosa e mais grossa (espessura de 50-200  $\mu\text{m}$ ), age apenas como um suporte. A taxa de permeação é inversamente proporcional à espessura da membrana, o que faz com que apresentem maior taxa de permeação do que uma membrana simétrica, de mesma espessura (MULDER, 2003).

A maioria das membranas poliméricas disponíveis comercialmente é fabricada pela técnica da inversão de fases, que consiste de três etapas principais: preparo de uma solução polimérica homogênea, espalhamento da solução sobre uma superfície formando

um filme de espessura determinada e, finalmente, formação da estrutura polimérica da membrana pela separação de fases do sistema.

A técnica de precipitação em banho de não-solvente para o polímero é muito utilizada no preparo de membranas poliméricas assimétricas. O filme polimérico é imerso em um banho composto de um não-solvente para o polímero ou de uma mistura de solvente e não-solvente, que devem ser completamente miscíveis entre si. Esse banho também é conhecido como banho de coagulação. Ocorre a difusão do solvente do filme polimérico para o banho de coagulação, e do não solvente do banho para o filme polimérico até a precipitação do polímero e formação da estrutura da membrana. A possibilidade de se utilizar diferentes polímeros e de se controlar os parâmetros do processo, como o tempo de evaporação do solvente, faz com que inúmeras membranas com diferentes estruturas possam ser preparadas (HABERT *et al.*, 1997; MULDER, 2003).

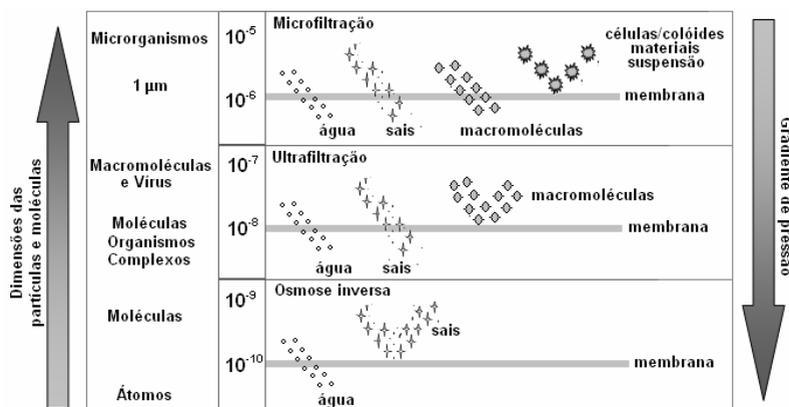
Atualmente, os processos de separação por membranas têm sido utilizados nos mais diferentes setores de atividade na indústria química, na área médica, biotecnologia, indústria alimentícia e farmacêutica e tratamentos terciários de águas residuais, para fins de reuso. O interesse em reatores de membrana biocatalíticos tem crescido, pois combinam o processo de transferência de massa com reações químicas, e a remoção seletiva de produtos da reação aumenta a conversão quando há inibição pelo produto. Reatores de membrana que utilizam catalisadores biológicos podem ser usados na produção, no processamento ou nas operações de tratamento de efluentes. Estes reatores estão situados nas denominadas tecnologias ambientais amigáveis (GIORNO e DRIOLI, 2000).

Por outro lado, alguns obstáculos como o tempo de vida reduzido da membrana, a baixa seletividade ou baixo fluxo de permeado e a polarização por concentração e conseqüente colmatagem (entupimento) da membrana, devem ser superados, na medida do possível. O entupimento da membrana e a polarização por concentração não devem ser considerados como desvantagens, já que são fenômenos inerentes aos processos de separação (MULDER, 2003). Muito embora a seleção da membrana seja determinante da eficiência do processo de separação, os parâmetros de operação e principalmente a dinâmica de circulação da alimentação, podem influenciar os fenômenos de transporte que ocorrem na fase fluida e serem, de igual modo, determinantes da eficiência global destes processos (MINHALMA, 2001).

#### 4.1 CLASSIFICAÇÃO DOS PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Uma membrana é uma barreira seletiva semipermeável que separa duas fases e restringe total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies químicas ou substâncias presentes nas fases, de uma maneira específica. As membranas podem ser classificadas de diferentes formas, entre elas quanto ao material de origem, quanto a sua estrutura, quanto ao fluxo de permeação ou quanto a sua capacidade seletiva (HABERT *et al.*, 2006).

As diferenças estruturais das membranas são responsáveis pela suas diferentes funcionalidades. Assim, elas podem ser utilizadas numa ampla gama de processos de separação, mas cada um requer uma membrana específica. Independentemente das características morfológicas e estruturais, as membranas podem ser classificadas de acordo com o tamanho dos seus poros: microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI) (MULDER, 2003). As características de cada processo são mostradas na Figura 2.



Fonte: Adaptado de SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001 (apud TREMARIN, 2007) e MULDER, 2003.

**Figura 2 - Características dos processos de separação por membranas que utilizam a diferença de pressão como força motriz.**

## 4.2 FUNDAMENTOS DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO

Nos processos de micro, ultra e nanofiltração, a força motriz para que a separação ocorra através da membrana é a pressão. Devido à pressão aplicada, o solvente e moléculas de vários solutos permeiam através da membrana, enquanto outras moléculas ou partículas são rejeitadas em diferentes proporções, de acordo com a estrutura da membrana. Quanto menor a partícula a ser separada, menor o tamanho dos poros da membrana e conseqüentemente maior a pressão a ser aplicada. Isto implica que a resistência da membrana à transferência de massa aumente com o aumento da pressão aplicada (MULDER, 2003). A Tabela 4 mostra a gama de pressões normalmente utilizada nos diferentes processos de separação.

**Tabela 4 – Faixa de pressões e fluxos de permeação nos processos de separação que utilizam gradiente de pressão como força matriz.**

<b>Processo de separação</b>	<b>Tipo de Membrana</b>	<b>Pressão (bar)</b>	<b>Método de separação</b>	<b>Fluxo de permeação (L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>.bar<sup>-1</sup>)</b>
Microfiltração	Microporosa 0.1-10 mm	0.1- 2.0	Filtração	> 50
Ultrafiltração	Assimétrica Microporosa 1-10nm	1.0 - 5.0	Filtração	10-50
Nanofiltração	Assimétrica Filme denso	5.0 - 40	Filtração- solução/ Difusão	1.4-12
Osiose inversa	Assimétrica Filmedenso	10 -100	Solução/ difusão	0.05-1.4

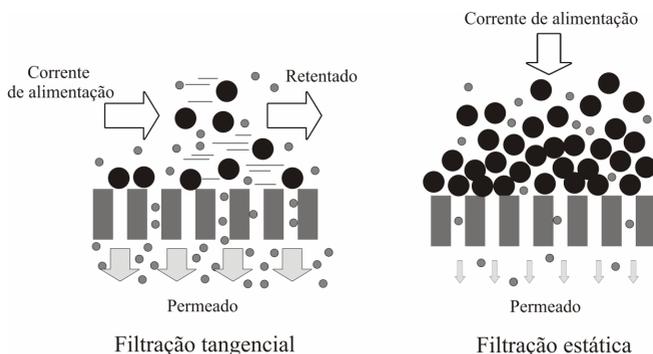
Fonte: Adaptado de MULDER, 2003.

A seletividade de uma membrana é função da diferença de tamanho entre as moléculas que compõem a mistura a ser fracionada e os poros da membrana. A escolha do material da membrana depende principalmente da estabilidade química. Na maioria dos processos de separação que utilizam membranas porosas, as espécies presentes devem ser na medida do possível, inertes em relação ao material que constitui a membrana. Entretanto, em alguns casos, as interações físico-químicas

(forças de atração e repulsão) entre o polímero e a solução a ser filtrada devem também ser consideradas de interesse. A seletividade da membrana é determinada com base na massa molar das moléculas que apresenta um índice de rejeição mínimo de 95%, chamado de rejeição nominal ou ponto de corte (MULDER, 2003; SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001).

A transferência de massa em membranas de ultrafiltração é governada principalmente por convecção, enquanto que em membranas de osmose inversa a transferência ocorre por difusão. As membranas de nanofiltração estão compreendidas entre as membranas de ultrafiltração e de osmose inversa, apresentando transferência de massa tanto convectiva quanto difusiva (ROSA e PINHO, 1994; PONTALIER, ISMAIL e GHOUL, 1997).

Basicamente, os processos de separação por membranas podem ocorrer de duas formas: com o fluxo de alimentação sendo direcionado perpendicularmente ou tangencialmente à membrana. Na filtração estática ou perpendicular, as moléculas retidas vão se acumulando sobre a membrana, formando uma camada que aumenta com o aumento do tempo de filtração, o que faz com que o fluxo de permeação decresça na mesma ordem. Na filtração tangencial, a espessura da camada depositada não aumenta indefinidamente, devido às tensões de corte originadas pelo fluxo tangencial à superfície da membrana, atingindo-se um estado estacionário. A diferença entre a filtração tangencial e estática é mostrada esquematicamente na Figura 3.



**Figura 3 – Diferença entre os processos de filtração tangencial e filtração estática.**

Além da seletividade, o fluxo de permeado ( $J_v$ ), que representa a vazão volumétrica, mássica ou molar do processo, é empregado para

avaliar o processo de separação. O fluxo permeado, dado pela Equação 1, é definido como a quantidade de permeado que atravessa a membrana por unidade de tempo em uma determinada área e normalmente expresso em  $L.h^{-1}.m^{-2}$  ou  $kg. h^{-1}.m^{-2}$ . É conveniente expressá-lo desta forma, para que se possa comparar a permeabilidade de membranas com áreas distintas (PETRUS, 1997).

$$J_v = \frac{\text{peso do permeado (kg)}}{\text{área de membrana (m}^2\text{)} * \text{tempo (h)}} \quad (1)$$

O fluxo de permeação através de uma membrana de ultrafiltração é diretamente proporcional à pressão aplicada e pode ser descrito por:

$$J_v = L_p \cdot \Delta P \quad (2)$$

quando o escoamento de fluido ocorre através de membranas de nanofiltração, o fluxo de permeação pode ser descrito por:

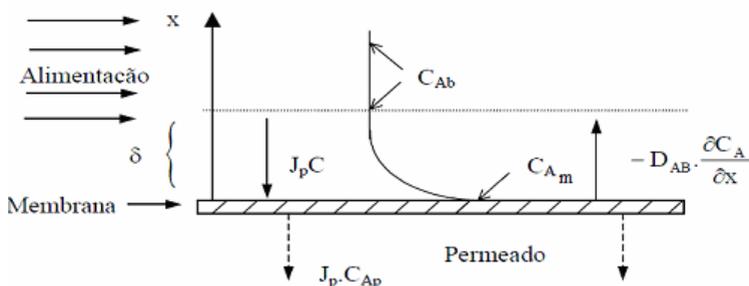
$$J_v = L_p \cdot (\Delta P - \Delta \pi) \quad (3)$$

onde  $L_p$  é a permeabilidade hidráulica, característica da membrana testada;  $\Delta P$  é a diferença de pressão aplicada entre os dois lados da membrana e  $\Delta \pi$  é a diferença de pressão osmótica entre os dois lados da membrana. A permeabilidade da membrana depende de fatores estruturais como a porosidade, número de poros e o diâmetro médio dos poros, sendo medida como o volume ou peso do líquido que passa através de uma unidade de superfície de membrana por unidade de tempo por unidade de pressão.

A capacidade seletiva ou seletividade de uma dada membrana pode ser expressa através do coeficiente de rejeição, também chamado de rejeição observada ( $R_{obs}$ ), definido como o quociente da concentração do material rejeitado no permeado dividido pela sua concentração no canal de alimentação, sendo expresso, muitas vezes, em porcentagem. A rejeição de um dado soluto pode ser calculada através da Equação 4 onde,  $C_A$  é a concentração de soluto na alimentação e  $C_P$  a concentração de soluto no permeado.

$$R_{obs}(\%) = 100 * \left(1 - \frac{C_P}{C_A}\right) \quad (4)$$

Quando um soluto neutro de concentração  $C_A$  é rejeitado parcialmente pela membrana, a fração do soluto que não permeia a membrana vai-se acumulando sob a superfície até que, em estado estacionário, o fluxo convectivo de soluto em direção à membrana ( $J_p \cdot C_A$ ) é equilibrado pelo fluxo de soluto através da membrana e pelo fluxo difusivo de soluto da superfície da membrana para o seio da alimentação ( $-D_{AB} \cdot (\partial C_A / \partial x)$ ). Desta situação decorre, em estado estacionário, o estabelecimento de um perfil de concentração adjacente à superfície da membrana, conforme esquematizado na Figura 4.



Fonte: MINHALMA, 2001.

**Figura 4 - Perfil de concentração de soluto retido na fase fluida adjacente à membrana no estado estacionário ( $C_{Ab}$ ,  $C_{Am}$  e  $C_{Ap}$  são as concentrações de soluto, na alimentação, à superfície da membrana e no permeado, respectivamente,  $J_p$  é o fluxo de permeado e  $\delta$  é a espessura de uma camada sub-laminar onde se desenvolve este perfil de concentrações de soluto).**

Este acúmulo de soluto é chamado de polarização por concentração. O aumento da concentração na camada de polarização pode atingir o limite de saturação de um soluto, resultando na formação de uma camada de gel que diminui o fluxo de permeação e pode levar à incrustação da membrana (BHATTACHARYYA e WILLIAMS, 1992). O fenômeno de polarização por concentração é reversível, porém, a sua ocorrência pode dar origem a outros tipos de fenômenos que podem prejudicar irremediavelmente o desempenho do processo: a formação de

incrustações. Os possíveis efeitos negativos da polarização por concentração são: decréscimo do fluxo de permeado devido ao aumento na pressão osmótica na superfície da membrana; aumento da passagem de soluto através da membrana; precipitação de soluto se a concentração exceder o limite de solubilidade do mesmo e o favorecimento de incrustações por deposição (HO e SIRKAR, 1992).

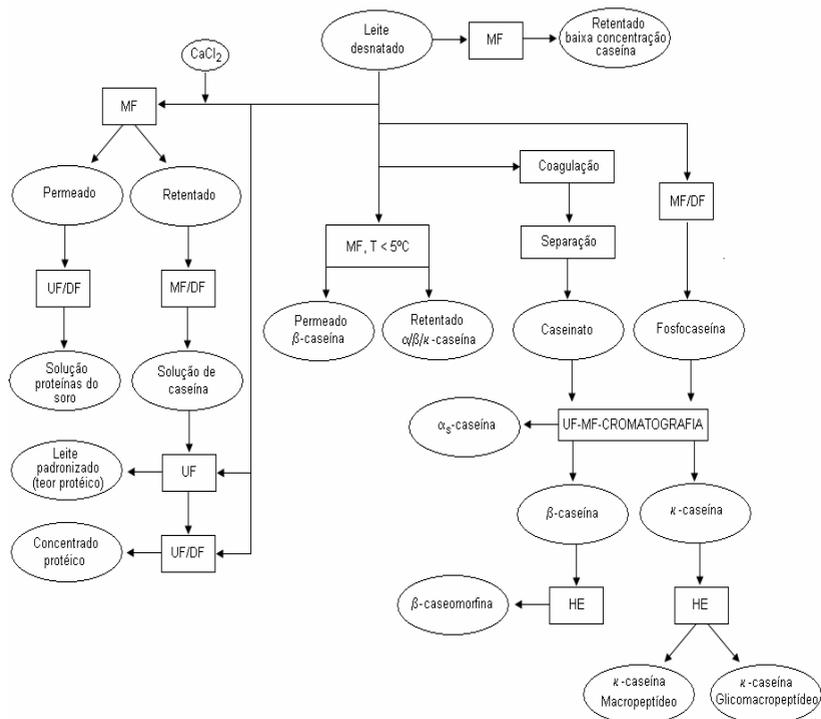
As membranas de NF têm características individuais de incrustações e, em geral, as membranas mais fechadas são menos incrustadas. Se um incrustante é capaz de permear através de uma membrana seu potencial de incrustação é maior. Além das condições de operação, as características da membrana e dos incrustantes determinam a intensidade das incrustações. A carga superficial da membrana, por exemplo, influencia diretamente na possibilidade de deposição de substâncias em sua superfície. Deseja-se que soluto e membrana tenham cargas idênticas para aumentar a repulsão e, portanto, diminuir a probabilidade de deposição. Porém, interações hidrofóbicas entre os incrustantes e as membranas podem ser maiores que as repulsões eletrostáticas. Este fenômeno pode ser minimizado através da promoção de uma boa mistura da solução de alimentação, quer incluindo promotores de turbulência como espaçadores no canal de alimentação ou por aumento da velocidade de circulação tangencial para que o fluxo de regime turbulento seja atingido (MULDER, 2003).

#### 4.3 ULTRAFILTRAÇÃO E A CONVERSÃO DA LACTOSE

A ultrafiltração (UF) é um processo de separação por membranas, utilizado quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo macromoléculas. As membranas de UF apresentam poros na faixa entre 1 a 100 nm. Soluções contendo solutos numa ampla faixa de massa molar ( $10^3 - 10^6$  Da) podem ser tratadas por este processo. Como os poros das membranas de UF são menores, uma força motriz maior é necessária para obter fluxos permeados elevados o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente. Por este motivo, as diferenças de pressão através da membrana variam na faixa de 2 a 10 bar (HABERT *et al.*, 2006).

O uso de membranas na indústria de laticínios foi proposto no final dos anos 60 por Maubois *et al.* (1969), quando a ultrafiltração foi utilizada para a concentração do leite durante a fabricação de queijos. O processo foi patenteado e ficou conhecido mundialmente como MMV, iniciais dos sobrenomes de seus idealizadores, Maubois, Mocquot e

Vassal. Atualmente, a UF é amplamente utilizada na indústria de laticínios, como mostra a Figura 5.



Fonte: ROSENBERG, 1995.

**Figura 5 - Aplicações da microfiltração (MF), ultrafiltração (UF) e diafiltração (DF) na padronização e fracionamento das proteínas do leite (HE, hidrólise enzimática; T, temperatura).**

O processo de separação por membranas na indústria de laticínios é ainda um campo de crescente interesse. O uso de membranas permite melhorar a qualidade dos produtos existentes e o desenvolvimento de outros, assim como pode melhorar a eficiência e a rentabilidade de processos (ROSENBERG, 1995).

O uso de reatores de membrana (UF) para hidrólise da lactose foi estudado por Mehaia, Alvarez e Cheryan (1993). Estes pesquisadores estudaram a hidrólise enzimática da lactose presente no soro de queijo em reator de membrana em tanque agitado contínuo. Uma alta taxa de

conversão da lactose, 90%, pode ser alcançada em um tempo de residência de 1 hora (40°C, pH 6,5 e razão substrato/enzima 2,5 ou menos). A produtividade neste reator (peso de monossacarídeos por unidade de peso de enzima) foi pelo menos seis vezes maior que o processo em descontínuo, equivalente.

Carminatti (2001) também estudou a hidrólise da lactose presente no soro de queijo em reator de membrana (40°C, pH 6, concentração de enzima 1250 mg.L<sup>-1</sup>). O reator de membrana mostrou-se mais eficiente, convertendo 92% da lactose, que um reator operando em modo descontínuo, que converteu apenas 82%.

Hatzinikolaou *et al.* (2005) propuseram um modelo cinético para hidrólise e ultrafiltração simultânea de permeado de soro de queijo. A hidrólise da lactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase *A. niger* ocorreu de acordo com a cinética de Michaelis-Menten com inibição competitiva para galactose, descrevendo muito bem o comportamento do reator.

A hidrólise da lactose por  $\beta$ -galactosidase (Lactozym), também foi estudada por Jurado *et al.* (2004) em dois tipos de reatores: um reator encamisado de tanque agitado (JSTR) e um reator de membrana de fibra oca com recirculação (RHFB). Mantendo-se as mesmas condições operacionais, a enzima apresentou menor atividade e menor conversão da lactose no RHFB. Os autores supõem que estas diferenças podem estar relacionadas com a adsorção da enzima na membrana e/ou a mudanças estruturais da enzima, causadas pelo processo de adsorção. Os autores propuseram, ainda, um modelo cinético que apresentou um bom ajuste aos resultados experimentais do RHFB. O modelo inclui um parâmetro da adsorção reversível, não somente da enzima, mas do complexo enzima-galactose na membrana.

NOVALIN *et al.* (2005) estudaram a hidrólise da lactose de leite desnatado em um reator de membrana de fibra oca com área de 4,9 m<sup>2</sup>. Para evitar perdas de atividade da enzima, devido à adsorção da mesma na membrana, uma pré-adsorção foi realizada com o leite desnatado. A circulação de leite por 1 hora possibilitou o recobrimento da superfície da membrana, com as proteínas do leite. O reator foi eficiente na retenção da enzima, que se mostrou mais estável, quando comparada com sistemas descontínuos. Além disto, a enzima apresentou a vantagem de estar livre no meio reacional, quando comparado com sistemas de enzima imobilizada. Quando a solução enzimática (120 U.mL<sup>-1</sup>) foi circulada a 25,0 L.h<sup>-1</sup> e o substrato a 10,5 L.h<sup>-1</sup>, o estado estacionário foi atingido, após 2 horas alcançando-se 81% de conversão de lactose.

Recentemente, a síntese de oligossacarídeos, em reatores de membrana, também tem sido estudada. A produção contínua de GOS, a partir de soro de queijo, utilizando-se a enzima Maxilact L 2000, foi estudada por Foda e López-Leiva (2000) em dois reatores de membrana: um de tanque agitado de escala laboratorial (membrana de ultrafiltração Amicon de 41,8 cm<sup>2</sup>) e uma unidade piloto de fibra oca (Romicon 0,5 m<sup>2</sup>). Ensaios, em modo descontínuo, foram realizados para determinação dos melhores tempos de residência, que se estabeleceu em torno de 4 horas, para as condições estudadas (concentração de enzima 0,05 e 0,1%; concentração inicial de lactose 14 e 23%; temperatura 35 e 45°C e pH 5 e 7). No reator em escala laboratorial, a conversão de GOS manteve-se praticamente constante, com rendimento de 20% para as seguintes condições operacionais: concentração de enzima 0,1%; concentração inicial de lactose 23%; temperatura 45°C, pH 7 e tempo de residência de 4 horas. No reator de fibra oca, para concentração inicial de lactose de 20% e 0,5% de enzima, o rendimento da reação foi de 31% de GOS.

Rustom *et al.* (1998) estudaram a formação de GOS durante a hidrólise da lactose presente no permeado de soro de queijo ultrafiltrado. As enzimas de leveduras comerciais (Maxilact e Lactozym) apresentaram rendimentos em GOS semelhantes e maiores que o obtido pela enzima extraída de fungos *A. oryzae*. Os autores recomendaram o uso de reatores de membrana para remoção contínua dos monossacarídeos formados para evitar o seu efeito inibitório e, conseqüentemente, aumentar o rendimento e a eficiência do processo.

Chockchaisawasdee *et al.* (2004) estudaram a síntese de GOS em um reator de membrana operando em modo contínuo e em reator de tanque agitado descontínuo. Neste trabalho, uma membrana de celulose de 10 kDa foi utilizada para retenção da enzima. Os autores estudaram a variação da concentração inicial de lactose (220 a 400 mg.mL<sup>-1</sup>) e de enzima (3 a 9 U.mL<sup>-1</sup>), a 40°C e pH 7, no reator de tanque agitado. Os resultados mostraram que a síntese de GOS foi maior quanto maior a concentração inicial de lactose e independente da concentração de enzima. Comparando-se os dois sistemas, o reator de membrana apresentou maior produtividade, quando mantidas as mesmas condições operacionais. A produtividade instantânea durante a produção contínua, variou de 4 a 7 mg de GOS por unidade de atividade de enzima utilizada. A produção total de GOS, após 4 horas de operação, variou de 16 a 26 mg por unidade de atividade de enzima utilizada. O melhor tempo de residência, 58 minutos, levou à conversão de 80% da lactose. Em relação ao desempenho do sistema, quanto maior a pressão aplicada,

maior foi a redução do fluxo permeado com o tempo de processo, atingindo-se 35% de redução, quando a pressão de 2,75 bar foi aplicada.

A produção contínua de GOS também foi estudada por Czermak *et al.* (2004) em uma unidade piloto utilizando-se uma membrana cerâmica de 50 kDa com área efetiva de 0,36 m<sup>2</sup>. Os autores utilizaram uma solução de lactose 20% (pH 7,5/40°C), por ser esta concentração típica do soro de leite concentrado por membranas de nanofiltração. O tempo de residência médio de contato com a enzima Maxilact LX 5000 foi de 30 minutos. O fluxo de permeado apresentou uma redução de 50%, após 1 hora (140-70 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>), estabilizando, entretanto, no tempo de ensaio restante (2,5 h). A concentração de GOS variou de 19 a 20% (p/p) no permeado, sendo produzidos no final do ensaio aproximadamente 2.900 g de GOS.

#### 4.4 NANOFILTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

As membranas de nanofiltração geralmente apresentam uma estrutura assimétrica, com uma camada ativa de 0,5 a 3 µm de espessura, sustentada por uma subcamada de alta porosidade com espessura entre 100 e 300 µm, que oferece pouca resistência ao fluxo de solvente. Em geral, estas membranas possuem tamanho de poros na faixa de 5 a 10 Å e são capazes de reter espécies moleculares com massa molar variando entre 200 e 1.000 g.mol<sup>-1</sup>. Segundo Mänttari, Pihlajamäki, e Nyström (2006), a camada ativa de uma membrana de nanofiltração pode ser vista como uma rede tridimensional de cadeias poliméricas. Desta forma, as membranas não teriam um real volume de poros, mas espaços livres dentro desta rede, que, quando submetidos a alterações, alteram também a permeabilidade da membrana e a passagem de moléculas não carregadas.

As membranas de nanofiltração combinam as propriedades das membranas de ultrafiltração e das membranas de osmose inversa. Assim, a transferência de massa é baseada em dois mecanismos: exclusão por tamanho e efeitos de carga (MULDER, 2003). O efeito de carga será importante na separação de eletrólitos, por causa da interação eletrostática entre a membrana e os íons. Aqueles que possuem a mesma carga da membrana tendem a ser retidos enquanto que os que possuem carga oposta tendem a passar pela membrana. Assim, a nanofiltração, um processo relativamente novo dentre os processos de separação, oferece fluxos mais elevados do que a osmose inversa e maiores retenções de moléculas de menor massa molar, como os açúcares,

matéria orgânica natural e até mesmo íons (BELLONA e DREWES, 2005; MÄNTTÄRI *et al.*, 2006).

As membranas têm sido aplicadas na separação de açúcares de diferentes fontes, especialmente para purificar e/ou concentrar GOS de extratos de chicória e de soja (MATSUBARA *et al.*, 1996; KAMADA *et al.*, 2002), cascas de arroz (VEGAS *et al.*, 2008), xaropes comerciais de fruto- e galacto-oligossacarídeos (GOULAS *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2004), soro de queijo (LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN, 1995), leite de cabra (MARTÍNEZ-FEREZ *et al.*, 2006) e do leite humano (SARNEY, 2000).

López-Leiva e Guzman (1995), já apontavam a nanofiltração como uma alternativa aos dispendiosos processos de separação, como a cromatografia, na separação ou a purificação de GOS, sintetizados a partir do permeado de soro de queijo. Os autores utilizaram um módulo de filtração tangencial para osmose inversa com uma membrana NF-PES-5/PP, operando a 20 bar. Os seguintes fatores de rejeição foram obtidos: 15,4% para monossacarídeos, 37% para lactose e 74,7% para GOS.

Martínez-Ferez *et al.* (2006) desenvolveram um processo para separação de GOS utilizando filtração tangencial em duas etapas. Primeiramente, uma membrana de ultrafiltração de 50 kDa foi utilizada para reter a caseína, permeando os GOS, a lactose e as proteínas solúveis para a fração permeada, depois de 4 diafiltrações. Na segunda etapa, a membrana de 1 kDa utilizada, reteve 80% dos GOS e parte da lactose, depois de 3 diafiltrações. A purificação e concentração de oligossacarídeos, combinando os processos de ultrafiltração e nanofiltração, já haviam sido propostas por Kamada *et al.* (2002). Os autores partiram de uma solução com 2,4°Brix e obtiveram um produto final com 30,3°Brix (retentado da nanofiltração).

O potencial da nanofiltração, operando com fluxo tangencial para purificação de GOS, foi reportado por Goulas *et al.* (2002). Os autores utilizaram as membranas NF-CA-50 e DS-5-DL no processo de diafiltração contínua e obtiveram rendimentos de 14-18% para monossacarídeos, 58-89% para dissacarídeos e 81-98% para trissacarídeos (GOS). Recentemente, Feng *et al.* (2009) aproximaram ainda mais as pesquisas acadêmicas da realidade industrial, estudando o desempenho de membranas comerciais na configuração espiral para a separação de GOS. Partindo-se de uma solução composta por 19% de monossacarídeos, 45% de lactose e 36% de GOS, foi possível remover 90% dos monossacarídeos e 52% da lactose, o que levou a uma pureza em GOS de 55% (1,5 vezes maior que a solução inicial).

#### 4.5 FATORES QUE AFETAM A NANOFILTRAÇÃO

Além da seletividade da própria membrana, a pressão aplicada, a temperatura, a composição e a concentração da alimentação afetam o processo de nanofiltração dos sacarídeos. Um aumento da temperatura normalmente ocasiona um aumento no fluxo de permeado devido à redução da viscosidade e ao aumento do tamanho efetivo dos poros, enquanto a rejeição dos açúcares tende a diminuir devido ao aumento do fluxo difusivo (FENG *et al.*, 2009). O efeito da temperatura na rejeição dos sacarídeos pode variar em função do tamanho molecular dos mesmos; os sacarídeos estão mais suscetíveis a alterações nas rejeições observadas quanto menor for o tamanho da molécula. Goulas *et al.* (2002) observaram que os monossacarídeos foram os mais afetados pelo aumento da temperatura de 25°C para 60°C, seguidos dos dissacarídeos. Dentre os dissacarídeos, a sacarose mostrou um efeito menos acentuado na rejeição do que o observado para a frutose. A rafinose, que era totalmente retida pela membrana a 25°C, permaneceu completamente retida às altas temperaturas.

Goulas *et al.*, (2002) estudaram também o efeito da pressão na separação de uma mistura composta por frutose, sacarose e rafinose, em proporções equivalentes, numa concentração total de 0,05 a 0,08 g.mL<sup>-1</sup>. Os coeficientes de rejeição observados para os três açúcares aumentaram com o acréscimo da pressão, devido à compactação da membrana e ao aumento do fluxo de permeado. Os autores postulam que a redução da espessura da membrana, que normalmente levaria a um aumento no fluxo de permeado, também causa uma redução nos tamanhos dos poros, sendo este o motivo do aumento da rejeição dos sacarídeos. O aumento da pressão também fez com que a diferença entre as rejeições observadas para os três sacarídeos diminuísse, resultando numa separação menos efetiva.

Considerando-se que o mecanismo de separação nas membranas de nanofiltração ocorre por mecanismos convectivos e difusivos, Pontalier *et al.* (1997) postula que o aumento da pressão causa uma diminuição nos fluxos convectivos com mais intensidade do que nos fluxos difusivos. Assim, na separação de solutos neutros, a importância do fluxo convectivo se torna maior quanto menor for o tamanho da molécula.

O efeito da pressão no fluxo de permeação para uma solução de GOS mais concentrada foi estudada por Feng *et al.* (2009). Os autores obtiveram o mesmo perfil de comportamento observado por Goulas *et al.* (2002) e afirmam que a pressão ótima do sistema não será aquela que

fornece o maior fluxo de permeação, mas aquela que fornece a melhor combinação entre o fluxo de permeação e o coeficiente de rejeição desejado.



## **CAPÍTULO IV**

### **MATERIAL E MÉTODOS**



# 1 SÍNTESE DE OLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO-SE ENZIMA IMOBILIZADA

## 1.1 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

Para as reações de síntese de oligossacarídeos foi utilizada a solução de  $\beta$ -galactosidase *K. lactis* comercial, *Lactozym 3000 L HP-G* (Novo Nordisk A/S). Diferentes quantidades de enzima foram imobilizadas em Duolite A-568, uma resina de fenol-formaldeído policondensado altamente porosa. Esta resina de troca aniônica de base fraca, gentilmente fornecida pela *Rohm and Haas* (França), apresenta-se em partículas que variam de tamanho entre 0,150 e 0,850 mm e possuem tamanho de poro entre 15 e 25 nm.

Primeiramente, a resina foi hidratada por 3 horas em uma solução tampão de fosfato de sódio e potássio 50 mM, contendo 10 mM de cloreto de magnésio. O sobrenadante foi removido, a resina lavada 4 vezes com a solução tampão e filtrada para remover o excesso de líquido. Soluções enzimáticas com diferentes concentrações foram preparadas e adicionadas em quantidades pré-determinadas de resina hidratada, mantendo-se constante a razão solução/resina seca de  $8 \text{ mL.g}^{-1}$ . As misturas permaneceram por 2 horas e a temperatura ambiente em um agitador magnético a 300 rpm. O sobrenadante foi recolhido e a resina lavada por 4 vezes com a solução tampão. A quantidade de proteína (enzima) adsorvida pela resina foi determinada por balanço de massa, considerando-se a quantidade de proteína na solução inicial, no sobrenadante e nos passos de lavagem. Aos resultados experimentais obtidos foram ajustados modelos teóricos de isotermas de adsorção, pelo método dos mínimos quadrados, para verificar qual o melhor ajuste.

## 1.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da enzima foi determinada monitorando-se os minutos iniciais da reação de hidrólise em modo descontínuo de uma solução de lactose 30 mM, preparada com a solução tampão descrita anteriormente no item 3.1.1, pH 6,5 a 25°C (MAUGARD *et al.*, 2003). A enzima imobilizada em 0,5 g de resina seca foi adicionada a 10 mL de solução de lactose e as amostras coletadas ao longo do tempo. Para cada amostra coletada, 750  $\mu\text{L}$ , a mesma quantidade de ácido tricloroacético

0,05 N foi adicionada imediatamente para parar a reação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima (proteína) imobilizada necessária para catalisar a liberação de 1 mol de glicose por minuto, nestas condições.

### 1.3 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA

O método de Bradford foi utilizado para determinar a quantidade de proteína adsorvida na resina. Padrões de soro albumina bovina (BSA fração V-Sigma), preparados com a solução tampão, foram utilizados para as curvas de calibração do método padrão ( $0,1$  a  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) e do micrométodo ( $0,01$  a  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ). No método padrão, para cada  $100 \mu\text{L}$  de amostra, foram adicionados  $5 \text{ mL}$  de reagente de Bradford e para o micrométodo, para cada  $300 \mu\text{L}$  de amostra, foram adicionados  $3 \text{ mL}$  do reagente. Depois de homogeneizados, a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (UV 1700 - SHIMADZU) ajustado para o comprimento de onda de  $540 \text{ nm}$ .

### 1.4 SÍNTESE DE OLIGOSSACARÍDEOS

A síntese de GOS foi realizada em reatores termoestabilizados a  $40^\circ\text{C}$  de  $50 \text{ mL}$  (descontínuo) e  $200 \text{ mL}$  (contínuo). Foram utilizadas duas soluções tamponadas de lactose,  $150 \text{ g.L}^{-1}$  (descontínuo/contínuo) e  $300 \text{ g.L}^{-1}$  (contínuo). Duas concentrações de enzima imobilizada foram utilizadas,  $10 \text{ U.mL}^{-1}$  (descontínuo/contínuo) e  $28 \text{ U.mL}^{-1}$  (descontínuo). O tempo de residência no reator operando em modo contínuo foi selecionado baseando-se na produção de GOS máxima obtida na operação em modo descontínuo.



**Figura 6 - Reator utilizado para síntese de oligossacarídeos**

### 1.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES

A análise quantitativa de todos os sacarídeos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O sistema é composto de um controlador (modelo 600 - Waters), um injetor automático (modelo 717 plus - Waters) e um detector de índice de refração (modelo 133 - Gilson). A separação dos açúcares foi realizada pela coluna Supelcogel™ Ag (Supelco Inc.) a 80°C. A eluição isocrática foi feita com água Mili-Q, circulando a 0,5 mL.min<sup>-1</sup> constantemente des aerada pela injeção de 15 mL.min<sup>-1</sup> de gás hélio. A quantificação dos sacarídeos foi determinada pela relação entre a concentração e a área do pico observada no cromatograma, utilizando-se curvas de calibração. Os padrões utilizados e os respectivos tempos de retenção (R<sub>t</sub>) foram: 17,6 min para galactose; 16,0 min para glicose; 13,3 min para lactose e 10,4 para melezitose. Todos os dissacarídeos diferentes da lactose foram chamados GOS-2 e quantificados com a curva de calibração da lactose, os trissacarídeos foram chamados de GOS-3 e quantificados com a curva de calibração de melezitose. A soma de todos os oligossacarídeos formados durante a reação foi chamada de GOS.



## 2 FRACIONAMENTO DE OLIGOSSACARÍDEOS POR NANOFILTRAÇÃO

### 2.1 UNIDADE DE FILTRAÇÃO

A unidade de filtração utilizada para o fracionamento dos GOS é composta por um tanque de alimentação com capacidade para 2 litros, uma bomba de diafragma, um amortecedor de pulsações e uma célula retangular de canal estreito de  $20\text{ cm} \times 3\text{ cm} \times 0.2\text{ cm}$ , onde a membrana é acoplada, como mostra a Figura 7.



**Figura 7 - Reator de membrana utilizado para fracionamento da mistura de mono-, di- e oligossacarídeos.**

Esta configuração, onde a altura é muito menor que as demais dimensões, reproduz a situação encontrada nos reatores de módulos enrolados em espirais. Na parte superior da célula estão localizados espaçadores de 1,2 mm que exercem a função de promover turbulência no canal de alimentação, diminuindo a formação da camada de

polarização por concentração. A temperatura do tanque é mantida por uma camisa de termostatização. Através de uma cabeça de aquecimento, a temperatura pode ser controlada com uma precisão de  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . A pressão do sistema é ajustada por uma válvula de controle manual, localizada após a célula retangular. Fechando-se a válvula, o sistema pode atingir até 40 bar.

## 2.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas utilizadas nos ensaios foram preparadas pelo método de inversão de fases. O polímero utilizado, acetato de celulose, continha 38,9 % de acetil (Sigma). A solução polimérica, composta por 17% de acetato de celulose, 56% de acetona (densidade  $0,7915 \text{ g.mL}^{-1}$  - Merk) e 27 % de formamida (densidade  $1,135 \text{ g.mL}^{-1}$  - Merk), foi agitada até completa dissolução do polímero (pelo menos 15 horas de agitação). O gel translúcido obtido foi espalhando sobre uma placa de vidro (30 cm x 20 cm), com uma faca de 0,2 mm de espessura. Depois de 30 segundos de evaporação do solvente, a placa foi imersa em um banho de água deionizada com temperatura de  $0\text{-}3^{\circ}\text{C}$ . Depois de 2 a 3 horas as películas formadas foram colocadas em uma solução de etanol 15% e mantidas sobre refrigeração até o uso. As membranas foram cortadas em retângulos de 20 cm x 03 cm e em algumas, foi aplicado um tratamento térmico (*annealing*) para reduzir o tamanho dos poros (CATARINO *et al.*, 2008). Independentemente da temperatura utilizada ( $77,5^{\circ}\text{C}$  e  $80^{\circ}\text{C}$ ) o tempo de tratamento foi o mesmo, 11 minutos.

Todas as membranas foram compactadas antes do uso por recirculação de água deionizada a 30 bar por 3 horas. A caracterização foi feita pela permeabilidade hidráulica e pelos coeficientes de retenção,  $R_{obs}$ , dos solutos de referência. A permeabilidade hidráulica ( $L_p$ ) é o coeficiente angular da reta obtida quando os fluxos de permeação são colocados em um gráfico, em função da pressão. Para cada membrana, os fluxos volumétricos de permeação,  $J_v$ , da água e da solução tampão dado pela Equação 1, foram medidos a diferentes pressões a 25 e  $40^{\circ}\text{C}$ .

O coeficiente de retenção,  $R_{obs}$ , dado pela Equação 4, foi calculado para os seguintes solutos de referência: glicose (peso molecular  $180,1 \text{ g.mol}^{-1}$ ), lactose (peso molecular  $342,3 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e rafinose (peso molecular  $504,5 \text{ g.mol}^{-1}$ ), respectivamente mono-, di- e trissacarídeos, e os sais NaCl,  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{NaHPO}_4$ . Para as soluções salinas, a condutividade foi medida à temperatura ambiente, com correção para  $25^{\circ}\text{C}$  (Crison/Espanha). A concentração dos sacarídeos foi

determinada por CLAE nas condições descritas no item 1.5. Os valores obtidos para a condutividade dos sais foram convertidos para valores de concentração através de curvas de calibração.

As soluções foram preparadas na concentração de 600 ppm e os coeficientes de retenção medidos a 12 bar, a 25 e 40°C, com o reator operando em recirculação total, ou seja, o retentado e o permeado voltam para o tanque de alimentação. Para todos os solutos, como valor da concentração da solução de alimentação foi considerado o valor obtido da média das amostras retiradas do tanque de alimentação, no início e no fim dos ensaios.

Entre todos os ensaios as membranas foram lavadas com água deionizada até que, pelo menos, 90% do fluxo de permeação inicial fossem atingidos. A pressão efetiva transmembranar é dada pela diferença entre a pressão aplicada (P) e a diferença de pressão osmótica ( $\Delta\pi$ ) a que a membrana está submetida, dada pela Equação 5:

$$\Delta\pi = \sum_{j=1}^n \Delta MRT_i \quad (5)$$

onde  $j$  corresponde aos solutos em solução, variando de 1 a 9 componentes, incluindo todos os componentes da solução tampão,  $\Delta M$  é a diferença de molaridade entre a alimentação e o permeado,  $R$  é a constante dos gases perfeitos,  $T$  é a temperatura absoluta e  $i$  é o fator de van't Hoff, que representa o número de moles de espécies produzidos em solução por cada mol de soluto  $j$ :

$$i = 1 + \alpha(q - 1) \quad (6)$$

onde  $\alpha$  é o grau de dissociação e  $q$  é o número de espécies produzido durante a dissociação, por molécula de soluto. A Equação 5 também foi utilizada para calcular a pressão osmótica das soluções de açúcar de altas concentrações utilizadas nos ensaios de fracionamento, com  $i=1$ , pois as concentrações de açúcar não eram altas o suficiente para se justificar o uso de Equações do Virial, dado o desvio do comportamento ideal. (RAUTENBACK, 1989).

## 2.3 FRACIONAMENTO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

As soluções mistas de açúcares obtidas nos ensaios de síntese de GOS foram fracionadas com membranas de nanofiltração a 25 (150 g.L<sup>-1</sup>) e 40°C (150 e 300 g.L<sup>-1</sup>), a diferentes pressões. O fracionamento das soluções (2 L) foi feito em modo de recirculação total, sob aplicação de diferentes pressões. Para cada pressão aplicada, o fluxo volumétrico de permeação medido e a pressão osmótica foram calculadas pelas Equações 5 e 6. O valor médio obtido entre amostras retiradas no tanque de alimentação no início e no fim dos ensaios foi considerado como a concentração da solução de alimentação. Entre todos os ensaios as membranas foram lavadas com água deionizada até que, pelo menos, 90% do fluxo de permeação inicial fossem atingidos.

### 3 SÍNTESE E FRACIONAMENTO SIMULTÂNEO DE OLIGOSSACARÍDEOS

#### 3.1 UNIDADE DE FILTRAÇÃO

Para a síntese e fracionamento em simultâneo de GOS foi utilizada a instalação CELFA P-28 (Figura 8), composta por um tanque de alimentação encamisado com capacidade para 500 mL. A membrana de 26,4 cm<sup>2</sup> fica localizada na base do reator. Uma bomba faz a solução circular tangencialmente pela membrana e a fração que não é permeada retorna para o tanque de alimentação. A pressão do sistema, monitorada por um manômetro localizado na base da célula, foi conferida pela injeção de nitrogênio.



**Figura 8 – Unidade de filtração Celfa P-28 utilizada para a síntese e fracionamento simultâneo de oligossacarídeos.**

#### 3.2 REAÇÃO E FRACIONAMENTO

As membranas utilizadas foram preparadas e submetidas a um tratamento térmico, como descrito no item 2.2. Antes de cada ensaio, as membranas foram compactadas e o fluxo de permeação da água medido em diferentes pressões.

Para a reação de síntese e fracionamento simultâneo de GOS, uma solução de 150 g.L<sup>-1</sup> de lactose foi preparada com a solução tampão pH 6,5 utilizada no item 3.1 (fosfato de sódio e potássio 50 mM, contendo 10 mM de cloreto de magnésio). A reação ocorreu a 40°C com 10 U.mL<sup>-1</sup> de enzima. Os efeitos da variação da pressão (20 e 24 bar) e da velocidade tangencial (1,7; 2,0 e 2;4 m.s<sup>-1</sup>) foram estudados. Amostras do permeado e do retentado foram retiradas ao longo do tempo. As amostras do retentado (750 µL) foram inativadas por diminuição do pH adicionado-se a mesmo volume de ácido tricloroacético 0,05 N. As análises dos açúcares foram realizadas por HPLC, como descrito no item 1.5.

### 3.3 CÁLCULO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA

O Modelo das resistências em série foi utilizado para calcular as resistências da membrana ao fluxo de permeação. A resistência da membrana ( $R_m$ ) foi calculada através da Equação 7. A permeabilidade hidráulica da membrana ( $L_p$ ) é o coeficiente angular da reta obtida pelo gráfico do fluxo de permeação da água em função das diferentes pressões aplicadas.

$$L_p = \frac{1}{\mu \times R_m} \quad (7)$$

A seguir, a mistura reacional (150 g.L<sup>-1</sup> de lactose pH 6,5 mais 10 U.mL<sup>-1</sup> de enzima) foi filtrada a uma pressão de 20 bar, 40°C, por 60 minutos e 1,7 m.s<sup>-1</sup> de velocidade de circulação. O fluxo de permeação desta mistura ( $J_{rm}$ ) foi então medido e a resistência total ( $R_t$ ) calculada de acordo com a Equação 8.

$$J_{rm} = \frac{\Delta P}{\mu \times R_t} \quad (8)$$

onde  $R_t$  é igual a soma das resistências da membrana ( $R_m$ ), do soluto fracamente aderido à membrana ( $R_{wk}$ ) e do soluto fortemente aderido à membrana ( $R_{st}$ ). Após o ensaio, a célula esgotada e lavada superficialmente circulando-se água deionizada à pressão atmosférica por 15 minutos para remoção do soluto fracamente aderido à membrana (polarização por concentração e fouling reversível).

A soma das resistências da membrana ( $R_m$ ) e devida ao *fouling* ( $R_{st}$ ) foi então calculada pela filtração de água deionizada a 40°C, medindo-se o fluxo de permeado para a pressão aplicada de 20 bar, como mostra a Equação 9. A resistência do soluto fracamente aderido à membrana,  $R_{wk}$ , foi calculada por diferença entre a resistência total e esta última resistência obtida ( $R_m + R_{st}$ ).

$$J_w = \frac{\Delta P}{\mu \times (R_m + R_{st})} \quad (9)$$

A membrana foi lavada com uma solução de NaOH 0,01M por 15 minutos para remoção do soluto fortemente aderido à membrana para que o procedimento fosse repetido a 2,0 m.s<sup>-1</sup>. Para os cálculos, o valor da viscosidade da água utilizado foi 6,5 E<sup>-4</sup> Pa.s.



## 4 HIDRÓLISE DA LACTOSE PRESENTE NO SORO DE QUEIJO

### 4.1 ENZIMA

Todos os ensaios de hidrólise da lactose foram realizados utilizando-se a solução comercial de enzima  $\beta$ -galactosidase *K. lactis*, Maxilact LX-5000, gentilmente fornecida pela Global Food (Brasil). Segundo informações do fabricante, cada grama do produto contém 5000 NLU (*Neutral Lactose Units*). Uma NLU é definida como a quantidade de enzima que pode liberar 1,0  $\mu$ mol de o-nitrofenol por minuto sob as condições do teste. As enzimas foram mantidas sob refrigeração a 5°C.

### 4.2 SUBSTRATO

Como substrato foi utilizado o permeado resultante da ultrafiltração do soro de queijo fornecido gentilmente pela empresa Laticínios Do Vale - Brasil. Todo o soro utilizado foi filtrado em um único ensaio, utilizando-se uma membrana de 10 kDa (Romicon - Koch Membranes/USA), a 2,6 bar e 45°C. O permeado foi colocado em recipientes com capacidade para 500 mL e armazenado à temperatura de -18°C. Imediatamente antes de cada ensaio, o permeado do soro foi descongelado e filtrado em papel qualitativo (Qualy/Brasil) para remoção do material precipitado durante o congelamento. Este permeado foi chamado de permeado pré-tratado. Um tratamento térmico (80°C/20 minutos) foi aplicado ao soro pré-tratado para remoção do material protéico residual. Depois de aquecido, o soro pré-tratado foi centrifugado (modelo 204N - Fanem /Brasil) a 3000 rpm por 20 minutos. O material precipitado foi mantido a -18°C e o sobrenadante chamado de permeado sem proteína. A determinação de lactose no permeado sem proteína foi baseada na Instrução Normativa nº 68 - Métodos Analíticos Oficiais Físicos Químicos, para controle de leite e produtos lácteos (BRASIL, 2006).

### 4.3 MEMBRANAS

Dois tipos de membrana foram utilizados nos ensaios de hidrólise em reator a membrana. Membranas de poliétersulfona (PES) foram preparadas pelo método de inversão de fases. A solução polimérica foi preparada com 12% (p/p) de polímero com peso molecular  $115.000 \text{ g.mol}^{-1}$  (Dupont S.A) e 88% (p/p) de N-N-Dimetilformamida, ou DMF (Nuclear Casa da Química). A mistura polímero/solvente permaneceu sob agitação com aquecimento por 24 horas. Posteriormente, a solução formada permaneceu em descanso por mais 24 horas para que a bolhas de ar saíssem da mesma. A solução polimérica foi espalhada com um bastão de vidro, em uma placa de vidro (30 cm x 20 cm) delimitada por fios de nylon com 0,5 mm de espessura. A placa de vidro foi coberta com um suporte de poliéster-polipropileno (Viledon Filter, Carl Freudenberg/Germany). Depois do espalhamento, a placa de vidro contendo a solução polimérica foi imediatamente imersa em um banho de coagulação com água a  $20^{\circ}\text{C}$  por 4 horas. As membranas formadas foram retiradas da água e colocadas em papel toalha até completa secagem. Também foram utilizadas membranas de polifluoreto de vinilideno (PVDF) de 10 kDa (Romicon). Após preparo, e imediatamente antes do uso, as membranas foram compactadas por circulação de água destilada ( $25^{\circ}\text{C}$ ) a 4 bar por 3 horas. Após a compactação, o fluxo volumétrico de permeação,  $J_v$ , para a água destilada foi medido na mesma pressão em que a membrana seria submetida no ensaio a seguir.

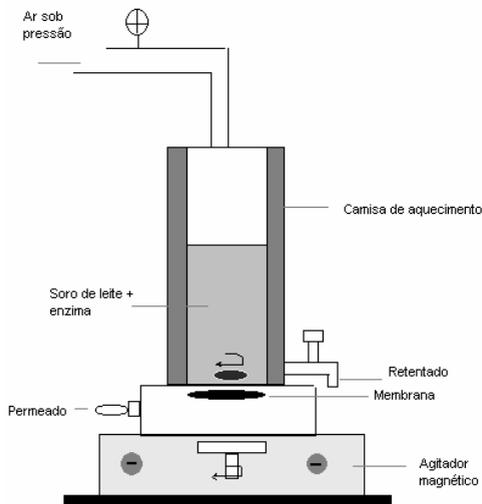
### 4.4 RETENÇÃO DA ENZIMA

Para verificar se as membranas preparadas estavam de fato, retendo a enzima, amostras do retentado e do permeado foram lidas em espectrofotômetro a 278 nm (Shimadzu UV-1650PC). A retenção percentual da enzima foi calculada subtraindo-se de 100, a divisão da absorbância da solução enzimática inicial pela absorbância da solução enzimática permeada.

## 4.5 UNIDADES DE FILTRAÇÃO

### 4.5.1 Filtração com Fluxo Perpendicular

Célula de filtração de bancada operando em fluxo perpendicular, conforme desenho esquemático mostrado na Figura 9.

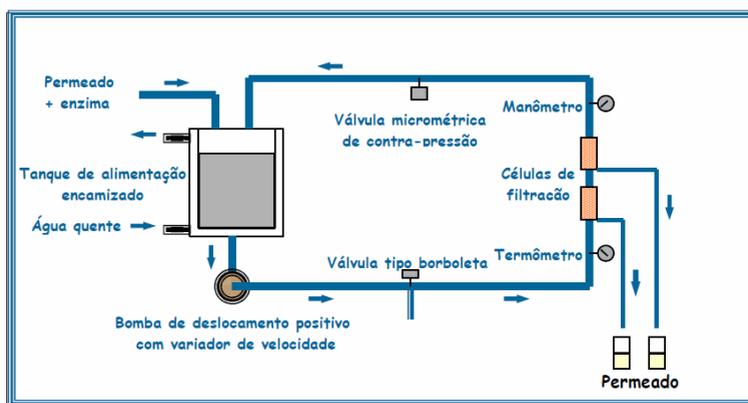


**Figura 9 - Desenho esquemático da célula de ultrafiltração de bancada com fluxo perpendicular.**

A célula foi confeccionada em aço inoxidável ANSI 316, com capacidade para 200 mL, e 10,2 cm<sup>2</sup> de área útil filtrante, sendo a mesma apoiada sobre um dispositivo de agitação mecânica, que permitiu a agitação do substrato através da utilização de agitador magnético. No seu interior, a célula possui na extremidade inferior uma grade de proteção, sobre a qual se localiza o agitador magnético e logo abaixo, o compartimento da membrana. Um banho termostatizado com circulação de água pela camisa da célula de ultrafiltração foi utilizado para manter a temperatura de processo no nível desejado. O controle da pressão foi realizado pela utilização de um manômetro com regulador de pressão, acoplado a um sistema de ar comprimido, conectado na parte superior da célula. Duas amostras para análise eram obtidas, simultaneamente, através dos pontos de coleta de permeado e retentado.

#### 4.5.2 Filtração com Fluxo Tangencial

O equipamento em escala piloto, mostrado na Figura 10 foi utilizado para as reações com fluxo de alimentação circulando em modo tangencial. A unidade é composta por um tanque de alimentação com capacidade para 5 litros, uma bomba de deslocamento positivo (1,0 cv) com inversor de frequência, válvula de contra-pressão e manômetro. As membranas, com área individual de  $17,7 \text{ cm}^2$  foram colocadas, simultaneamente, nas duas células independentes, fabricadas em acrílico transparente e dispostas em série. A temperatura de processo foi estabelecida e mantida através de circulação de água por um banho termostático conectado à camisa do tanque de alimentação.

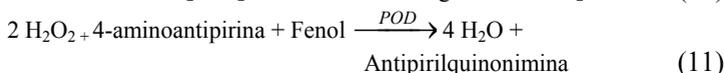


**Figura 10 - Desenho esquemático do equipamento de ultrafiltração com fluxo tangencial.**

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE E DO PERCENTUAL DE HIDRÓLISE

O percentual de hidrólise foi quantificado através da quantificação da glicose liberada pela ação da enzima sobre a lactose. A concentração de glicose foi medida com um kit colorimétrico enzimático comercial. O método baseia-se na oxidação da glicose a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio com a enzima glicose oxidase atuando como catalisador. O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha. A coloração foi determinada por espectrofotômetro (modelo E225D -

CELM/Brasil) com comprimento de onda de 500 nm. O kit pode ser utilizado para concentrações de glicose entre  $0,0023 \text{ g.L}^{-1}$  e  $5 \text{ g.L}^{-1}$ . As reações que ocorrem durante a realização do teste são:



O percentual de hidrólise foi determinado pela estequiometria da reação, considerando-se que para cada molécula de lactose degradada é formada uma molécula de glicose e uma de galactose. Sabendo-se a concentração de lactose no substrato, o percentual de hidrólise por ser calculado pela Equação 12:

$$\% \text{hidrólise} = \left( \frac{C_g}{C_{gt}} \right) \cdot 100 \quad (12)$$

onde  $C_g$  é a quantidade de glicose medida na amostra e  $C_{gt}$  é a quantidade de glicose que seria formada considerando-se a hidrólise total da lactose presente no substrato.

#### 4.6.1 Análise das Amostras

As leituras das amostras e da solução padrão foram feitas em espectrofotômetro contra o branco, composto apenas pelo reagente de cor. Para cada  $20 \mu\text{L}$  de amostra ou de padrão, foram adicionados  $2 \text{ mL}$  do reagente de cor fornecido pelo kit. O branco foi utilizado para a calibração do espectrofotômetro e o padrão, que continha uma concentração conhecida de glicose, para se determinar a curva de calibração do teste. Devido à linearidade do teste, apenas uma leitura do padrão foi realizada. Os tubos de ensaio preparados foram homogeneizados e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente. A medida da absorbância foi realizada a  $500 \text{ nm}$ . A absorbância obtida é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra. Como a metodologia obedece à lei de Lambert-Beer, a concentração das amostras pode ser calculada pelo fator de calibração,  $F_c$ , dado pela razão entre a concentração de glicose ( $0,001 \text{ g.mL}^{-1}$ ) e a absorbância medida

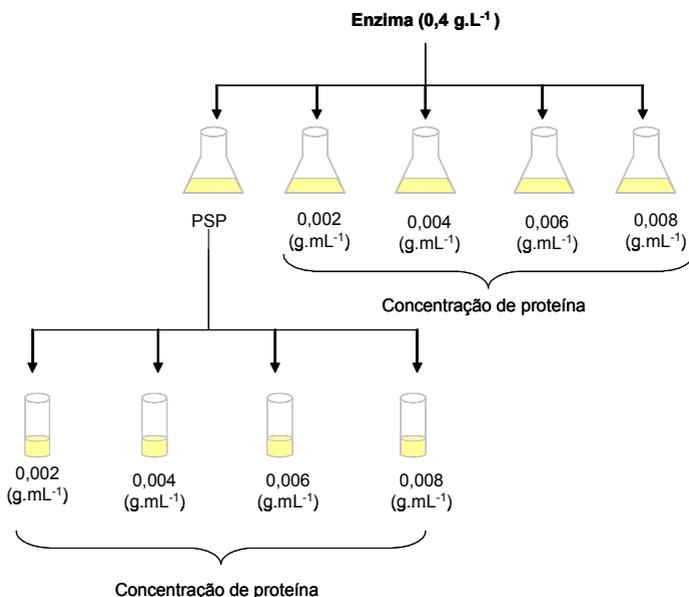
para o padrão. A concentração de glicose nas amostras é dada pela multiplicação da absorbância obtida pelo fator de calibração.

#### 4.7 EFEITO PROTEÍNA RESIDUAL NA DETERMINAÇÃO DA GLICOSE

Soluções de glicose com diferentes concentrações foram preparadas. O material protéico precipitado, obtido anteriormente, foi adicionado ao permeado sem proteína nas concentrações de 1 g.L<sup>-1</sup> e 4 g.L<sup>-1</sup>. A concentração de glicose foi medida na presença e na ausência de proteína. O efeito da concentração de proteína (4, 8, 12 e 16 g.L<sup>-1</sup>) foi medido na concentração de glicose de 15 g.L<sup>-1</sup>.

A taxa de hidrólise foi medida no permeado sem proteína e com diferentes concentrações de material protéico (2, 4, 6 e 8 g.L<sup>-1</sup>). Todas as reações foram realizadas em frascos erlenmeyer de 50 mL, em um banho Dubnoff termoestabilizado a 35°C, agitado a 200 rpm, utilizando-se 0,4 g.L<sup>-1</sup> de concentração de enzima. O pH foi ajustado para 6,8 com solução tampão fosfato (0,6 M). Depois de 60 minutos, amostras foram retiradas e inativadas por imersão em água em ebulição por 3 minutos. Paralelamente, em um erlenmeyer a reação de hidrólise do permeado sem proteína ocorreu nas mesmas condições. Depois da completa reação de hidrólise, o permeado hidrolisado foi distribuído em tubos de ensaio (5 mL) e o material protéico foi adicionado em diferentes concentrações (2, 4, 6 e 8 g.L<sup>-1</sup>) e a quantidade de glicose medida com o kit enzimático.

Um esquema do procedimento seguido pode ser visto na Figura 11.



**Figura 11 – Ensaios realizados para estudar o efeito das proteínas na hidrólise do permeado**

#### 4.8 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA TAXA DE HIDRÓLISE

Diferentes concentrações de enzima foram adicionadas a 50 mL permeado sem proteína (pH 6,8) a 35°C. As reações ocorreram simultaneamente em um banho Dubnoff agitado a 200 rpm. As concentrações de enzima utilizadas foram 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 g.L<sup>-1</sup>. Depois de 60 minutos, amostras de dentro dos frascos foram retiradas, inativadas por imersão em água em ebulição e a quantidade de glicose formada foi determinada pelo kit enzimático. Para verificar se a taxa de hidrólise da lactose seria diferente devido a interações entre a enzima e a membrana, a variação da concentração de enzima também foi testada nos dois reatores a membrana.

Na unidade de filtração com fluxo perpendicular foi utilizada uma membrana de PES. Para 200 mL de permeado sem proteína (pH 6,8/35°C), as seguintes concentrações de enzima foram utilizadas: 0,05;

0,1; 0,2 e 0,4 g.L<sup>-1</sup>. Após a adição da enzima, a célula foi fechada e a pressão de 2 bar aplicada.

Na unidade piloto de filtração com fluxo tangencial, as concentrações de enzima utilizadas foram 0,1; 0,2 e 0,4 g.L<sup>-1</sup>, para 3000 mL de permeado pré-tratado (pH 6,8/35°C), circulando a 0,9 m.s<sup>-1</sup> e com pressão aplicada de 2 bar. Para esta unidade foram utilizadas membranas comerciais de PVDF. Também foi realizada uma reação de hidrólise com permeado sem proteína (pH 6,8/35°C) e 0,2 g.L<sup>-1</sup> de concentração de enzima. Para os dois reatores, o fluxo de permeação ( $J_v$ ) foi medido por 60 minutos. Após este tempo, amostras do retentado e do permeado foram retiradas, imersas em água em ebulição para inativação da enzima. A quantidade de glicose foi medida com o kit enzimático. Para cada reação foi utilizada uma nova membrana.

Depois das reações os reatores foram esvaziados e o fluxo de permeação de água medido novamente para o cálculo do índice de colmatagem ( $IC$ ), dado pela equação 13.

$$IC = 100 * \left( 1 - \left( \frac{J_w'}{J_w} \right) \right) \quad (13)$$

onde  $J_w'$  é o fluxo de água depois da reação e  $J_w$  o fluxo de permeação de água inicial.

#### 4.9 ESTABILIDADE DA ENZIMA

Para verificação da estabilidade da enzima ao longo do tempo, na unidade de filtração perpendicular, 60 mL de permeado sem proteína (pH 6,8/35°C) foram adicionados juntamente com 0,2 g.L<sup>-1</sup> de enzima e 2 bar de pressão foram aplicados. Depois de 90 minutos a célula foi aberta e o mesmo volume permeado (cerca de 20 mL) foi repostado com novo permeado sem proteína. Este procedimento foi repetido três vezes e a quantidade de glicose presente no permeado foi medida a cada 90 minutos, após inativação da enzima.

#### 4.10 INTERAÇÃO ENZIMA-MEMBRANA

A unidade de filtração perpendicular foi preenchida com 150 mL de permeado sem proteína. Estabilizada a temperatura de 35°C, a enzima foi adicionada na concentração de 0,2 g.L<sup>-1</sup>, a célula foi fechada e a pressão de 2 bar aplicada ao sistema, com uma membrana comercial de PVDF. Depois de 2 horas, a célula foi lavada três vezes com água destilada e preenchida novamente com o mesmo volume de permeado sem proteína, sem adição de enzima. A filtração transcorreu por mais 2 horas. Amostras do permeado e do retentado foram coletadas ao longo do tempo. A taxa de hidrólise foi determinada depois da inativação enzimática.

A técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho, com transformada de Fourier (FTIR, Perkin Elmer/USA), foi utilizada para investigar se ocorreu alguma ligação química a nível molecular, entre a enzima e a superfície da membrana. Foram analisadas membranas de PVDF: uma nova, outra depois de imersa em uma solução enzimática 0,2 g.L<sup>-1</sup> por 24 horas, à temperatura ambiente e, a terceira foi uma membrana utilizada na hidrólise de permeado em proteína na célula de filtração perpendicular (0,2 g. L<sup>-1</sup> de concentração enzimática, 2 bar e 35°C por 2 horas).



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS**



ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. **Food service impulsiona setor de queijos**. Disponível em: [http://www.abiq.com.br/imprensa/abiqnamidia\\_detalhes.asp?id=125](http://www.abiq.com.br/imprensa/abiqnamidia_detalhes.asp?id=125). Acesso em 10 de janeiro de 2009.

ALBAYRAK, N. e YANG, S.T. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -Galactosidase immobilized on cotton cloth. **Biotechnology and Bioengineering**, v.77, n.1, p.8-19, 2002.

ALMEIDA, E.S. **Tratamento do efluente da indústria de queijos por processos biológicos e químicos**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004. 67p.

ANDRADE, A.C. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase *Saccharomyces cerevisiae***. Tese de Mestrado. Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005. 110p.

ANTHONY, J.C.; MERRIMAN, T.N. e HEIMBACH, J.T. 90-Day oral (gavage) study in rats galactooligosaccharides syrup. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 819-826, 2006.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem**. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Atualizado em julho de 2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em 26 de janeiro de 2010.

ARONSON, M. Transgalactosidation during lactose hydrolysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.39, p.370-378, 1952.

ASP, N.-G.; BURVALL, A.; DAHLQVIST, A.; HALLGREN, P. e LUNDBLAD, A. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (Maxilact). Part 2- Oligosaccharide structure. **Food Chemistry**, v. 5, p. 147-155, 1980.

BAILEY, J.E. e OLLIS, D.F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2 ed. New York, 1986.

BARRETEAU, H.; DELATTRE, C. e MICHAUD, P. Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation. **Food Technology. Biotechnolog**, v. 44, p. 323-333, 2006.

BAYRAMOĞLU, G.; TUNALI, Y. e ARICA, M.Y. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. **Catalysis Communications**, v. 8, p. 1094-1101, 2007.

BAYRAMOĞLU, G.; YILMAZ, M.; ŞENEL, A.Ü. e ARICA M.Y. Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 262-274, 2008.

BELLONA, C. e DREWES, J.E. The role of membrane surface charge and solute physico-chemical properties in the rejection of organic acids by NF membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 249, p. 227-234, 2005.

BERRUGA, M.I.; JASPE, A. e SANJOSE, C. Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 40, p.119-123, 1997.

BHATTACHARYYA, D. e WILLIAMS, M.E. **Reverse osmosis: theory** In Membrane Handbook, Van Nostrand Reinhold, New York, 1992.

BIEGER, A. e LIMA, J.F. Empresa e desenvolvimento sustentável: um estudo de caso da Sooro. **Revista FAE**, Curitiba, v.11, n.2, p.59-67, jul./dez. 2008.

- BOON, M.A.; JANSSEN, A.E.M. e VAN 'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 271-281, 2000.
- BOON, M.A.; VAN 'T RIET, K. e JANSSEN, A.E.M. Enzymatic synthesis of oligosaccharides: product removal during a kinetically controlled reaction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n. 4, 2000.
- BRANDÃO, S.C.C. Soro: um desafio para as fábricas de queijos. **Leite & Derivados**, n.15, p.13-19,1994.
- BURVALL, A.; ASP, N.G. e DAHLQVIST, A. Oligosaccharides formation during hydrolysis of lactose with *S. lactis* lactase (Maxilact). Part 1: Quantitative Aspects. **Food Chemistry**, v.4, p. 243-250, 1979.
- BURVALL, A.; ASP, N.G. e DAHLQVIST, A. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *S. lactis* lactase (Maxilact). Part 3: Digestibility by human intestinal enzymes in vitro. **Food Chemistry**. v. 5; p.189-194, 1980.
- BUTYLINA, S.; LUQUE, S.; NYSTRÖM, M. Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration. **Journal of Membrane Science**. v. 280, p. 418-426. 2006.
- CARMINATTI, C. A. **Ensaio de Hidrólise enzimática da Lactose em Reator de membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***. (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001. 66p.
- CARRARA, C.R. e RUBIOLO, A. The Immobilisation of  $\beta$ -Galactosidase on chitosan. **Biotechnology Progress**, v. 10, p. 220-224, 1994.

CAVALLIERI, A.L.F., **Influência da desnaturação térmica e do pH sobre as propriedades reológicas de proteínas do soro e sua compatibilidade termodinâmica com a xantana.** Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003. 130 p.

CHATTERTON, D.E.W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P. e BRODKOR, A. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin – Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1229–1240, 2006.

CHEN, C-S.; HSU, C-K. e CHIANG, B-H. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 801-808, 2002.

CHENG, C.-C.; YU, M.-C. ; CHENG, T.-C. ; SHEU, D.-C.; DUAN, K.-J. e TAI, W.-L. Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 793-797, 2006.

CHOCKCHAISAWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V.I.; NIRANJAN, K. e RASTALL, R.A. Synthesis of Galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, p. 434-443, 2004.

CRITTENDEN, R.G. e PLAYNE, M.J. 1996. Production, properties and applications of foodgrade oligosaccharides. **Trends Food Science and Technology**, v.7, n. 11, p. 353-361, 1996.

CRITTENDEN, R.G. e PLAYNE, M.J. Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 297-302, 2002.

CUNHA, L.R.; SOARES, N.F.F.; ASSIS, F.C.C.; MELO, N.R.; PEREIRA, A.F. e SILVA, C.B. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, sup. 1, p. 23-26, 2007.

CURCIO, S. CALABRÒ, V. e IORIO, G. A theoretical and experimental analysis of a membrane bioreactor performance in recycle configuration. **Journal of Membrane Science**, v. 273, n. 1-2, p. 129-142, 2006.

CZERMAK, P.; EBRAHIMI, M.; GARU, K.; NETZ, S.; SAWATZKI, G. e PFROMM, P.H. Membrane-assited enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process. **Journal of Membrane Science**, v. 232, p. 85-91, 2004.

DAUFIN, G.; ESCUDIER, J.-P.; CARRERE, H.; BEROT, S.; FILLAUDEAU, L. e DECLoux, M. Recent and emerging applications of membrane processes in the food and dairy industry. **Trans IChemE**, v. 79, Part C, p. 89-102, 2001.

DI SERIO, M.; MATURO, C.; DE ALTERIS, E.; PARASCANDOLA, P.; TESSER R. e SANTACESARIA, E. Lactose hydrolysis by immobilized  $\beta$ -galactosidase: the effect of the supports and the kinetics. **Catalysis Today**, v. 79–80, p. 333–339, 2003.

DURING, M.J.; XU, R.; YOUNG, D.; KAPLITT, M.G.; SHERWIN, R.S. e LEONE, P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. **Nature Medicine**, v. 4, p.1131-1135, 1998.

FENG, Y.M.; CHANG, X.L.; WANG, W.H. e MA, R.Y. Separation of galacto-oligosaccharides mixture by nanofiltration. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p.326-332, 2009.

FODA, M.I. e LOPEZ-LEIVA, M. Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 581-587, 2000.

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

FURTADO, M.M.; KARDEL, G.; NETO, J.P.M.L. Lactase na indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios "Candido Tostes"**, v. 50, n. 294, p. 15-17, 1995.

GEISSER, A.; HENDRICH, T.; BOEHM, G. e STAHL, B. Separation of lactose from human milk oligosaccharides with simulated moving bed chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 1092, p. 17-23, 2005.

GEKAS, V. e LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose – A literature review. **Process Biochemistry**, v.20, p.2-12, 1985.

GHALY, A.E. e SINGH, R.K. Pollution potential reduction of cheese whey through yeast fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, p. 181-2-3, 1989.

GIBSON, G.R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements*, v.1, p. 25–31, 2004.

GIBSON, G.R. e ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIORNO, L.; DRIOLI, E. Biocatalytic membrane reactors: Applications and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 339-349, 2000.

GIROTO, J.M. **Soro de leite nos laticínios do estado do Paraná: potencial, oportunidades e restrições**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

GIROTO, J.M. e PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, n. 10, Setembro/Outubro, 2001.

GONZÁLEZ-SISO, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

GOULAS, A.K., KAPASAKALIDIS, P.G., SINCLAIR, H.R., RASTALL, R.A. e GRANDISON, A.S. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 209, p. 321-335, 2002.

GU, Q. Enzyme-mediated reactions of oligosaccharides and polysaccharides. **Journal of Environmental Polymer Degradation**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 1999.

HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Escola Piloto em Engenharia Química. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ. 1997, 112p.

HABERT, A.C.; BORGES, C.P. e NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Escola Piloto em Engenharia Química – COPPE/UFRJ. E-papers Serviços Editoriais, 2006. 180p.

HAIDER T, HUSAIN Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 72–80, 2007.

HATZINIKOLAOU, D.G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A.D.; CHRISTAKOPOULOS, P. e KEKOS, D. Modeling of the simultaneous hydrolysis–ultrafiltration of whey permeate by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v.24, n.2, p. 161-172, 2005.

HO, W. e SIRKAR, K.K. **Membrane handbook**. Chapman and Hall, New York, 1992.

HOLSINGER, V.H.; POSATI, L.P. e DEVILBISS, E.D. Whey beverages: A review. **Journal of Dairy Science**, v.57, p. 849-859, 1974.

HOSSEINI, M.; SHOJAOSADATI, S.A. e TOWFIGHI, J. Application of a bubble-column reactor for the production of a single-cell protein from cheese whey. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, p. 764-766, 2003.

JIMÉNEZ-GUZMÁN, J.; CRUZ-GUERRERO, A.E.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; GÓMEZ-RUIZ, L. e GARCÍA-GARIBAY, M. Enhancement of lactase activity in milk by reactive sulphydryl groups induced by heat treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2497-2502, 2002.

JIMÉNEZ-GUZMÁN, J.; SARABIA-LEOS, C.; CRUZ-GUERRERO, A.E.; RODRIGUEZ-SERRANO, G.M.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; GÓMES-RUIZ, L. E. e GARCÍA-GARIBAY, M. Interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity.

**Internacional Dairy Journal**, v. 16, n.10, p. 1169-1173, 2006.

JULIANO, A.M.M.; PETRUS, J.C.C. e TORRANO, A.D.M.

Recuperação por ultrafiltração das proteínas do soro para fabricação de queijos. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v.42, p. 3-6, 1987.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G. e VICARIA, J. M. A new model proposed for hydrolysis of lactose by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300-309, 2002.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G. e VICARIA, J. M. Kinetic model for lactose hydrolysis in a recirculation hollow-fiber bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 2, p. 397-405, 2004.

KAMADA, T.; NAKAJIMA, M.; NABETANI, H.; SAGLAM, N. e IWAMOTO, S. Availability of membrane technology for purifying and concentrating oligosaccharides. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 435-440, 2002.

KOCIÁN, J. Lactose intolerance – minireview. **International Journal Biochemistry**, v. 20, n. 1, p.1-5, 1988.

KOSIKOWSKI, F.V. Greater utilization of whey powder for human consumption and nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 8, p. 1343-1345, 1967.

KOSIKOWSKI, F.V. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.7, p. 1149-1160, 1979.

LADERO, M.; SANTOS, A. e GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 583–592, 2000.

LI, W.; LI, J.; CHEN, T. e CHEN, C. Study on nanofiltration for purifying fructooligosaccharides I. Operation modes, **Journal of Membrane Science**, v. 245, p. 123-129, 2004.

Li, X.; ZHOU, Q.Z.K. e CHEN, X. D. Pilot-scale lactose hydrolysis using  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton fabric. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, n. 5, p. 497-500, 2007.

LOEB, S. e SOURIRAJAN, S. Sea water demineralization by means of an osmotic membrane. **Advances in Chemistry Series**, v. 38, p. 117-132, 1962.

LÓPEZ-LEIVA, M.H. e GUZMAN, M. Formation of oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**, v. 30, n.8, p.757-762, 1995.

LUQUET, F.M. **Leche y Productos lacteos vaca-oveja-cabra, 2 Los Productos Lacteos – Transformacion y Tecnologias**, Editora Acribia, S. A. Zaragoza (España), 1993, 524p

MACFARLENE, G.T.; STEED, H. e MACFARLENE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 305-344, 2008.

MAHONEY, R.R. Lactose: Enzymatic modification. In: Lactose, water, salts and vitamins. **Advanced Dairy Chemistry**, v. 3, p. 77-125. 1997.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 147-154, 1998.

MAISCHBERGER, T. ; NGUYEN,T. ; SUKYAI, P. ; KITTL, R. ; RIVA, S. ; LUDWIG, R. e HALTRICH, D. Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 12, p. 2140-2147, 2008.

MÄNTTÄRI, M.; PIHLAJAMÄKI, A. e NYSTRÖM, M. Effect of pH on hydrophilicity and charge and their effect on the filtration efficiency of NF membranes at different pH. **Journal of Membrane Science**, v. 280, n. 1-2, p. 311-320, 2006.

MARTÍNEZ-FEREZ, A.; RUDLOFF, S.; GUADIX, A.; HENKEL, C. A.; POHLENTZ, G.; BOZA, J.J.; GUADIX, E.M. e KUNZ, C. Goat's milk as natural source lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 2, p. 173-181, 2006.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; OLANO, A.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. e JIMENO, M.L. Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 557-563, 2008.

MARTINS, A.R. e BURKERT, C.A.V. Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.3, p.230-240, 2009.

MASUDA, T., SONOBE, T., MATSUDA, F. e HORIE, M. **Process for fractional separation of multi-component mixture**. U.S. patent 5.198.120, 1993.

MATSUBARA, Y., IWASAKI, K., NAKAJIMA, M., NABETANI, H. e NAKAO, S. Recovery of oligosaccharides from steamed soybean waste water in Tofu processing by reverse osmosis and nanofiltration membranes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, p. 421-428, 1996.

MATSUMOTO, K.; NATSUKO, T. e TSUNEKAZU, W. **Method for producing galactooligosaccharides**. EP0272095, 1988.

MAUBOIS, J.L.; MOCQUOT, G.; VASSAL, L. Procédé de traitement du lait et de sous-produits laitiers. Patent Française 2.052.121, Paris, França, 1969.

MAUGARD, T.; GAUNT, D.; LEGOY, M.D. e BESSON, T. Microwave-assisted synthesis of galactooligosaccharides from lactose with immobilized -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, **Biotechnol. Lett.**, 25 (2003) 623-629.

MDA. Ministério do Desenvolvimento Agrário. **Agricultores familiares de Santa Catarina** investem em fábrica de leite em pó. Publicado em 14 de janeiro de 2009, disponível em

<<http://www.mda.gov.br/portal/index/show/index/cod/134/codInterno/20045>>. Acesso em 10 de janeiro de 2009.

MINHALMA, L.M. **Síntese e Otimização de Processos de Recuperação de Águas Residuais Industriais com Integração de Ultrafiltração e Nanofiltração**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2001, 345p.

MEHAIA, M.A.; ALVAREZ, J. e CHERYAN, M. Hydrolysis of whey permeate lactose in a continuous stirred tank membrane reactor. **International Dairy Journal**, v. 3, n. 2, p. 179-192, 1993.

MEHRA, R. e KELLY, P. Milk oligosaccharides: Structural and technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1334-1340, 2006.

MICKE, P.; BEEH, K.M. e BUHL, R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Nutrition**, v.41, p.12-18, 2002.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. The Netherlands, 2º edição, 2003. 564p.

MUSSATTO, S.I. e MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587-597, 2007.

NELSON, F.E. e BROWN, W. Corrosion whey utilization in fruit juice drinks. **Journal of Dairy Science**, v.52, n.6, p.901, 1969.

NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: EMBRAPA GADO DE LEITE. **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil**: qualidade e segurança alimentar. Juiz de Fora, MG, p. 97-108, 2001.

NAKAMAE, I.J. **Anualpec 2004**: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP, p.191-232, 2004.

NIITYNEN, L.; KAJANDER, K. e KORPELA, R. Galacto-oligosaccharides and bowel function. **Scandinavian Journal of Food & Nutrition**, v. 51, n.2, p. 62-66, 2007.

NOBLE, R.D. e STERN, S.A. **Membrane Separations Technology - Principles and Applications**. Edited by NOBLE, R.D., STERN, S.A., 718 p., 1995.

NOVALIN, S.; NEUHAUS, W. e KULBE, K.D. A new innovative process to produce lactose-reduced skim milk. **Journal of Biotechnology**, v.119, n.2, p.212-218, 2005.

OGRODOWSKI, R. **Produção de biomassa a partir do soro de queijo para obtenção de ribonucleotídeos**. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. 122 p.

ONISHI, N., YAMASHIRO, A. e YOKOZEKI, K. Production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Sterigmatomyces elviae* (BS 8119). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4022-4025., 1995.

ÖZBEK, B.; SENER, N. e APAR, D.K. A modelling study on milk lactose hydrolysis and  $\beta$ -galactosidase stability under sonication. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 1493–1500. 2006.

ÖZDURAL, A.R.; TANYOLAÇ, D.; BOYACI, I.H.; MEHMET MUTLU, M. e WEBB, C. Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 27–36, 2003.

PAZUR, J.H. The enzymatic conversion of lactose into galactosyl oligosaccharides. **Science**, v. 117, p. 355-356, 1953.

PEREIRA FILHO, D.; FURLAN, S. A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). **Revista Saúde e Ambiente**, v. 5, n. 1, p. 24-30, 2004.

PESELA, B.C.CH.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCIA, J.L., CARRASCOSA, A.V., GUISAN, J.M. e

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 199-205, 2003.

PETRUS, J.C.C. **Preparação, modificação e caracterização de membranas assimétricas para clarificação de suco de frutas**. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997. 139 p.

PONTALIER, P.Y.; ISMAIL, A. e GHOU, M. 1997. Mechanisms for the selective rejection of solutes in nanofiltration membranes. **Separation and Purification Technology**, v. 12, p. 175-181, 1997.

POSANO, E.H.G; PINTO, M.F. e CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. Soro de Leite - obtenção, características e aproveitamento: revisão. **Semina**, v.13, p. 92-96, 1992.

PRENOSIL J.P., STUKER E. e BORNE J.R. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose. Part I State of art. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 1019-1025, 1987.

PRUKSASRI, S. **Production and separation of galacto-oligosaccharides from lactose by  $\beta$ -galactosidase immobilized on nanofiltration membranes**. Tese de Doutorado The Ohio State University, 2007. 181p.

RAUTENBACH, R e ALBRECHT, R. **Membrane Processes**, John Wiley & Sons Ltd., New York, 1989.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. e SEUMA, M.R.P. La importancia de los ingredientes funcionales en lãs leches y cereales infantiles. **Nutrición Hospitalaria**, v. 20, n. 2, p. 135-146, 2005.

ROBERFROID, M e SLAVIN, J. Non digestible oligosaccharides. **Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition**, v. 46, p. 461-480, 2000.

ROSA, M.J. e PINHO, M.N. Separation of organic solutes by membrane pressure-driven processes. **Journal of Membrane Science**, v. 89, n. 3, p. 235-243, 1994

ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E. e SGARBIERI, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, v.5, p.221-228, 2002.

ROSEMBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 12 -16, 1995.

RUSTOM, I.Y.S.; FODA, M.I. e LÓPEZ-LEIVA, M.H. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. **Food Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 141-147, 1998.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K. e TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 69-80, 1999.

SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L.D.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Revista Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4. 2004.

SANTOS, A.; LADERO, M. e GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 7, p. 558-567, 1998.

SARNEY, D.B., HALE, C., FRANKEL, G. e VULFSON, E.N. A novel approach to recovery of biologically active oligosaccharides from milk using a combination of enzymatic treatment and nanofiltration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, p. 461-467, 2000.

SCHNEIDER, R.P. e TSUTIYA, M.T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reuso**. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2001. p. 234

SEAPA/MG. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. **Indústrias de Minas investem na secagem do soro do leite** Publicado em 04 de setembro de 2007.

Disponível em:

<<http://www.agricultura.mg.gov.br/noticia.asp?id=465>>. Acesso em 10 de janeiro de 2009.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SGARBIERI, V.C. e PACHECO, M.T.B. - Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, p. 7-19, 1999.

SHAH, N.P.; FEDORAK, R.N. e JELEN, P.J. Food consistency effects of quarg in lactose malabsorption. **International Dairy Journal**, n. 2, p. 257-269, 1992.

SHEU, D.C. ; LI, S.Y. ; DUAN, K.J. e CHEN, C.W. Production of galactooligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase immobilized on glutaraldehyde treated chitosan beads. **Biotechnology Techniques**, v. 12, p. 273-276, 1998.

SHIN, H.J.; PARK, J.M. e YANG, J.W. Continuous production of galactooligosaccharides from lactose by *Bullera singularis*  $\beta$ -galactosidase immobilized in chitosan bead. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 787-792, 1998.

SJÖMAN, E.; MÄNTTÄRI, M.; NYSTRÖM, M.; KOIVIKKO, H. and HEIKKILÄ, H. Separation of xylose from glucose by nanofiltration from concentrated monosaccharide solutions. **Journal of Membrane Science**, v. 292, n. 1-2, p. 106-115, 2007.

SPIEGEL, J. E., ROSE, R., KARABELL, P., FRANKOS, V. H., e SCHMITT, D. F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v. 48, p. 85–89, 1994.

STEFE, C.A.; ALVEZ, M.A.R. e RIBEIRO, R. L. 2008. Probióticos, prebióticos e simbióticos – artigo de revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 3, n. 11, p. 16-33, 2008.

SUÁREZ, E.; LOBO, A.; ALVAREZ, S.; RIERA, F.A. e Alvarez, R. Partial demineralization of whey and milk ultrafiltration permeate by nanofiltration at pilot-plant scale. *Desalination*, v. 198, p. 274-281, 2006

TANRISEVEN A, DOĞAN S. A novel method for the immobilization of  $\beta$ -galactosidase. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 27-30, 2002.

TÉO, C.R.P.A. Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. *Arquivos de Ciências da Saúde Unipar*, v. 6, n. 3, p. 135-140, 2002.

TREMARIN, A. **Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. 87p.

TOBA, T., YOKATO, A. e ADACHI, S. Oligosaccharides structures formed during hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. *Food Chemistry*, v. 16, p. 147-162, 1985.

TORRES, A.N. Benefícios e malefícios do uso do leite de vaca na alimentação humana. *Nutrição Brasil*, v. 3, n. 4, 2004.

TULLIO, L.T. **Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite**. Tese de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

USDEC - UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. Trade Data (2004-2009). Valores de todo soro desidratado exportado (U.S. Exports of all Dry Whey-Value). Disponível em:

<http://usdec.files.cms-plus.com/TradeData/PDFs/HVWHEY%20VAL1.pdf>

Acesso em 10 de janeiro de 2010.

USDEC - UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. Trade Data (2004-2009). Volume de todo soro desidratado exportado (U.S. Exports of all Dry Whey-Volume). Disponível em:

<http://usdec.files.cms-plus.com/TradeData/PDFs/HVWHEY%20Vol1.pdf>

Acesso em 10 de janeiro de 2010.

VEGAS, R.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C.; ALVAREZ, J.R. e LUQUE, S. Evaluation of ultra- and nanofiltration for refining soluble products from rice husk xylan. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5341-5351, 2008.

VELLENGA, E. e TRÄGARDH, G. Nanofiltration of combined salt and sugar solutions: coupling between retentions. **Desalination**, v. 120, p. 211-220, 1998.

VORAGEN, A.G.J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 328-335, 1998.

YANG, S.T. e SILVA, E.M. Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2541-2562, 1995.

WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, p. 8-12, 2009.

ZADOW, J.G. Lactose - Properties and uses. **Journal of Dairy Science**, v.67, p. 2654-2679, 1984.

ZIMMER, T.R. **Influência da carga orgânica e do tempo de enchimento sobre o desempenho do reator anaeróbio em batelada seqüencial com biomassa granulada tratando soro de queijo**. Tese de Mestrado. Engenharia Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2006. 160p.

ZYDNEY, A. Protein Separations Using Membrane Filtration: New Opportunities for Whey Fractionation. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 243-250, 1998.



**CAPÍTULO V**  
**ARTIGOS PREPARADOS**  
**PARA PUBLICAÇÃO**



## Artigo 1

### ARTIGO PUBLICADO

#### **Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galactooligosaccharides**

**Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 29-36, 2010.

Vanessa A. Botelho-Cunha<sup>1,2</sup>, Marília Mateus<sup>1,3</sup>, José C.C. Petrus<sup>2</sup>,  
Maria N. de Pinho<sup>1</sup>

1. Department of Chemical and Biological Engineering, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1, 1049-001, Lisboa, Portugal
2. Chemical and Food Engineering Department, Centro Tecnológico (CTC), Universidade Federal de Santa Catarina, Caixa postal 476, 88040-900 Florianópolis, SC-Brasil
3. IBB - Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Biological and Chemical Engineering, Instituto Superior Técnico, 1049-001 Lisboa, Portugal.



## ABSTRACT

Continuous galacto-oligosaccharides (GOS) synthesis by bead-immobilized - galactosidase and nanofiltration fractionation of derived sugar mixtures by cellulose acetate membranes are investigated. Upon enzyme adsorption assays (8 mL.g<sup>-1</sup> of solution/resin ratio, 150 mg.mL<sup>-1</sup> of initial enzyme concentration and 14 ± 1.4 mg protein/g resin), a Langmuir-type isotherm is observed. Enzyme concentration of 10 U.mL<sup>-1</sup>, selected in batch reactor experiments, is used for continuous GOS production carried out at lactose concentrations of 150 g.L<sup>-1</sup> and 300 g.L<sup>-1</sup>, and at 40°C. Total dissolved solids concentration influences both reaction and saccharide mixtures fractionation. All observed sugar retention coefficients, mainly for monosaccharides, increase with transmembrane pressure and a gap between the retention values of synthesized disaccharides and lactose (87% versus 77%, respectively, for 2 bar/40°C) is displayed as a function of the effective transmembrane pressure and total sugars concentration. At 150 g.L<sup>-1</sup> total sugars in feed, trisaccharides are totally retained. Doubling sugars concentration, trisaccharides retentions decreased for all applied pressures, reaching 90%.

**Keywords:** Nanofiltration, enzyme immobilization, oligosaccharides synthesis, saccharides fractionation.



## 1 INTRODUCTION

Lactose, an ingredient in food and pharmaceutical industry, is also a precursor of lactose derived bioactive substances with applications in both industries [1].  $\beta$ -Galactosidase typically catalyses the hydrolysis of  $\beta$ -D-galactosides but is also able of catalyzing the synthesis of galacto-oligosaccharides (GOS), via the galactosyl transfer reaction [2]. Consumption of GOS brings health benefits [3], mainly because they are prebiotics – are not digested in the human small intestine and stimulate the growth and/or activity of bacterial flora [4]. The main drawback of oligosaccharide synthesis by these enzymes is the shift of reaction equilibrium in aqueous systems, to favour hydrolysis over synthesis, leading to low yields in oligosaccharides production [5]. Therefore, the most important parameter regulating the amount of GOS is the water activity of the solutions used for the synthesis [6]. Besides, it is important to separate the synthesized GOS from the substrate to prevent their hydrolysis [7].

Recently, a kinetic model for batch GOS synthesis from lactose by a  $\beta$ -galactosidase from an *Aspergillus* source was applied, which lighten a few of the multiple parameters that influence the reaction yields [8]. Although commercial applications, mainly for lactose hydrolysis, are commonly carried out in batch stirred tank reactors using free enzyme, continuous processes with immobilized  $\beta$ -galactosidase formulations may become economically relevant, even with lower enzyme activities [9]. Immobilization techniques and matrices employed for  $\beta$ -galactosidase are chosen to ensure the highest retention of enzyme activity, stability and durability. Entrapment, adsorption onto phenol-formaldehyde resins [5], like in the present work, diverse covalent attachments, especially onto magnetic supports that have gained much interest recently [8,10], are methodologies described in the scientific literature. However, adsorption is a simpler method and may have a higher potential for industry.

GOS production requires downstream processing to reduce lactose to residual acceptable values [11] if not fully converted in bioreaction and to decrease the monosaccharide content that causes browning and hinders crystallization. A second enzymatic reaction is proposed by Splechtna *et al.* [12] to overcome the difficulty of lactose separation. Membrane technologies can be a good alternative and have been applied to separate sugars from different sources, specially for purifying and/or concentrating oligosaccharides in chicory and soybean

extracts [13,14], rice husks [15], galacto- and fructo-oligosaccharides commercial syrups [16,17], milk whey [9], caprine milk [18] and in the processing of human milk [19]. The commercial interest in the GOS production and separation can be evidenced by the patent registrations in this area [20, 21].

The potential of cross-flow nanofiltration (NF) in the purification of GOS from mixtures containing contaminant monosaccharides was clearly demonstrated [16] upon combined studies of total sugar concentration, their molecular weights and membrane molecular weight cut-off (MWCO) effects on the sugars observed rejections. Recent studies on the fractionation of saccharides by NF and ultrafiltration (UF) membranes [22], based on similar system parameters, have pointed out possible solvent/solute(s) interactions in the feed solutions that may have a crucial influence on the separation outcome. The authors evidenced a range of membranes MWCO (2000 to 7000 Da) for best effectiveness of sugars fractionation, although at low total concentration of sugars. There are only few studies published about NF retention results of low molecular weight saccharide solutions at higher sugars concentration ( $>100 \text{ g.L}^{-1}$ ) and there is a lack of information on the influence of solution composition on retention coefficients and permeate fluxes. The main objective of this work is to bring out the parameters coupling the GOS continuous synthesis with  $\beta$ -galactosidase immobilized in phenol-formaldehyde resins and the nanofiltration capability for fractionation of the emerging concentrated GOS solutions.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1. BIOLOGICAL AND CHEMICAL MATERIALS

A soluble commercial preparation of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, Lactozym 3000 L HP-G (Novo Nordisk A/S), was used. The reagents used to prepare the reaction media and standard solutions were lactose monohydrate and glucose anhydrous from Merck; galactose, melezitose and bovine serum albumin (BSA), fraction V, from Sigma and raffinose from Panreac. Duolite A-568, a highly porous weak base anion exchange resin based on crosslinked phenol-formaldehyde polycondensate, was kindly offered by Rohm and Haas. The bead sizes range from 0.150 and 0.850 mm with pore size radius varying between 15 and 25 nm. Cellulose acetate with 38.9% acetyl content was purchased from Sigma. The other reagents used were all of analytical grade.

### 2.2. CHEMICAL ANALYSIS

#### 2.2.1. Salts Analysis

The feed and permeate salts concentrations were measured by conductivity at room temperature with compensation to 25°C (Crison, Spain). The conductivities measured were converted into salts concentrations by calibrations curves constructed for each salt studied (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

#### 2.2.2. Protein Analysis

The Bradford method was used to measure the amount of protein bound to the beads. BSA solutions, prepared with the immobilization and reaction buffer, were used as standards in two calibration curves: standard (0.1 to 1.0 g.L<sup>-1</sup>) and micro method (0.01 to 0.1 g.L<sup>-1</sup>).

### 2.2.3. Sugars analysis

Quantitative analyses of all carbohydrates were done by high performance liquid chromatography (HPLC). The system was equipped with a Waters 600 Controller, Waters 717 plus auto sampler and Gilson 133 refractive index detector. The saccharides separation was done at 80°C with Supelcogel™ Ag column (Supelco Inc.). Elution was isocratic at 0.5 mL.min<sup>-1</sup> of pure water continuously sparged (15 mL.min<sup>-1</sup>) with helium. The standards and respective column retention time (Rt) used for chromatographic peak area calibration were: galactose (Rt = 17.6 min), glucose (Rt = 16.0 min), lactose (Rt = 13.3 min) and melezitose (Rt = 10.4 min). All concentrations of disaccharides different from lactose, named GOS-2, were assessed with lactose calibration and that for all trisaccharides, named GOS-3, were assessed with melezitose calibration. The total GOS is the sum of all GOS-2 and GOS-3 produced in each reaction.

## 2.3. ENZYME IMMOBILIZATION

Duolite A-568 was soaked for 3 hours in 50 mM sodium and potassium phosphate buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> for swelling. The supernatant was removed and the resin washed four times with the same buffer. Afterwards, the beads were filtered to remove the excess of buffer. Mixtures of hydrated resin and enzyme solutions, with different concentrations and a constant ratio solution/dry resin of 8 mL.g<sup>-1</sup>, were magnetically stirred (300 rpm) for 2 hours at room temperature. Then, the supernatant was removed and the resin washed four times with buffer. Material balances accounting for the amount of enzyme in the initial solutions and in the supernatants and washing steps determined the amount of protein adsorbed into the resin. The adsorption experiments results were compared to usual isothermal behaviour equations and the best-fit model equation was determined by minimizing the sum of squared deviations using the add-in solver from Microsoft Excel software.

The adsorbed enzyme did not leak from the matrix during the batch and continuous enzyme reactions, at the pH and pI of the implemented experiments. This was confirmed in three ways – by dissolved protein measurements during catalysis, by the lack of a soluble protein peak in the HPLC chromatogram and by the ease of restoring the membrane permeability after NF fractionation studies.

## 2.4. ENZYME ACTIVITY ASSAY

The enzyme activity was determined following the initial minutes of a batch hydrolysis reaction of 30 mM lactose solution, pH 6.5, at 25°C, prepared with the buffer described above (Maugard et al., 2003). Immobilized enzyme (on 0.5 g of resin dry weight) was added to lactose solution (10 mL) and samples were collected along the time. To every sample collected (750  $\mu\text{L}$ ), equal amount of trichloroacetic acid 0.05 N was immediately added to stop the reaction. One unit of enzyme activity was defined as the amount of immobilized enzyme catalyzing the release of 1 mol glucose per minute, under these conditions.

## 2.5. OLIGOSACCHARIDES SYNTHESIS

GOS productions were performed in 50 mL (batch) and 200 mL (continuous) jacketed vessel thermostated at 40°C, under magnetic stirring and using buffered lactose solutions of 150  $\text{g.L}^{-1}$  (batch/continuous) and 300  $\text{g.L}^{-1}$  (continuous). Two immobilized enzyme concentrations were used: 10  $\text{U.mL}^{-1}$  (batch/continuous) and 28  $\text{U.mL}^{-1}$  (batch). The operating residence time was selected after investigation of maximal GOS production.

## 2.6. MEMBRANE PREPARATION AND CHARACTERIZATION

Cellulose acetate (CA) membranes were prepared by phase inversion method and further subjected to an annealing treatment [22] for 11 min. The tangential flow filtrations were performed in a cell unit described previously [23] with a slit-type (20 cm  $\times$  3 cm  $\times$  0.2 cm) feed channel and an effective membrane area of 60  $\text{cm}^2$ . The membranes were first compacted through pure water recirculation at a pressure of 30 bar for 3 hours and characterized through the determination of the hydraulic permeabilities, observed retentions to reference solutes,  $R_{obs}$ , and MWCO. The volumetric permeate fluxes of water and buffer solution,  $J_v$ , were measured at 25 and 40°C and at different pressures for each membrane, by weighting the collected permeate during a fixed time. The observed retention,  $R_{obs}$ , of a given solute was defined as expressed in the following equation:

$$R_{obs} (\%) = \left(1 - \frac{C_p}{C}\right) \times 100 \quad (1)$$

where  $C_p$  and  $C$  are the concentrations of the solute in the permeate and in the feed, respectively. The permeation of 600 ppm solutions of reference saccharides and salts was performed at an effective applied pressure of 12 bar, at 25 and 40°C in total recirculation mode; i.e. permeate and retentate were circulated back to the feed tank. The reference sugar solutes used were glucose (180.1 Da), lactose (342.3 Da) and raffinose (504.5 Da); respectively mono-, di- and trisaccharide, and the salts reference solutes were NaCl, CaCl<sub>2</sub>, and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. The feed concentration of each solution was considered the average value of feed/retentate samples taken at the beginning and at the end of experimental runs. Between each run, the membranes were washed with deionized water until at least 90% of the initial permeate flux was reached.

The effective transmembrane pressure, difference between the applied pressure and the osmotic pressure difference across the membrane, was estimated according to the van't Hoff osmotic pressure equation:

$$\Delta\pi = \sum_{j=1}^n \Delta MRT_i \quad (2)$$

where  $j$  correspond to the solutes in solution from 1 to 9 components,  $\Delta M$  is the molarity difference between feed and permeate,  $R$  is the perfect gas constant,  $T$  is the absolute temperature and  $i$  is the van't Hoff factor that represents the number of moles of species produced in the solution by each mole of solute  $j$ :

$$i = 1 + \alpha(q - 1) \quad (3)$$

being  $\alpha$  the degree of dissociation and  $q$  the number of species produced during the dissociation per molecule of the solute. Equation (2) was also used to estimate the osmotic pressure of feed and permeate sugar solutions at higher concentrations, with  $i = 1$ , since the concentrations in this study were not high enough to justify the use of Virial equations and account for deviations from ideal behaviour [24].

## 2.7. OLIGOSACCHARIDES FRACTIONATION

NF fractionation studies with a given membrane, at 25 and 40°C and at different pressures, were performed with sugars mixtures (150 g.L<sup>-1</sup> and 300 g.L<sup>-1</sup>) obtained from GOS synthesis, at 40°C. The sugars mixture fractionation (2 L) was done in total recirculation mode at 25°C (150 g.L<sup>-1</sup>) and 40°C (150 g.L<sup>-1</sup> and 300 g.L<sup>-1</sup>) under different applied pressures. The volumetric permeate fluxes, at imposed applied pressures, were measured. The osmotic pressures were calculated by equation (2). The feed concentration of each solution filtered was considered the average of samples taken at the beginning and at the end of experimental runs. Between each run, the membranes were washed with deionized water until at least 90% of the initial permeate flux was reached.



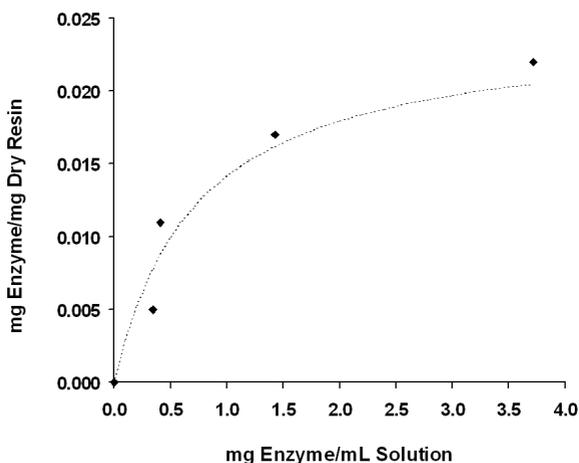
### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 ENZYME IMMOBILIZATION

The experimental enzyme adsorption data (Fig. 1) were well fitted by a Langmuir isotherm, described by the model equation:

$$W = \frac{kbC}{1 + kC} \quad (4)$$

where  $W$  is the amount of adsorbed enzyme ( $\text{mg.mg resin}^{-1}$ ) and  $C$  is the enzyme concentration in the aqueous phase ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ), both at equilibrium. The Langmuir equilibrium constant,  $k = 1.37$ , and the maximum amount of adsorbed enzyme,  $b = 0.024 \text{ mg.mg resin}^{-1}$ , were given by the model fitting.



**Figure 1.** Adsorption isotherm of  $\beta$ -galactosidase immobilized on Duolite A-568 at 25°C (Symbols:  $\blacklozenge$  experimental data; ----- Langmuir model).

Table 1 shows that the higher the concentration of enzyme employed for immobilization, the higher the loading obtained, but with important losses of enzyme activity and increase of unbound enzyme. More adsorbed enzyme per unit of solid matrix does not always lead to

higher specific enzyme activity, as the smallest specific activity was obtained with the higher amount of loaded protein. Such behaviour was also reported for lipase adsorption in different supports, inclusive on Duolite A-568 [25]. This was attributed to a possible adsorption of new enzyme molecules onto the previously adsorbed ones rather than onto the support surface, probably due to subsequent diffusional problems. Thus, the initial enzyme concentration of  $150 \text{ mg.mL}^{-1}$  and a solution/resin ratio of  $8 \text{ mL.g}^{-1}$  were used in all subsequent adsorption runs. In these conditions, an average value of  $14 \pm 1.4 \text{ mg.g}^{-1}$  resin for adsorbed protein was obtained (mean of six adsorption assays).

**Table 1. Adsorption data of  $\beta$ -galactosidase immobilization on Duolite A-568**

Enzyme added ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Enzyme adsorbed ( $\text{mg.g resin}^{-1}$ )	Adsorption (%)	Activity* ( $\text{U.mg enzyme}^{-1}$ )
46	5	61	ND
52	11	73	11.4
150	16	57	19.0
293	23	42	07.1

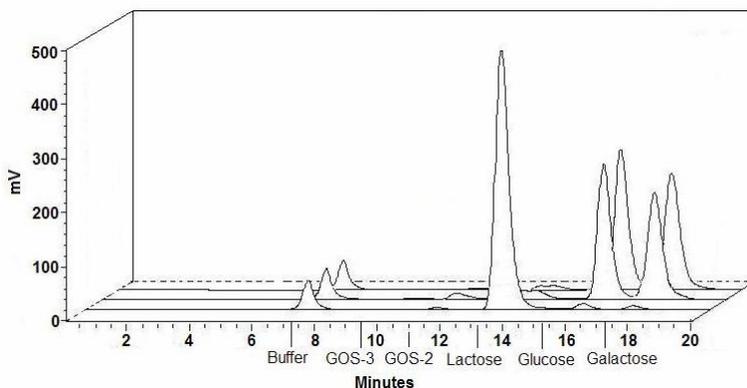
\*Specific activity of adsorbed enzyme; ND – Not determined

## 3.2. OLIGOSACCHARIDES SYNTHESIS

### 3.2.1. Batch Operation Mode

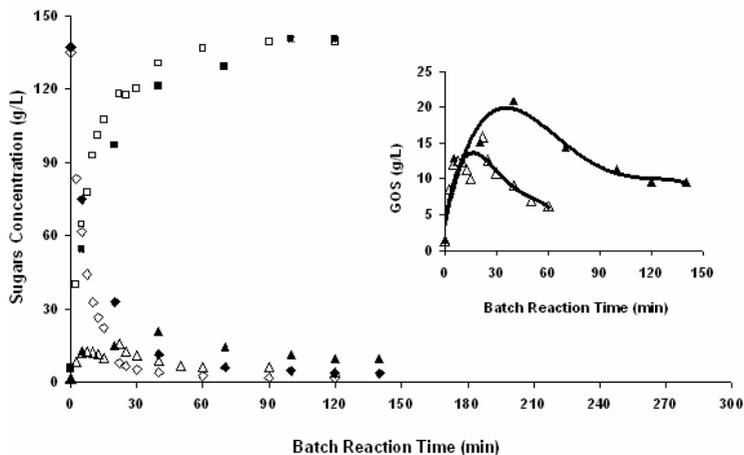
Figure 2 displays a HPLC chromatogram of the reaction medium products after 40 minutes of reaction, when  $10 \text{ U.mL}^{-1}$  of enzyme concentration was used. The splitting of the lactose peak observed in the chromatogram was evident for reaction times equal or higher than 30 minutes. This feature was probably due to allolactose formation. Lactose differs from allolactose by a galactoside linkage position; while lactose presents a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) linkage, allolactose presents a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) one. According to Mahoney [26], allolactose ( $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucoopyranoside) is the primary transferase product and galactobiose ( $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactopyranoside) is formed along and quantitatively, the  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) linkages are preferred for oligosaccharides synthesis. Striegel [27] studied disaccharides conformation and reported that, in fact, the configuration is entropically preferential and the linkage  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) is highly favoured and presents a

larger conformation freedom, a reason for inhibition of lactose back formation.



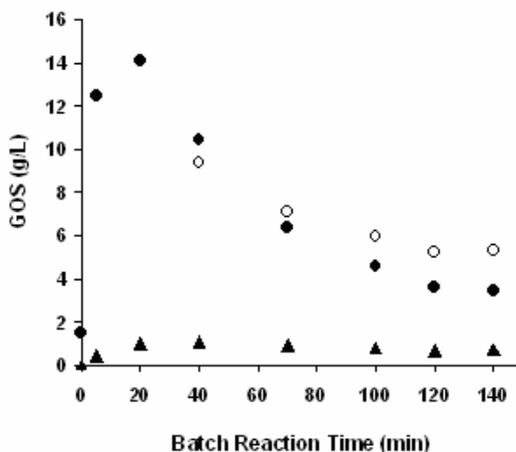
**Figure 2 - HPLC chromatogram of a sample of the reaction medium at 40 minutes of batch reaction for the 150 g.L<sup>-1</sup> lactose solution processed with 10 U.mL<sup>-1</sup> of  $\beta$ -galactosidase.**

Figure 3 shows the time evolution of the mixture components in the bioreactor. It was observed a great hydrolysis activity for both enzyme concentrations tested, reaching yields of 92% at 10 U.mL<sup>-1</sup> and 97% at 28 U.mL<sup>-1</sup>, after 40 minutes of reaction. The increase of enzyme concentration instead of improving the GOS synthesis, led to smaller GOS amounts probably due to the speed-up of the hydrolysis of produced GOS. This result can be seen in the close-up of Figure 3. For the batch experiment with 28 U.mL<sup>-1</sup> of enzyme concentration, it is clearly observable that the same enzyme soon hydrolyzes detected synthesized GOS. At about 22 minutes of reaction the overall GOS concentration starts to decline from a maximum of 16 g.L<sup>-1</sup>. At a lower enzyme concentration though, 10 U.mL<sup>-1</sup>, the maximum concentration of GOS produced was 21 g.L<sup>-1</sup> after 40 minutes of reaction. The same GOS hydrolysis behavior is visible afterwards.



**Figure 3 - Lactose conversion by immobilized  $\beta$ -galactosidase in batch mode at  $150 \text{ g.L}^{-1}$  initial lactose concentration,  $40^\circ\text{C}$ , pH 6.5 (Symbols:  $\blacksquare, \square$  monosaccharides;  $\blacktriangle, \triangle$  GOS;  $\blacklozenge, \lozenge$  lactose; black symbol for enzyme concentration of  $10 \text{ U.mL}^{-1}$  and open symbol for  $28 \text{ U.mL}^{-1}$  of enzyme concentration).**

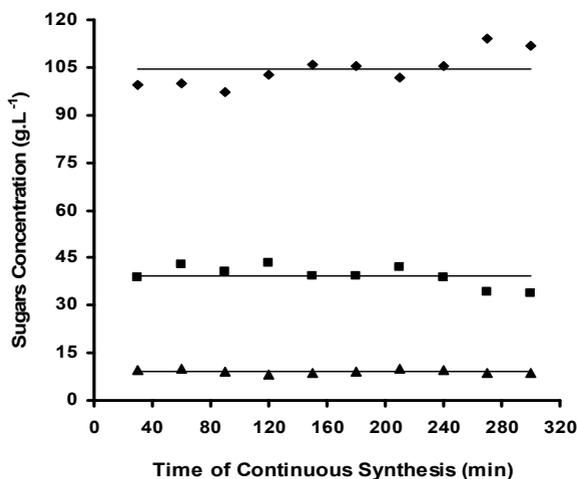
As it can be seen in Figure 4, mainly oligo-disaccharides were synthesized (GOS-2 and GOS-2'). These results confirm the ones obtained by Cheng *et al.* [11] that reported a strong hydrolytic activity to  $\beta$ -galactosidase from *K. lactis* ( $10$  and  $13 \text{ U.mL}^{-1}$ ) and mainly GOS-2 production. Maugard *et al.* [5], however, using the same enzyme and immobilization support used in this work, observed mostly GOS-3 and the unique GOS-2 found by them seems to be allolactose, although no identification was done. The values of total GOS concentrations obtained in batch operation mode are low for industrial operation, although are of the same order of magnitude of those found by Maugard *et al.* [5]. Synthesis reactions in continuous mode of operation were subsequently carried out with  $10 \text{ U.mL}^{-1}$  of enzyme concentration and different residence times as an attempt to increase the reaction yields of GOS production.



**Figure 4 - Lactose conversion by immobilized  $\beta$ -galactosidase in batch mode at  $150 \text{ g.L}^{-1}$  initial lactose concentration,  $10 \text{ U.mL}^{-1}$  enzyme concentration,  $40^\circ\text{C}$ , pH 6.5. (Symbols: ▲ GOS-3, ● GOS-2 and ○ GOS-2', possibly allolactose).**

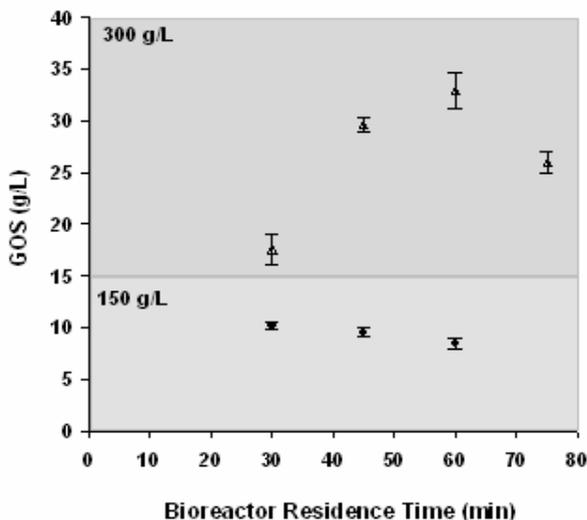
### 3.2.2. Continuous Operation Mode

The chromatographic elution profile in continuous operation mode was similar to the one found in batch mode, however allolactose formation was not observed at residence times of 30 and 60 minutes (data not shown). Figure 5 presents the steady state of GOS synthesis carried out with  $150 \text{ g.L}^{-1}$  initial lactose concentration,  $10 \text{ U.mL}^{-1}$  of enzyme concentration and 30 minutes of bioreaction residence time. It can be seen that the steady state was reached quickly and was kept stable during the sampling time (5 hours). The total GOS concentration observed was  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , around 50% smaller than expected from batch reaction results. This result evidences that one should be careful about predictions of continuous operation performance based on the batch operation results.



**Figure 5 - Lactose conversion by immobilized  $\beta$ -galactosidase in continuous mode at: 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, 10 U.mL<sup>-1</sup> enzyme concentration, residence time of 30 min, 40°C, pH 6.5 (Symbols: ■ monosaccharides; ▲ GOS; ◆ lactose).**

Aiming to synthesize higher GOS amounts, further bioreaction residence times were then tested with the previous and a higher lactose concentration, 300 g.L<sup>-1</sup>. The average of total GOS concentration synthesized during the steady state of each operational condition studied is presented in Figure 6. The yield of GOS synthesis practically did not change when 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration was used in the bioreactor, however, when the synthesis was carried out with 300 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, differences in the GOS production were observed. Based on literature results, it is also our interpretation that the increase in the initial lactose concentration reduced the water activity and then the GOS synthesis was favoured versus hydrolysis over all residence times tested. The probability of the galactosyl-enzyme complex, formed in a first reaction step, reaching a sugar as acceptor is increased with less water molecules available in the system. When the acceptor is water, free galactose is formed by hydrolysis [26].



**Figure 6 - Residence time and total sugars concentration effects on total GOS synthesis in continuous bioreactor (Symbols for total sugar concentrations: ●/light background – 150 g.L<sup>-1</sup>; △/dark background – 300g.L<sup>-1</sup>).**

When the initial lactose concentration was 300 g.L<sup>-1</sup>, operating times longer than 60 minutes rendered lower GOS productions probably due to its own hydrolysis. Despite the amount of GOS synthesized had been higher when the residence time of 60 minutes was used, a residence time of 45 minutes was used in subsequent runs in order to shorten experimental times to reach steady state and still be able to conduct the experiment before resin disintegration at 120 minutes of reaction. Although resin disintegration did not affect the enzyme activity it renders difficult to operate for longer times due to the occurrence of small particles dispersed in the reaction medium and clogging the mesh screen at the exit of the reactor. Bioreactor design, although out of the scope of this work, can overcome problems associated with mechanical particle damage. A packed-bed reactor can operate shear sensitive beads, even accommodating high enzyme loads in a reduced reactor volume. Nevertheless, differential concentration of reagents and products across the bed cannot be disregarded in the design. A fluidized bed reactor can also be an alternative to consider.

### 3.3. MEMBRANE CHARACTERIZATION

The laboratory made cellulose-acetate membranes (CA) were submitted to annealing treatments at 77.5°C and 80°C that yielded two different membranes designated by CA-77.5 and CA-80, respectively. The membranes were characterized by the permeate fluxes of water and observed retentions to reference solutes. For a transmembrane pressure of 15 bar the pure water permeate fluxes are 134 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, 61 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> and 35 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> for CA, CA-77.5 and CA-80 membranes, respectively. Further characterizations, in terms of permeate fluxes and solute rejection coefficients with reference salts (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, NaHPO<sub>4</sub>) and sugars (glucose, lactose, raffinose) solutes, is shown in Table 2. As expected, for a membrane annealed at a higher temperature, the permeate fluxes of the CA-80 membrane are lower than the ones of the CA-77.5 membrane. For this membrane, the permeate fluxes are practically constant and equal to 55 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>. For the CA-80 membrane the permeate fluxes are approximately equal to 30 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> for all solutions with the exception of the one of raffinose for which the flux is 20 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, probably due to the higher osmotic pressure of the raffinose solution. CA membrane did not get an annealing post-treatment and therefore it presents practically 100% transmission for all solutes, with the exception for Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and raffinose. Conversely, the CA-77.5 and CA-80 membranes have much higher retention coefficients for all solutes and particularly to raffinose (Table 2), evidencing a NF character.

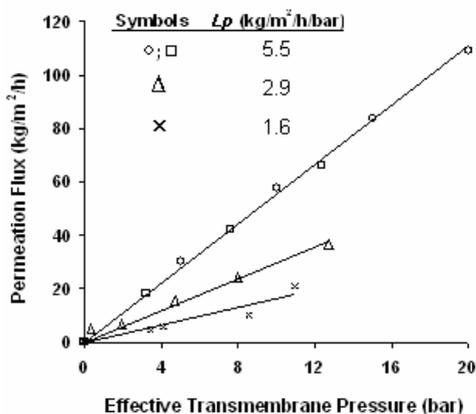
**Table 2. Permeate fluxes,  $J_v$ , and solute retentions coefficients,  $R_{obs}$ , for CA, CA-77.5 and CA-80 membranes at 25°C<sup>a</sup>.**

Solute	$J_v$ <sup>b</sup> (kg.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )		$R_{obs}$ (%)		
	CA-77.5	CA-80	CA	CA-77.5	CA-80
NaCl	55.5	30.3	3.4	58.4	79.3
CaCl <sub>2</sub>	54.4	30.7	0.2	63.4	79.6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	54.1	28.2	25.3	75.5	97.7
Glucose	51.9	30.3	8.1	84.1	82.8
Lactose	53.3	29.4	2.8	88.9	77.7
Raffinose	55.4	20.4	25.2	92.1	94.3

<sup>a</sup> Applied transmembrane pressure: 2 bar (CA); 15 bar (CA-77.5 and CA-80).

<sup>b</sup>  $J_v$  of pure water at 15 bar: CA- 134 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, CA-77.5 - 61 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> and CA-80 -35 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>.

The GOS fractionation studies were carried out with the CA-77.5 membrane. Figure 7 displays, for this membrane, the variation of the permeate fluxes with the effective transmembrane pressure for the phosphate buffer solution (that is equal to the one of pure water) and for the oligosaccharides mixture obtained by the continuous synthesis reactions.



**Figure 7 - Evolution of permeate flux with effective transmembrane pressure at 40°C. (Symbols:  $\diamond$  water,  $\square$  buffer,  $\Delta$  GOS mixture 150 g.L<sup>-1</sup>,  $\times$  GOS mixture 300 g.L<sup>-1</sup>).**

Up to a maximum applied pressure of 35 bar, the effective transmembrane pressure tested ranged from 0 to 13 bar (Table 3). A linear relationship between the permeate flux and effective transmembrane pressure applies for both sugar solution concentrations that present a reduction of the straight line slope (permeability,  $L_p$ ) from 2.9 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>.bar<sup>-1</sup> for the solution with 150 g.L<sup>-1</sup> of total sugar to 1.6 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>.bar<sup>-1</sup> for the solution with 300 g.L<sup>-1</sup> of total sugar content. These results evidence a hydrodynamic control of permeate flux with pressure in the studied range of operating conditions. Nevertheless, as can be seen below, there are solutes rejected by this membrane forming a polarization layer. The water permeate fluxes were recovered just by room temperature water cleaning. No irreversible fouling was found.

**Table 3. Osmotic pressures estimated using the van't Hoff equation<sup>a</sup>.**

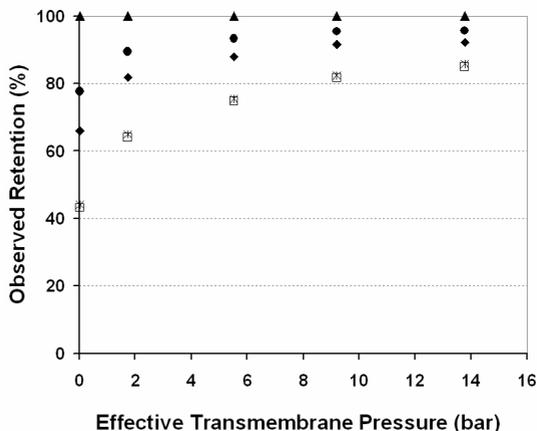
Applied Pressure (bar)	$\Delta\pi$ (bar)		
	Buffer solution	Sugar solutions	
		150 g.L <sup>-1</sup>	300 g.L <sup>-1</sup>
5	0	-	-
10	1.8	7.5	-
15	2.4	10.4	-
20	2.6	12.5	13.8
25	2.8	13.5	17.7
30	3.2	13.8	18.2
35	3.2	-	20.8

<sup>a</sup> Equations (2) and (3) were used based on literature [29-30]

### 3.4. OLIGOSACCHARIDES FRACTIONATION

The NF capability to fractionate the sugar mixtures, obtained from the continuous GOS synthesis, is not a direct function of the NF selective permeation characteristics of individual sugar solutions. The fractionation characteristics of the GOS mixture components – glucose, galactose, GOS-2 and GOS-3 – are displayed in Figure 8, for NF carried out at 25°C and an initial lactose concentration of 150 g.L<sup>-1</sup>, and in Figure 9, for NF carried out at 40°C and for the initial lactose concentrations of 150 g.L<sup>-1</sup> and 300 g.L<sup>-1</sup>.

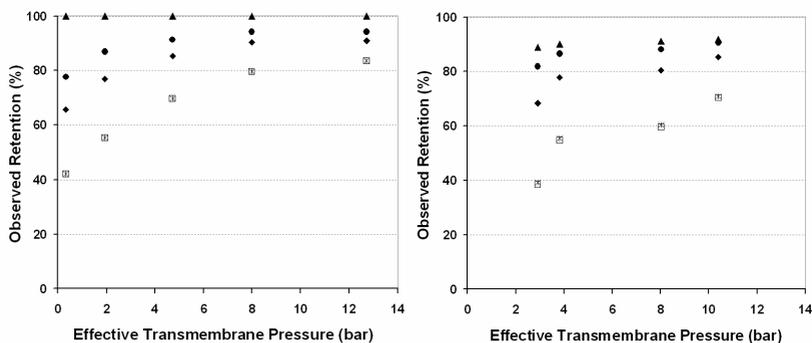
Figure 8 demonstrates that the observed rejection coefficients, *R<sub>obs</sub>*, of GOS-2, lactose, glucose and galactose increased with the increase of the effective transmembrane pressure, for a wide range of variation of this parameter (up to 12 bar), while GOS-3 observed rejections remained pressure independent and were practically 100%. A gap between lactose and GOS-2 observed rejections was observed, enforcing the investigation done by [22] during saccharides fractionation assessment. These authors verified that molecular retention mechanism is not solely based on molecular weight sieving effect of the solvent in binary aqueous solutions. Moreover, it depends on the solute/solute and solute/solvent interaction in the multicomponent solutions where the water (solvent) activity also plays a major role.



**Figure 8 - NF fractionation of sugars mixture obtained from continuous GOS synthesis using an initial lactose concentration of  $150 \text{ g.L}^{-1}$ , at  $25^\circ\text{C}$  (Symbols: ▲ GOS-3, ● GOS-2, ◆ Lactose, □ Glucose, x Galactose).**

Practically, there is no difference between synthesized GOS-2 and lactose in terms of molecular size. They differ from each other by the monosaccharide moieties and linkage positions; consequently they will have different steric hindrances and freedom degrees of motion and may interact with the membrane in a different way. The conformation difference between the lactose,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) linkage, and GOS-2,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) linkage, may be one of the reasons for the difference in the observed rejections. Fig. 9 compares the variation of observed rejections with the effective transmembrane pressure for the sugars mixtures obtained from synthesis with  $150 \text{ g.L}^{-1}$  (left-hand side) and  $300 \text{ g.L}^{-1}$  (right-hand side) of initial lactose concentration and  $40^\circ\text{C}$  of operating temperature. The variation of the observed rejections with pressure follows the same pattern as in Figure 8. At  $150 \text{ g.L}^{-1}$  of total sugars concentration, the GOS-3 were totally retained and pressure independent while other components presented a slight decrease of the observed rejections, mainly at lower pressures. The monosaccharides were the most affected ones. The temperature increase from  $25^\circ\text{C}$  to  $40^\circ\text{C}$  promoted only a slight reduction in the observed rejections for all components, with the exception of GOS-3. Goulas *et al.* (2002) investigated the temperature effect on the rejection values of a model solution containing raffinose, sucrose and fructose, using UF and NF membranes. An increase of the operation temperature caused the sugar

rejections to decrease, but a constant rejection of raffinose was observed, like in this work for the trisaccharides. The authors supposed that the actual pore size of the membrane was not affected by temperature, although the effective pore diameter changed due to the thinner layer of adsorbed water molecules on the pore wall.



**Figure 9: NF fractionation of sugars mixture obtained from continuous GOS synthesis using an initial lactose concentration of 150 g.L<sup>-1</sup>, on the left, and 300 g.L<sup>-1</sup>, on the right, at 40°C (Symbols: ▲ GOS-3, ● GOS-2, ◆ Lactose, □ Glucose, x Galactose).**

The important feature evidenced in Figures. 8 and 9 is the clear gap enhancement between the observed rejection of lactose and GOS-2 when the total sugar concentration increased, mainly under low effective transmembrane pressure (below 8 bar). Vellenga and Trägårdh [29] investigated NaCl retention in combined sugar and salt solutions and reported that the salt rejection by a DS5 NF membrane decreased as the sugar concentration increased, as a direct effect of the increased viscosity in the concentration polarization layer. This enhanced layer viscosity due to the sugar concentration caused back diffusion of the salt to be hindered resulting in a higher local salt concentration and a lower rejection. By analogy, the same behaviour might occur with the sugar mixture components explaining the observed rejection decrease in the present work, at 300 g.L<sup>-1</sup>. Mandale and Jones [30], studying the interaction between electrolytes and non-electrolytes in nanofiltration, affirmed that salt rejection is apparently independent of the presence of a solute but the organic solutes are strongly influenced by the concentration of the salt present. Controversially, Vellenga and

Trägårdh [29] had previously reported that when both salt and sugar were present in the feed, the sugar retention was unaffected by the salt concentration. The salt retention, on the other hand, was dependent on both the salt and the sugar amount.

De Pinho *et al.* [31] had called the attention to the importance of the total solutes concentration increase in the fractionation of ternary systems – glucose, ethanol, and water. As the solvent (water) became less available (lower water activities), ethanol had preferential permeation and retention even reached negative values. This was valid over a wide range of cellulose acetate membranes, including the one used in the present work, in a study where only organic solutes were dissolved in water. In the present work, for complex solutions at high sugars concentration, lactose seems to have also a preferential permeation over other disaccharides (GOS-2). The 2-fold increase in total sugars in solution, although promoting a decrease in all retention coefficients, also seems to slightly enlarge the gap between observed retention values of lactose and GOS-2; the experimental results sustain the existence of a preferential permeation of lactose induced by a total solutes enhancement. This idea is strengthened by the fact that at low concentration (600 ppm), in binary solute water solutions, this membrane shows a higher retention coefficient for lactose as compared to sucrose [22]. Nonetheless, as discussed above, in the present work, the retention values gap for disaccharides lactose and GOS-2 may also be conformation related.



## 4 CONCLUSION

An optimization process was carried out to undertake this complex production and separation system, through the variation of parameters pertaining to the synthesis – enzyme concentration, fluid residence time in reactor, initial lactose concentration and temperature – and to the NF fractionation of GOS – the former, fluid residence time in reactor, initial lactose concentration and temperature, plus effective transmembrane pressure in a large range of values (up to 16 bar).  $\beta$ -galactosidase was easily and irreversibly adsorbed on phenol-formaldehyde resins, following a Langmuir isotherm. Immobilized enzyme activity increases with the increase of pre-equilibrium enzyme concentration if enzyme loads are too high. A decrease in the specific enzyme activity is observed when specific enzyme concentration exceeds  $16 \text{ mg.g}^{-1}$  resin dry weight, probably due to stereochemical effects.

A too high enzyme concentration speeds-up GOS synthesis but also speeds-up the product hydrolysis, rendering decreased GOS yields. The profile of synthesized products in continuous operation mode is similar to the one found in batch mode, however allolactose formation is not observed for all residence times. The steady state is reached quickly and kept stable for up to 5 hours.

Nanofiltration fractionation of galacto-oligosaccharides solutions at high concentration, carried out with CA-77.5 membrane, evidences a hydrodynamic control of permeate flux with pressure up to effective transmembrane pressures of 13 bar (up to 35 bar of applied pressure). The membrane permeabilities were  $2.9 \text{ kg.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$  and  $1.6 \text{ kg.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$ , respectively for solutions with  $150 \text{ g.L}^{-1}$  and  $300 \text{ g.L}^{-1}$  of total sugar content. When the fractionation is done with  $150 \text{ g.L}^{-1}$  total sugar concentration, the observed rejections of glucose, galactose, lactose and of synthesized galacto-oligosaccharides (GOS-2) increase with the increase of effective transmembrane pressure, while observed rejections for the synthesized galacto-oligotrisaccharides (GOS-3) is pressure independent.

There is a gap between observed retention values of lactose and GOS-2 which confirms that rejection of neutral solutes by nanofiltration is not only dependent on simple sieving effects. Interaction between solute and solvent (like water confinement by the sugars) may lead to these retention differences, making fractionation between disaccharides possible. Furthermore, solute retention differences among the disaccharides may be also due to the different molecular conformations.

Lactose has a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) linkage, while GOS-2 are supposed to have  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) instead. The referred gap is enhanced upon total sugar concentration increase that also promotes a decrease of all rejections coefficients, inclusive of GOS-3 that starts to permeate. The experimental results sustain the existence of a preferential permeation of lactose induced by a total solutes increase in the feed. The transport of monosaccharides through the membrane was the most affected by changes in the filtration operational parameters: temperature, effective transmembrane pressure and total concentration of solutes in the feed.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research project is supported by Alβan Programme, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America, scholarship n° E07D402537BR.



## REFERENCES

- [1] G. Schaafsma, Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **Int. Dairy J.**, 18 (2008) 458-465.
- [2] C. Martínez-Villaluenga, A. Cardelle-Cobas, N. Corzo, A. Olano, M. Villamiel, Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G), **Food Chem.**, 107 (2008) 258-264.
- [3] A.G.J. Voragen, Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends Food Sci. Technol.**, 9 (1998) 328-335.
- [4] G.R. Gibson, M.B. Roberfroid, Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, **J. Nutrition**, 125 (1995) 1401-1412.
- [5] T. Maugard, D. Gaunt, M.D. Legoy, T. Besson, Microwave-assisted synthesis of galactooligosaccharides from lactose with immobilized -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, **Biotechnol. Lett.**, 25 (2003) 623-629.
- [6] A. Goulas, G. Tzortziz, G.R. Gibson, Development of a process for the production and purification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, **Int. Dairy J.**, 17 (2007) 648-656.
- [7] M.A. Boon, A.E.M. Janssen, K. van't Riet, Enzymatic synthesis of oligosaccharides: product removal during a kinetically controlled reaction. **Biotechnol. Bioeng.**, 70 (2000) 411-420.
- [8] D.F.M. Neri, V.M. Balcão, R.S. Costa, I.C.A.P. Rocha, E.M.F.C. Ferreira, D.P.M. Torres, L.R.M. Rodrigues, L.B. Carvalho Jr., J.A. Teixeira, Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol, **Food Chem.**, 115 (2009) 92-99.
- [9] M.H. López-Leiva, M. Guzman, Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates, **Process Biochem.**, 30 (1995) 757-762.

- [10] G. Bayramoglu, Y. Tunalı, M.Y. Arica, Immobilization of -galactosidase onto magnetic poly(GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor, **Catal. Commun.**, 8 (2007) 1094–1101.
- [11] C.-C. Cheng, M.-C. Yu, T.-C. Cheng, D.-C. Sheu, K.-J. Duan, W.-L. Tai, Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*, **Biotechnol. Lett.**, 28 (2006) 793–797.
- [12] B. Splechtna, I. Petzelbauer, U. Baminger, D. Haltrich, K.D. Kulbe, B. Nidetzky, Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid, **Enzyme Microb. Technol.**, 29 (2001) 434–440.
- [13] Y. Matsubara, K.-I. Iwasaki, M. Nakajima, H. Nabetani, S.-I. Nakao, Recovery of oligosaccharides from steamed soybean waste in tofu processing by reverse osmosis and nanofiltration membranes, **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 60 (1996) 421–428.
- [14] T. Kamada, M. Nakajima, H. Nabetani, N. Saglam, S. Iwamoto, Availability of membrane technology for purifying and concentrating oligosaccharides, **Eur. Food Res. Technol.**, 214 (2002) 435–440.
- [15] R. Vegas, A. Moure, H. Domínguez, J.C. Parajó, J.R., Alvarez, S. Luque, Evaluation of ultra- and nanofiltration for refining soluble products from rice husk xylan, **Bioresource Technol.**, 99 (2008) 5341–5351.
- [16] A.K. Goulas, P.G. Kapasakalidis, H.R. Sinclair, R.A. Rastall, A.S. Grandison, Purification of oligosaccharides by nanofiltration, **J. Membr. Sci.**, 209 (2002) 321–335.
- [17] W. Li, J. Li, T. Chen, C. Chen, Study on nanofiltration for purifying fructooligosaccharides I. Operation modes, **J. Membr. Sci.**, 245 (2004) 123–129.
- [18] A. Martínez-Ferez, A. Guadix, E.M. Guadix, Recovery of caprine milk oligosaccharides with ceramic membranes, **J. Membr. Sci.**, 276 (2006) 23–30.

- [19] D.B. Sarney, C. Hale, G. Frankel, E.N. Vulfson, A novel approach to the recovery of biologically active oligosaccharides from milk using a combination of enzymatic treatment and nanofiltration, **Biotechnol. Bioeng.**, 69 (2000) 461-467.
- [20] S. Defrees, Carbohydrate purification using ultrafiltration, reverse osmosis and nanofiltration, (2005) Patent US2005269265.
- [21] N. Sprenger, F. Morgan, R. Berrocal, M. Braun, Oligosaccharide mixture, (2007) Patent WO2007090894.
- [22] I. Catarino, M. Minhalma, L.L. Beal, M. Mateus, M.N. de Pinho, Assessment of saccharide fractionation by ultrafiltration and nanofiltration, **J. Membr. Sci.**, 312 (2008) 34-40.
- [23] V.M. Geraldes, V.A. Semião, M.N. de Pinho, Nanofiltration mass transfer at the entrance region of a slit laminar flow, **Ind. Eng. Chem. Res.**, 37 (1998) 4792-4800.
- [24] R. Rautenbach, R. Albrecht, Membrane Processes, John Wiley & Sons Ltd., New York, 1989.
- [25] I.E. Fuentes, C.A. Viseras, D. Ubiali, M. Terreni, A.R. Alcántara, Different phyllosilicates as supports for lipase immobilisation, **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, 11 (2001) 657-663.
- [26] R.R. Mahoney, Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review, **Food Chem.**, 63 (1998) 147-154.
- [27] A.M. Striegel, Anomeric configuration, glycosidic linkage, and the solution conformation entropy of O-linked disaccharides, **J. Am. Chem. Soc.**, 125 (2003) 4146-4148.
- [28] E.Y. Yoon, A conformational study of linkage positions in oligosaccharides investigated by 2-D NMR spectroscopy and molecular modelling. **Bull. Korean Chem. Soc.**, 24 (2003) 339-344.
- [29] E. Vellenga, G. Trägårdh, Nanofiltration of combined salt and sugar solutions: coupling between retentions, **Desalination**, 120 (1998) 211-220.

[30] S. Mandale, M. Jones, Interaction of electrolytes and non-electrolytes in nanofiltration, **Desalination**, 219 (2008) 262-271.

[31] M.N. de Pinho, T. Matsuura, T.D. Nguyen, S. Sourirajan, Reverse osmosis separation of glucose-ethanol-water system by cellulose acetate membranes, **Chem. Eng. Commun.**, 64 (1988) 113-123.

## Artigo 2

### ARTIGO A SER SUBMETIDO

#### **Simultaneous Synthesis and Fractionation of Oligosaccharides in a Membrane Bioreactor**

Vanessa A. Botelho-Cunha<sup>1,2</sup>, Marília Mateus<sup>1,3</sup>, José C.C. Petrus<sup>2</sup>,  
Maria N. de Pinho<sup>1</sup>

1. Chemical and Biological Engineering Department, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1, 1049-001, Lisboa, Portugal

2. Chemical and Food Engineering Department, Centro Tecnológico (CTC), Universidade Federal de Santa Catarina, Caixa postal 476, 88040-900 Florianópolis, SC-Brasil

3. IBB - Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Biological and Chemical Engineering, Instituto Superior Técnico, 1049-001 Lisboa, Portugal.



## ABSTRACT

The simultaneous synthesis and fractionation of GOS in a membrane reactor was studied. The fractionation was carried out by cellulose acetate membranes prepared by phase inversion method with hydraulic permeability  $18.6 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{bar}^{-1}$ , at  $40^\circ\text{C}$ . The reactions of GOS synthesis were conducted using lactose solutions  $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , at  $40^\circ\text{C}$  with  $10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  of enzyme concentration. The effect of two pressures (20 and 24 bar) and three velocities (1.7; 2.0 and  $2.4 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) on the reactor performance were studied. The sugars analyses were done by HPLC. The membrane reactor increased the GOS synthesis in more than 60% in comparison to the reaction carried out in the same conditions without permeation. The membrane rejection profile was directly affected by the operational conditions. Mono and disaccharides were the most affected ones; on tri- and tetrasaccharides this effect was not so intense due to great difference between the molecule and the pore size. The monosaccharides, that presented rejection values around 40% at 20 bar, when the pressure was increased the monosaccharides reached rejection coefficients values as low as 12%. The low value of monosaccharides retention plays a major role on the shift of the enzymatic hydrolysis/synthesis equilibrium in the reaction vessel and in addition, the removal of monosaccharides from the retentate is very interesting from the technological point of view. The GOS-4 synthesized were totally retained and GOS-3 presented approximately 90% of retention. Lactose, GOS-2 and GOS-2', presented different rejection coefficients. The operating conditions can be tuned in order to reach rejection values as different as 41% for GOS-2 and 84 % for lactose. The enzyme adsorption on the membrane rendered an irreversible fouling and affected the saccharides transport through the membrane.

**Keywords:** Nanofiltration, oligosaccharides synthesis, oligosaccharides fractionation.



## 1 INTRODUCTION

The called “functional foods” are a new generation of food that more than supply the energetic and nutritional human body requirements, promote health benefits. The functional foods are the wave of the future and an exciting and challenge opportunity to expand the market for processed foods [1]. Oligosaccharides are non-digestible carbohydrates found in human and mammals milk. These compounds present important physicochemical and physiological properties beneficial to the health of consumers, and for this reason, their use as food ingredients has increased rapidly [2]. Such properties include non-carcinogenicity, a low calorific value and the ability to stimulate the growth of beneficial bacteria in the colon, the bifidobacteria population, a reason to be considered as prebiotic [3]. They are also associated with a lower risk of infections and diarrhoea, and an improvement of the immune system response. Moreover, due to the decrease of the intestinal pH caused by their fermentation, they provoke pathogens flora reduction and an increase on minerals availability [4, 5].

In the food industry, these compounds have great potential to improve the quality of many foods, providing modifications to food flavour and improving its physicochemical characteristics. Prebiotics can be used for their nutritional advantages or technological properties, but they are often applied to offer double benefit: an improved organoleptic quality and a better-balanced nutritional composition. Prebiotics, as oligosaccharides, could be present in the composition of food, such as yoghurts and desserts, beverages and drinks, meat products, cake and biscuits, baby food, etc., acting as sugar or fat substitute; fiber; heat resistance, texture and mouthfeel enhancer and others [6].

The low concentration of oligosaccharides present in bovine milk has hindered their utilization in the healthcare and food sector as biological active ingredients. Research directed towards development of methods and/or processes for large-scale separation and enrichment of bovine milk oligosaccharides is necessary [7]. One possibility to obtain higher amounts of oligosaccharides is synthesize then since lactose, a disaccharide naturally found in bovine milk and dairy wastes like cheese whey. Oligosaccharides obtained from lactose enzymatic transgalactosylation are named galacto-oligosaccharides (GOS). The hydrolytic reaction occurs by enzymatic transfer of the galactosyl moieties of lactose to water molecules, while the synthetic reaction occurs by transfer of these units to saccharide molecules [8]. In aqueous

solutions the equilibrium is shifted to favour hydrolysis over synthesis, consequently it is necessary to increase the lactose concentration to decrease the water molecules availability. Highest levels of GOS production have been found using the high starting lactose levels, 15 to 50% [9].

The enzyme can be used free, in discontinuous reactors or immobilized in different supports. Many enzymes and microorganisms have been used in membrane bioreactors since the first protease immobilization in the 1950s. Besides the combination of selective mass transport with chemical reaction, the selective products removal from the reaction site can increase the conversion of product-inhibited or thermodynamically unfavourable reactions [10].

Ultrafiltration, a well established separation process, has been used to retain the enzyme during GOS production [11, 12]. The product of reaction is a mixture of monosaccharide, unreacted lactose and GOS. To obtain GOS mixtures/products with high purity the application of a new separation process is necessary. Commercially, most of sugar separations are performed by chromatographic methods however the applicability of nanofiltration (NF) for purification, isolation or concentration of sugar solutions, containing oligosaccharides, has been studied in the later years. Nanofiltration has been used to concentrate GOS as second step after synthesis [11] or to purify commercial GOS mixtures [13, 14].

Nanofiltration processes studied until now were carried out at low feed concentrations, although, high concentrations of lactose are required to favour GOS synthesis over lactose hydrolysis. According to Sjöman *et al.* [15], there is a lack of published information on NF retention results of monosaccharide solutions in this situation. The aim of this work is to study the simultaneous enzymatic synthesis and fractionation of galacto-oligosaccharides (GOS) in a bioreactor, using nanofiltration membranes. The pressure and crossflow velocity effects on both processes were investigated.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 BIOLOGICAL AND CHEMICAL MATERIALS

A commercial preparation of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, Lactozym 3000 L HP-G (Novo Nordisk A/S), was used. The reagents used to prepare the reaction media and standard solutions were lactose monohydrate and glucose anhydrous from Merck; galactose, melezitose and bovine serum albumin (BSA), fraction V, from Sigma and raffinose from Panreac. Cellulose acetate with 38.9% acetyl content was purchased from Sigma. The other reagents used were all of analytical grade.

### 2.2 ENZYME ACTIVITY ASSAY

The enzyme activity was determined following the initial minutes of a batch hydrolysis reaction of 30 mM lactose solution, pH 6.5, at 25°C, prepared with 50 mM sodium and potassium phosphate buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> [16]. The commercial enzyme preparation (0.5 g) was added to lactose solution (10 mL) and samples were collected along the time. To every sample collected (750  $\mu$ L), the same amount of trichloroacetic acid 0.05 N was immediately added in the tube to stop the reaction. The amount of glucose released was quantified by HPLC, under the conditions that will be explained in the 2.6. One unit of enzyme activity was defined as the amount of immobilized enzyme catalyzing the release of 1 mol glucose per minute, under these conditions.

### 2.3 MEMBRANES

Cellulose acetate (CA) membranes were prepared by phase inversion method and further subjected to a thermal treatment to reduce the membrane pore size [17] at the conditions presented on Table 1.

**Table 1 – Casting solutions and conditions used to prepare the membranes.**

<b>Casting solution (wt.%)</b>	
Cellulose acetate	CA
Acetone	17
Formamide	56
	27
<b>Casting conditions</b>	
Temperature (°C)	20-25
Evaporation time (s)	30
Gelation medium (25°C/2h)	Deionized water
<b>Annealing treatment</b>	
Temperature (°C)/time (min)	77.5/11

## 2.4 MEMBRANE BIOREACTOR

The tangential flow filtrations were performed in a cell unit with a 500 mL feed tank (P-28 Celfa). The membrane, with an effective area of 26.4 cm<sup>2</sup>, is located in the underneath, where the permeate can be collected. The fraction that is not permeated through the membrane returns to the feed tank. One gear pump with velocity control makes the fluid circulation. The system was pressurized by nitrogen injection. The membranes were first compacted through pure water recirculation at a pressure of 30 bar for 2 hours and characterized through the determination of the hydraulic permeabilities at 40°C, obtained plotting the volumetric permeate flux of water,  $J_v$ , at different pressures.  $J_v$  can be calculated by equation 1:

$$J_v = \frac{\text{permeate weight (kg)}}{\text{membrane area (m}^2\text{) * time (h)}} \quad (1)$$

## 2.5 OLIGOSACCHARIDES SYNTHESIS

The GOS syntheses were carried out with lactose solution 150 g.L<sup>-1</sup> (400 mL) and 10 U.mL<sup>-1</sup> of enzyme concentration, at 40°C. After the temperature stabilization on the determined crossflow velocity (1.7; 2.0 and 2.4 m.s<sup>-1</sup>), the enzyme was added and the cell was immediately

closed and the nitrogen applied until reach the fixed pressure (20 and 24 bar).

The permeate flux of the saccharide mixture was measured and samples from permeate and retentate fractions were taken along the time and the amount of saccharides quantified by HPLC. To every sample collected (750  $\mu\text{L}$ ) from the retentate, equal amount of trichloroacetic acid 0.05 N was immediately added to stop the reaction. The observed retentions to solutes,  $R_{obs}$ , were calculated as expressed in the following equation:

$$R_{obs} (\%) = \left(1 - \frac{C_p}{C_f}\right) \times 100 \quad (2)$$

where  $C_p$  and  $C_f$  are the concentrations of the solute in the permeate and in the feed, respectively.

## 2.6 MEMBRANE RESISTANCE

The membrane resistance,  $R_m$ , was calculated measuring the hydraulic permeability,  $L_p$ , at 20 bar and 40°C, as given by equation 3:

$$L_p = \frac{1}{\mu \times R_m} \quad (3)$$

where  $\mu$  is the water viscosity and  $L_p$  is the angular coefficient of the measuring the water permeate flux in different pressures. The reaction mixture (150  $\text{g.L}^{-1}$  lactose buffered solution plus 10  $\text{U.mL}^{-1}$  enzyme concentration) was filtered for 60 minutes at 20 bar, 40°C, and 1.7  $\text{m.s}^{-1}$ . The total resistance,  $R_{tot}$ , calculated by the following equation

$$J_{rm} = \frac{\Delta P}{\mu \times R_t} \quad (4)$$

where  $R_t$  is the sum of the membrane resistance ( $R_m$ ), the resistance of the material strongly attached to the membrane ( $R_{st}$ ) and weakly attached to the membrane ( $R_{wk}$ ). After the filtration, the reactor was rinsed through water circulation for 15 minutes to remove resistance given by the concentration polarization ( $R_{wk}$ ). The water permeate flux

was measured in the same experimental conditions again and  $R_{st}$  could be calculated by equation 5:

$$J_{w'} = \frac{\Delta P}{\mu \times (R_m + R_{st})} \quad (5)$$

The  $R_{wk}$  could be calculated by the difference between  $R_t$  and  $(R_m + R_{st})$ . The reactor was emptied, cleaned with NaOH alkaline solution 0.01M for 15 minutes and rinsed through water circulation. The water permeate flux was measured again and  $R_{m'}$  could be calculated by equation 6, and the procedure repeated in the same conditions at 2.0 m.s<sup>-1</sup>.

$$J_{w'} = \frac{\Delta P}{\mu \times R_{m'}} \quad (6)$$

## 2.7 PROTEIN ANALYSIS

The Bradford method was used to measure the decrease of protein amount in the reactor. BSA solutions were prepared with 50 mM sodium and potassium phosphate buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> and used as standards in two different calibration curves: standard (0.1 to 1.0 g.L<sup>-1</sup>) and micro method (0.01 to 0.1 g.L<sup>-1</sup>). In the standard method, 100 μL of sample were added to 5 mL of Bradford reagent and in the micro method 300 μL to 3 mL of Bradford reagent. The absorbances were immediately measured in a spectrophotometer (UV 1700 – SHIMADZU) at 540 nm.

## 2.8 SUGARS ANALYSIS

Quantitative analyses of all carbohydrates were done by high performance liquid chromatography (HPLC). The system was equipped with a Waters 600 Controller, Waters 717 plus auto sampler and Gilson 133 refractive index detector. The saccharides separation was done at 80°C with Supelcogel™ Ag column (Supelco Inc.). Elution was isocratic at 0.5 mL.min<sup>-1</sup> of pure water continuously sparged (15 mL.min<sup>-1</sup>) with helium. The standards used for chromatographic peak area calibration were: glucose, lactose and melezitose. All

concentrations of disaccharides different from lactose, named GOS-2, were assessed with lactose calibration and that for trisaccharides and tetrasaccharides, named GOS-3 and GOS-4, respectively, were assessed with melezitose calibration. The total GOS is the sum of all GOS-2, GOS-3 and GOS-4 produced in each reaction.



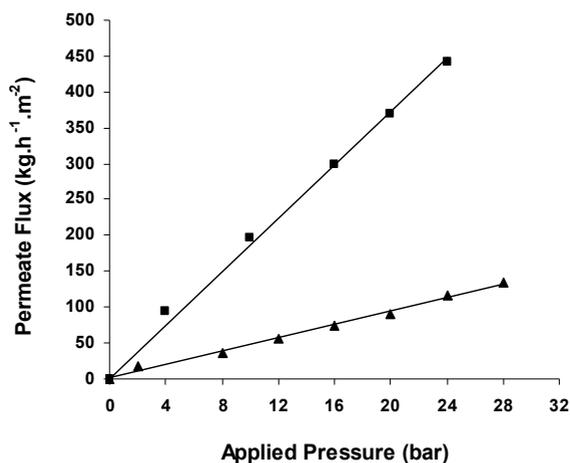
### 3 RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained to the membranes CA and CA-77.5 characterization are presented in Table 2.

**Table 2. Permeate fluxes,  $J_v$ , and solute retentions coefficients,  $R_{obs}$ , for CA and CA-77.5 membranes at 25°C<sup>a</sup>.**

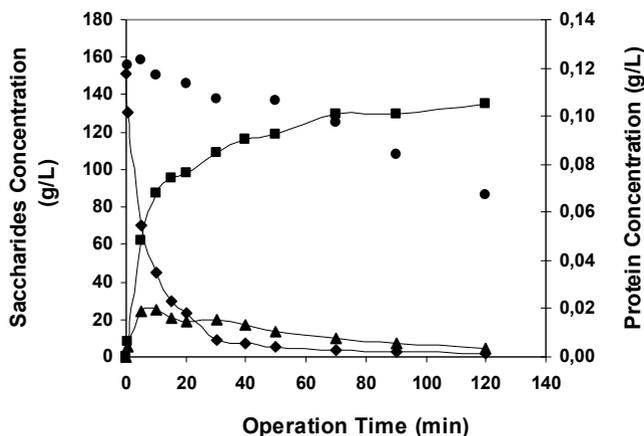
Reference Solutes	Rejection (%)	
	CA	CA-77.5
NaCl	3	58
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25	75
Glucose	8	84
Lactose	3	89
Raffinose	25	92

The permeate fluxes to pure water, in the filtration unit used in this work, are presented in Figure 1.



**Figure 1 - Evolution of permeate flux with effective transmembrane pressure at 40°C (Symbols: ■ CA and ▲ CA-77.5).**

The annealing treatment reduced the hydraulic permeability at 40°C from 18,6 to 4,7 kg.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>.bar<sup>-1</sup> and increased the NaCl that was almost zero to 58%, a value normally found to nanofiltration membranes. The first reaction was carried out with the CA-77.5 membrane in batch mode operation with the objective of investigate the GOS production profile, along the time. The membrane was placed in the reactor and 400 mL of lactose solution and 10 U.mL<sup>-1</sup> of enzyme were added, but no pressure was applied. The temperature was set to 40°C and 1.7 m.s<sup>-1</sup> of crossflow velocity was used. The reactor remained opened and samples from the feed tank were taken along the time. The amounts of saccharides were measured by HPLC and the amount of protein was measured by the Bradford method. The results are present in Figure 2.



**Figure 2 - Lactose conversion by  $\beta$ -galactosidase in batch mode at 150 g/L initial lactose concentration, 40°C, pH 6.5 (Symbols: ■ monosaccharides, ♦ lactose, ▲ GOS, ● enzyme concentration).**

The maximum GOS production was observed at the reaction beginning, near 10 minutes, after this, they were constantly hydrolyzed. The maximum GOS production occurred around 60% of lactose consumption. As reported by Mahoney [9], normally the higher amounts of GOS are synthesized when more than 40% of initial lactose concentrations were hydrolysed, because to form the higher molecules, the enzyme needs the monosaccharide units. After 2 hours of reaction, the protein (enzyme) concentration in the feed tank decreased around

50%. This decrease in the enzyme concentration can be attributed to some interaction between the enzyme molecule and the membrane, even being this a hydrophilic membrane, i.e. with reduced adsorption tendencies.

The adsorption of solutes has a negative influence on the flux because the adsorbed layer presents an extra resistance towards mass transfer and consequently contributes to a decline in flux. In addition, adsorption layers are difficult to remove by cleaning methods [19]. More studies must be done to investigate the linkage extent between the enzyme and the membrane observed in this study. The irreversible fouling observed reinforces the existence of an interaction between the enzyme and the membrane. It seems that in spite of being linked or just restricted on the concentration polarization layer, the enzyme remained activated, since the monosaccharides concentration was increasing until the end of the experiment. The reaction was carried out again, in the same conditions, but applying 24 bar on the system. A similar behaviour on the GOS production was observed. The maximum GOS production, around 30 g.L<sup>-1</sup>, was reached between 20 and 30 minutes (data not shown).

Figure 3 shows the permeate flux evolution along the time and the  $R_{obs}$  to mono-, di- and trisaccharides

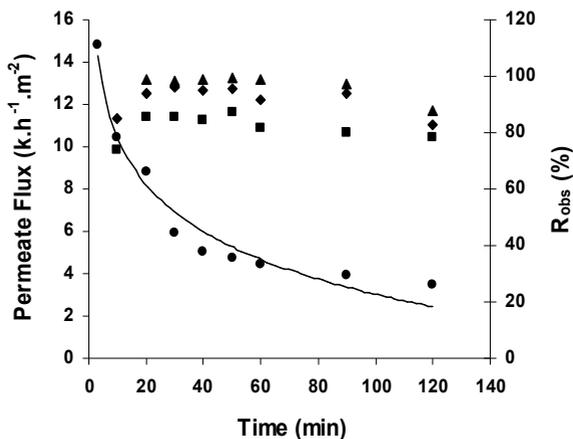


Figure 3 - Permeate flux evolution and  $R_{obs}$  along the reaction time. (Symbols: ■ monosaccharides, ◆ lactose, ▲ GOS and • permeate flux).

In this reaction no formation of GOS-4 was observed. A fast decrease on the permeate flux can be observed from the first minutes until 40 minutes. After this filtration time, a reduction on the permeate flux can still be observed, but in a smaller rate. Still in this figure, we can observe that the  $R_{obs}$  to the tri-, di- and monosaccharides did not change during this period of fast flux decline; but a tendency to this can be observed after 90 minutes of filtration. The  $R_{obs}$  obtained to all saccharides are very high and close between each other.

The objective of this work was to fractionate the GOS solution, so as this membrane (CA-77.5) was not suitable to do this, the CA membrane, without annealing treatment, was tested. The results obtained to the GOS synthesis carried out at 20 bar with  $1.7 \text{ m.s}^{-1}$  crossflow velocity and using the CA membrane are presented in Figure 4.

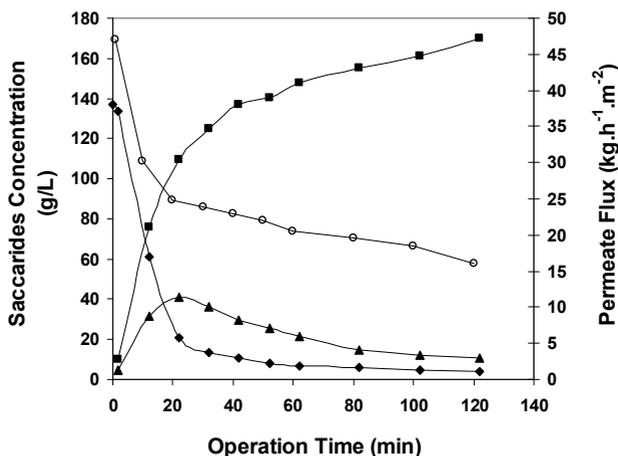
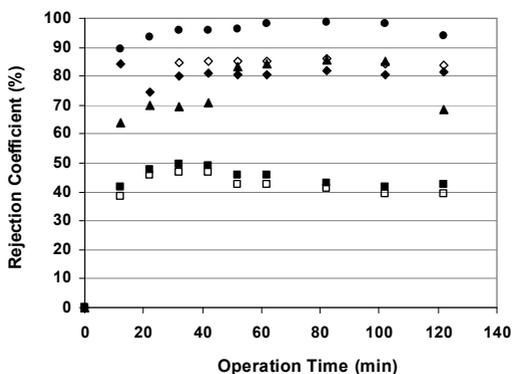


Figure 4 - Lactose conversion by  $\beta$ -galactosidase at  $150 \text{ g.L}^{-1}$  initial lactose concentration,  $40^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6.5$ , 20 bar and  $1.7 \text{ m.s}^{-1}$  (Symbols: ■ monosaccharides, ♦ lactose, ▲ GOS and • permeate flux).

The permeate flux declines fast until 30 minutes and then, in a smaller rate. After 2 hours of filtration, the permeate flux was  $16 \text{ kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ , 4-fold higher than observed at the same time to membrane CA-77.5. The maximum GOS production,  $40 \text{ g.L}^{-1}$ , was observed around 20 minutes and was 25% higher than the one obtained with the tighter membrane and approximately 62% higher, in comparison with the same

system without permeation. This increase on the GOS production can be attributed to the monosaccharides removal of the reactor and or to the higher permeate flux. As the permeate flux increase, the retention time ( $RT$ ) inside the reactor decrease, because  $RT$  is obtained dividing the reactor volume by the volume flow rate.

Figure 5 shows the  $R_{obs}$  to all saccharides. Just 40% of monosaccharides remain in the feed tank, the disaccharides retention rate between 70 and 85 %, and the trisaccharides are almost totally retained. The difference observed between retention of lactose, GOS-2 and GOS-2' had been observed in our previous work [18]. This result reinforces our observation that the molecular retention mechanism is not solely based on molecular weight sieving effect and as had been reported by another authors [17, 20].



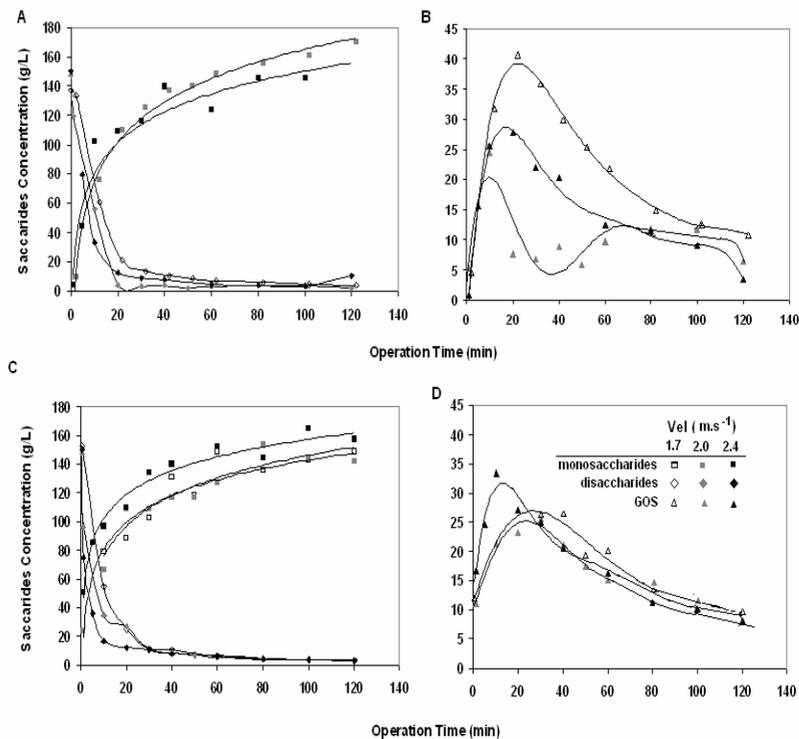
**Figure 5 - Rejections coefficients observed during GOS synthesis and fractionation at 150 g.L initial lactose concentration, 40°C, pH 6.5, 20 bar and 1.7 m.s<sup>-1</sup> (Symbols: ● GOS-3, ◇ GOS-2, ▲ GOS-2', ◆ Lactose, □ Glucose, ■ Galactose).**

Practically, there is no difference between GOS-2 and lactose molecular size. They differ from each other by the monosaccharide moieties and linkage positions. During disaccharides synthesis, the first molecule will be always galactose while the second can be galactose or glucose. If the second molecule is galactose, the linkage can be  $\beta$ -(1→6) or  $\beta$ -(1→3); if it is glucose, the possibilities are  $\beta$ -(1→6),  $\beta$ -(1→3),  $\beta$ -(1→2) or  $\beta$ -(1→4), and in this case is a lactose molecule.

Striegel [21] studied the anomeric configuration and the solution conformation entropy of disaccharides solution. The authors reported that the linkage  $\beta$ -(1→6) presents a larger conformation freedom in

comparison to  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Yoon [22] reported that linkage position among other structural parameters of carbohydrate may be the most sensitive to variance in vibrational freedom, particularly rotation, due to the different steric hindrance and degrees of freedom of motion between sugars. The rotational freedom of tree trisaccharides was studied by the authors that reported that Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glu-  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Glu was the most rigid isomer, followed by Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glu-  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glu and being Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glu-  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Glu the most flexible one. Therefore, the disaccharides synthesized during the reaction may interact with the membrane in a different way. If the difference between the membrane pore size and the disaccharide is much large, maybe this difference could not be realized.

The pressure and tangential velocity effects on the GOS synthesis can be seen in Figure 6.



**Figure 6 - Lactose conversion by  $\beta$ -galactosidase at 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, 40°C, pH 6.5, at 20 bar (A; B) and 24 bar (C; D) and different crossflow velocities.**

After 20 minutes of reaction, practically no difference on monosaccharides and lactose concentrations (7A and 7C) can be observed, but the profile of GOS formation observed is quite different, mainly at 20 bar (7B and 7D). The maximum GOS production was observed in the slowest crossflow velocity,  $1.7 \text{ m.s}^{-1}$ . At 24 bar, the maximum GOS production was obtained at  $2.4 \text{ m.s}^{-1}$  but the difference between the concentration obtained to each crossflow velocity was not so high, as observed at 20 bar.

Table 3 presents the percentual composition in the feed tank after 120 minutes of filtration and it can be noticed that the composition is very similar, so the composition effect can be excluded at this time. Moreover, it can be noticed that monosaccharides represent 90% of the total composition in the feed tank. In this study, the reactor was operating in discontinuous mode, as an attempt to understand a complex reaction/permeation system. Performing the same reaction in continuous mode, the adequate  $RT$  should be chosen to obtain higher rate of GOS.

**Table 3 – Feed tank composition after 120 minutes of reaction and fractionation at different crossflow velocities and pressures.**

Pressure (bar)	Velocity ( $\text{m.s}^{-1}$ )	Concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )					
		LAC	GOS-4	GOS-3	GOS-2 <sub>t</sub> <sup>1</sup>	GLI	GAL
20	1.7	0.4	0.3	1.8	11.6	89.2	90.9
	2.0	0.5	0.4	1.9	14.5	79.6	85.7
	2.4	1.2	0.5	3.9	15.0	94.4	96.7
24	2.0	0.7	0.6	3.0	17.6	90.9	91.9
	2.4	0.7	0.7	3.3	15.4	93.3	94.3

<sup>1</sup>GOS-2<sub>t</sub> = GOS-2 + GOS-2'

Figure 7 shows the tangential velocity effect on the  $R_{obs}$ , after 120 minutes of filtration, at 20 and 24 bar. An increase in the tangential velocity led to an increase in  $R_{obs}$  while the pressure increase, caused a decrease in all  $R_{obs}$ , with exception to lactose. GOS-4 was observed now and was totally retained at 20 bar and  $2.0 \text{ m.s}^{-1}$ , but presented  $R_{obs}$  84% when the pressure increased to 24 bar, at the same velocity. The highest difference in the rejection coefficient, 57 %, due to pressure increase was observed to monosaccharides at 24 bar and  $2.4 \text{ m.s}^{-1}$ . These effects may be related to the concentration polarization layer and/or membrane fouling, since a continuous decline in flux was observed.

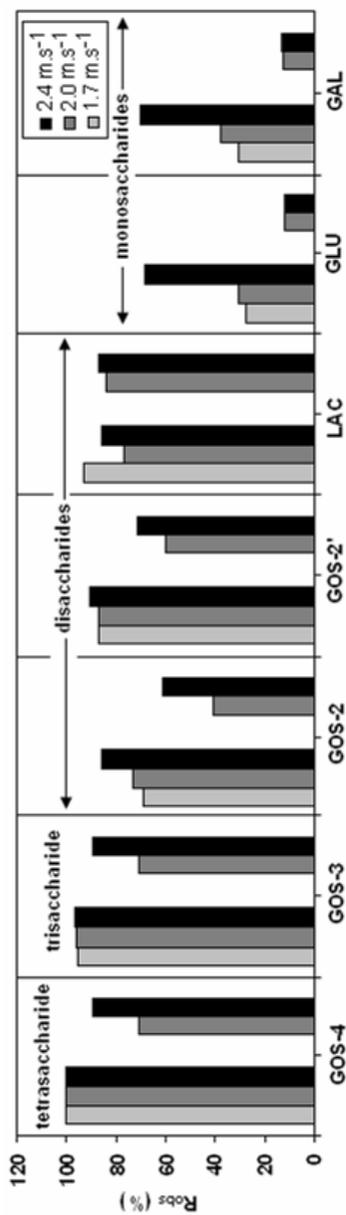
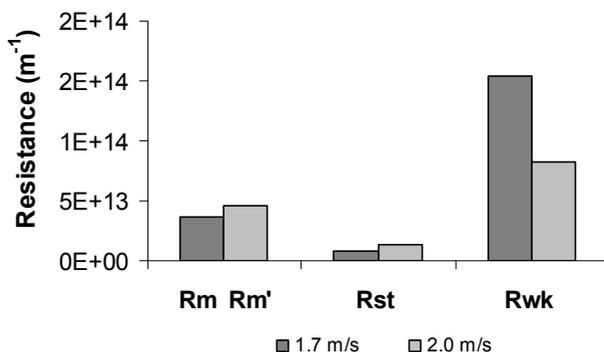


Figure 7 - Rejections coefficients observed during GOS synthesis and fractionation at 150 g.L<sup>-1</sup> initial lactose concentration, 40°C, pH 6.5, at different pressures and crossflow velocities (first group of each division – 20 bar; second group of each division – 24 bar).

Ahmad, Ismail and Bhatia [23] observed the opposite effect of crossflow velocity on  $R_{obs}$  during palm oil effluent filtration. The authors observed that the  $R_{obs}$  value to organic matter increased with the decrease in crossflow velocity where the value is in the range of 46–56% for crossflow velocity of 8 m.h<sup>-1</sup>. However, at crossflow velocity of 20 m.h<sup>-1</sup> the  $R_{obs}$  was reduced to the range of 9–11%.

The resulting concentrated layer at the membrane surface increases the filter resistance and consequently reduces the permeate flux through the membrane due to the greater local osmotic pressure. Concentration polarization can have a strong influence on the selectivity; the retention coefficient can be higher in the case of mixtures of macromolecular solutes. The higher molecular weight solutes that are retained completely form a kind of second or dynamic membrane [24–26].

Figure 8 shows the resistance to two different CA-27 membranes. They were submitted to filtrations at 20 bar for 60 minutes, using crossflow velocities 1.7 and 2.0 m.s<sup>-1</sup>. It can be observed that the main contribution on the  $R_{tot}$  is the one conferred by the weakly attached material and it is increased with the crossflow velocity decrease. An increase in tangential velocity increases the permeate flow rate by promoting greater turbulence, causing a dispersion in the solute molecules concentrated on the membrane surface, reducing the thickness of the “second” layer.



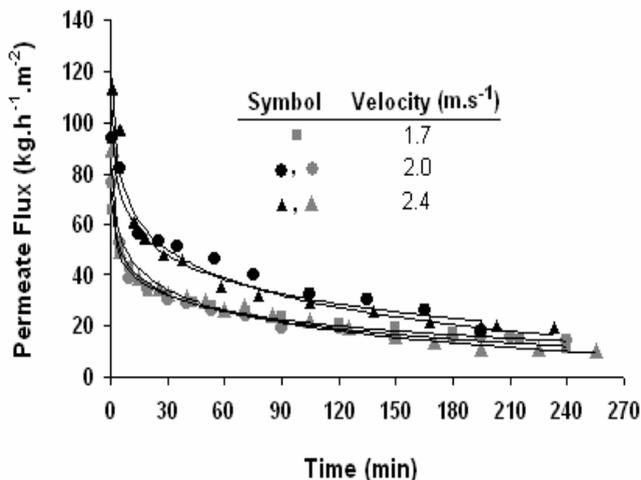
**Figure 8. Resistances of the membrane at different crossflow velocities ( $R_m$ : membrane resistance;  $R_{m'}$ : modified membrane resistance;  $R_{st}$ : resistance of strongly attached material;  $R_{wk}$ : resistance of weakly attached material)**

Goulas *et al.* [13], reported that the pressure increase can cause a decrease in the membrane thickness, what would lead to higher permeate flux, causing an increase on diffusivity of the solute in the opposite direction and more than this, the pressure increase could decrease the membrane pore size and for this reason, the  $R_{obs}$  of saccharides increased with the pressure increase. Vellenga and Trägårdh [27] reported that the increased concentration polarization layer, due to feed concentration increase, hindered the salt back diffusion during the filtration of sugar and salt solutions with dense membranes, resulting in decreased salt rejection coefficient. Botelho-Cunha *et al.*[18] studied the feed solution concentration and pressure effect on GOS nanofiltration. The authors observed the same behaviour to feed concentration effect, i.e. the rejection coefficients decreased with the increase of the concentration polarization layer and it was observed an increase in sugar rejection coefficients due to pressure increase.

In this study, the pressure increase caused a decrease in the rejection coefficients, at the same crossflow velocity. Here, the pressure interferes on the concentration polarization and/or fouling layer, formed by the interaction between the enzyme and the membrane. One explanation can be that: the higher the concentration polarization layer, the harder is the solutes back diffusion, thus reducing the  $R_{obs}$ . The tangential velocity increase promoted more turbulence in the feed channel and decreased the concentration polarization layer. Increasing crossflow velocity could enhance the back diffusion of solute accumulated on the membrane surface, therefore, the permeate flux could be improved [23]. Seidel and Elimelech [28] explained that increasing crossflow velocity it will increase the shear rates which mitigate the fouling effect to some extent by reducing the accumulation of natural organic matter on the membrane and arresting the growth of fouling layer.

In spite of being disaccharides, GOS-2, GOS-2' and lactose, were not affected in the same way by changes on pressure and crossflow velocity. GOS-2 was more affected by changes in the velocity in both pressures tested. Monosaccharides were the most affected by the velocity increase at 20 bar. The average  $R_{obs}$  at  $2.0 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  increased from 34 to 70%. When the pressure increased, the  $R_{obs}$  were very close, 12.5% to both velocities tested. The low value of monosaccharides retention plays a major role on the shift of the enzymatic hydrolysis/synthesis equilibrium in the reaction vessel and in addition, the removal of monosaccharides from the retentate is very interesting from the technological point of view.

The permeate flux evolution along the experiment duration at different pressures and velocities is presented in Figure 9. At 20 bar practically no difference in the permeate flux was observed. It can be confirmed by the average permeate flux that was exactly the same to the three velocities tested,  $25 \text{ kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ , at 20 bar. At 24 bar, the permeate flux was very similar too,  $39 \text{ kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  to  $2.0 \text{ m.s}^{-1}$  crossflow velocity and  $34 \text{ kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  to  $2.4 \text{ m.s}^{-1}$  crossflow velocity.



**Figure 9. Permeate flux evolution along the GOS synthesis and fractionation at different pressures and velocities.**

Significant reductions in flux, 80% in average, for the first 60 min indicate that the development of fouling layer was occurring. This observation is consistent with Ahmad *et al.* [23] that observed a permeate flux reduction from 100 to  $40 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  during the ultrafiltration of an agro-industry effluent. Mikulašek *et al.* [29] and Balakrishnan *et al.* [30] obtained the same findings. The first authors concluded that the flux decline was due to cake build-up while second group demonstrated that the significant flux decline was due to the deposition of small particles and colloidal on the membrane surface which led to the membrane fouling. Mourad and Martine [31] also observed the relationship between permeate flux and crossflow velocity. They reported that at the highest crossflow velocity, 88% of the mass carried by convection to the membrane surface was removed by the tangential flow. The high shear tangential to the membrane surface

sweeps deposited particles away [32] thus fouling layer on the surface of the membrane is reduced. The pressure increase led to an increase in both initial and final flux values, although practically no permeate flux improvement was observed with the crossflow velocity increase in the range studied.

## 4 CONCLUSIONS

Nanofiltration membranes were firstly applied for simultaneous GOS synthesis and fractionation. The membrane reactor increased the GOS synthesis in more than 60% in comparison to the reaction carried out in the same conditions without permeation. The enzyme adsorption affected the saccharides rejection profile in the system. While in literature it has been reported an increase in rejection coefficients due to pressure increase and crossflow velocity decrease, we observed the opposite. The permeate flux showed a great decrease along the time presenting a pseudo stationary state just after 190 minutes.

The interaction between the enzyme and the membrane occurs and it seems to form a modified membrane, that was not disturbed due to changes on crossflow velocity, since no changes on the permeate flux was observed. Although, the crossflow velocity acts directly on the concentration polarization layer that is formed above this modified membrane. The crossflow velocity increase decreased the thickness of the concentration polarization layer and allowed the back diffusion to occur in a higher rate. Consequently, the  $R_{obs}$  were higher due to crossflow velocity increase. The pressure increase decreased the second layer and therefore the resistance to mass transfer, as a result lower rejection coefficients were observed.

The membrane rejection profile was directly affected by the operational conditions. Mono and disaccharide were the most affected ones; on tri- and tetrasaccharides this effect was not so intense due to great difference between the molecule and the pore size. The monosaccharides, that presented rejections values around 40% at 20 bar, when the pressure was increased the monosaccharides reached rejection coefficients values as low as 12%. The GOS-4 synthesized were totally retained and GOS-3 presented approximately 90% of retention. Between lactose, GOS-2 and GOS-2' that differ from each other by the monosaccharide moieties and linkage positions, different rejection coefficients were observed. The operating conditions can be tuned in order to reach rejection values as different as 41% for GOS-2 and 84 % for lactose.



## **ACKNOWLEDGMENTS**

This research project is supported by Alβan Programme, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America, scholarship n° E07D402537BR.



## REFERENCES

- [1] Thomas, P.L. and Earl, R. **Opportunities in nutrition and food sciences**. Washington, DC: National Academy Press; 1994. p 109.
- [2] Mussatto, S.I. and Mancilha, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587-597, 2007.
- [3] Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.
- [4] Crittenden, R.G. and Playne, M.J. Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 297-302, 2002.
- [5] Rivero-Urgell, M.; Santamaria-Orleans, A. and Seuma, M.R.P. La importancia de los ingredientes funcionales en l as leches y cereales infantiles. **Nutrici on Hospitalaria**, v. 20, n. 2, p. 135-146, 2005.
- [6] Wang, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, p. 8-12, 2009.
- [7] Mehra, R. and Kelly, P. Milk oligosaccharides: Structural and technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1334-1340, 2006.
- [8] Pazur, J.H. The enzymatic conversion of lactose into galactosyl oligosaccharides. **Science**, v. 117, p. 355-356, 1953.
- [9] Mahoney, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 147-154, 1998.
- [10] Boon, M.A.; Janssen, A.E.M. and van't Riet, K. Enzymatic synthesis of oligosaccharides: product removal during a kinetically controlled reaction. **Biotechnology. Bioengineering**, v. 70, p. 411-420, 2000.

[11] López-Leiva, M.H. and Guzman, M. Formation of oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**, v. 30, n.8, p.757-762, 1995.

[12] Czermak, P.; Ebrahimi, M.; Garu, K.; Netz, S.; Sawatzki, G. and Pfromm, P.H. Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process. **Journal of Membrane Science**, v. 232, p. 85-91, 2004.

[13] Goulas, A.K., Kapasakalidis, P.G., Sinclair, H.R., Rastall, R.A. and Grandison, A.S. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 209, p. 321-335, 2002.

[14] Feng, Y.M.; Chang, X.L.; Wang, W.H. and Ma, R.Y. Separation of galacto-oligosaccharides mixture by nanofiltration. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p.326-332, 2009.

[15] Sjöman, E.; Mänttari, M.; Nyström, M.; Koivikko, H. and Heikkilä, H. Separation of xylose from glucose by nanofiltration from concentrated monosaccharide solutions. **Journal of Membrane Science**, v. 292, n. 1-2, p. 106-115, 2007.

[16] Maugard, T.; Gaunt, D.; Legoy, M.D. and Besson, T. Microwave-assisted synthesis of galactooligosaccharides from lactose with immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 623-629, 2003.

[17] Catarino, I.; Minhalma, M.; Beal, L.L.; Mateus, M. and Pinho, M.N. Assessment of saccharide fractionation by ultrafiltration and nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 312, p. 34-40, 2008.

[18] Botelho-Cunha, V.A ; Mateus, M.; Petrus, J.C.C.; Pinho, M.N. Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galactooligosaccharides. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 29-36, 2010.

[19] Mulder, M. **Basic principles of membrane technology**. University of Twente, Enschede, The Netherlands, 2<sup>o</sup> ed., 2003. 564p.

- [20] Pinho, M.N.; Matsuura, T.; Nguyen, T.D. and Sourirajan, S. Reverse osmosis separation of glucose-ethanol-water system by cellulose acetate membranes. **Chemical Engineering Communications**, v. 64, p. 113-123, 1988.
- [21] Striegel, A.M. Anomeric configuration, glycosidic linkage, and the solution conformation entropy of O-linked disaccharides, **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 4146-4148, 2003.
- [22] Yoon, E.Y. A conformational study of linkage positions in oligosaccharides investigated by 2-D NMR spectroscopy and molecular modelling. **Bulletin Korean Chemical Society**, v. 24, p. 339-344, 2003.
- [23] Ahmad, A.L.; Ismail, S. and Bhatia, S. Ultrafiltration behavior in the treatment of agro-industry effluent: Pilot scale studies. **Chemical Engineering Science**, v. 60, p. 5385-5394, 2005.
- [24] Song, L. and Elimelech, M. Theory of Concentration Polarization in Crossflow Filtration. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions articles**, v. 91, p. 3389-3398, 1995.
- [25] Lapointe, J-F; Gauthier, S.F.; Pouliot, Y. and Bouchard, C. Fouling of a nanofiltration membrane by a  $\beta$ -lactoglobulin tryptic hydrolysate: impact on the membrane sieving and electrostatic properties. **Journal of Membrane Science**, v. 253, p. 89-102, 2005.
- [26] Coutinho, C.M.; Chiu, M.C.; Basso, R.C.; Ribeiro, A.P.B.; Gonçalves, L.A.G. and Viotto, L.A. State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: A review. **Food Research International**, v. 42, p. 536-550, 2009.
- [27] Vellenga, E. and Trägårdh, G. Nanofiltration of combined salt and sugar solutions: coupling between retentions. **Desalination**, v. 120, p. 211-220, 1998.
- [28] Seidel, A. and Elimelech, M. Coupling between chemical and physical interactions in natural organic matter (NOM) fouling of nanofiltration membranes: implications for fouling control. **Journal of Membrane Science**, v. 203, p.245-255, 2002.

- [29] Mikulašek, P., Doleček, P., Šmidova, D., Pospišil, P. Crossflow microfiltration of mineral dispersions using ceramic membranes. **Desalination**, v. 163, p. 333–343, 2004.
- [30] Balakrishnan, M., Dua, M., Bhagat, J.J. Effect of operating parameters on sugarcane juice ultrafiltration: results of a field experience. **Separation and Purification Technology**, v. 19, p. 209–220, 2000.
- [31] Mourad, H., Martine, M.P. Analysis of deposit behaviour in crossflow microfiltration by means of thickness measurement. **Chemical Engineering Journal**, v. 86, p. 251–257, 2002.
- [32] Oe, T., Koide, H., Hirokawa, H. and Okukawa, K. Performance of membrane filtration system used for water treatment. **Desalination**, v. 106, p. 107–113, 1996.

### **Artigo 3**

#### **ARTIGO A SER SUBMETIDO**

#### **Lactose hydrolysis in whey permeate on membrane bioreactors – serum proteins interference during glucose determination and enzyme-membrane interactions**

Vanessa A. Botelho-Cunha, Andréia Tremarin, Müller, J.M.; José C.C.  
Petrus

Chemical and Food Engineering Department, Centro Tecnológico  
(CTC), Universidade Federal de Santa Catarina, Caixa postal 476,  
88040-900 Florianópolis, SC-Brasil



## ABSTRACT

Lactose hydrolysis, an interesting process from technological and environmental point of view, was investigated. The hydrolysis reaction were carried out in membrane reactors with two different membranes: a laboratory made one, prepared with polyethersulfone (PES), and a commercial one, prepared with polyvinylidene fluoride (PVDF) with 10 kDa cut off. The permeate obtained from whey ultrafiltration was used as a lactose source and the effect of enzyme concentration on lactose hydrolysis in dead-end and crossflow (or tangential) filtration. The highest activities were obtained when  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  of enzyme concentration was used in both reactors. A heat treatment ( $80^\circ\text{C}/20$  minutes) was applied to precipitate the protein fraction that remained on the permeate and the effect of this protein fraction on the glucose analytical method was studied on  $15 \text{ g.L}^{-1}$  glucose solution (4, 8, 12 and  $16 \text{ g.L}^{-1}$ ) and during the PWP (permeate without protein) hydrolysis (2, 4, 6 and  $8 \text{ g.L}^{-1}$ ). The results showed that the protein presence in the medium led to underestimated amounts of glucose independently of their concentration. The enzyme adsorption on to the membrane rendered irreversible fouling and could be confirmed by FTIR analysis. Independently the reactor configuration, dead-end or crossflow filtration, less than 50% of the origin permeate flux could be recovered after cleaning. Regardless the interaction between the enzyme and membrane, some residual enzyme activity was observed on the adsorption/fouling layer.

**Keywords:** membrane, reactor, lactose, hydrolysis



## 1 INTRODUCTION

The use of membrane technology in dairy industry nowadays is a reality. The use of ultrafiltration to concentrate skim milk prior to cheese making forty years ago improved the quality of traditional dairy products and opened the market to new products [1]. The permeate fraction from milk ultrafiltration and the whey obtained from the traditional production of cheese are by-products of dairy industry. Both streams, that cannot be drained without a treatment due to the very high chemical oxygen demand (COD) value, about  $60.000 \text{ mg.L}^{-1}$ , present remarkable compounds (serum protein, lactose and minerals) in their composition [2]. Apply membrane technology once again can be an alternative to recovery these products, for economical or environmental reasons. A number of research works have been published on membrane process for the fractionation or concentration of whey proteins [3]. Although this process is interesting for the economical point of view it cannot solve the environmental problem. The large amount of lactose that remains in the permeate part is responsible for the high COD, since protein recovery from whey reduces it around 12% [4].

Lactose can be recovered from whey by different processes and used directly in food and/or pharmacy industry. However, lactose hydrolysis, one important biotechnological process can be applied. Lactose is a disaccharide that can be converted into two monosaccharides: glucose and galactose. It presents advantages in health and technological area, because these monosaccharides can be consumed by humans with lactose intolerance and are more soluble and sweet than lactose among others advantages [5]. The enzyme  $\beta$ -galactosidase typically catalyzes the hydrolysis of  $\beta$ -D-galactosides and the hydrolysis rate can be estimated by the glucose amount released during the reaction. The glucose can be quantified by different analytical methods. A common one is the enzymatic colorimetric assay based on the glucose oxidase-peroxidase system. To stop the reaction a thermal treatment or the addition of trichloroacetic acid solution can be applied [6].

Jimenes-Guzmán *et al.* [6] studied the interaction between serum proteins and  $\beta$ -galactosidase and its effect on enzyme activity. The activity of  $\beta$ -galactosidase increased when it was measured in the presence of either heat treated  $\beta$ -lactoglobulin or bovine serum albumin, whereas  $\alpha$ -lactalbumin showed no effect on enzyme activity. The authors assigned that  $\beta$ -lactoglobulin raises lactase activity through the

release of sulfhydryl groups by heat treatment from the denatured protein, and the native protein has the ability of bind the enzyme.

Polyethersulfone (PES) and polyvinylidene fluoride (PVDF) are membrane material with excellent chemical stability, thermal resistance and mechanical properties that could be used in membrane reactor for lactose from whey hydrolysis. However, their intrinsic hydrophobicity often leads to the adsorption of proteins on membrane surface and inside the membrane pores, when these are present in feed solution [7]. The enzyme adsorption can occur due to various physicochemical interactions between the enzyme molecules and the membrane and can cause serious membrane fouling and decrease of membrane performance. To physicochemical interactions occur the hydrodynamics of the separation process are as important as the characteristics of the membrane and the solution [8].

The objective of this work is study the interference of remaining protein in the permeate fraction obtained from whey ultrafiltration on the glucose oxidase-peroxidase system, selected to quantify the hydrolysis rate. Furthermore, the effect of  $\beta$ -galactosidase concentration in two different membrane reactors configurations was evaluated.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 CHEMICAL AND BIOLOGICAL REAGENTS

The hydrolysis experiments were done with Maxilact LX 5000 (kindly offered by Global Food/Brazil), a commercial  $\beta$ -galactosidase *Kluyveromyces lactis* solution. One NLU is defined as the amount of enzyme that releases 1.0  $\mu\text{mol}$  of *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) per minute, on specific assay conditions. According to the manufacturers the enzyme presents 5000 NLU.g<sup>-1</sup>. The protein amount was determined spectroscopically (278 nm) and estimated in 6%.

An enzymatic test was used to measure the glucose concentration increase during lactose hydrolysis. Glucose concentration was measured with a glucose oxidase-peroxidase test. Glucose is transformed to gluconic acid and hydrogen peroxide by glucose oxidase. The hydrogen peroxide formed reacts in the presence of peroxidase with 4-aminoantipyrine and phenol to form a quinoneimine dye. The intensity of the colour produced is directly proportional to the glucose concentration in the sample. The absorbance (500nm) can be linearly related to the concentration of glucose from 0.23 mg.dL<sup>-1</sup> to 500 mg.dL<sup>-1</sup>. All the others reagents used during this work were of analytical grade.

### 2.2 SUBSTRATE

Cheese whey, kindly offered by Laticínios do Vale/Brazil, was ultrafiltered with a 10 kDa cut-off membrane at 2.6 bar and 45°C. The permeated fraction collected was placed in 500 mL bottles and kept at -18°C. Before the use, the whey permeate was filtered through quality filter paper (Qualy/Brazil). This pre-treated whey was named PTW. A thermal treatment was applied in the permeate to remove the residual protein that could be found on it. The permeate was kept at 80°C for 20 minutes and then centrifuged (Fanem/Brazil) at 3000 rpm for 20 minutes. The precipitate material was kept at -18°C. The permeate without protein was named PWP.

## 2.3 MEMBRANES

The hydrolysis reaction were carried out in membrane reactors with two different membranes: a laboratory made one, prepared with polyethersulfone (PES), and a commercial one, prepared with polyvinylidene fluoride (PVDF) with 10 kDa cut-off (Romicon, Koch Membranes/USA). The PES membranes were prepared by phase inversion using the following casting solution: 12% w/w PES (molecular weight 115.000 g.mol<sup>-1</sup> – DuPont/Brazil) and 88% N-N-Dimetilformamide (DMF). The casting solution was spread uniformly to a depth of 0.5 mm on a glass plate covered with a polyester-polypropylene support (Viledon Filter, Carl Freudenberg/Germany). After the spreading, the glass plate was immediately immersed on a coagulation bath at 20°C for 4 hours. The membrane formed was removed and placed on paper towels until completely dry. It was used a new membrane to each experiment and all of them were first compacted through pure water recirculation at a pressure of 4 bar for 2 hours and characterized through the determination of volumetric permeate fluxes,  $J_w$ , to water at 25°C and 2 bar, as given by equation 1:

$$J_w = \frac{\text{permeate weight (kg)}}{\text{membrane area (m}^2\text{)} * \text{time (h)}} \quad (1)$$

## 2.4 MEMBRANES REACTORS

### 2.4.1 Dead-end filtration

The stainless steel laboratory reactor presents a feed cell with 200 mL capacity. The membrane, with effective area of 10.2 cm<sup>2</sup>, is located in the bottom part and is protect by a grid. A magnetic bar was put inside the reactor (on the grid) and the cell placed over a magnetic stirrer. This system allowed the substrate agitation during the reaction. The temperature control could be done circulating thermostated water in the cell jacket. The pressure was applied by injection of compressed air at the top of the cell. Samples from retentate could be collected by a valve localized on the reactor base, immediately above the membrane.

### 2.4.2 Crossflow filtration

The pilot scale equipment has a feed tank with capacity of 5 L. The positive displacement pump and frequency inverter allows working with constant pressure and different flow rates. The maximum velocity reached by the pump is  $0.9 \text{ m.s}^{-1}$ . The membranes, with individual area of  $17.7 \text{ cm}^2$ , are placed two independent acrylic cells arranged in series. The temperature control was done circulating thermostated water in the feed tank jacket and the pressure control was done by a manual valve localized after the cells.

## 2.5 EFFECTS OF RESIDUAL PROTEIN ON GLUCOSE DETERMINATION

Glucose solutions with different concentrations were prepared. The protein fraction obtained from whey thermal treatment was added at  $1 \text{ g.L}^{-1}$  and  $4 \text{ g.L}^{-1}$  in glucose solutions with different concentrations (10 to  $50 \text{ g.L}^{-1}$ ). The amount of glucose was determined in the absence and in the presence of protein. The protein concentration effect (4, 8, 12 and  $16 \text{ g.L}^{-1}$ ) was studied on a  $15 \text{ g.L}^{-1}$  glucose solution. The hydrolysis rate of PWP was determined with (2, 4, 6 and  $8 \text{ g.L}^{-1}$ ) and without the protein. All reactions were carried out in 50 mL flasks in a Dubnoff shaker at  $35^\circ\text{C}$ , 200 rpm, using  $0.4 \text{ g.L}^{-1}$  of enzyme concentration. The pH was adjusted to 6.8 using phosphate buffer 0.6 M. After 60 minutes, samples were inactivated by immersion on boiling water for 3 minutes. From a flask with PWP completely hydrolyzed in the same conditions, samples were withdrawn and mixed with the same amounts of protein used during the reaction. The amount of glucose was determined with the enzymatic kit in all conditions studied.

## 2.6 EFFECTS OF ENZYME CONCENTRATION

Different enzyme concentrations were tested on PWP and PTW, both with pH adjusted to 6.8 with phosphate buffer, at  $35^\circ\text{C}$  in different systems. In all of them, after 60 minutes a sample from the reaction medium was immersed on boiling water for 3 minutes to stop the reaction and the amount of glucose was determined with the enzymatic kit.

The reactions were first carried out in 50 mL glass flasks at 200 rpm in a Dubnoff shaker with enzyme concentration varying from 0.2 to 0.8 g.L<sup>-1</sup>. In the laboratory unit the reactions were carried out with 200 mL of PWP, 200 rpm and 2 bar, with enzyme concentration varying from 0.05 to 0.4 g.L<sup>-1</sup>. In the pilot unit the reactions were carried out with 3000 mL of PTW, 0.9 m.s<sup>-1</sup>, 2 bar and enzyme concentration varying from 0.1 to 0.4 g.L<sup>-1</sup>. A reaction using PWP as substrate was done using 0.2 g.L<sup>-1</sup> of enzyme concentration. In both reactors, the permeate flux (L.h<sup>-1</sup>.m<sup>2</sup>) was measured until 60 minutes. After the hydrolysis reactions, the fouling coefficient (FC), a measure of deposit extent on the membrane surface after filtration, was calculated using equation 2:

$$FC = 100 * \left( 1 - \frac{J_{w'}}{J_w} \right) \quad (2)$$

where  $J_{w'}$  is the water permeation flux obtained after rinsing the cell at the end of the process and  $J_w$  is the initial pure water flux before processing.

## 2.7 ENZYME ADSORPTION ON THE MEMBRANE

The laboratory unit was filled with 150 mL of PWP and after temperature stabilization (35°C), enzyme was added to the system (0.2 g.L<sup>-1</sup>). The filtration was carried out at 2 bar for 2 hours, using a commercial PVDF membrane. After the ultrafiltration, the cell was washed three times with distilled water and filled again with 150 mL of PWP with no enzyme. The filtration were carried out for two hours again in the same conditions, collecting samples of the permeate and retentate at different time intervals. The hydrolyzed PWP was removed and the cell washed with distilled water. The hydrolysis rate was determined after stopping the reaction with boiling water for 3 minutes and measuring the glucose with the enzymatic kit.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), that provides specific information about chemical bonding and molecular structures, was used to investigate the interaction between the enzyme and the PVDF membrane. The first membrane was a new one, the second membrane was immersed in enzyme solution 0.2 g.L<sup>-1</sup> for 24 hours and

the third one was used in the laboratory unit during a PWP hydrolysis reaction for two hours with  $0.2 \text{ g. L}^{-1}$ , 2 bar and  $35^{\circ}\text{C}$ .

## 2.8 ENZYME STABILITY

The enzyme activity variation along the time was measured in the laboratory cell using PWP as substrate. The pH was adjusted to 6.8 with phosphate buffer; the temperature was  $35^{\circ}\text{C}$ , pressure 2 bar and the enzyme concentration  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$ . Sixty millilitres of PWP was placed in the cell and the enzyme added. After 90 minutes, the cell was opened and filled with new PWP in the same volume permeated during this time (around 20 mL). This procedure was repeated 3 times and the glucose concentration measured after every 90 minutes.



### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 EFFECTS OF PROTEIN ON GLUCOSE DETERMINATION

Glucose oxidase-peroxidase method has been used in many articles to determine the amount of glucose released during lactose hydrolysis. To stop the reaction, usually a thermal treatment is applied and this was the procedure followed during this work. When the hydrolysis reaction was studied using PTW as substrate, it was observed an increase of the turbidity after enzyme inactivation. As the analytical method used to quantify the glucose concentration was based on absorbance measurements, we decided to investigate if this cloudy formed would interfere on it. Different glucose standard solutions were prepared and analysed with and without the addition of the protein. Figure 1 shows the results when  $1 \text{ g.L}^{-1}$  and  $4 \text{ g.L}^{-1}$  of the precipitated material was added on glucose solutions. When  $1 \text{ g.L}^{-1}$  of protein was added, a decrease in the glucose determination was observed mainly to glucose concentrations higher than  $0.03 \text{ g.mL}^{-1}$ . To the highest concentration added, this decrease can be seen since  $0.01 \text{ g.mL}^{-1}$  of glucose concentration. Figure 2 shows the results found when higher amounts of protein were added to a  $15 \text{ g.L}^{-1}$  standard glucose solution. Once again it was observed a decrease on the glucose determination to all the amounts of protein tested and, in the range studied, this decrease was independent of the protein concentration.

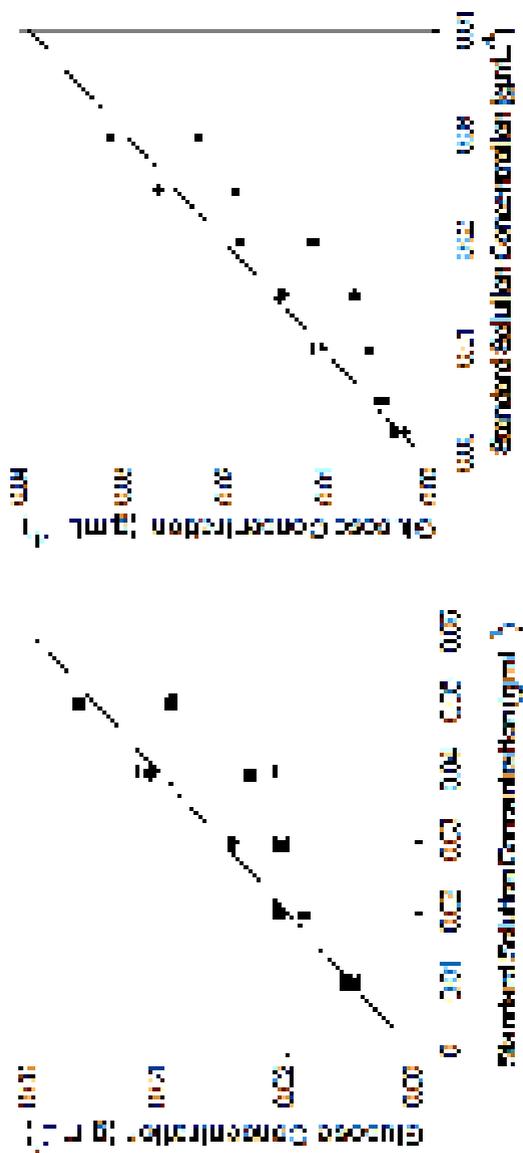
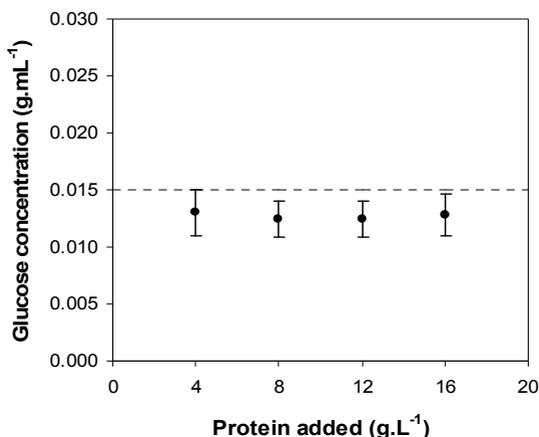


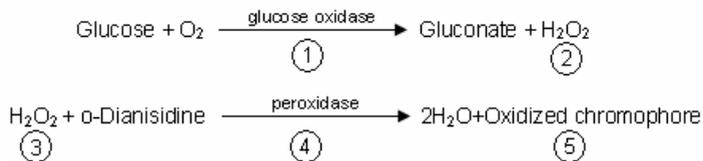
Figure 1 – Effect of protein addition on glucose standard solutions (on the left: 1 g.L<sup>-1</sup>; on the right: 4 g.L<sup>-1</sup>).



**Figure 2 - Effect of different amounts of protein on 15 g.L<sup>-1</sup> glucose standard solutions.**

Blaedel and Uhi [9] studied the interference of different compounds in the glucose oxidase-peroxidase-o-dianisidine method for glucose determination. Five possible ways or modes in which interferences could affect the system were reported in this work. These ways are illustrated on Figure 3 and are: 1. Inhibition of the glucose oxidase enzyme; 2. Nonenzymatic destruction of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced in the glucose oxidase reaction; 3. Peroxidase-catalyzed chemical reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in competition with 4-aminoantipyrine; 4. Inhibition of the peroxidase enzyme and 5. Destruction (bleaching) of the oxidized form of 4-aminoantipyrine (quinoneimine).

The authors reported that proteins can interfere in the glucose oxidase-peroxidase-o-dianisidine reaction in different ways, depending on the size of the molecule. Proteins with 40 kDa molecular weight presented mode 3 interference while 500 kDa one presented a mode 1 and also indicated interference on the peroxidase reaction. Our results indicated that even small proteins or peptides released during the coagulation process can interfere in this analytical method, since the whey was filtered with a 10 kDa membrane.

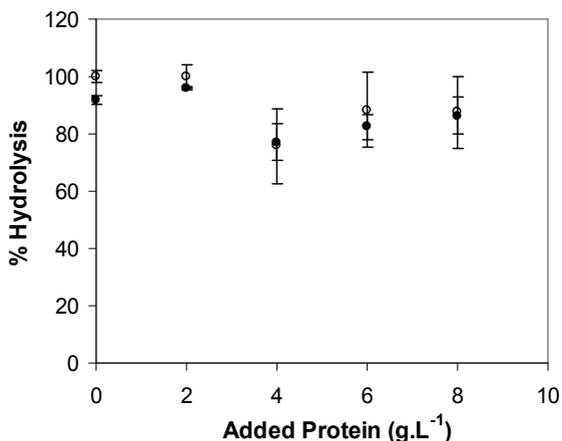


Source: Blaedel and Uhi [9]

**Figure 3 – Possible sites of interference in the glucose oxidase-peroxidase-o-dianisidine system (sites of interference are indicated by Arabic numerals).**

### 3.2 EFFECTS OF PROTEIN ON LACTOSE HYDROLYSIS

Some tests were done to verify if the protein addition could cause discrepancies in the hydrolysis rate due to some interaction between the proteinaceous material and the enzyme. Figure 4 shows that when the reaction was carried out with no protein addition, practically 100% of hydrolysis was reached.



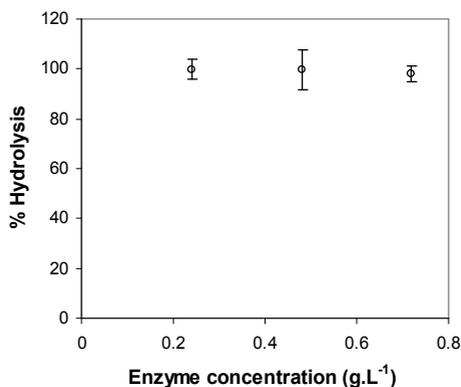
**Figure 4. Hydrolysis rate measured on the presence of different amounts of protein and without protein addition (Open symbol: no protein; closed symbol: with protein)**

When the protein were added to PWP, in the same rate found in the original permeate,  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , a slightly decrease was observed and, the addition of this amount of protein to a sample previously hydrolyzed, practically did not change the glucose determination. To the samples with amounts of protein addition higher than  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , added before or after the reaction, lower hydrolysis rates were observed. This indicates that in fact, the protein addition interferes on the glucose oxidase-peroxidase system.

It is important to consider that, in the permeate obtained from whey ultrafiltration, the protein are in their native form and can present a different or no effect in the glucose oxidase-peroxidase reaction. However, if a thermal treatment is used to stop the reaction, it will promote protein denaturation and, unless these proteins are removed from the medium, it will result in an underestimated glucose measurement. More studies are necessary to identify the mechanisms of the reaction.

### 3.3 EFFECTS OF ENZYME CONCENTRATION ON LACTOSE HYDROLYSIS

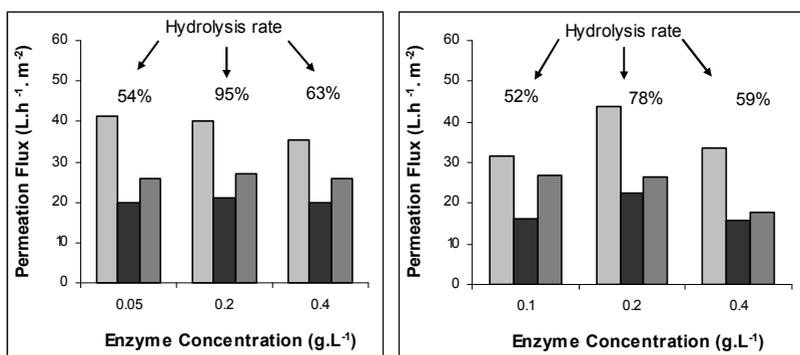
To study the enzyme concentration effect, PWP was used as substrate at  $35^\circ\text{C}$  and pH 6.8 in different systems. Figure 5 shows the hydrolysis rate when the reaction was carried out in glass flasks in a Dubnoff shaker.



**Figure 5 - Effect of enzyme concentration on PWP hydrolysis carried out in glass flasks at  $35^\circ\text{C}$  and pH 6.8.**

In this system, the enzyme is completely free and no adsorption is expected, since there is no membrane in contact with the enzyme solution. To all concentrations tested, nearly 100% of hydrolysis was obtained, what means that we are in the range of enzyme concentration where adding additional enzyme in the system does not mean an increase in the enzyme activity. Additional enzyme molecules could speed up the reaction but, in this case, there are more active sites than are needed and the reaction levelled off.

The results obtained when the reactions were carried out in the membrane reactors are presented in Figure 6.



**Figure 6 - Effect of Maxilact concentration on PTW hydrolysis rate on dead-end filtration (on the left) and PWP hydrolysis rate carried out in crossflow filtration (on the right), at 35°C and pH 6.8.**

It can be seen that in both reactors, the hydrolysis rate increase and then decrease with the enzyme concentration increase. This behaviour was observed by Botelho-Cunha *et al.* [10] during  $\beta$ -galactosidase immobilization on phenol-formaldehyde beads. The authors observed that more adsorbed enzyme per unit of solid matrix does not always lead to higher specific enzyme activity, as the smallest specific activity was obtained with the higher amount of loaded protein. Such behaviour could be attributed to a possible adsorption of new enzyme molecules onto the previously adsorbed ones rather than onto the support surface, probably due to subsequent diffusional problems.

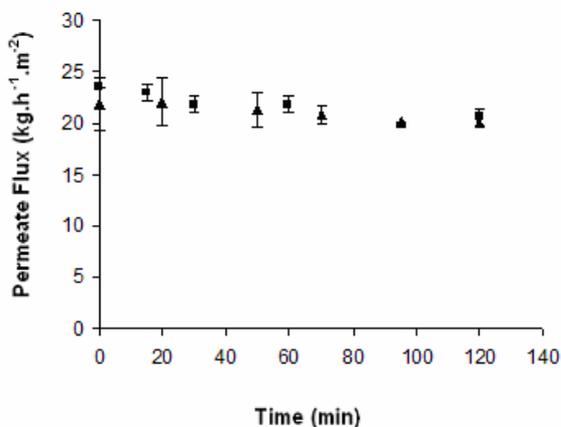
The highest activities were obtained when 0.2 g.L<sup>-1</sup> was used, but the complete lactose conversion was not observed, as observed in the shaker reaction. In the laboratory unit, 95% of conversion was reached, however, in the pilot unit the hydrolysis rate was 78%. In both reactors

the maximum hydrolysis rate was observed after 60 minutes. To be sure that this difference in the hydrolysis rate is not caused by the protein fraction present in the PTW, a reaction in the same operational conditions using  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  of enzyme concentration was carried out with PWP. The hydrolysis rate reached was practically the same, 74% (data not shown). The reactor operated in the highest tangential velocity to avoid, as much as possible, the concentration polarization phenomena, but the shear stress caused by this velocity may have decreased the enzyme activity. Another explanation is the difference in membrane area. The reactor used in the crossflow filtration presented a membrane area 3.5-fold higher than the one used in the dead-end filtration reactor. With more membrane area, more enzyme molecules can be adsorbed and during this process, the enzyme can lose some activity.

Due to the hydrophobic characteristics of the membranes used, PES in the perpendicular filtration and PVDF in the tangential one, interactions between the enzyme and the membranes are expected. The decrease on the enzyme activity when enzyme concentration higher than  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  was used can be assigned to these interactions. When more enzymes are linked to the membrane, a steric hindrance of the active sites can occur. This behaviour is very common when enzymes are immobilized on different supports. Fuentes *et al.* [11], studying lipase adsorption, reported that using higher amounts of initial enzyme concentration led to complex with smaller activities. They attributed this behaviour to a possible adsorption of new enzyme molecules onto the previously adsorbed ones.

Related to pure water filtration, the reaction mixture permeate flux was around 50% lower and very similar to both membranes and all enzyme concentrations tested. The new membrane formed by the interaction between the enzyme and the hydrophobic surface presents similar behaviour about water and reaction mixture permeation. The same glucose concentration was measured inside both reactors and permeates what means a complete permeation of monosaccharides.

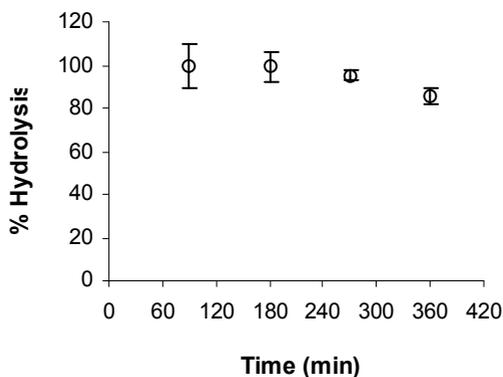
Figure 7 shows the permeate flux evolution in both reactors when  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  of enzyme concentration was used. It was observed a slight decrease on the permeate flux until 60 minutes and after this the stabilization occurred around the same value. The lactose concentration used here was very low and not enough to cause the great permeate flux decline observed by Botelho-Cunha *et al.* [10] that studied galacto-oligosaccharides synthesis on membrane reactor using a commercial preparation of  $\beta$ -galactosidase *K. lactis*.



**Figure 7 – Permeate flux evolution along the time (Symbols: ▲, crossflow filtration; ■ dead-end filtration).**

Due to the high concentration of feed solution,  $150 \text{ g.L}^{-1}$ , the authors observed a great permeate flux decline and reported that the enzyme interaction with the membrane forms a second layer on the membrane surface. The interaction between the enzyme and the membrane can be translated on the irreversible fouling observed on this work and by these authors. The average fouling coefficient in the laboratory unit was 0.32 and in the pilot unit was 0.43, including the one obtained on the reaction with PWP.

Figure 8 shows the enzyme stability. The enzyme could be used twice, for 180 minutes, without any lost of activity. A gradual decrease was observed since 270 minutes. Reminding that in this reactor we have a dead-end filtration, these results suggest that the growing fouling layer formed on the membrane surface can be the cause of this decrease. More studies should be done to investigate the enzyme interaction with the membranes and the permeate flux behaviour along the time and how the operation conditions affect it as an attempt to operate the reactors in continuous operation mode.



**Figure 8 – Enzyme stability along PWP hydrolysis at 35°C, 2 bar and 0.2 g.L<sup>-1</sup> of enzyme concentration. Every 90 minutes the cell was opened and filled with new PWP.**

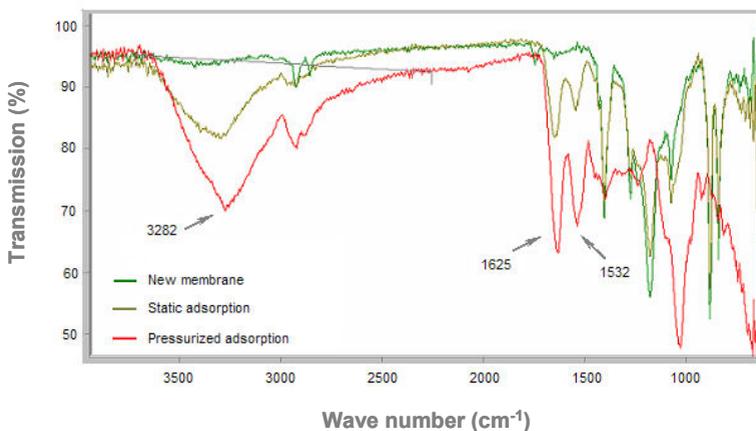
### 3.4 ENZYME ADSORPTION ON THE MEMBRANE

Protein adsorption on membrane surface is used as indicator of the membrane performance. Many researchers have focused on the elucidation of protein adsorption mechanisms or control methods of the adsorption phenomena. The static adsorption method, which is performed by simply submerging the membrane materials into a protein solution, has been generally used and the dynamic adsorption method, which means membrane filtration, is also used. Nakamura and Matsumoto [12] reported that adsorption isotherm for the static adsorption was a Langmuir type while that for the dynamic adsorption was a multilayer type. Although, the protein adsorption on membranes are still not fully understood because it will depend on quite many factors such as operating conditions, solution chemistry, surface physicochemical conditions and pore morphology [12].

The FTIR spectra of PVDF membranes are shown in Figure 9. The PVDF characteristic band occurs on 1400 cm<sup>-1</sup> [13, 14]. To the new membrane and the one immersed on enzyme solution, this peak is very similar, just a slight decrease was observed. The surface modification was more intense when the membrane was submitted to pressure during the reaction/filtration experiment and a more intense decrease on this peak was observed. While the PVDF characteristic

band decreased, characteristic peaks were inspected as the evidence of the adsorption of  $\beta$ -galactosidase on the membrane surface, which are observed at 3282, 1625 and 1532  $\text{cm}^{-1}$ , since these peaks were not observed on the new membrane.

The first one, 3282  $\text{cm}^{-1}$ , would be related to N-H bonds of proteins [15, 16] but in this region a large and centered sign around 3300  $\text{cm}^{-1}$ , can be attributed to the stretching of OH bonds [15], present on glycerol molecule that is used to prepare the commercial enzyme solution. At 1625  $\text{cm}^{-1}$  is located the amide I band of peptides and proteins, which mainly involves the carbonyl stretching vibrations of the peptide backbone. It is a sensitive marker of peptide secondary structure, as the vibrational frequency of each C=O bond depends on hydrogen bonding and the interactions between the amide units. The amide II band, characteristic of the bending of NH groups in the plane and the C–N stretching modes of the polypeptide chains, is located at 1532  $\text{cm}^{-1}$ . The variation in the intensity of the amide I and II bands was in agreement with the variation in the degree of adsorption [17] and it is clear that when the membrane was submitted to pressurized filtration, the enzyme adsorption was higher than the one obtained when the membrane was just immersed on a enzyme solution. Salgin, Takaç and Özdamar [18] studied the BSA adsorption on ultrafiltration membranes and reported the presence of amide I and II on their FTIR spectra around the same value.



**Figure 9.** FTIR spectra of new membrane, one immersed on enzyme solution and one used during PWP hydrolysis reaction for two hours with 0.2 g.  $\text{L}^{-1}$  of enzyme, 2 bar and 35°C.

The reactions carried out in the laboratory unit without enzyme addition confirms that further than be adsorbed, the enzyme presents a residual activity. When the reactor was emptied, cleaned with water and filled again just with PWP, a hydrolysis rate of 6.4% was reached. The membrane reactors combine the characteristics of reactors operating with free and immobilized enzyme. More studied should be done to investigate how the operational parameters can interfere on the enzyme activity and reactor performance operating mainly in continuous mode.



#### 4 CONCLUSION

The protein fraction that remains in the whey ultrafiltration permeate can interfere on the glucose oxidase-peroxidase method, given underestimated values. To avoid it, when a thermal treatment is applied to inactivate the enzyme, a centrifugation or filtration step should be included after this and before the glucose enzymatic kit utilization or, another method should be employed.

The hydrolysis rate increase with the enzyme concentration increase until a limit, after this a decrease on the hydrolysis rate was observed to both membrane reactor configurations – dead-end and crossflow filtration

The observed interaction between the enzyme and the membrane was higher when pressure was applied to the system. Besides, less enzyme activity on the membrane reactors was observed in comparison with the reaction carried out in the same conditions in reactors without the membrane. This interaction is reflected on the irreversible fouling observed to all operational condition in both reactor configurations studied; less than 50% of the origin permeate flux could be recovered after the reaction, although some residual enzyme activity could be found on the adsorption/fouling layer.

During the lactose hydrolysis on membrane reactors, the physicochemical conditions are set to obtain the highest enzyme activity and the operating conditions should be chosen as a compromise between the reaction yield and membrane reactor performance because the protein adsorption is inherited to the process.



## REFERENCES

- [1] Atra, R.; Vatai, G.; Bekassy-Molnar, E.; Balint, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 325–332, 2005.
- [2] Suárez, E.; Lobo, A.; Alvarez-Blanco, S.; Riera, F. A.; Alvarez, R. Utilization of nanofiltration membranes for whey and milk ultrafiltration permeate demineralization. **Desalination**, v. 199, p. 345–347, 2006.
- [3] Alomirah, H.F.; Alli, I. Separation and characterization of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin from whey and whey protein preparations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 411–419, 2004.
- [4] González-Siso, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.
- [5] Jurado, E.; Camacho, F.; Luzón, G.; Vicaria, J.M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300–309, 2002.
- [6] Jiménez-Guzmán, J.; Sarabia-Leos, C.; Cruz-Guerrero, A. E.; Rodríguez-Serrano, G. M.; López-Munguía, A.; Gómez-Ruiz, L.; García-Garibay, M. Interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity. **International Dairy Journal**, v.16, p. 1169-1173, 2006.
- [7] Zhu, L-P.; Du, C-H.; Xu, L.; Zhu, B-K, Xu, Y-Y. Improved protein-adsorption resistance of polyethersulfone membranes via surface segregation of ultrahigh molecular weight poly(styrene-*alt*-maleic anhydride). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 57, p. 189-197, 2007.
- [8] Salgın, S.; Takaç, S.; Özdamar, T. H. Effect of ionic environments on the adsorption and diffusion characteristics of serine alkaline protease enzyme in polyethersulfone ultrafiltration membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 299, p. 806–814, 2006.

- [9] Blaedel, W. J.; Uhi, J. M. Nature of materials in serum that interfere in the glucose oxidase-peroxidase-o- dianisidine method for glucose, and their mode of action. **Clinical Chemistry**, v. 21, p. 119-124, 1975.
- [10] Botelho-Cunha, V.A ; Mateus, M.; Petrus, J.C.C.; Pinho, M.N. Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galacto-oligosaccharides. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 29-36, 2010.
- [11] Fuentes, I.E. ; Viseras, C.A. ; Ubiali, D. ; Terreni, M. ; Alcántara, A.R. Different phyllosilicates as supports for lipase immobilisation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 657-663, 2001.
- [12] Nakamura, K. and Matsumoto, K. Protein adsorption properties on a microfiltration membrane: A comparison between static and dynamic adsorption methods. **Journal of Membrane Science**, v. 285, p. 126–136, 2006.
- [13] Petrus, J.C.C. **Preparação, modificação e caracterização de membranas assimétricas para clarificação de suco de frutas**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1997, 139p.
- [14] Chen, Y.; Liu, D.; Deng, Q.; He, X. and Wang, X. Atom transfer radical polymerization directly from poly(vinylidene fluoride): surface and antifouling properties. **Journal of Polymer Science Part A Polymer Chemistry**, v. 44, p. 3434-3443, 2006.
- [15] Osiro, D.; Filho, H.D.C.; Machado, M.A. and Colnago, L.A. Uso de FTIR para análise de bactérias causadoras do cancro cítrico e cvc. **EMBRAPA - Comunicado Técnico**, n. 40, p. 1-5, 2000.
- [16] Pascu, M.; Nicolas, D.; Poncin-Epaillard, F. and Vasile, C. Surface modification of PVDF by plasma treatment for electroless metallization. **Journal of optoelectronics and advanced materials**, v. 8, p. 1062 – 1064, 2006.

[17] Belfer, S.; Fainchtain, R.; Purinson, Y. and Kedem, O. Surface characterization by FT-IR-ATR spectroscopy of polyethersulfone membranes-unmodified, modified and protein fouled. **Journal of Membrane Science**, v. 172, p. 113-124, 2000.

[18] Salgin, S.; Takaç, S. and Özdamar, H. T. Adsorption of bovine serum albumin on polyether sulfone ultrafiltration membranes: Determination of interfacial interaction energy and effective diffusion coefficient. **Journal of Membrane Science**, v. 278, p.251-260, 2006.



## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSÕES E SUGESTÕES**



Investigou-se o processo de síntese e fracionamento de oligossacarídeos. parâmetros pertinentes, tanto à reação de síntese quanto ao fracionamento foram estudados, como concentração de enzima, tempo de residência no reator, concentração inicial de lactose, temperatura e pressão.

Verificou-se que a enzima  $\beta$ -galactosidase foi adsorvida irreversivelmente em resinas de fenol-formaldeído, segundo a isoterma de Langmuir. A atividade da enzima imobilizada aumentou com a concentração de equilíbrio, quando a quantidade de enzima adsorvida foi muito elevada. Um decréscimo na atividade específica da enzima foi observada para concentrações enzimáticas maiores que 16 mg.g de resina<sup>-1</sup>, provavelmente devido a efeitos estereoquímicos.

Concentrações elevadas de enzima aceleraram a produção de GOS, mas também a reação de hidrólise, portanto, reduzindo a produção de GOS. O perfil dos produtos de reação, em modo contínuo, é o mesmo que o observado em modo descontínuo, entretanto, a formação de alolactose não foi observada para todos os tempos de reação. O estado estacionário foi atingido rapidamente e manteve-se estável por aproximadamente 5 horas.

A nanofiltração das soluções concentradas de monossacarídeos e GOS, utilizando-se a membrana CA-77.5, evidenciou o controle hidrodinâmico do fluxo de permeado com pressões efetivas de até 13 bar, equivalente à pressão aplicada de 35 bar, considerando-se a pressão osmótica da solução. A permeabilidade da membrana foi 2,9 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>bar<sup>-1</sup> e 1,6 kg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>bar<sup>-1</sup>, respectivamente para soluções com concentrações totais de 150 g.L<sup>-1</sup> e 300 g.L<sup>-1</sup>. Quando a reação foi realizada com soluções de 150 g.L<sup>-1</sup>, as rejeições observadas de glicose, galactose, lactose e GOS-2 aumentaram com o aumento da pressão transmembrana efetiva, enquanto que as rejeições observadas para os GOS-3 foram independentes da pressão.

Uma variação nos valores das rejeições observadas dos dissacarídeos, lactose e GOS-2, mostram que a rejeição de solutos neutros não depende apenas dos efeitos de exclusão por tamanho molecular. Interações entre os solutos e o solvente (retenção histórica de água pelos açúcares) podem levar a estas diferenças nas rejeições, tornando possível o fracionamento entre dissacarídeos. Além disso, as diferenças entre as rejeições dos dissacarídeos podem ser atribuídas às diferenças de conformação molecular. A lactose apresenta uma ligação  $\beta$ -(1→4), enquanto a GOS-2 apresenta uma ligação  $\beta$ -(1→6).

Esta diferença entre as rejeições dos dissacarídeos aumentou com

o aumento da concentração total de açúcar, que também causou um decréscimo em todos os coeficientes de rejeição observados, inclusive os GOS-3, que passaram a permear a membrana. Os resultados experimentais reforçam a existência de uma permeação preferencial da lactose, induzida pelo aumento da concentração total dos açúcares na alimentação. O transporte dos monossacarídeos através da membrana foi o mais susceptível às mudanças nos parâmetros operacionais da filtração como temperatura, pressão efetiva e concentração total de açúcares na alimentação.

-X-X-X-X-X-X-X-X-

Neste trabalho, membranas de nanofiltração foram utilizadas, pioneiramente, nos processos de síntese e fracionamento simultâneos de GOS. A forma de operação do sistema - com e sem permeação dos produtos de reação levou a rendimentos distintos. O sistema com permeação resultou num rendimento de GOS 60% superior ao sistema sem permeação, ambos operando sob as mesmas condições operacionais.

Observou-se que a enzima adsorvida afetou as rejeições dos açúcares. O fluxo de permeado decresceu significativamente com o tempo de operação do reator, apresentando um pseudo estado estacionário somente após 190 minutos de processo.

A interação entre a enzima e a membrana ocorreu rapidamente, formando uma segunda camada sobre a superfície da membrana. Constatou-se que esta segunda camada apresenta atividade catalítica, portanto monossacarídeos e GOS são formados durante passagem da lactose pela membrana, da mesma forma que acontece no seio do reator.

Verificou-se que um aumento na velocidade tangencial levou a um aumento na rejeição dos açúcares e um aumento da pressão provocou redução nos coeficientes de rejeição da membrana a estes açúcares, principalmente aqueles de menor massa molar.

Os monossacarídeos apresentaram rejeição de aproximadamente 40% a 20 bar. Aumentando-se a pressão para 24 bar, houve decréscimo da rejeição para 12%. Os GOS-4 foram completamente retidos e os GOS-3, apresentaram rejeição próxima a 90%. Portanto, as condições operacionais podem ser alteradas para que sejam alcançadas melhores taxas de rejeição, tais como 41% para GOS-2 e 84% para lactose.

-X-X-X-X-X-X-X-X-

Estudos com o permeado do soro de queijo mostraram que a fração protéica que permanece no permeado pode interferir na quantificação da glicose por métodos colorimétricos enzimáticos, resultando em valores subestimados.

As taxas de hidrólise da lactose, presente no permeado do soro de queijo, não são diretamente proporcionais à concentração de enzima se estabilizando a partir de uma determinada concentração. A partir de então, uma diminuição da atividade foi observada para as duas configurações de reatores estudadas - reator com fluxo perpendicular e reator com fluxo tangencial.

O gradiente de pressão aplicado ao sistema aumentou o grau de ligação entre a enzima  $\beta$ -galactosidase e a membrana, também observado apenas por contato (imersão). A colmatagem irreversível observada, para todas as condições operacionais estudadas, reflete esta interação. Durante o processo de adsorção nem todos os sítios ativos das moléculas adsorvidas foram obstruídos, já que a enzima ainda apresentou uma atividade residual.

Nos reatores de membrana, devido possivelmente à adsorção da enzima na membrana, com perda parcial de sua atividade, menores taxas de hidrólise foram observadas quando realizadas, nas mesmas condições, em reator desprovido de membrana. Devido à colmatagem, independente da configuração do reator – com fluxo perpendicular e tangencial, menos de 50% do fluxo de permeado original pode ser recuperado após a reação.

Durante a hidrólise da lactose em reatores de membrana, as condições físico-químicas devem ser selecionadas para a obtenção da maior atividade enzimática, lembrando-se que as condições operacionais também irão interferir na reação e que a adsorção da enzima sobre a membrana é inerente ao processo. Assim, deve-se ajustar o processo ponderando-se o rendimento da reação e o desempenho do reator.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)