

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**CONVERSÃO DA LACTOSE E SÍNTESE DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR
AÇÃO DE β -GALACTOSIDASE E DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EM
BIOPROCESSOS SIMULTÂNEOS COM CATÁLISE E FERMENTAÇÃO LÁCTICA**

Eng. André Rosa Martins

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos necessários para obtenção do
título de Mestre em Engenharia e Ciência
de Alimentos

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert

Orientador

RIO GRANDE, RS

2009

Esse trabalho é fruto de dedicação e incentivo. Deve ser, portanto, dedicado a quem mais me incentivou. Minha gata e minha companheira, Maria Ceci.

“Tendo em vista os obstáculos, a distância mais curta entre dois pontos é a linha sinuosa”.

Bertold Brecht

“Então me diz qual é a graça de já saber o fim da estrada, quando se parte rumo ao nada”.

Paulinho Moska

“De nada serve partir das coisas boas de sempre, mas sim das coisas novas e ruins”.

Bertold Brecht

“A utopia está lá no horizonte, me aproximo dois passos e ela se afasta dois passos. Caminho dez passos, o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais a alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar”.

Eduardo Galeano

Agradeço, em primeiro lugar, à Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pela oportunidade e a vivência junto a uma importante instituição de ensino e pesquisa que me faz acreditar, ainda mais, na opção cidadã por espaços públicos, gratuitos, democráticos, autônomos e de qualidade, na busca de um ensino que construa, antes de tudo, a libertação de um povo a partir do conhecimento de sua gente.

Aos contribuintes e, muito especialmente, ao trabalhador honrado de meu país que com seu suor e sua honestidade permitiu-me usufruir da qualidade de uma instituição pública e gratuita do nível dessa Universidade Federal do Rio Grande.

Agradeço, ainda, aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos – PPGECA, pela compreensão e paciência com alguém que estava a tanto tempo afastado do ambiente acadêmico e, em especial, ao Prof. Carlos André pela orientação, a Prof^a Janaína pelo apoio no planejamento experimental e expressão dos resultados e a Prof^a Eliana pelo apoio e suporte analítico.

Aos colegas pelo convívio e amizade, especialmente à Elisane e Danielle que sempre acreditaram em mim, por vezes correndo certos riscos. Aos demais integrantes do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG, muito especialmente ao Ricardo pela atuação constante ao longo do trabalho.

A equipe da secretaria do Programa, em especial à Islanda, pelo apoio, compreensão, convívio, café, inconfidência, discrição, enfim, parceria.

Ao apoio inequívoco e constante da Perdigão, em especial à Cláudia, ao Marfan e ao Ângelo e, muito especialmente, à equipe da Unidade de São Lourenço com que tive o prazer de conviver por 2 anos e a alegria de retornar inúmeras vezes ao longo desse trabalho. Agradeço imensamente ao apoio da Patrícia e sua equipe pelo suporte nas análises no laboratório, ao Leonardo pelo suporte logístico e ao meu velho colega de graduação e outras caminhadas, Humberto, pelo apoio e compreensão.

À equipe do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Unicamp, especialmente à Ana Paula, pelo apoio fundamental nas análises de GOS.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e à Chr Hansen e Prozyn pelo apoio material.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
1.1 Premissas de Processo	2
1.2 Objetivos	5
CAPÍTULO II – REVISÃO	7
2.1 Oligossacarídeos	8
2.2 Oligossacarídeos no leite	9
2.3 Intolerância à lactose	11
2.4 Galactooligossacarídeos (GOS)	14
2.5 Cinética da Conversão da Lactose em Meio Livre	21
2.6 Efeitos Prebióticos dos GOS	26
2.7 Efeitos Bifidogênicos e a Sinergia entre GOS e Probióticos	29
CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Matéria-Prima e Insumos	34
3.2 Fluxo de Processo	35
3.3 Respostas do Planejamento Experimental	38
3.3.1 Lactose	38
3.3.2 Sinérese	39
3.3.3 GOS	39
3.3.4 Viscosidade	40
3.3.5 Densidade	40
3.4 Métodos de Análise das Respostas	41
3.4.1 Método Paramétrico	41
3.4.2 Método Não-Paramétrico	42
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Ensaio Prévios	46
4.2 Respostas do Planejamento Experimental	47
4.2.1 Ensaio Controle	47
4.2.2 Ensaio do Planejamento Experimental	48
4.2.3 Tempo de Processamento	50

4.2.4 Densidade	51
4.2.5 Viscosidade e Sinérese	53
4.2.6 Lactose Final e Conversão da Lactose	55
4.2.7 GOS	59
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES	66
5. Conclusões	67
CAPÍTULO VI – SUGESTÕES	69
6. Sugestões	70
REFERÊNCIAS E APÊNDICES	72
Referências	73
Apêndice 1 – Laudo com caracterização do leite em pó desnatado	80
Apêndice 2 – Laudo com a caracterização do soro de leite em pó	81
Apêndice 3 – Procedimento para clarificação de amostras	82
Apêndice 4 – Solução por redes neurais artificiais (RNA)	83

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Processos para obtenção de fermentado com baixo teor de lactose _____ 4

CAPÍTULO II

Tabela 2: Quantidade de Lactose e Oligossacarídeos em leites _____ 11

Tabela 3: Incidência média de intolerância a lactose na população adulta _____ 13

CAPÍTULO III

Tabela 4: Valores de lactose, proteína e umidade das matérias-primas _____ 34

Tabela 5: Níveis do planejamento experimental _____ 36

CAPÍTULO IV

Tabela 6: Respostas dos ensaios controle (sem adição de enzima) _____ 48

Tabela 7: Matriz do planejamento fatorial e suas respostas _____ 49

Tabela 8: Análise de variância para a densidade _____ 52

Tabela 9: Análise de variância para lactose final _____ 55

Tabela 10: Análise de variância para conversão da lactose _____ 56

Tabela 11: Valores reais, preditos e resíduos do modelo RBF 3:3-7-1:1 _____ 60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Processo convencional de conversão da lactose em fermentados _____ 4

CAPÍTULO II

Figura 2: Representação esquemática da fixação da lactase no TGI _____ 12

Figura 3: Rotas enzimáticas de conversão da lactose por β -galactosidase _____ 15

Figura 4: Estrutura dos trissacarídeos 4'-GOS e 6'-GOS _____ 17

Figura 5: Representação do dissacarídeo lactulose _____ 18

Figura 6: Trissacarídeos transgalactosilados obtidos da lactulose _____ 19

Figura 7: Trissacarídeos com ligações tipo β -1,1 obtidos da lactulose _____ 20

Figura 8: Representações espaciais de β -galactosidase _____ 25

Figura 9: Representação dos sítios ativos da β -galactosidase _____ 26

Figura 10: Representação do cólon humano _____ 27

Figura 11: Micrografia eletrônica mostrando o efeito anti-adesivo dos GOS _____ 31

CAPÍTULO III

Figura 12: Preparado enzimático e cultura láctica _____ 35

Figura 13: Microscopia eletrônica mostrando efeitos do tratamento térmico _____ 36

Figura 14: Fermentador Biostat B Braun _____ 37

Figura 15: Viscosímetro Brookfield _____ 40

Figura 16: Densímetro DMA 35-N _____ 41

Figura 17: Representação de um neurônio artificial _____ 42

CAPÍTULO IV

Figura 18: Resultados dos ensaios prévios para variação de pH no tempo _____ 46

Figura 19: Variação de pH no tempo para os ensaios e os brancos _____ 50

Figura 20: Superfície de resposta e curva de contorno para densidade _____ 52

Figura 21: Efeito das variáveis sobre as respostas de textura _____ 54

Figura 22: Superfícies de resposta para lactose final e conversão da lactose _____ 57

Figura 23: Superfícies de resposta pelo modelo de redes neurais _____ 61

Figura 24: Cromatograma obtido por HPLC-PAD _____ 63

RESUMO

Esse projeto desenvolveu um processo simultâneo de catálise e fermentação láctica visando obter um iogurte com características nutracêuticas. O objetivo principal foi avaliar a conversão da lactose e a síntese de galactooligossacarídeos (GOS) para um substrato específico, comparando biocatálises conduzidas simultaneamente à fermentação com os processos sem adição de enzima. A fermentação foi realizada a partir de cultura láctica liofilizada comercial contendo dois microrganismos probióticos, *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*, associados aos microrganismos característicos do iogurte, *Lactobacillus delbruekii* subs. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus*. Foi utilizado um preparado enzimático contendo β -galactosidases obtidas de duas origens distintas: *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus niger*. Foram avaliados os efeitos das variações da concentração de lactose no substrato, da concentração de enzima e do tempo de adição da enzima em um planejamento experimental 2^3 . As respostas foram o tempo de processo, a lactose final, a conversão da lactose, a densidade, a viscosidade, a sinérese e a concentração de GOS, comparando os processos enzimáticos e fermentativos simultâneos com a fermentação sem a adição de enzima. Os resultados indicaram um percentual de conversão da lactose entre 97,7 e 99,7% e uma produção de GOS nas condições de maior concentração inicial de lactose no substrato, menor concentração de enzima e maior tempo de defasagem na adição da enzima. Os efeitos sobre os parâmetros de textura foram negativos, indicando a necessidade de um acréscimo de agentes espessantes e estabilizantes nos bioprocessos simultâneos, quando do aumento da concentração de enzima. Observou-se, ainda, um impacto positivo no tempo de processamento quando da comparação entre os bioprocessos simultâneos e os processos de múltiplos estágios, na elaboração de fermentados lácticos com baixa concentração de lactose.

Palavras-chave: galactooligossacarídeos, β -galactosidase, prebiótico, probiótico.

ABSTRACT

Lactose conversion and galactooligosaccharides synthesis by action of β -galactosidase and probiotics microorganisms in simultaneous bioprocesses with catalysis and lactic fermentation

This project developed a simultaneous process of catalysis and lactic fermentation aiming to obtain a yogurt with nutraceuticals characteristics. The main objective was the conversion of lactose and the synthesis of galactooligosaccharides (GOS) for a specific substrate, comparing the bio-catalysis conducted simultaneously to the fermentation with the processes without adding enzymes. Fermentation started with a commercial lactic lyophilized containing two probiotics microorganisms, *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus*, associated with microorganisms characteristics of yogurts, *Lactobacillus delbruekii* subs. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus*. It was used an enzymatic preparation containing β -galactosidases obtained from two distinct sources: *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus niger*. It were evaluated the effects of the variation of lactose concentration on the substrate, the enzyme concentration and the time of enzyme addition in an experimental design 2³. The results were the process time, final lactose, lactose conversion, density, viscosity, sineresys and GOS concentration, comparing simultaneous enzymatic and fermentation processes with fermentation without the addition of enzymes. Results indicated a lactose conversion percentage between 97,7% and 99,7%, and a production of GOS in the condition of higher initial concentration of lactose in the substrate, lower enzyme concentration and more time of delayed in the addition of enzyme. The effects on texture parameters were negative, indicating the need for an increase of thickening agents and stabilizers in simultaneous bioprocesses when the increasing the enzyme concentration. It was also observed a positive impact on processing time when it was compared the simultaneous bioprocesses with the multiple stages processes in the elaboration of lactic fermented with low concentration of lactose.

Keywords: galactooligosaccharides, β -galactosidase, prebiotics, probiotics.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Premissas de Processo

Esse trabalho de pesquisa, desenvolvido junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), avaliou a conversão da lactose e a formação de galactooligosacarídeos (GOS) por ação de microrganismos probióticos e de β -galactosidases comerciais, em fermentações lácticas conduzidas simultaneamente com a catálise enzimática.

O apelo por produtos com características de qualidade que aportem ganhos fisiológicos aos consumidores, além das exigidas vantagens nutricionais, é a nova fronteira de expansão no mercado de alimentos processados. A crescente demanda por alimentos funcionais tem impulsionado o mercado de produtos lácteos no Brasil, em especial no que diz respeito a leites fermentados. A diversidade de bebidas lácteas e iogurtes, desde produtos adicionados de fibras ou elaborados a partir de culturas probióticas, têm aquecido o mercado desse segmento e impulsionado importantes esforços em pesquisa, desenvolvimento e *marketing*, em especial junto às principais empresas desse segmento em nosso país. A variedade e as alternativas de iogurtes, leites fermentados e bebidas lácteas com características prebióticas e probióticas, presentes nas gôndolas refrigeradas das redes de varejo no Brasil, indica o potencial de crescimento desse mercado.

As pesquisas em processos para conversão da lactose usando tecnologia enzimática sempre tiveram como objetivo o desenvolvimento de produtos com baixo teor desse dissacarídeo, seja para consumo de indivíduos intolerantes a lactose ou para evitar características tecnológicas indesejáveis, como a cristalização desse carboidrato (JURADO et al., 2002).

A intolerância a lactose atinge cerca de 70% da população adulta da América Latina, com um impacto expressivo nas comunidades afro-descendentes e ameríndias, onde esses patamares podem ser superiores a 90% (PEREIRA FILHO e FURLAN, 2004; SCHAAFSMA, 2008; SWALLOW, 2003).

As enzimas comerciais disponíveis no mercado têm, em geral, seu intervalo de ação próximo ao pH neutro (7,0 – 6,5), sendo obtidas de leveduras do gênero *Kluyveromyces*, ou atuam no pH ácido (5,5 – 4,5), sendo obtidas de bolores do gênero *Aspergillus*. Sua aplicação na redução da concentração de lactose em derivados lácteos é amplamente conhecida (ABU-REESH, 2000; JURADO et al., 2004).

A adição de β -galactosidase na fabricação de fermentados lácteos ocorre, usualmente, em diferentes estágios. No processo convencional, em primeiro lugar ocorre a catálise enzimática em um substrato mantido em pH entre 6,5 e 6,8. O ideal seria manter a temperatura entre 37 e 40°C, o que levaria a um tempo de contato de 2 a 3 h. Na prática, no processo convencional ocorre a manutenção do substrato lácteo em uma temperatura entre 4 e 6°C, com vistas a minimizar riscos microbiológicos. Tal temperatura eleva o tempo de contato para, ao menos, 30 h. Nesse processo convencional, o substrato com reduzido teor de lactose vai, então, para a segunda etapa do processamento, onde ocorre a aplicação da cultura láctica para início da fermentação. A elaboração de um fermentado com reduzido teor de lactose a partir desse processo se dá, então, em processamento em dois estágios (Figura 1): a catálise enzimática e, após, a fermentação (ROSALES, 2005).

Uma alternativa para reduzir o elevado tempo de contato da etapa enzimática nesse processo é usar sistemas que concentrem a lactose, em geral a partir de filtração em membranas. A concentração do substrato propicia uma maior agilidade na comparação com o processo tradicional, no entanto o investimento em imobilizado é uma importante restrição. Na prática sistemas que operam por concentração prévia do

substrato acontecem em três estágios: concentração; biocatálise e fermentação (VALIO, 2009).

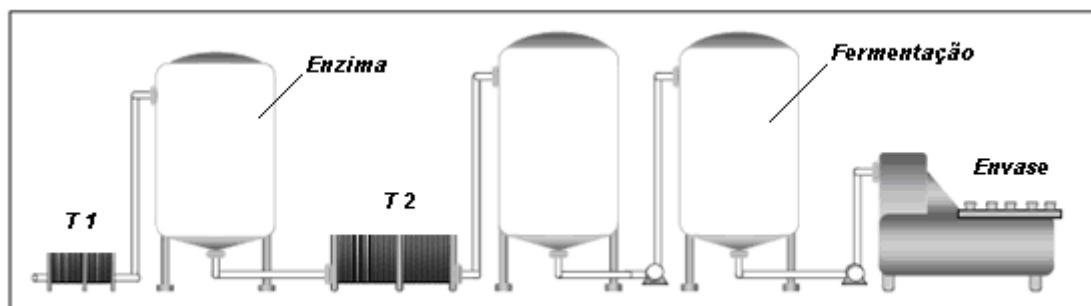


Figura 1 – Processo convencional de conversão da lactose em fermentados lácteos (T_1 = tratamento prévio do substrato; T_2 = tratamento final do substrato)

O principal resultado que se busca em um processo simultâneo, onde biocatálise e fermentação se associam, é superar os inconvenientes do processo em dois ou mais estágios. A Tabela 1 sumariza a diferença entre os processos usuais e o processo sugerido nesse trabalho.

Tabela 1 – Processos para obtenção de fermentado lácteo com baixo teor de lactose

Processo	Estágios	Equipamento Extra	Tempo de Processo
Convencional	2	Nenhum	Catálise (30 h) + Fermentação
Substrato concentrado	3	Concentrador	Catálise (3 h) + Fermentação
Simultâneo	1	Nenhum	Fermentação

Longo (2006) encontrou um acréscimo de aproximadamente 15% no tempo de fermentação, comparando substratos com idêntica composição, sendo um com lactose reduzida em um estágio enzimático prévio e o outro sem redução de lactose. Tal resultado indica que a conversão de lactose prévia à fermentação contribui para o

incremento no tempo do processo fermentativo, sendo outra importante restrição do processo em múltiplos estágios.

Os oligossacarídeos, segundo Fooks e Gibson (2002), estão entre as fibras que proporcionam efeito positivo na composição da microbiota intestinal quando consumidos associados a microrganismos probióticos, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacteria* spp.

Para Roberfroid (2007), somente os frutooligossacarídeos (FOS) e os galactooligossacarídeos (GOS), dentre os oligossacarídeos, possuem características comprovadamente prebióticas.

A opção por desenvolver um processo para elaboração de fermentado lácteo com reduzido teor de lactose e com eventuais características simbióticas, que permita avaliar o consórcio existente entre prebióticos – no presente caso, os GOS – e as culturas probióticas, está associada a essa nova realidade no mercado de alimentos, vinculada a obtenção de biomoléculas de interesse nutracêutico.

1.2 – Objetivos

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo geral avaliar a conversão da lactose e a formação de GOS a partir da interação entre uma mistura comercial de enzimas β -galactosidases e as bifidobactérias e lactobacilos usados na fermentação láctica, como componentes de culturas probióticas comerciais, em processos fermentativos conduzidos simultaneamente a catálise enzimática. Destacam-se, ainda, os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar o grau de conversão da lactose em processos enzimáticos e fermentações simultâneas, estabelecendo parâmetros ótimos para a

quantidade inicial de lactose, para a concentração de enzima comercial adicionada e para o tempo de adição da enzima, avaliados a partir de planejamento experimental específico e sob premissas que possam ser reproduzidas em um processo em escala industrial sem necessidade de investimentos em imobilizado.

2. Avaliar o impacto no tempo de processamento comparando os processos atuais de elaboração de fermentados com reduzido teor de lactose, realizados em múltiplos estágios, com os bioprocessos simultâneos e com a fermentação sem enzima.
3. Avaliar se o fermentado assim obtido atende as legislações para produto de baixa lactose e rico em fibras, estabelecendo eventual processo que permita atingir as referidas premissas legais.
4. Avaliar o efeito da concentração de lactose inicial, da concentração de enzima e do tempo de aplicação da enzima sobre a textura dos fermentados lácteos, em especial sua influência sobre a viscosidade e sinérese do produto.
5. Avaliar o efeito da concentração de lactose inicial, da concentração de enzima e do tempo de aplicação da enzima sobre a densidade dos fermentados lácteos nos bioprocessos simultâneos, em comparação com as fermentações sem adição de β -galactosidase.

CAPÍTULO II
REVISÃO

2 – REVISÃO

2.1 – Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são definidos estritamente como sendo carboidratos que contém entre 02 e 10 monossacarídeos, covalentemente ligados através de ligações glicosídicas (MEHRA e KELLY, 2006).

Os oligossacarídeos não-digeríveis (NDO) ocorrem naturalmente em muitos alimentos e em tecidos vegetais, bem como são sintetizados no metabolismo de animais e microrganismos. As propriedades biológicas e físico-químicas de seus componentes têm sido relatadas como equivalentes às fibras dietéticas, associando sua ação fisiológica com importantes aspectos da saúde humana (TUNGLAND e MEYER, 2002). Os oligossacarídeos podem ser obtidos por extração de tecidos vegetais, por fermentação microbiana, por catálise enzimática ou por reação química (MUSSATO e MANCILHA, 2007).

Dentre os oligossacarídeos destaca-se a inulina cujo uso em alimentos e os efeitos fisiológicos associados aos seres humanos têm sido estudados nas últimas décadas. A inulina é reserva de carboidrato em muitas plantas dicotiledôneas. Atualmente é produzida via extração em raízes de chicória e de outros vegetais (RUPÉREZ, 1998).

A oligofrutose é um oligossacarídeo importante na indústria de alimentos funcionais, sendo formado por 2 a 4 unidades de frutose ligadas a um resíduo terminal de glicose (PASSOS e PARK, 2003). O termo frutooligossacarídeos (FOS) descreve moléculas formadas por adição enzimática de frutose à sacarose pela enzima β -frutosidase. São formados compostos como 1-kestose, nistose e frutofuranosil nistose,

entre outros, em que as unidades de frutose estão adicionadas à sacarose por ligação glicosídica tipo β -2,1 (TUNGLAND e MEYER, 2002).

Os galactooligossacarídeos (GOS) são formados pela transgalactosilação da galactose por ação da enzima β -galactosidase, a partir de substratos ricos em lactose (MAHONEY, 1998). A rafinose (α -galactooligossacarídeo) é obtida de extração vegetal, em especial da soja. Os xilooligossacarídeos são obtidos a partir de hidrólise parcial de polixilanos realizada pela β -xilânase. Os glicooligossacarídeos são obtidos por transglicosilação da glicose via α -glicosidase (TUNGLAND e MEYER, 2002).

2.2 – Oligossacarídeos no leite

Entre os oligossacarídeos presentes no leite destacam-se os que estão contidos no leite humano, chamados de HMO's (oligossacarídeos do leite humano). Desde os anos 50 do século passado os HMO's têm sido estudados como fatores de promoção e crescimento da flora *Bifidus* em crianças. Estudos recentes associam os oligossacarídeos do leite humano à redução da adesão de leucócitos em paredes endoteliais, o que indicaria um efeito imuno regulador desses carboidratos (KUNZ e RUDLOFF, 2006). Esse efeito ocorre devido às semelhanças estruturais dos oligossacarídeos do leite humano com as glicoproteínas que formam a parede celular da mucosa (BENGMARK e ORTIZ DE URBINA, 2005).

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.

Os três principais oligossacarídeos do leite humano são: o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose (chamado de 3'-galactosil

lactose); o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose (cujo nome usual é 4'-galactosil lactose) e o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose (chamado de 6'-galactosil lactose), cujas estruturas são diferenciadas pelo tipo de ligação glicosídica, respectivamente β -1,3, β -1,4 e β -1,6.

O efeito de barreira que os oligossacarídeos propiciariam junto à superfície da mucosa do intestino humano, contribuindo para minimizar a invasão e colonização de microrganismos indesejáveis a esse órgão vital, é citado como sua principal ação benéfica para a saúde humana (FOOKS e GIBSON, 2002).

Estudos feitos especificamente com oligossacarídeos do leite humano mostraram um efeito sistêmico de interação entre leucócitos e parede endotelial, o que indica que esses carboidratos contribuem para a redução de doenças inflamatórias em crianças que se alimentam do leite materno (KUNZ e RUDLOFF, 2006).

Um importante estudo indicou que oligossacarídeos associados a medicamentos "anti-adesivos" foram usados de forma experimental em coelhos e ratos para reduzir os efeitos da ação de *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* na mucosa do trato respiratório (RIVERO-URGELL e SANTAMARIA ORLEANS, 2001).

Em um estudo recente, numa avaliação randomizada e duplo-cego controlado com placebo foi verificado que a aplicação de oligossacarídeos não reduziu a incidência de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* em 500 crianças saudáveis, indicando ser necessário avançar nos estudos sobre o efeito anti-adesivo dos oligossacarídeos no trato respiratório humano (KUNZ e RUDLOFF, 2006).

A Tabela 2 apresenta a relação entre a quantidade de lactose e de oligossacarídeos em leites de diferentes origens.

Tabela 2 – Quantidade de Lactose e Oligossacarídeos em leites de diferentes origens

Origem	Lactose (g/L)	Oligossacarídeos (g/L)
Caprino	45	0,25 – 0,30
Bovino	48	0,03 – 0,06
Ovino	48	0,02 – 0,04
Humano	68	5 – 8

Fonte: MARTÍNEZ-FEREZ et al., 2006

2.3 – Intolerância a lactose

A lactose é hidrolisada em seus monômeros galactose e glicose no organismo humano por uma enzima chamada lactase. A lactase é uma enzima diretamente acoplada a mucosa intestinal humana e é também denominada lactase-floriza hidrolase (E.C.3.2.1.108). Trata-se de uma molécula complexa que têm a habilidade de catalisar tanto as reações efetuadas pela E.C.3.2.1.23 (β -galactosidase) quanto às reações efetuadas pela E.C.3.2.1.62 (glicosilceramidase) (SWALLOW, 2003).

A lactase está ancorada na membrana intestinal por sua extremidade C-terminal, com a maior parte da molécula projetada para o lúmen do tubo digestivo humano. É uma grande glicoproteína com dois sítios ativos que podem catalisar a hidrólise de uma variedade de β -glicosídeos, incluindo florizina, glicosídeos flavonóides e β -galactosídeos, além da própria lactose (SWALLOW, 2003).

A atividade de lactase é maior e vital durante a primeira fase da infância dos mamíferos, quando o leite é a principal fonte nutricional do indivíduo. No homem, como em muitos mamíferos, a atividade de lactase reduz após a fase inicial da vida. Porém, em alguns grupos populacionais humanos que possuem o hábito alimentar continuado de consumo do leite, surge o que se denomina de “lactase persistente”. Pessoas que possuem essa capacidade podem usualmente digerir alto conteúdo de lactose, ao contrário dos indivíduos que são denominados intolerantes à lactose. As

características que envolvem o declínio da atividade da lactase nos humanos são estritamente genéticas (SWALLOW, 2003). A intolerância a lactose é pouco comum em crianças de origem caucasiana (brancos originários da Europa), ocorrendo em maior frequência em crianças de outras origens, como africanos, asiáticos, aborígenes da Oceania e ameríndios (ROBERFROID e DELZENNE, 1998).

A Figura 2 representa a fixação da lactase ao trato gastrointestinal humano e mostra a extremidade da molécula projetada à parte interna do trato gastrointestinal (TGI).

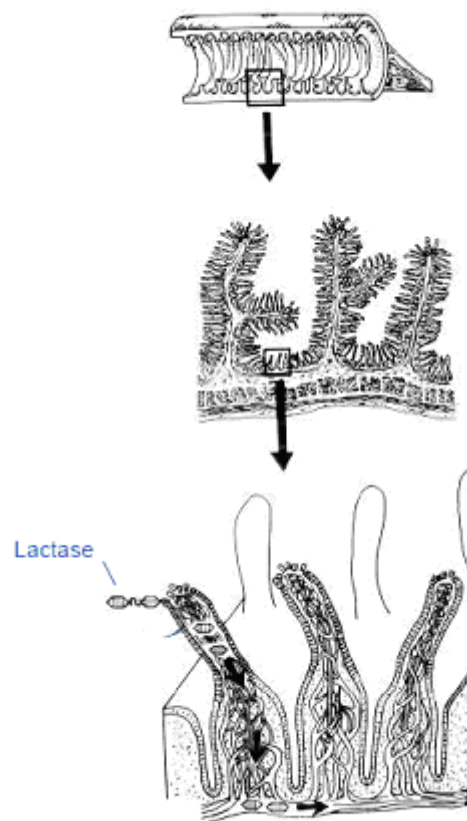


Figura 2 – Representação esquemática da fixação da lactase no TGI

A Tabela 3 sumariza alguns valores médios de incidência de intolerância a lactose.

Tabela 3 – Incidência média de intolerância a lactose na população adulta

País / Grupo populacional	(%)
França	30 – 40
Alemanha	15 – 20
Rússia	20 – 30
Finlândia	15 – 20
Suécia	< 5
Grécia	70 – 80
Etiópia	80 – 90
Nigéria	80 – 90
Nômades Fulani	< 10
Sudão	60 – 65
China	90 – 100
Japão	95 – 100
Índia	60 – 65
Jordânia	20 – 25
Israel	70 – 80
Israelitas Jemenitas	40 – 50
EUA (brancos)	10 – 15
EUA (negros)	65 – 70
EUA (índios)	85 – 90
México	50 – 60
Uruguai	60 – 65
Povos Originários da América (ameríndios)	90 – 100
Esquimós da Groelândia	85 – 90
Aborígenes da Austrália	80 – 85

Fonte: SCHAAFSMA, 2008

Na população adulta humana os índices de intolerância a lactose são elevados, sendo estimados em 70% na América do Sul e África, podendo chegar a próximo de 100% em alguns países da Ásia, como na China e na Tailândia. Na Europa a intolerância a lactose é menor nos países escandinavos, em especial na Suécia e na

Dinamarca, crescendo nas direções sul e leste do continente. Entre os suecos é de cerca de 2%, chegando a 70% nos italianos da Sicília. Nos EUA a intolerância a lactose prevalece nas comunidades afro-descendentes em cerca de 80% e chega a 53% em descendentes de latinos com origem pré-hispânica. Nos norte-americanos descendentes de caucasianos a intolerância atinge apenas 15% da população, enquanto que nos ameríndios descendentes das comunidades originais da América do Norte a incidência atinge quase 100%.

Não existem dados oficiais sobre o percentual de brasileiros que sofrem desse problema, no entanto estima-se em mais de 58 milhões a população intolerante à lactose (CUNHA et al., 2007).

Pereira Filho e Furlan (2004) avaliaram a distribuição de indivíduos com intolerância à lactose na população de Joinville (SC), estudada a partir de distribuição de sexo e de faixa etária baseada no censo de 2000, a partir de um laboratório de referência do sistema de saúde do referido município. 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 2g de lactose por kg de massa corpórea ao dia, sem ultrapassar o limite máximo diário de 50g de ingestão desse carboidrato. Considerando o somatório entre indivíduos intolerantes e limítrofes, tem-se 62,4% de incidência desse problema em uma cidade com indicadores sócio-econômicos superiores a média do país.

2.4 – Galactooligossacarídeos (GOS)

Os GOS são produzidos a partir da lactose por atividade de transgalactosilação da enzima β -galactosidase. A enzima β -D-galactosidase galactohidrolase (E.C.3.2.1.23), designada usualmente como β -galactosidase, é igualmente

responsável pela reação de hidrólise da lactose, formando galactose e glicose. A β -galactosidase possui afinidade similar tanto para hidrolisar a lactose quanto para trangular a galactose (JURADO et al., 2002).

A formação de GOS ocorre a partir de um substrato rico em lactose, notadamente o leite, o soro de leite ou uma mistura entre ambos. O acréscimo de soro de leite a uma base láctea que serve de substrato à ação da β -galactosidase implica no aumento da disponibilidade de lactose no meio, no incremento de proteína e na redução da atividade de água. A taxa de conversão da lactose aumenta com o incremento da concentração inicial do substrato, tendo em vista o efeito de redução da atividade de água na solução (PESELA et al., 2003).

A Figura 3 apresenta as duas rotas de conversão de lactose a partir da enzima β -galactosidase.

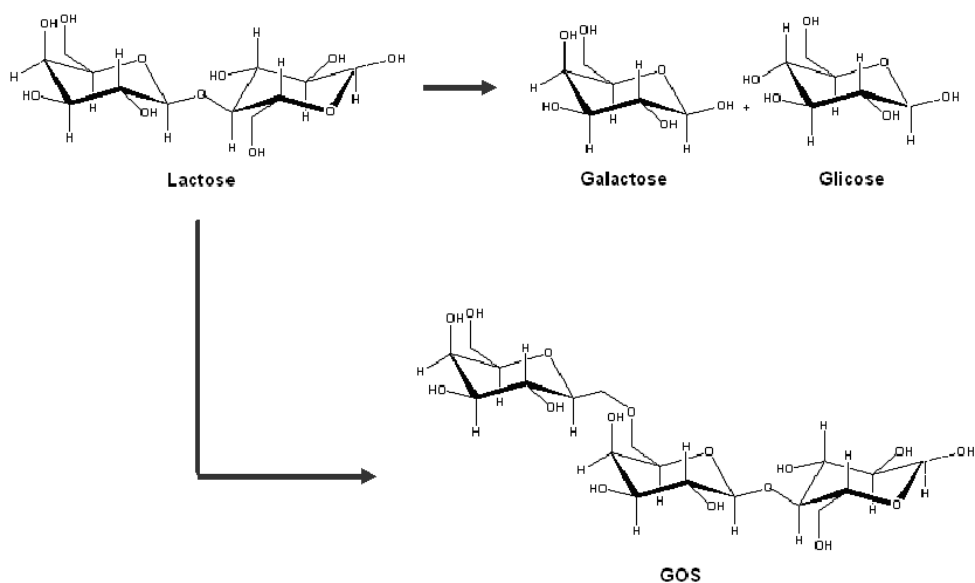


Figura 3 – Rotas enzimáticas de conversão da lactose por β -galactosidase

A lactose (4-o- β -D-galactopiranosil-D-glicose) possui duas formas em equilíbrio mutarrotacional, em decorrência do tipo de ligação glicosídica entre os seus

monômeros de galactose e glicose. A β -lactose possui ligação do tipo β -1,4 e a α -lactose possui ligação do tipo α -1,4. As vantagens de obter um derivado lácteo com reduzido teor de lactose, segundo Jurado et al. (2002), são:

- ✓ Obtenção de produtos aptos ao consumo para grupos populacionais intolerantes a lactose;
- ✓ Formação de substâncias que favorecem o crescimento de microflora intestinal desejáveis à saúde humana, precisamente os galactooligossacarídeos;
- ✓ 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 reológicas como a melhor textura e a maior cremosidade, em especial na redução do ponto de congelamento de sorvetes;
- ✓ Obtenção de melhores características sensoriais em derivados lácteos, tais como o incremento no poder dulçor, via ação dos monossacarídeos glicose e galactose;
- ✓ Formação de monossacarídeos que auxiliam no metabolismo do fermento em produtos fermentados, como iogurtes e bebidas lácteas;
- ✓ Redução da probabilidade de ocorrência da reação de Maillard, pois os galactooligossacarídeos obtidos não atuam como açúcares redutores;
- ✓ Maior biodegradabilidade dos efluentes da indústria láctea.

A ligação entre unidades de galactose, ou seja, a eficiência da transgalactosilação e os tipos de componentes gerados no produto final dependerão da enzima e das condições de reação (GU, 1999). A cinética da conversão da lactose

responde a um modelo de inibição competitiva. A partir do seu início de formação a galactose irá competir com a lactose pelos sítios ativos da enzima. A cinética da reação de transgalactosilação da galactose irá aumentar com a redução da lactose no meio (SANTOS et al., 1998).

A mistura de GOS seria formada desde dissacarídeos até hexassacarídeos. A baixa efetividade da β -galactosidase em produzir oligossacarídeos de maior peso molecular 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 o peso molecular do oligossacarídeo aceptor, o que explicaria a maior formação de di, tri e tetrassacarídeos em comparação com oligômeros maiores (MAHONEY, 1998).

Existem duas rotas industriais para obtenção de GOS, uma formando preferencialmente ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e a outra formando ligações β -1,6 (SAKO et al., 1999).

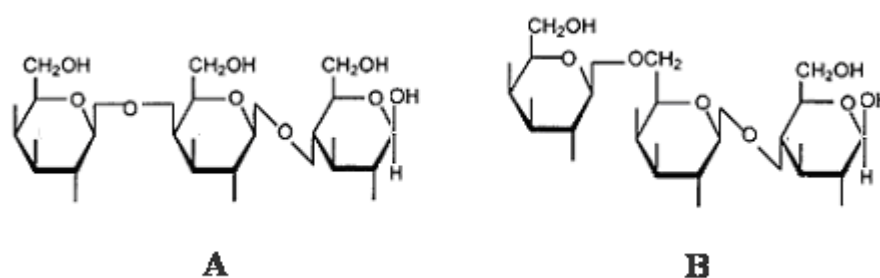


Figura 4 – Estrutura dos trissacarídeos 4'-GOS (A) e 6'-GOS (B)
(adaptado de GU, 1999)

Na hipótese das ligações serem do tipo β -1,4 o trissacarídeo formado é mostrado na Figura 4A, sendo chamado de β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose (ou 4'-GOS) e quando forem do tipo β -1,6

(Figura 4B) o trissacarídeo será o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose (ou 6'-GOS).

As ligações do tipo β -1,2 e β -1,3 também podem ocorrer, porém em menor incidência que as β -1,4 e β -1,6. Existem GOS formados apenas por unidades de galactose, como galactobiose, galactotriose e galactotetraose (MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al., 2008). Outros dissacarídeos, como a lactulose e a allolactose, também podem sofrer transgalactosilação (TUNGLAND e MEYER, 2002).

A lactulose (4- α - β -D-galactopiranosil-D-frutose) sofre transgalactosilação formando trissacarídeos diferentes daqueles obtidos da lactose. A Figura 5 mostra a lactulose, um açúcar não redutor que possui um poder dulçor que se assemelha ao da sacarose.

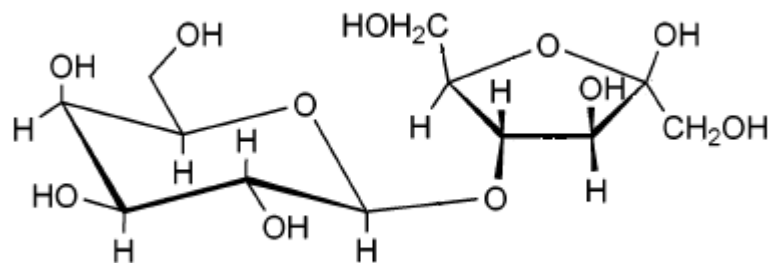


Figura 5 – Representação do dissacarídeo lactulose

A Figura 6 mostra os trissacarídeos obtidos por Martínez-Villaluenga et al. (2008) a partir da transgalactosilação da lactulose por β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. A forma A mostra o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-frutopiranosose, a forma B é o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-frutofuranose e a forma C é o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-frutofuranose.

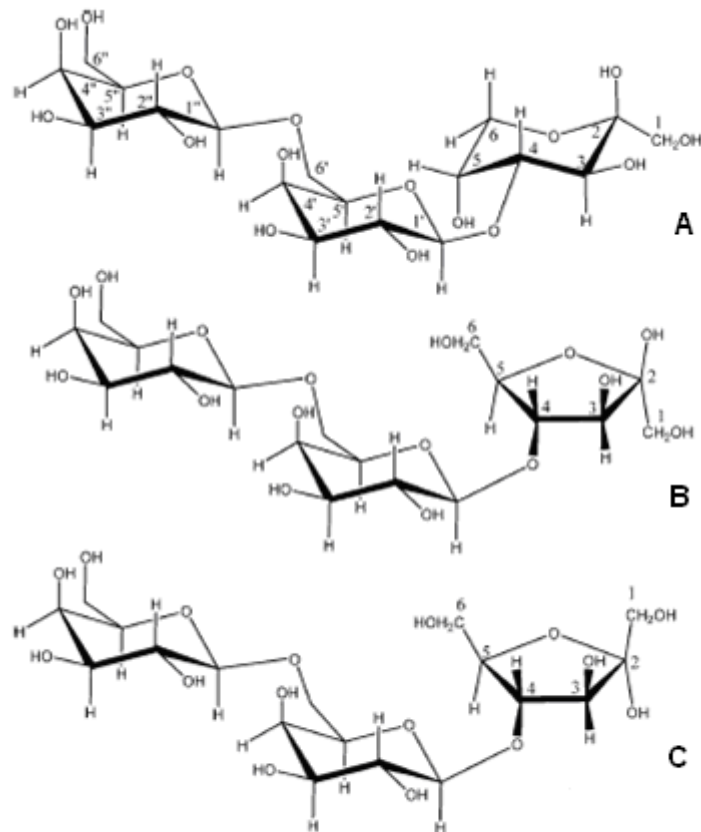


Figura 6 – Trissacarídeos transgalactosilados obtidos da lactulose
(MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al., 2008)

A Figura 7 mostra três diferentes trissacarídeos, onde aparecem ligações glicosídicas tipo β -1,1: a estrutura 7A é o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-frutopiranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranosil; a estrutura 7B mostra o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-frutofuranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranosil e a estrutura 7C mostra o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-frutofuranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranosil.

Essa variabilidade de moléculas e variações nas ligações glicosídicas explicaria a alta resistência dos GOS à digestão ácida (MACFARLENE et al., 2007).

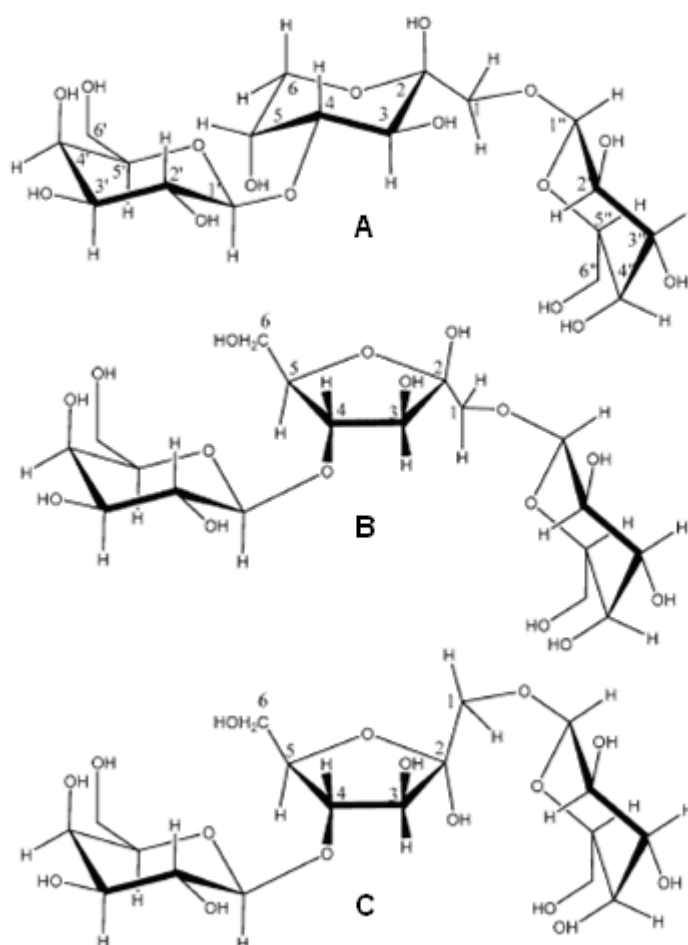


Figura 7 – Trissacarídeos com ligações tipo β -1,1 obtidos da lactulose (MARTINEZ-VILLALUENGA et al., 2008)

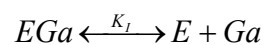
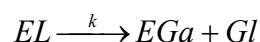
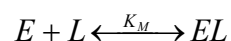
Preparados comerciais de galactooligosacarídeos são misturas de diferentes espécies de oligossacarídeos com aproximadamente 55% destes compostos em sua constituição, em torno de 20% de lactose e de 20% de glicose e uma pequena quantidade de galactose. Os GOS são muito estáveis a condições adversas de pH e temperatura. Resistem a 160°C por 10 minutos em pH neutro ou a 120°C por igual tempo em pH 3. Em pH 2 chegam a resistir até a 100°C por 10 minutos. Nesta condição a degradação da sacarose seria superior a 50% (SAKO et al., 1999).

Para Goulas et al. (2007), o incremento da concentração de glicose e galactose no meio reacional favoreceu a formação dos GOS a partir de enzima obtida de *Bifidobacterium bifidum*, desde o início da catálise até atingir-se um máximo, a partir

do qual ocorreu um decréscimo na atividade de transgalactosilação. O resultado obtido por esses autores, tendo permeado de soro de leite como substrato, demonstrou uma concentração final de lactose menor no substrato de maior concentração inicial, além da formação de oligossacarídeos em maior quantidade no substrato com maior quantidade inicial de lactose.

2.5 – Cinética da conversão da lactose em meio livre

O mecanismo de transgalactosilação da galactose bem como da hidrólise da lactose, por ação da enzima β -galactosidase, pode ser aplicado a diferentes substratos sendo o leite, o soro de leite e as soluções de lactose os mais citados na literatura. O modelo cinético que melhor representa esta reação em meio livre é o que a descreve a partir de uma equação de Michaelis-Menten de primeira ordem com inibição competitiva (SANTOS et al., 1998). Nesse caso, a taxa da reação de conversão do substrato é obtida a partir das seguintes relações (JURADO et al., 2002):



Onde E é a concentração de enzima livre presente no meio reacional, L , Ga e Gl são as concentrações de lactose, galactose e glicose, respectivamente. Ocorre a formação de dois complexos enzimáticos, onde EL representa a concentração do complexo enzima/lactose e EGa , a concentração do complexo enzima/galactose.

Com respeito às constantes cinéticas, K_M representa a constante de Michaelis-Menten, k a constante da reação de hidrólise da lactose e K_I a constante

de inibição competitiva de um dos produtos da hidrólise, justamente a galactose. Considerando negligenciáveis as concentrações de EL e EGa , pode-se definir a variação das concentrações de lactose, galactose e glicose a partir das seguintes expressões, onde o índice subscrito representa as concentrações iniciais de cada componente no meio reacional:

$$L = L_0(1 - x) \quad (\text{eq. 1})$$

$$Ga = Ga_0 + L_0x \quad (\text{eq. 2})$$

$$Gl = Gl_0 + L_0x \quad (\text{eq. 3})$$

A variação da concentração de lactose ao longo do tempo será, portanto, função da concentração de enzima ativa, C_E , e da variação do produto que compete com o sítio ativo da enzima, tem-se, então, por definição:

$$\frac{dL}{dt} = \frac{C_E \left(\frac{k}{K_M} \right) L}{1 + \frac{L}{K_M} + \frac{Ga}{K_I}} \quad (\text{eq. 4})$$

Substituindo L e Ga por suas respectivas expressões (eq. 1 e 2) encontra-se:

$$\frac{d[L_0(1-x)]}{dt} = -L_0 \frac{dx}{dt} = \frac{C_E k L_0 (1-x)}{K_M + L_0(1-x) + \frac{K_M}{K_I} (Ga_0 + L_0x)} \quad (\text{eq. 5})$$

Em uma reação onde não ocorra desativação da enzima pode-se considerar que a concentração ativa de β -galactosidase permanecerá constante ao longo da

catálise e será igual a sua concentração inicial, ou seja, $C_E = C_{E0}$. Nesse caso, tem-se (JURADO et al., 2002):

$$-L_0 \frac{dx}{dt} = \frac{C_{E0} k L_0 (1-x)}{K_M + L_0(1-x) + \frac{K_M}{K_I} (Ga_0 + L_0 x)} \quad (\text{eq. 6})$$

Separando as variáveis e integrando obtém-se:

$$\left(K_M + \frac{K_M (L_0 + Ga_0)}{K_I} \right) [-\ln(1-x)] + \left(1 - \frac{K_M}{K_I} \right) L_0 x = k C_{E0} t \quad (\text{eq. 7})$$

Simplificando a expressão anterior (eq. 7) e considerando o substrato na condição inicial, S_0 , como sendo a soma das concentrações iniciais de lactose e galactose, ou seja, $S_0 = L_0 + Ga_0$, tem-se:

$$K_M \left(1 + \frac{S_0}{K_I} \right) [-\ln(1-x)] + \left(1 - \frac{K_M}{K_I} \right) L_0 x = k C_{E0} t \quad (\text{eq. 8})$$

Essa expressão permite calcular o grau de conversão de um dado substrato em um tempo pré-definido, tendo uma concentração de enzima ativa conhecida e constante ao longo da reação e a partir de uma concentração inicial conhecida desse referido substrato, em um processo conduzido em meio livre.

A obtenção dos valores das constantes cinéticas pode ser realizada linearizando a expressão anterior ou através de regressão não-linear. Para o caso da enzima possuir a mesma afinidade tanto para hidrolisar a lactose quanto para

transgalactosilar a galactose as constantes cinéticas de Michaelis-Menten e de inibição terão os mesmos valores, ou seja, $K_M = K_I$. Nesse caso, a expressão anterior (eq. 8) poderia ser simplificada para (JURADO et al., 2002):

$$C_{E0}t = \frac{1}{k}(K_M + S_0)[- \ln(1 - x)] \quad (\text{eq. 9})$$

As constantes de equilíbrio K_M e k podem ser determinadas experimentalmente. A aplicação dessa relação em um processo industrial possibilita estimar a fração de conversão do substrato na temperatura ótima de reação, obtida em um tempo admissível e com a adição de uma quantidade de enzima que permita alcançar a viabilidade econômica do uso de β -galactosidase em escala de fabricação.

A temperatura e o pH ótimo para a ação da β -galactosidase têm dependência direta com a origem da enzima (BONN et al., 2000). O tempo de reação é inversamente proporcional à temperatura. Isso significa que, mantidos os valores de conversão e concentrações, quanto maior a temperatura menor será o tempo teórico de reação, respeitando-se o limite de estabilidade da enzima (SANTOS et al., 1998).

Os valores ótimos de pH e de temperatura para enzimas comerciais, usadas na forma livre ou imobilizada, aplicadas a sistemas modelo para hidrólise de lactose, foram estudados por Jurado et al. (2004), para enzimas comerciais obtidas de *Kluyveromyces fragilis* e de *Kluyveromyces lactis*. Estas enzimas são utilizadas, em geral, em pH entre 6,5 e 7,0 e temperatura entre 35 e 45°C.

A Figura 8 mostra representações de formas espaciais sugeridas para β -galactosidase de diferentes origens: obtida de um microrganismo extremofílico, a bactéria *Arthrobacter sp.* (8-A) e de um microrganismo mesofílico, a bactéria *Escherichia coli* (8-B).

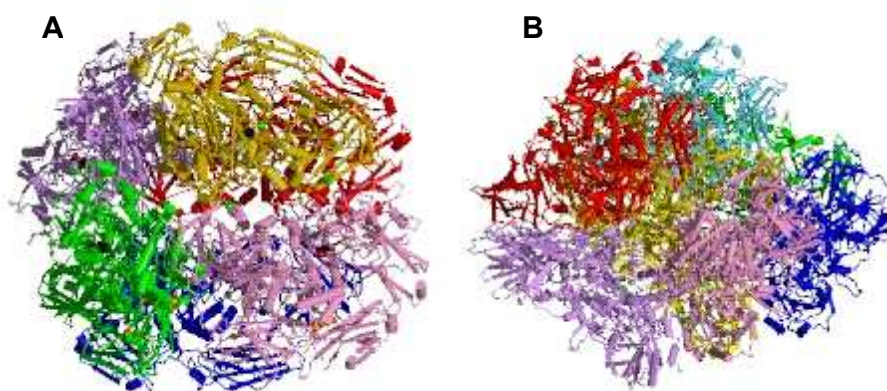


Figura 8 – Representações espaciais de β -galactosidase obtida de *Arthrobacter sp.* (A) (SKÁLOVÁ et al., 2005) e obtida de *E. coli* (B) (JACOBSON et al., 1994)

Quanto maior a temperatura ótima de ação da β -galactosidase maior será a velocidade inicial de reação da enzima. O potencial de uso industrial de uma β -galactosidase será tanto maior quanto maiores seus intervalos de temperatura e pH admissíveis (PARK et al., 2008). O efeito da temperatura na síntese de GOS a partir de β -galactosidase obtida de *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* e *Bacillus circulans*, foi estudado por Bonn et al. (2000). Foram observados diferentes comportamentos na reação dependendo da origem da enzima. No trabalho de Roy et al. (2002) foram formados GOS em um processo fermentativo a partir de *Bifidobacterium infantis*. O resultado obtido por esses autores indicou um processo ótimo de fermentação conduzido a 50°C por 6 h. A Figura 9 representa a β -galactosidase obtida de *E. coli* e mostra duas moléculas de lactose (representadas em branco) junto aos sítios ativos da estrutura tetramérica da enzima.

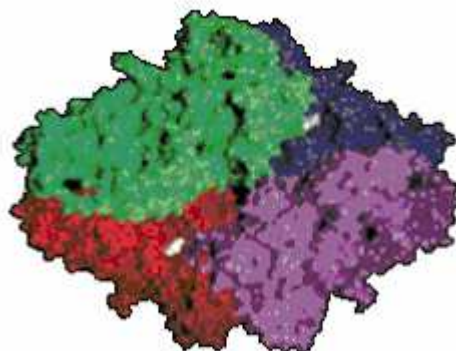


Figura 9 – Representação de duas moléculas de lactose (em branco) nos sítios ativos da estrutura tetramérica da β -galactosidase (adaptado de JUERS et al., 2001)

Outra enzima termoestável foi obtida por Park et al. (2008) a partir da *Sulfolobus solfataricus*, tendo atingido a máxima produção de galactooligosacarídeos em pH 6,0 na temperatura de 85°C. Segundo Hsu et al. (2007) foi obtido GOS em um processo fermentativo a partir da enzima produzida por *Bifidobacterium longum*. Os autores produziram β -galactosidase em uma fermentação e obtiveram atividade de transgalactosilação no sistema, indicando a possibilidade de ocorrer transgalactosilação e fermentação simultânea. No trabalho de Pessela et al. (2003) utilizou-se uma enzima produzida por *Thermus* sp., que atuou na temperatura de 70°C e em pH 5,5 tendo soro de leite como substrato. O tempo para a conversão de 90% da lactose foi de 50 minutos para um soro com aproximadamente 5% de concentração inicial desse carboidrato.

2.6 – Os efeitos prebióticos dos GOS

Nos últimos 20 anos a popularidade dos oligossacarídeos como ingredientes em alimentos vêm crescendo, em especial na Europa e no Japão (RUPÉREZ, 1998).

Como vantagens associadas aos alimentos formulados que contenham oligossacarídeos destacam-se o dulçor e a possibilidade de consumo por indivíduos

diabéticos (RIVERO-URGELL e SANTAMARIA-ORLEANS, 2001). Os oligossacarídeos possuem, ainda, um baixo teor calórico e não servem de substrato para o *Streptococcus mutans*, microrganismo responsável pelo aparecimento das cáries (SAAD, 2006). Os oligossacarídeos resistem ao processo digestivo no intestino delgado e são hidrolisados a pequenos oligômeros ou monômeros pelas bactérias anaeróbias do cólon, em especial as bifidobactérias.

A Figura 10 representa o cólon humano e apresenta as principais funções associadas a cada região.

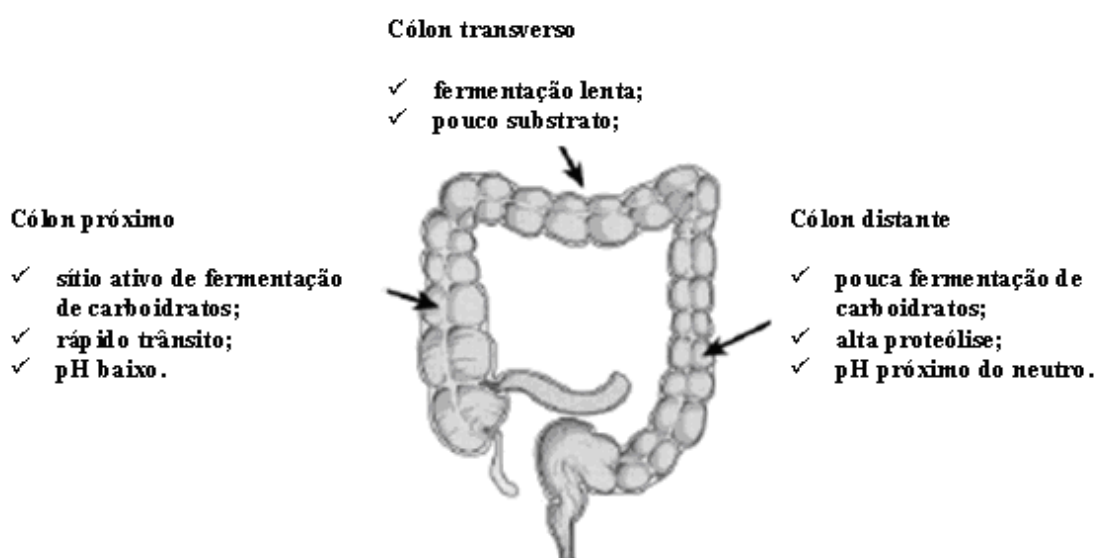


Figura 10 – Representação do cólon humano (RABIU e GIBSON, 2002)

Dentre os microrganismos do trato intestinal humano, os que mais se beneficiam com a presença de oligossacarídeos são as bifidobactérias e os lactobacilos. Muitos oligossacarídeos não são digeríveis pelo organismo humano porque esses não possuem as enzimas necessárias para romper as ligações do tipo β formadas pelas unidades de monossacarídeos. Outros oligossacarídeos são parcialmente hidrolisados no trato gastrintestinal e podem resultar na formação de

carboidratos essenciais para a saúde, os quais servem de substratos e reguladores para a maioria das rotas metabólicas (MACFARLENE et al., 2007).

No processo metabólico de fermentação, os oligossacarídeos servem de fonte de energia para proliferação destes microrganismos, os quais geram gases (H_2 , CO_2 , CH_4) e pequenos ácidos orgânicos, os SCFA (ácidos graxos de cadeia curta), tais como acetatos, butiratos, propionatos e lactatos. A taxa com que os oligossacarídeos são fermentados por esses microrganismos depende de fatores como o grau de polimerização, os tipos de monômero e quais as ligações glicosídicas entre eles, a sinergia entre os oligômeros e a bactéria durante a fermentação e a relação entre o substrato e os produtos formados. São citados os seguintes efeitos à saúde humana mediante ação dos oligossacarídeos (MUSSATO e MANCILHA, 2007):

- ✓ Modificação significativa na microflora colonizadora do cólon, pois os oligossacarídeos servem de substrato para o crescimento e proliferação de bactérias anaeróbicas, principalmente bifidobactérias e, por consequência, como inibidores ao crescimento de bactérias putrefativas e patogênicas.
- ✓ Estímulo à produção de nutrientes, como as vitaminas do complexo B (B_1 , B_2 , B_6 e B_{12}) e os ácidos fólico e nicotínico.
- ✓ Decréscimo no pH do cólon e, conseqüentemente, uma maior produção dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) e a inibição ao crescimento de algumas espécies de bactérias patogênicas.
- ✓ Incremento na excreção fecal de massa seca, como resultado do aumento do número de bactérias fermentativas.
- ✓ Aumento na umidade do bolo fecal através de pressão osmótica, ocasionando efeitos positivos na motilidade do cólon e na prevenção da constipação fecal, por ação dos produtos da fermentação, em especial os SCFA's, que são

eficientemente absorvidos pelas paredes epiteliais e estimulam a absorção de água e sais.

- ✓ Inibição da diarreia, em especial quando esta é associada com infecções intestinais, por efeitos de inibição à aderência das bactérias gram positivas e gram negativas.
- ✓ Efeito protetor contra infecções nos tratos gastrintestinal, respiratório e urogenital, por efeito da capacidade de inibir a adesão de bactérias às superfícies epiteliais.
- ✓ Aumento na capacidade de absorção de diferentes minerais, como o ouro, o cálcio e o magnésio, pois os oligossacarídeos possuem capacidade de quelar ou seqüestrar estas substâncias e, no caso específico do cálcio, contribuem para a redução do risco de osteoporose e aumento na densidade e na massa óssea.
- ✓ Efeito benéfico no metabolismo de carboidratos e lipídios, em especial a redução das concentrações de colesterol, triglicerídios e fosfolipídios no sangue, reduzindo os riscos de diabetes e obesidade.
- ✓ Redução do risco de câncer de cólon, em especial pela redução do pH e das concentrações de amônia, *p*-cresol e indol por ação das bifidobactérias e dos lactobacilos e conseqüente redução na população de *Bacteroidaceae*.

2.7 – Efeitos bifidogênicos e a sinergia entre GOS e probióticos

As associações entre FOS e bifidobactéria e entre GOS e bifidobactérias são as mais usuais com respeito a alimentos formulados simbióticos (COLLINS e GIBSON, 1999). O desenvolvimento de produtos simbióticos, os quais aliam características

prebióticas com culturas probióticas, segundo Sako et al. (1999), são associados a dois fatores:

- Os chamados fatores bifidogênicos são carboidratos que resistem ao metabolismo humano e chegam intactos até o cólon, sendo metabolizados preferencialmente pelas bifidobactérias.
- Os fatores de crescimento são fontes de nitrogênio ricas em aminoácidos e peptídeos, que estimulam o crescimento das culturas probióticas.

Os GOS são considerados fatores bifidogênicos porque servem de substrato para as bifidobactérias, estimulando seu metabolismo e crescimento na microbiota intestinal humana. Os efeitos bifidogênicos dos oligossacarídeos prebióticos permitem que esses carboidratos resistam à ação das enzimas do trato digestivo e possam ser fermentados pelas bifidobactérias. Para além dessas vantagens, agregam ao alimento uma leve sensação de dulçor e modificam propriedades físicas (SAKO et al., 1999).

Os efeitos bifidogênicos ocorrem no cólon, local onde os prebióticos são fermentados pelas bifidobactérias, tendo como consequência a redução da adesão de enteropatógenos à mucosa intestinal e beneficiando o sistema imune (SAAD, 2006).

O efeito anti-adesivo dos GOS com respeito a agentes patogênicos foi estudado por Shoaf et al. (2006), especificamente com a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Os autores utilizaram quatro tipos de frutooligossacarídeos comerciais, bem como GOS e rafinose, para comparar efeitos anti-adesivos na *E. coli* O127:H6.

A Figura 11 mostra a micrografia eletrônica obtida quando da avaliação de culturas celulares na ausência de GOS (A) e na presença de GOS (B). Na imagem pode-se observar a redução da aderência das células de *E. coli*.

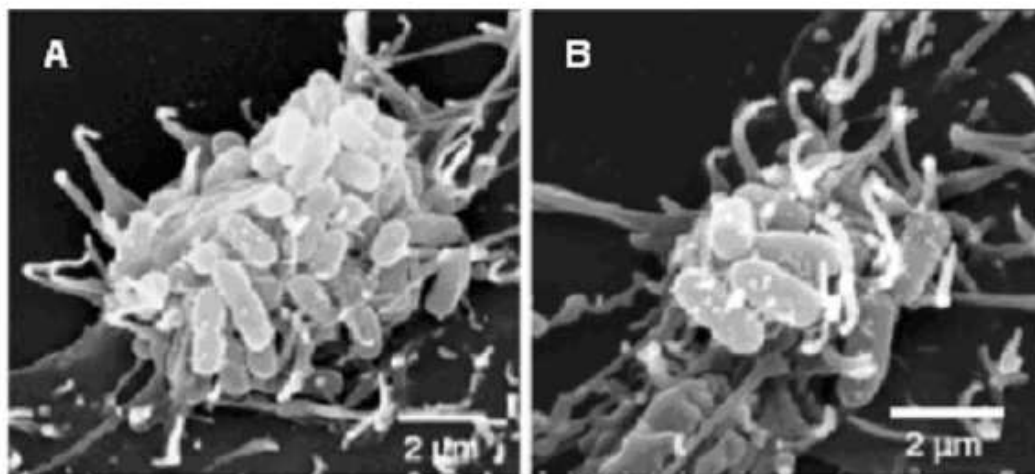


Figura 11 – Micrografia eletrônica mostrando: (A) a aderência de células na ausência de GOS e (B) o efeito anti-adesivo dos GOS (adaptado de SHOAF et al., 2006)

Os resultados observados demonstraram que o melhor desempenho entre os oligossacarídeos testados foi o do GOS, inibindo a aderência desse microrganismo em 48% quando comparado ao controle.

São crescentes as pesquisas por obtenção de produtos formulados que aproveitem a sinergia entre oligossacarídeos e microrganismos probióticos na alimentação e tratamento de pacientes críticos. A associação de fibras com culturas probióticas é utilizada na alimentação de pacientes em pós-operatório com vistas a minimizar riscos de infecção e melhorar o estado de saúde dos enfermos. Bengmark e Ortiz de Urbina (2005) apontaram cinco (5) importantes vantagens no uso de simbióticos em pacientes graves:

- ✓ Redução ou eliminação de microrganismos potencialmente patógenos.
- ✓ Redução ou eliminação de várias toxinas e de substâncias mutagênicas e carcinogênicas.
- ✓ Modulação de mecanismos da defesa imune, inatos e adaptativos.

- ✓ Promoção de apoptose (morte programada de vários tipos de células e que pode agir na regressão de tumores).
- ✓ Liberação de numerosos nutrientes, de anti-oxidantes e de fatores de crescimento e de coagulação.

Para além das vantagens do uso de GOS associadas ao efeito sistêmico na redução no teor calórico do alimento, no menor risco de formação de cáries e na redução na intolerância à lactose, ocorrem, ainda, três importantes efeitos da sinergia entre GOS e probióticos, atuando no sentido de modular o sistema imune, de regular o trânsito intestinal e de estimular a assimilação de nutrientes (RIVERO-URGELL et al., 2005).

A comunidade europeia define protocolos de misturas entre GOS e FOS para uso em alimentos infantis formulados desde 2001, através do SCF (sigla em inglês para Comitê Científico de Alimentos, entidade assessora vinculada a União Europeia). No trabalho de Anthony et al. (2006) foram avaliados aspectos toxicológicos ou efeitos adversos no consumo de GOS em ratos, com vistas a estimar possíveis patamares admissíveis de uso desses oligossacarídeos em alimentos formulados para consumo infantil. O consumo de GOS na faixa de 2,5 a 5,0 g/kg de massa corporal ao dia, ao longo de 90 dias, não resultou em efeitos toxicológicos adversos.

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Matérias-Primas e Insumos

O substrato foi obtido a partir da base láctea cedida pela empresa Perdigão, desde sua unidade fabril de São Lourenço do Sul (RS), contendo leite em pó desnatado e soro de leite em pó, ambos da marca Elegê.

A Tabela 4 apresenta os valores de lactose, proteína e umidade das matérias-primas utilizadas. Os laudos completos são apresentados nos Apêndices 1 (leite em pó desnatado) e 2 (soro de leite em pó).

Tabela 4 – Valores de lactose, proteína e umidade das matérias-primas

Parâmetro (% m/m)	Leite em pó desnatado	Soro de leite em pó
Lactose	77,76	53,16
Proteína	11,75	34,33
Umidade	1,72	3,88

Fonte: Laudos do fabricante (apêndices 1 e 2)

O leite em pó desnatado foi utilizado em todos os experimentos reconstituído unicamente na proporção de 9% (m/v). O soro de leite em pó foi adicionado em diferentes proporções para se atingir os valores de lactose inicial expressos no planejamento experimental, quais sejam: 1,5%; 3,5% e 5,5% (m/v). O substrato sofreu prévio tratamento térmico a $90 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 ± 1 min, para desnaturar a proteína e minimizar riscos de contaminação microbológica.

Foi utilizada a enzima comercial Lactomax Flex (Figura 12-A), fornecida pela empresa Prozyn. Trata-se de uma formulação líquida composta por β -galactosidases obtidas de duas origens distintas: *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus niger*. O preparado enzimático foi adicionado diretamente ao substrato, sendo dosado em g de

preparado enzimático por L de substrato, conforme planejamento experimental. O fermento comercial utilizado foi o ABY-3 (Figura 12-B), fornecido pela empresa Chr Hansen. Essa cultura láctea liofilizada é fornecida em uma embalagem única onde estão presentes os seguintes microrganismos: *Lactobacillus delbruekii* subs. *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*. A cultura láctea foi fornecida em embalagem para fermentação de 250 L de substrato. Por indicação do fabricante, a quantidade de fermento da embalagem foi adicionada em 500 mL de leite desnatado UHT e acondicionado em frascos previamente esterilizados. O inóculo foi guardado em refrigeração (8°C) por 30 dias, sendo dosado 4 mL em cada batelada de 2 L de substrato.



(A)



(B)

Figura 12 – Enzima (A) e cultura láctica (B)

3.2 – Fluxo de Processo

Inicialmente o substrato sofreu prévio tratamento térmico para desnaturar a proteína e minimizar riscos de contaminação microbiológica. O tratamento térmico primário tem como objetivo básico a desnaturação da proteína, incrementando suas propriedades de formação do gel e reduzindo o risco de sinérese após fermentação.

Segundo Afonso e Maia (1999), este tratamento térmico propicia as principais mudanças na manufatura de iogurtes, porque desnatura as proteínas do soro e induz interações entre a κ -caseína, a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina, incrementando as propriedades hidrofílicas do coágulo e contribuindo para a estabilização do gel do iogurte. A Figura 13 apresenta a microscopia eletrônica de um substrato lácteo com 10 g/L de sólidos totais, comparando os efeitos do tratamento térmico prévio e mostrando o incremento na estrutura do gel propiciado pelo complexo caseína/proteínas do soro.

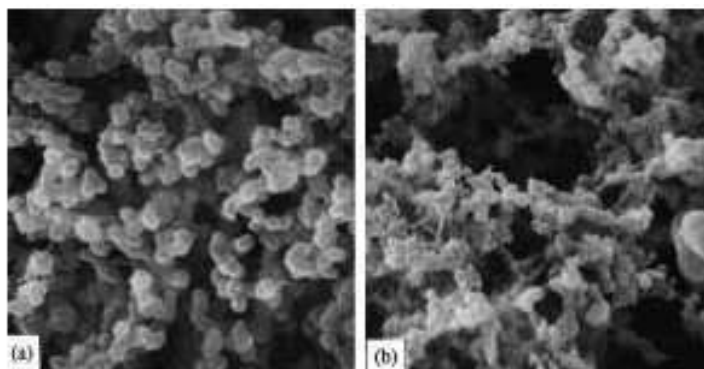


Figura 13 – Microscopia eletrônica com efeitos do tratamento térmico: (a) sem tratamento e (b) com tratamento a 90°C (TAMINE e ROBINSON, 2000)

A temperatura foi mantida em $43 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ao longo do tempo de processamento até atingir-se o pH 4,70 quando, então, o processo foi cortado via resfriamento rápido à $6 \pm 2^\circ\text{C}$. O planejamento experimental simplificado é apresentado na Tabela 5, sendo um fatorial 2^3 .

Tabela 5 – Níveis do planejamento experimental

Parâmetros	-1	0	+1
Lactose (g/L)	59	75	91
Enzima (g/L)	0,50	0,75	1,00
Tempo (min)	0	30	60

Os processos ocorreram em um fermentador de bancada Biostat B Braun (mostrado na Figura 14), com capacidade para 2 L.

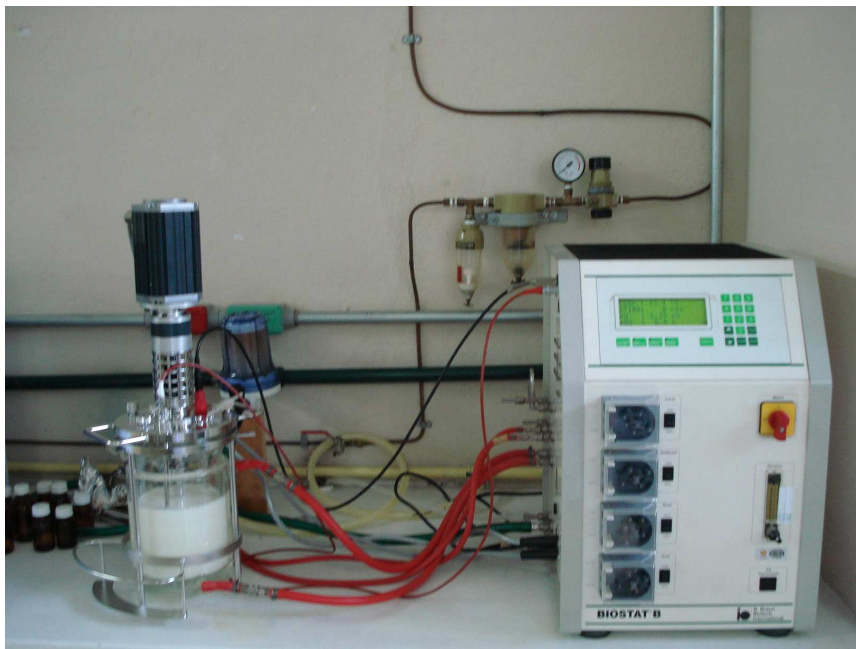


Figura 14 – Fermentador Biostat B Braun

No que diz respeito à lactose, o intervalo de variação levou em conta relato de Hsu et al. (2007) que identificaram uma maior produção de GOS em fermentações conduzidas por bifidobactérias quando o substrato tinha 9% desse dissacarídeo. Como o leite fluido desnatado possui aproximadamente 48 g/L de lactose, buscou-se estabelecer um intervalo acima desse patamar e que fosse reprodutível em um processo de elaboração de iogurte líquido em escala industrial.

O intervalo de variação do preparado enzimático foi o sugerido pelo fabricante, tendo em vista não existirem estudos anteriores com essa enzima.

O parâmetro tempo diz respeito ao intervalo observado entre a adição da cultura láctea e a adição da enzima. O limite inferior, cujo valor do parâmetro tempo é igual a zero, indica a adição simultânea do fermento e do preparado enzimático. O

valor intermediário indica a adição da enzima 30 minutos após a adição do fermento e o limite superior indica que essa adição ocorreu 60 minutos após a adição do fermento. A idéia central da variação do tempo de adição da enzima foi avaliar se a fase de adaptação dos microrganismos ao meio, a fase *lag*, não deveria ocorrer sem a presença de enzima exógena, como forma de permitir que os microrganismos sintetizassem as enzimas necessárias para consumo daquele substrato específico.

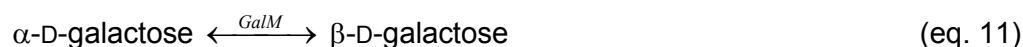
No total foram 11 fermentações da matriz fatorial e 3 fermentações controle (uma para cada concentração de lactose), perfazendo 14 experimentos.

3.3 – Respostas do Planejamento Experimental

3.3.1 – Lactose

As amostras foram previamente clarificadas utilizando-se solução de Carrez I (3,60g de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ em 100 mL de água destilada), solução de Carrez II (7,20g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ em 100 mL de água destilada) e solução de NaOH 100mM (vide apêndice 3).

O princípio de medição do kit K-Lacgar da empresa Megazyme, é uma modificação do método oficial AOAC nº 985:15, onde a lactose inicialmente é hidrolisada a D-galactose e D-glicose por β -galactosidase de *Aspergillus niger* em pH 5,0 (eq. 10). Na seqüência, ocorre uma interconversão da forma anomérica α para a β -D-galactose através da galactose mutarotase (eq. 11). A seguir a β -D-galactose é oxidada a ácido D-galactônico em presença de NAD^+ por ação da β -galactose desidrogenase, gerando NADH (eq. 12). A quantidade de NADH gerada é medida em espectrofotômetro a 340 nm e sua relação é estequiométrica com a quantidade de lactose na amostra.



3.3.2 – Sinérese

O parâmetro de sinérese (**S**) foi avaliado pelo método de centrifugação, conforme Amatayakul et al. (2006).

Uma amostra de 10 g do fermentado foi pesada em tubo de centrifuga de 50 mL e armazenada a 4°C por 2 h para estabilização. Na seqüência a amostra foi centrifugada a 4.000 * g por 10 min e o soro obtido foi separado e pesado.

A sinérese foi expressa como sendo o percentual da massa de soro em relação à massa total do gel da amostra.

3.3.3 – GOS

Na identificação e quantificação de galactooligossacarídeos (GOS) utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência com pulso amperométrico de detecção (HPLC-PAD), cujas análises ocorreram no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Unicamp.

A cromatografia foi realizada empregando uma coluna Carbopac PA1 (4 x 250mm) com uma pré-coluna PA1 (4 x 50 mm), na temperatura de 22 a 24°C, usando uma bomba gradiente GP-50, um detector eletroquímico ED40 e o software Peaknet, todos da Dionex. A eluição ocorreu utilizando-se NaOH 20 mM, a uma taxa de 1,0 mL/min.

3.3.4 – Viscosidade

O parâmetro de viscosidade (**V**) foi analisado na unidade Perdigão de São Lourenço do Sul, pelo método do viscosímetro de Brookfield, com spindle nº 62. As amostras são medidas na temperatura de 10°C e na rotação de 10 rpm. A leitura de viscosidade é diretamente em cP e é realizada transcorrido um tempo de 20 segundos de medição. A Figura 15 apresenta o equipamento.



Figura 15 – Viscosímetro Brookfield

3.3.5 – Densidade

O parâmetro densidade (**D**) foi analisado na Unidade Perdigão de São Lourenço do Sul, utilizando o densímetro digital portátil DMA 35-N mostrado na Figura 16. Esse equipamento analisa a densidade pelo método do “tubo em U”, onde a amostra líquida circula em um capilar em formato de U, medindo-se a vibração desse tubo, a qual é diretamente proporcional ao peso específico da amostra.

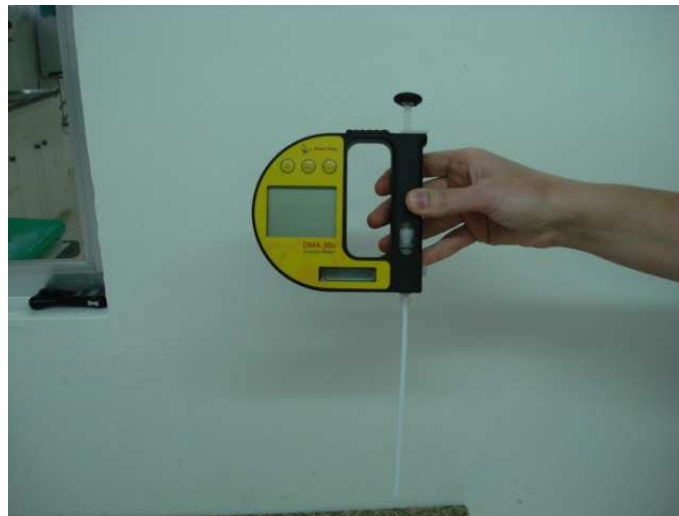


Figura 16 – Densímetro DMA 35-N

3.4 – Métodos de Análise das Respostas

3.4.1 – Método Paramétrico

Na análise de todas as respostas foi aplicado, inicialmente, o teste W de Shapiro-Wilk, a partir do software Statistica 5.0, para verificar se seguiam a normalidade. As respostas ditas normais – cujo p-valor foi igual ou superior a 0,05 – foram tratadas por método paramétrico de Análise de Variância (ANOVA), conforme Rodrigues e lemma (2005).

Nesse caso, os resultados foram avaliados estatisticamente tendo como matriz de entrada um fatorial tipo 2^3 , sem pontos axiais e com triplicata no ponto central. Para as respostas cujo comportamento foi significativo e preditivo em 95% de confiança, foram montadas as respectivas tabelas ANOVA e gerados as superfícies de resposta e curvas de contorno. As respostas paramétricas cujo comportamento não foi preditivo foram apresentadas como gráficos de efeitos principais e de interação no nível de confiança de 95%.

3.4.2 – Método Não-Paramétrico

As respostas não lineares, cujo p-valor foi inferior a 0,05 no teste de Shapiro-Wilk, foram tratadas a partir do método estatístico não-paramétrico de Redes Neurais Artificiais (RNA), conforme Galushkin (2007).

A rede neural artificial (RNA) é um processador com alto grau de paralelismo, que tem tendência de armazenar conhecimento experimental e usa conexões e pesos inspirados no funcionamento do neurônio humano (JANG et al., 2006).

Notadamente um neurônio artificial é representado a partir das conexões entre os valores de entrada (a_j) e os pesos de entrada (W_{ij}), mostrados na Figura 17. Essas relações geram a função de entrada (en_i), que normalmente é a soma ou o produto de valores e pesos de entrada. Quando a função de entrada atinge determinado limiar, aciona a função de ativação (g). A função de ativação é usualmente uma função não-linear, como uma sigmóide, uma tangente hiperbólica ou uma gaussiana (GALUSHKIN, 2007).

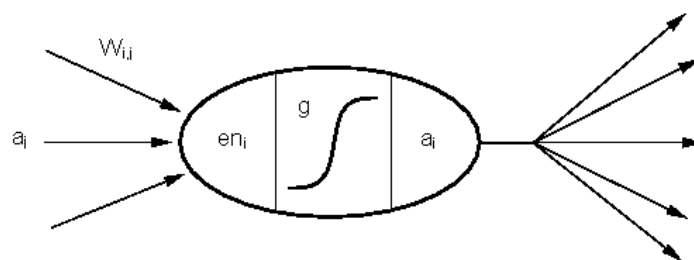


Figura 17 – Representação de um neurônio artificial

Onde en_i é a função de entrada que, normalmente, é o somatório ou produtório entre a_j e $W_{j,i}$, ou seja:

$$en_i = \sum_j a_j W_{j,i} \quad (\text{eq. 13}) \quad \text{ou} \quad en_i = \prod_j a_j W_{j,i} \quad (\text{eq. 14})$$

A função de ativação g será uma função não-linear. No caso da função de ativação ser uma sigmóide, ela pode ser do tipo:

$$\begin{aligned} \text{(eq. 15)} \quad g = sig(x) &= \frac{1}{1 + e^{-x}} \Rightarrow \\ sig(x) &= +1 \rightarrow x \geq 0 \\ sig(x) &= 0 \rightarrow x < 0 \end{aligned}$$

A matriz de conexões mostrada na Figura 17 será, portanto, interpretada como a matriz de pesos de um grafo, o grafo representativo da rede neural. Quando a resposta dos pesos dos links de entrada (função de entrada) atinge um limiar, o neurônio é disparado, ativando a saída (função de ativação).

As redes neurais são sistemas complexos com neurônios artificiais interconectados por rótulos numéricos. Esses rótulos que conectam os diferentes neurônios usualmente são interpretados como os valores nebulosos (*fuzzy*) entre as conexões. Nesse caso eles devem pertencer a um conjunto que, na maioria dos casos, é o conjunto $[0,1]$, muito embora outros intervalos também possam ser considerados (GALUSHKIN, 2007).

As redes progressivas possuem mais de um nível, sendo um de entrada, no mínimo um intermediário (dito escondido) e um de saída. As camadas escondidas geralmente utilizam funções de ativação derivadas da sigmóide ou da gaussiana para que a rede neural busque a solução das relações não-lineares do problema (JANG et al., 2006).

As redes diretas utilizam um algoritmo de retropropagação do erro (*backpropagation*) na solução de redes neurais com camadas escondidas. O algoritmo

busca uma solução ótima dos parâmetros livres, na direção mais acentuada do gradiente negativo da curva do erro. Essas redes são capazes de aproximar qualquer função não-linear, com maior ou menor precisão, dependendo do número de neurônios da rede (GALUSHKIN, 2007).

O software Statistica 5.0 foi utilizado para tratamento das respostas não-paramétricas usando RNA. Foram testadas as seguintes topologias de redes neurais artificiais: GRNN (*General Regression Neural Networks*); RBF (*Radial Basis Function*); MLP (*Multi Layer Perceptron*).

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÕES

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Ensaio Preliminares

Foram realizados estudos preliminares para avaliar o comportamento dos processos sem a enzima e com a sua adição em diferentes intervalos de tempo em relação ao início da fermentação, como forma de definir a variação do parâmetro tempo expresso na Tabela 5. As concentrações de lactose inicial e de enzima foram estabelecidas no nível (+1) em todos os ensaios. Os resultados são mostrados na Figura 18.

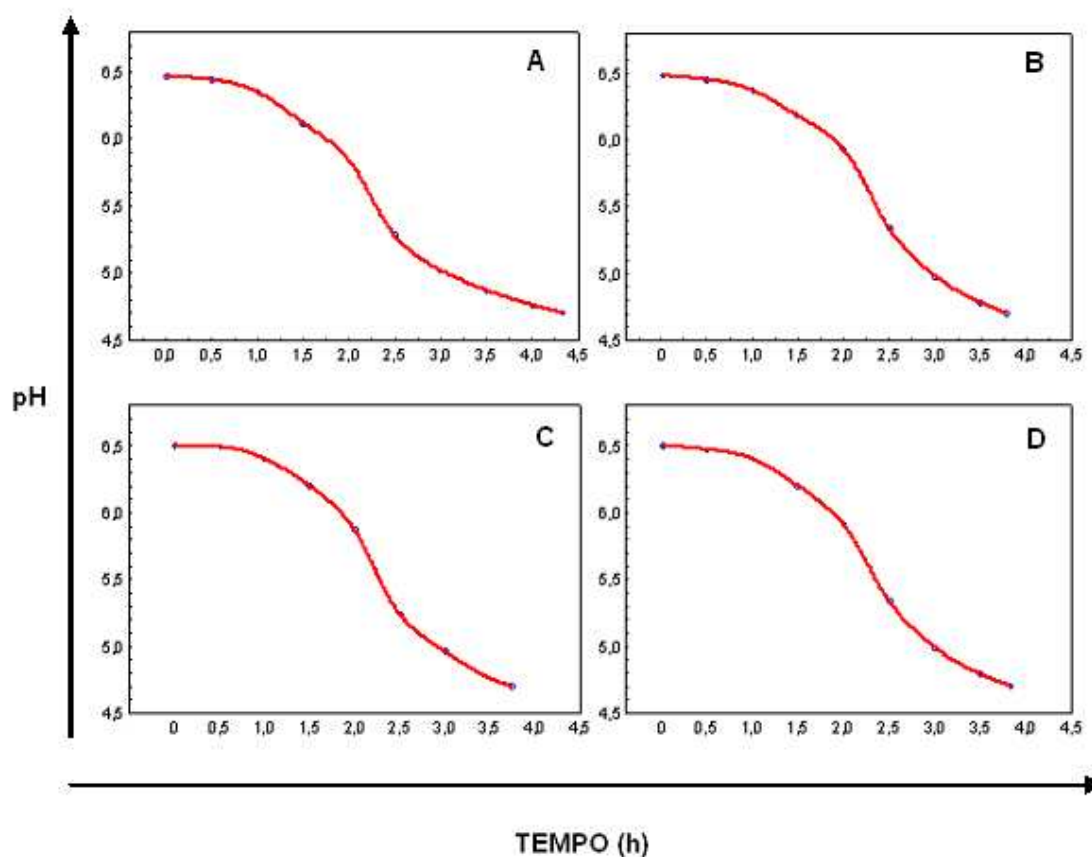


Figura 18 – Respostas dos ensaios preliminares para variação de pH no tempo para: (A) fermentação sem enzima; (B) adição da enzima junto com o fermento; (C) adição da enzima 1 h após o fermento; (D) adição da enzima 2 h após o fermento.

O comportamento dos ensaios preliminares indicou que o pH do processo encontrava-se abaixo de 6, quando da adição da enzima 2 h após o início da fermentação, podendo indicar riscos à viscosidade e sinérese do fermentado láctico. Por ser a fermentação láctica um processo estritamente anaeróbio não é usual a adição de quaisquer ingredientes após seu início, tendo em vista a possibilidade de causar prejuízos à formação e estabilidade do coágulo. Segundo Tamine e Robinson (2000), o coágulo é formado pela precipitação da proteína láctea ao atingir-se o seu ponto isoelétrico (PI) e, como o substrato possui diferentes proteínas, tipicamente esse início de precipitação acontece a partir do pH 5,35. A defasagem na adição da enzima em relação ao início da fermentação deve ser realizada, portanto, antes do início de formação do coágulo como forma de evitar prejuízos à textura do fermentado láctico.

Como os tempos de processo foram próximos, optou-se por fixar o intervalo de variação do tempo de adição da enzima no nível (-1) em zero e no nível (+1) em 60 min. Por outro lado, Hsu et al. (2007) encontraram a melhor produção de GOS em um processo com até 2 h de fermentação por bifidobactéria e, após, houve redução da quantidade de GOS que poderia indicar uma ação hidrolítica da β -galactosidase sobre os galactooligossacarídeos. A idéia de defasar a adição da enzima com respeito ao início da fermentação teve o objetivo de avaliar esse eventual comportamento hidrolítico da enzima sobre a formação de GOS.

4.2 – Respostas do Planejamento Experimental

4.2.1 – Ensaios Controle

A Tabela 6 apresenta os resultados para os ensaios controle (fermentações sem a adição de enzima).

Tabela 6 – Respostas dos ensaios controle (sem adição de enzima)

Ensaio	L₀ (g/L)	T_P (h)	V (cP)	S (% m/m)	D (g/cm³)	L_F (g/L)	C_L (%)
B1	59	4,45	2013	80,49	1033,0	47,3	19,8
B2	75	4,38	2104	78,41	1036,3	63,6	15,2
B3	91	4,55	2451	76,30	1039,9	78,4	13,8

L₀ → lactose inicial; T_P → tempo de processo; V → viscosidade; S → sinérese;

D → densidade; L_F → lactose final; C_L → conversão da lactose.

Os valores obtidos nos ensaios controle são típicos de um fermentado láctico com as concentrações de lactose e de proteína presentes na base láctea utilizada. O tempo de processo é o esperado para um iogurte produzido na temperatura de 43°C, entre 4,5 e 5 h de fermentação. Os valores de viscosidade aumentaram com o incremento da proteína, propiciada pela adição de soro de leite, e a separação de fases foi tão maior quanto maior o acréscimo de soro no substrato. Segundo Afonso e Maia (1999) esse é o comportamento esperado quando do acréscimo de soro de leite ao substrato lácteo. Os valores de densidade cresceram com o incremento da lactose inicial e a conversão da lactose ficou dentro da faixa típica de um iogurte que, segundo Longo (2006), varia entre 15 e 30%, dependendo da composição do substrato. Quanto maior a concentração inicial de lactose no substrato, menor o percentual de conversão desse carboidrato ao final do processo. Nesse caso a redução da lactose seguiu o comportamento esperado e ficou entre 13,8 e 19,8%, tendo em vista se partir de uma concentração de lactose inicial elevada.

4.2.2 – Ensaios do Planejamento Experimental

A Tabela 7 mostra a matriz do planejamento fatorial e suas respostas para os ensaios teste.

Tabela 7 – Matriz do planejamento fatorial e suas respostas

Ensaio	L ₀ (g/L)	E (g/L)	t (min)	T _P (h)	V (cP)	S (% m/m)	D (g/cm ³)	L _F (g/L)	C _L (%)	GOS (g/L)
T01	-1 (59)	-1 (0,5)	-1 (0)	3,55	1701	77,24	1031,9	0,7	98,8	0
T02	+1 (91)	-1 (0,5)	-1 (0)	3,68	2343	74,79	1045,5	1,9	97,9	2,7
T03	-1 (59)	+1 (1,0)	-1 (0)	3,67	1962	75,89	1034,7	0,2	99,7	0
T04	+1 (91)	+1 (1,0)	-1 (0)	3,85	2193	73,94	1045,5	0,7	99,2	0
T05	-1 (59)	-1 (0,5)	+1 (60)	3,90	2001	76,56	1029,9	1,2	98,5	0
T06	+1 (91)	-1 (0,5)	+1 (60)	3,98	1797	77,13	1043,5	2,1	97,7	4,2
T07	-1 (59)	+1 (1,0)	+1 (60)	3,97	1450	79,17	1035,1	0,3	99,5	0
T08	+1 (91)	+1 (1,0)	+1 (60)	4,05	1539	77,35	1045,7	0,9	98,7	0
T09	0 (75)	0 (0,75)	0 (30)	3,97	1636	77,85	1038,9	0,5	99,3	0
T10	0 (75)	0 (0,75)	0 (30)	3,95	1696	77,84	1040,2	0,6	99,2	0
T11	0 (75)	0 (0,75)	0 (30)	3,99	1687	77,90	1040,9	0,6	99,2	0

L₀ → concentração de lactose inicial no substrato;

E → concentração do preparado enzimático adicionado ao processo;

t → tempo de defasagem de adição da enzima em relação ao início da fermentação;

T_P → tempo de processo;

V → viscosidade medida ao final do processo;

S → sinérese medida ao final do processo;

D → densidade medida ao final do processo;

L_F → concentração de lactose medida ao final do processo;

C_L → conversão da lactose calculada ao final do processo;

GOS → concentração de galactooligossacarídeos medida ao final do processo.

4.2.3 – Tempo de processo

A Tabela 7 mostra os resultados nos experimentos para o tempo de processo. A grande vantagem observada na comparação das respostas para esse parâmetro, expressos nas Tabelas 6 e 7, é a verificação que não existe incremento no tempo de processamento dos bioprocessos simultâneos (T01 à T11) quando comparados com a fermentação tradicional (B01 à B03). Ao contrário, existe uma tendência de redução nesse tempo, muito embora não seja possível afirmar que, em escala industrial, essa redução possa ser significativa, tendo em vista que o controle de temperatura do processo no fermentador de bancada utilizado foi de 0,1°C e, na indústria, a variação tende a ser maior.

Na Figura 19 observa-se que o tempo de processo para as fermentações sem adição de enzima foi superior ao tempo observado nos bioprocessos simultâneos.

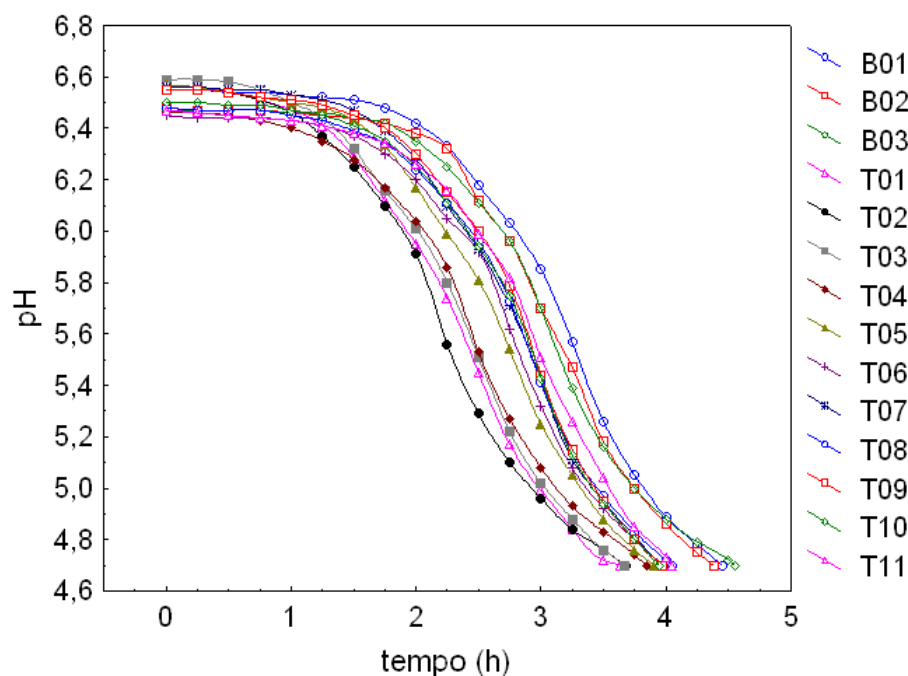


Figura 19 – Variação de pH no tempo para os ensaios da matriz fatorial (T01 à T11) e para as fermentações controle (B01 à B03)

Os resultados obtidos por Longo (2006) e por Pereira (2002) indicaram que os processos de elaboração de fermentados lácticos com reduzido teor de lactose utilizando o processo em dois estágios e a enzima obtida de *Kluyveromyces lactis*, resultaram em um incremento no tempo de fermentação em comparação aos fermentados obtidos sem conversão enzimática prévia. Para Longo (2006), esse incremento de tempo de processo chegou a 15%, sendo outra tendência negativa dos processos em múltiplo estágio para elaboração de fermentados lácticos de baixa lactose, quando comparados com os bioprocessos simultâneos.

A conversão de lactose usando reator em membrana foi avaliada por Carminatti (2001), que verificou um tempo de aproximadamente 1 h para conversão de um substrato composto exclusivamente de soro de leite a partir de enzima obtida de *Kluyveromyces lactis*, na temperatura de 37°C. Esse resultado indica a vantagem de concentrar o substrato para reduzir o tempo de processo no estágio enzimático. Por outro lado, uma restrição importante é a temperatura, pois a permanência do substrato a 37°C por 1 h necessitaria de condições assépticas para evitar contaminações por microrganismos indesejáveis e, sobretudo, as indústrias lácteas de nosso país não possuem esses sistemas em seu parque fabril.

Os resultados apresentados por esse trabalho indicam uma grande vantagem no tempo de processo quando se comparam os bioprocessos simultâneos com o processamento em múltiplos estágios na elaboração de fermentado de baixa lactose.

4.2.4 – Densidade

Os resultados de densidade para os ensaios do planejamento experimental são mostrados na Tabela 7. Para verificação da validade do modelo linear da variação da densidade em função das variáveis codificadas, foi realizada uma análise de variância

(ANOVA), conforme Rodrigues e lemma (2005), apresentada na Tabela 8. Apenas as variáveis lactose inicial (L_0) e enzima (E) foram significativas e preditivas e, portanto, a análise de variância foi construída excluindo-se a variável tempo (t), sendo essa incorporada ao resíduo.

Tabela 8 – Análise de variância para a densidade

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F (calculado)
Regressão	308,25	2	154,13	97,41
Resíduo	12,66	8	1,58	
Total Corrigido	320,91	10		

$F_{(tabelado) 2; 8; 0,05} = 4,46$; Coeficiente de correlação: $R = 0,98$

A validade do modelo pode ser observada na comparação entre o $F_{(calculado)}$ superior ao $F_{(tabelado)}$ em 21,8 vezes, para um nível de confiança de 95%. A equação 16 expressa a relação linear entre as variáveis codificadas do modelo.

$$D = 6,075 * L_0 + 1,275 * E \quad (\text{eq. 16})$$

A partir do modelo foi obtida a superfície de resposta e a curva de contorno apresentadas na Figura 20.

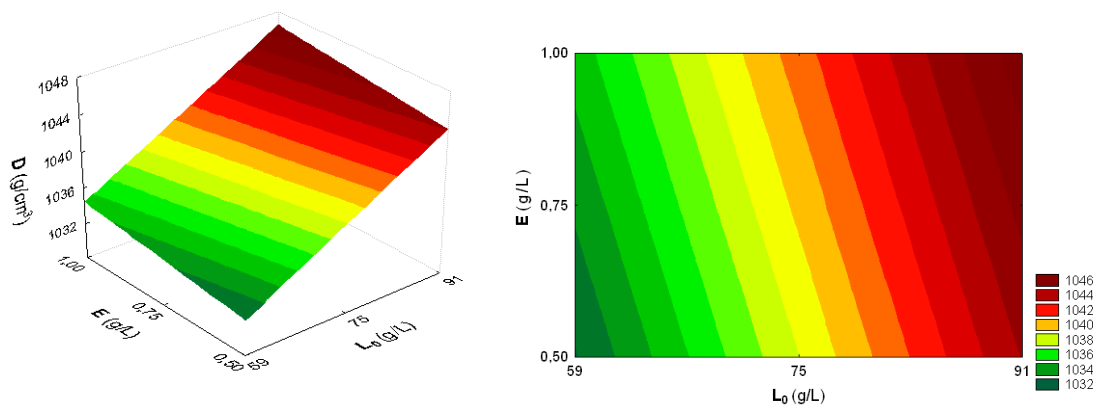


Figura 20 – Superfície de resposta e curva de contorno para densidade

Não foram encontrados na literatura estudos que correlacionem a variação da densidade em processos simultâneos de fermentação e catálise enzimática. O resultado de incremento da densidade com o aumento da lactose era totalmente esperado, tendo em vista se partir de um maior teor de sólidos totais no substrato. A informação nova desse resultado é a tendência de aumento na densidade quando de uma maior concentração de enzima. Como o processo em questão é descontínuo e fechado, não se pode presumir incremento de rendimento ou ganho mássico decorrente do aumento da densidade.

4.2.5 – Viscosidade e Sinérese

Para avaliar a influência dos bioprocessos simultâneos na textura dos fermentados lácteos, foram avaliados os parâmetros de viscosidade e de sinérese.

Os resultados de viscosidade e sinérese para os ensaios do planejamento experimental são mostrados na Tabela 7. A Figura 21 apresenta os efeitos de cada variável sobre as respostas em um nível de confiança de 95%.

O incremento de 59 g/L para 91 g/L na concentração inicial de lactose no substrato foi significativo, aumentando em média 190 cP na viscosidade e reduzindo em média 1,41% (m/m) na sinérese.

A variação de 0,5 g/L para 1,0 g/L na concentração do preparado enzimático foi significativo para ambas as respostas, reduzindo em média 175 cP na viscosidade e aumentando 0,16% (m/m) na sinérese.

O incremento do tempo de adição de enzima de zero, ou seja, no início da fermentação, para 60 min após o início da fermentação foi significativo, aumentando a sinérese em média em 2,09 (m/m) e reduzindo a viscosidade em média em 353 cP.

As interações entre a concentração inicial de lactose e a concentração de enzima foram significativas para a sinérese e as demais interações foram significativas para ambas as respostas.

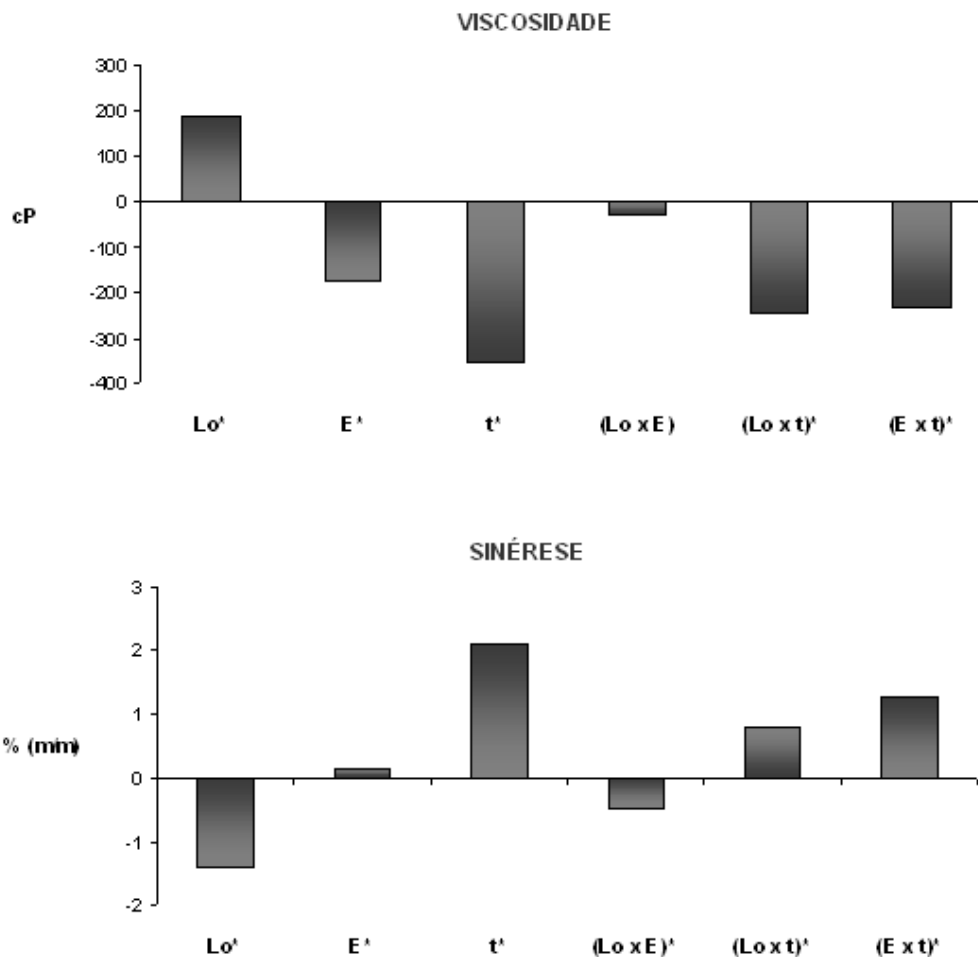


Figura 21 – Efeitos principais e de interação sobre as respostas viscosidade e sinérese (* $p \leq 0,05$)

A análise da Figura 21 permite observar que os parâmetros enzima e tempo são responsáveis tanto por reduzir a viscosidade como por aumentar a separação de fases.

Não foram encontrados na literatura estudos que relacionem os parâmetros de textura em bioprocessos simultâneos em leites fermentados. No entanto, o comportamento de redução na viscosidade e de aumento da sinérese com o

incremento da adição de β -galactosidase pode estar associado à redução na formação de exopolissacarídeos (EPS) pelas bactérias ácido-lácticas (BAL). Segundo Canilha et al. (2006), as enzimas do tipo glicosil-hidrolases são responsáveis pela degradação dos EPS em fermentações longas e o rendimento na produção desses polissacarídeos depende do pH ótimo para ação dessas enzimas endógenas das BAL. Como a enzima exógena utilizada nesse trabalho é uma glicosil-hidrolase típica, que atua em diferentes faixas de pH ao longo da fermentação, presume-se que uma maior adição de enzima possa reduzir a quantidade de EPS formado, com consequente impacto negativo na viscosidade e na separação de fases do fermentado lácteo.

4.2.6 – Conversão da Lactose e Lactose Final

A conversão da lactose e a concentração de lactose final nos bioprocessos simultâneos têm seus resultados apresentados na Tabela 7. Para verificação da validade do modelo linear da variação da lactose final (L_F) em função das variáveis codificadas, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), conforme Rodrigues e lemma (2005), apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Análise de variância para lactose final

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F (calculado)
Regressão	3,21	3	1,07	12,74
Resíduo	0,59	7	0,08	
Total Corrigido	3,80	10		

$F_{(tabelado) 3; 7; 0,05} = 4,35$; Coeficiente de correlação: $R = 0,92$

Todas as variáveis foram significativas e preditivas e a validade do modelo pode ser observada na comparação entre o valor do $F_{(calculado)}$ superior ao $F_{(tabelado)}$ em

aproximadamente 3 vezes, para um nível de confiança de 95%. A equação 17 expressa a relação linear entre as variáveis codificadas do modelo.

$$L_F = 0,475 * L_0 - 0,4 * E + 0,125 * t \quad (\text{eq. 17})$$

Para verificação da validade do modelo linear da variação da conversão da lactose (C_L) em função das variáveis codificadas foi realizada uma análise de variância (ANOVA), conforme Rodrigues e lemma (2005), apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 – Análise de variância para conversão da lactose

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F (calculado)
Regressão	3,51	3	1,17	14,44
Resíduo	0,57	7	0,08	
Total Corrigido	4,08	10		

$F_{(tabela)} 3; 7; 0,05 = 4,35$; Coeficiente de correlação: $R = 0,93$

Todas as variáveis foram significativas e preditivas e a validade do modelo pode ser observada na comparação entre o valor do $F_{(calculado)}$ superior ao $F_{(tabela)}$ em 3,3 vezes, para um nível de confiança de 95%. A equação 18 expressa a relação linear entre as variáveis codificadas do modelo.

$$C_L = -0,375 * L_0 + 0,525 * E - 0,15 * t \quad (\text{eq. 18})$$

A partir dos modelos foram obtidas as superfícies de resposta para lactose final e conversão da lactose, apresentadas na Figura 22.

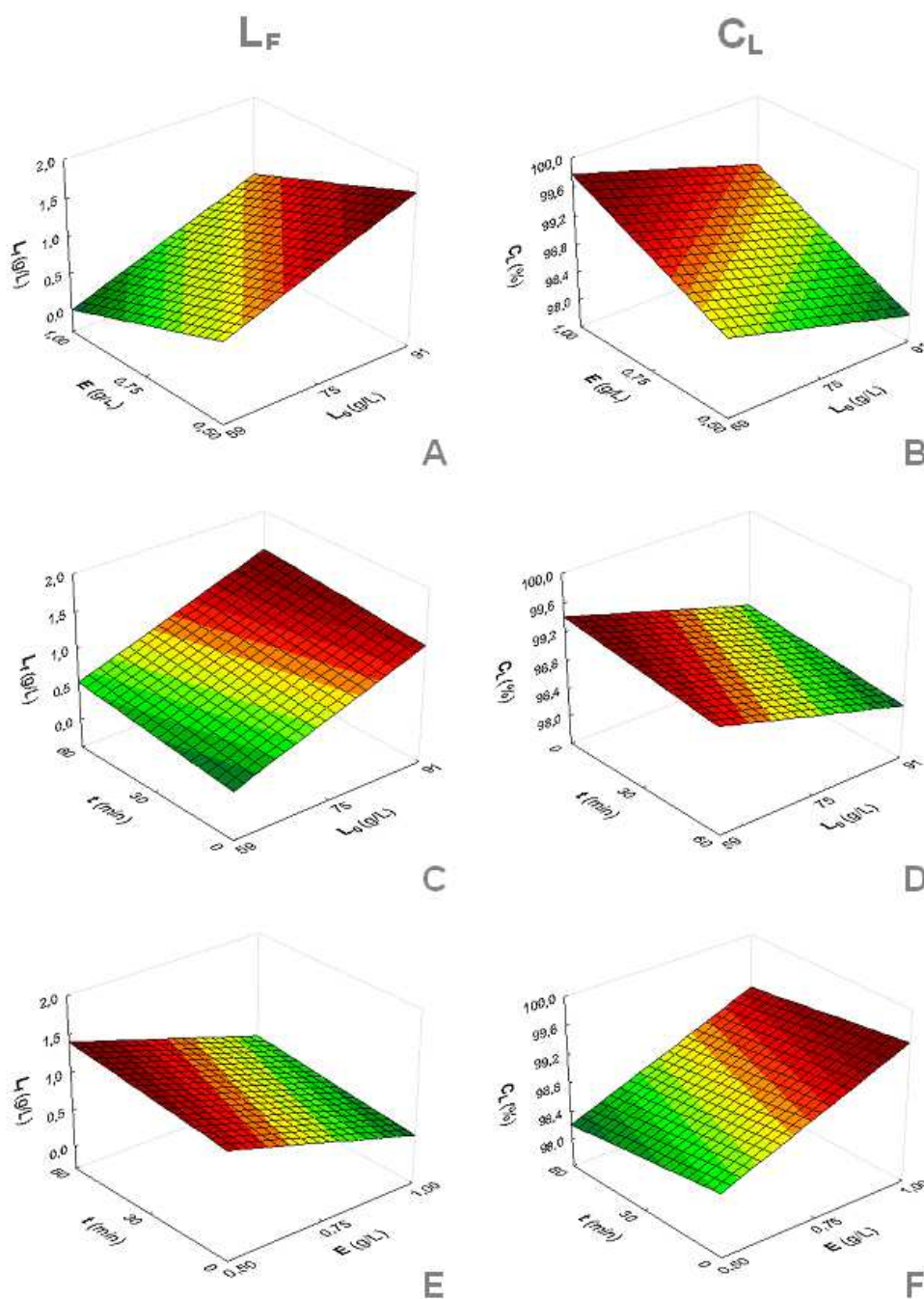


Figura 22 – Superfícies de resposta para lactose final

(L_F = A, C e E) e conversão da lactose (C_L = C, D e F)

Nos bioprocessos simultâneos, quando foram variadas as concentrações de enzima adicionada e de lactose inicial no substrato (Figura 22-A e 22-B), foi possível observar que a menor quantidade de lactose final e a maior conversão da lactose no

iogurte foram obtidas na condição de maior concentração de enzima adicionada e de menor concentração de lactose inicial.

O comportamento da lactose final e conversão da lactose quando foram variadas a concentração de lactose no substrato e o tempo de adição da enzima (Figura 22-C e 22-D), demonstrou que o ideal para a obtenção de iogurtes com a menor concentração possível de lactose final é a adição da enzima no início da fermentação, junto com a cultura láctica, em substratos com menor teor de lactose inicial.

A variação da lactose final e da conversão da lactose com respeito à concentração de enzima adicionada e ao seu tempo de adição (Figura 22-E e 22-F), indicou que a melhor condição foi na maior concentração de enzima, quando essa é adicionada no início do processo.

Para Longo (2006) a redução da lactose em 4 h de tratamento do leite pasteurizado com enzima comercial obtida de *Kluyveromyces lactis*, aplicada previamente à fermentação, foi de 88%. Para Carminatti (2001) a aplicação de enzima em um processo batelada reduziu em até 82% a lactose em soro de leite, aumentando a conversão para 92% quando em um processo de concentração com membranas. Trevisan (2008) avaliou duas diferentes enzimas comerciais obtidas de levedura em um processo de conversão em leite pasteurizado e encontrou valores de redução de lactose entre 57,2% e 75,4%.

No trabalho de Toba et al. (1986), em que se obteve iogurte através de bioprocessos simultâneos com β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, os autores obtiveram 64% de conversão da lactose em 8 h de processamento. Mais recentemente, Rodriguez et al. (2008) realizaram fermentação e catálise simultânea utilizando leite de cabra como substrato e uma enzima obtida de *Aspergillus oryzae*,

aplicada juntamente com a cultura láctea, obtendo uma conversão de até 82,6% na lactose partindo de uma concentração inicial de 44,2 g/L.

Nesse trabalho foi possível obter valores entre 97,7 e 99,7% de redução de lactose através dos bioprocessos simultâneos em fermentados lácticos, em comparação com a conversão entre 13,8 e 19,8% quando da fermentação sem adição de enzima, para idênticas composições de substrato.

4.2.7 – GOS

A Tabela 7 apresenta os resultados do planejamento experimental para GOS, representando a concentração de galactooligosacarídeos obtida ao final do processo. As respostas para GOS não possuem normalidade que permita seu tratamento por métodos estatísticos paramétricos, como foram os tratamentos das demais respostas, tendo sido aplicado técnica não-paramétrica de redes neurais artificiais.

O melhor ajuste aconteceu com a topologia RBF 3:3-7-1:1 que obteve uma correlação de 0,998 e um erro padrão de 0,1 g/L. Trata-se de uma topologia de rede progressiva com 3 camadas no nível de entrada, um nível escondido intermediário com 7 camadas e uma camada no nível de saída (vide apêndice 4), que aproximou as variáveis de entrada da resposta a partir de uma função de base radial do tipo gaussiana. A Tabela 11 compara os valores reais com os valores preditos e os resíduos do referido modelo de redes neurais artificiais, onde é possível observar que o ajuste do modelo sofre variações apenas quando a resposta retorna ao valor zero, após passar por um valor diferente de zero.

A partir do modelo referido, a função multidimensional de ativação do tipo gaussiana construiu uma superfície, estimando um mapeamento de entrada e saída tendo como base o conjunto de dados do problema.

Tabela 11 – Valores reais, preditos e resíduos a partir do modelo RBF 3:3-7-1:1

Ensaio	Valores Reais	Valores Preditos	Resíduos
1	0	0,00	0,0
2	2,7	2,70	0,0
3	0	- 0,13	- 0,13
4	0	0,00	0,0
5	0	0,00	0,0
6	4,2	4,20	0,0
7	0	- 0,33	- 0,33
8	0	0,00	0,0
9	0	0,00	0,0
10	0	0,00	0,0
11	0	0,00	0,0

Coefficiente de correlação: R = 0,998

A Figura 23 apresenta as superfícies de resposta geradas pelo modelo de redes neurais artificiais (RNA) do tipo RBF 3:3-7-1:1. A Figura 23-A apresenta a superfície de resposta gerada pelo modelo de redes neurais para as variações de concentração de lactose inicial (L_0) e concentração da enzima (E), indicando a tendência de maior produção de GOS nas condições de aumento da concentração de lactose inicial no substrato e redução na concentração da enzima.

Conforme Lisboa (2008), a transgalactosilação é um processo no qual a enzima β -galactosidase hidrolisa a lactose e, ao invés de transferir a unidade de galactose para o grupo hidroxila da água, a transfere para um composto hidroxilado que pode ser galactose, lactose ou GOS. Desta forma, em maiores concentrações de lactose, a transgalactosilação é favorecida em relação à hidrólise. Por outro lado, a menor concentração de enzima provavelmente implicou em menor hidrólise de GOS, já que este também é substrato da β -galactosidase.

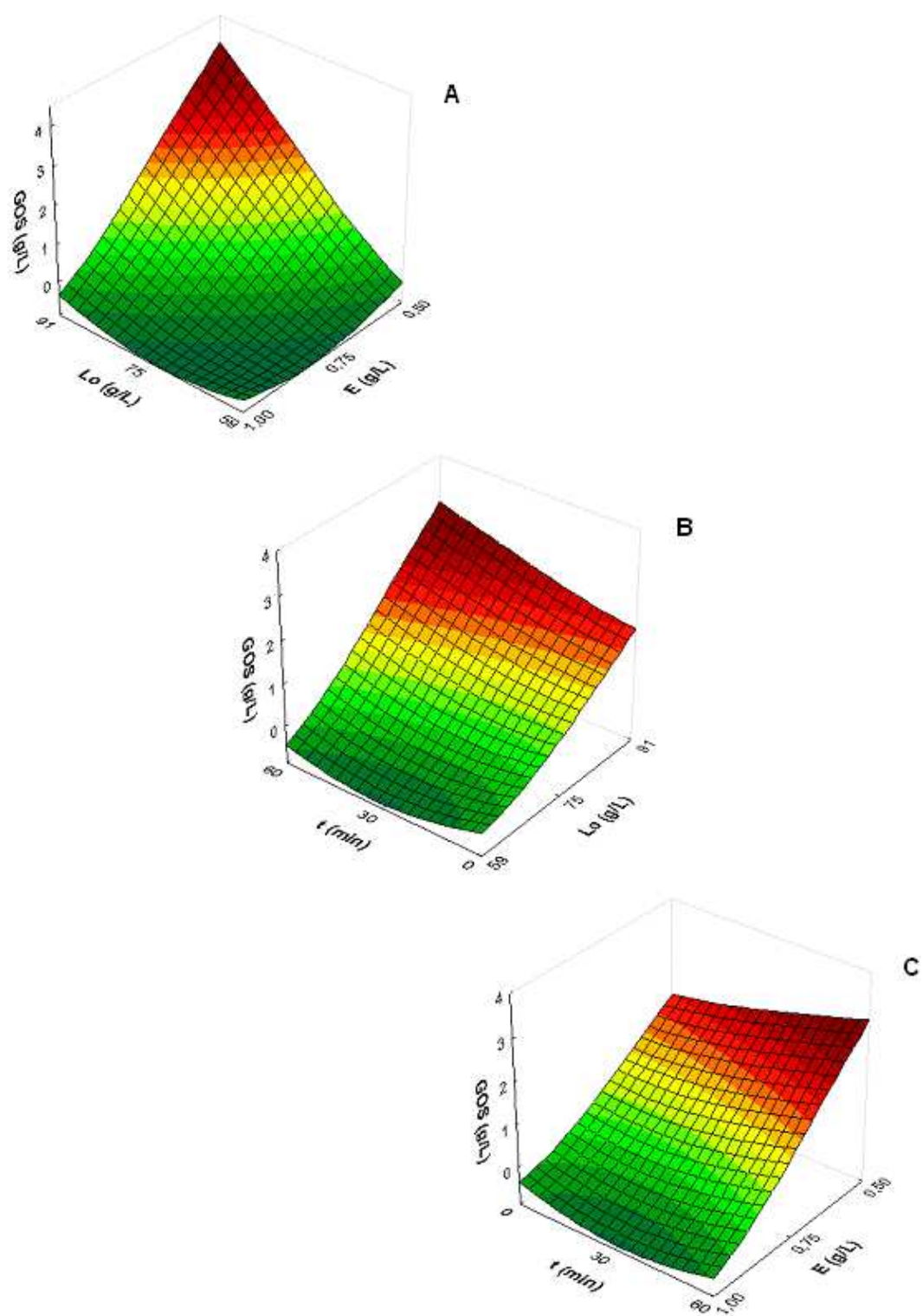


Figura 23 – Superfícies de resposta para GOS pelo modelo de redes neurais

O trabalho de Toba et al. (1986) buscou obter GOS aplicando enzima obtida de *Aspergillus oryzae* em um processo simultâneo à fermentação láctica com 8 h de duração. Os autores encontraram até 15% de conversão da lactose inicial em GOS até a 2ª hora de processamento, usando cromatografia gasosa. Esses valores decaíram pela metade até o final da fermentação, indicando que a própria enzima tende a hidrolisar os GOS formados. Não foram encontrados dados recentes na literatura que apontem para a concentração de GOS obtida em bioprocessos simultâneos na elaboração de fermentados lácticos.

A Figura 23-B apresenta a superfície de resposta gerada pelo modelo de redes neurais para as variações de concentração de lactose inicial (L_0) e para o tempo de adição da enzima (t), indicando a tendência de maior produção de GOS nas condições de aumento da concentração de lactose inicial no substrato e aumento no tempo de defasagem entre o início da fermentação e a adição da enzima.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que correlacionem obtenção de galactooligossacarídeos em bioprocessos simultâneos, conjugando adição defasada da enzima β -galactosidase em sinergia com a fermentação láctica. Essa defasagem no tempo de adição da enzima, em relação à aplicação da cultura láctica, pode contribuir para minimizar o efeito de hidrólise de GOS, citado por Lisboa (2008), indicando a possibilidade de estabelecimento de Bioprocessos Simultâneos Defasados (BSD) como estratégia para a obtenção de fermentados lácticos de baixa lactose e com concentrações de GOS de interesse comercial.

Pode-se entender um Bioprocesso Simultâneo Defasado (BSD) como sendo aquele processo em que a adição da enzima ocorre em um tempo posterior ao início da fermentação. Por outro lado, o bioprocessos simultâneo, por vezes designado na

literatura como Hidrólise e Fermentação Simultânea, é o processo em que a adição da enzima e da cultura láctea ocorre no mesmo momento (Rodriguez et al., 2008).

A Figura 23-C apresenta a superfície de resposta gerada pelo modelo de redes neurais para as variações de concentração de enzima (E) e o seu tempo de adição (t), indicando a tendência de maior produção de GOS nas condições de redução na concentração de enzima adicionada e aumento no tempo de defasagem entre o início da fermentação e a adição da β -galactosidase.

A Figura 24 apresenta o cromatograma obtido no ensaio T06, onde se quantificou o maior valor para GOS no planejamento experimental realizado nesse trabalho.

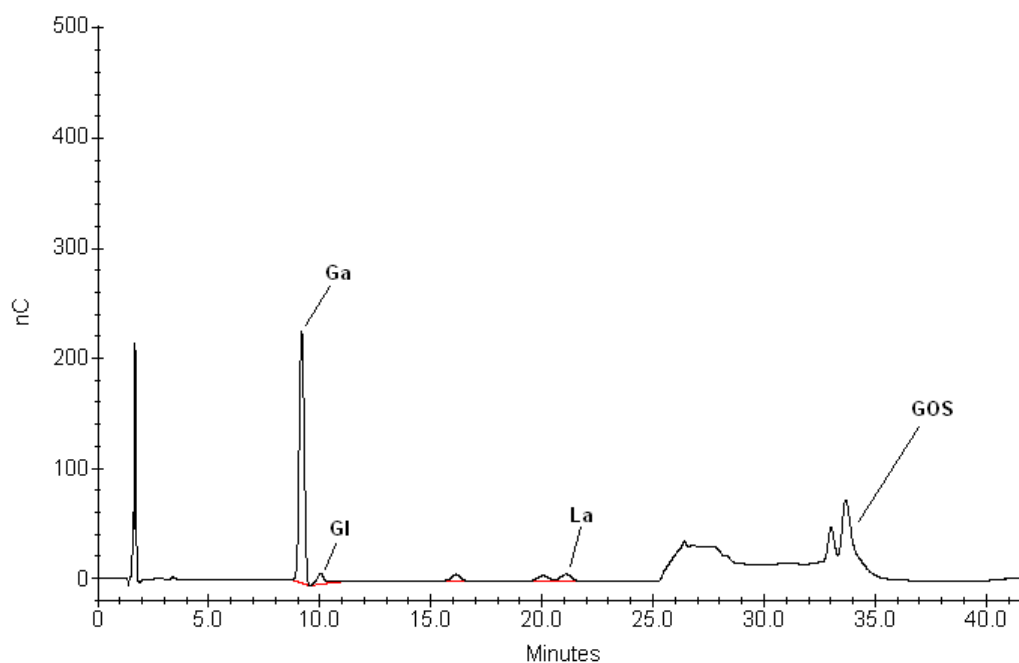


Figura 24 – Cromatograma obtido por HPLC-PA do ensaio T06
Ga (galactose); Gl (glicose); La (lactose); GOS (galactooligossacarídeos)

As correlações entre as respostas reais e o modelo, mostradas na Figura 22 servem para apontar os caminhos de uma possível maximização desse processo de obtenção de GOS, a partir dos seguintes pressupostos:

1. Aumento da concentração de lactose inicial no substrato;
2. Redução na concentração de enzima adicionada;
3. Aumento na defasagem do tempo de adição de enzima em relação ao início da fermentação.

As amostras do planejamento experimental foram armazenadas sob refrigeração e analisadas ao final do 30° dia após fabricação. Em todos os casos o valor obtido foi zero, mostrando uma tendência de ação hidrolítica da β -galactosidase, mesmo com a temperatura mantida entre 6 e 8°C.

As respostas de GOS obtidas nos dois ensaios em que houve quantificação foram ponderadas pela densidade, para obtenção da concentração de galactooligossacarídeo em g/100g, resultando em:

$$\text{Ensaio T02} = 2,7 * 10^{-3} \frac{\text{kg}}{\text{L}} * \left(\frac{1}{1/1,0455 \frac{\text{L}}{\text{kg}}} \right) * 100 \frac{\text{g}}{100\text{g}} = 0,28 \frac{\text{g}}{100\text{g}} = 0,28\% \quad (\text{eq. 19})$$

$$\text{Ensaio T06} = 4,2 * 10^{-3} \frac{\text{kg}}{\text{L}} * \left(\frac{1}{1/1,0435 \frac{\text{L}}{\text{kg}}} \right) * 100 \frac{\text{g}}{100\text{g}} = 0,44 \frac{\text{g}}{100\text{g}} = 0,44\% \quad (\text{eq. 20})$$

Nenhum dos resultados obtidos atingiu o mínimo de 3% (m/m) exigidos pela legislação (BRASIL, 1998) para caracterizar o fermentado como rico em fibras.

É importante observar que a legislação brasileira não prevê a possibilidade de derivados lácteos com alegação (*claim*) de produto “zero em lactose”, apenas com reduzido teor desse carboidrato, como é o caso do leite de baixa lactose.

A adequação da legislação a essa nova possibilidade permitiria a fabricação de produtos de base láctea voltados prioritariamente à população intolerante à lactose que poderiam concorrer com os chamados “iogurtes de soja”, com a vantagem de ser fonte natural de cálcio.

Outra vantagem prática dos resultados apontados nesse trabalho, realizado a partir de fermentador em batelada e adição de enzima em meio livre, é que para realizar esse processamento não se fazem necessários investimentos em imobilizado, podendo ser aplicado à estrutura atual das indústrias lácteas de nosso país.

A quantificação de GOS obtida nesse trabalho indica a possibilidade do desenvolvimento de um processo simultâneo de biocatálise e fermentação que possa obter valores que permitam atingir o mínimo exigido pela legislação para declarar um produto rico em fibras, ou seja, 3% (m/m) na composição do produto final. Por outro lado, a dificuldade será manter a concentração obtida no bioprocessamento simultâneo ao longo do *shelf life* do produto, em especial no caso de leites fermentados.

A manutenção da concentração de GOS obtida só será possível a partir da desnaturação ou remoção da β -galactosidase do produto final. A remoção da enzima é plenamente factível quando se trabalha com processos com imobilização dessas macromoléculas. Por outro lado, a aplicação de calor para desnaturar a enzima não é recomendada, dado seu impacto negativo na viabilidade das células dos microrganismos.

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES

5 – CONCLUSÕES

A adição de uma mistura de β -galactosidases de origens diferentes e sua ação simultânea ao longo de fermentação conduzida por quatro diferentes bactérias ácido-lácticas, sendo duas delas probióticas, têm seus resultados sumarizados como tendo propiciado:

1. Um impacto positivo sobre a conversão de lactose dos fermentados lácticos, reduzindo entre 97,7 e 99,7% a concentração desse carboidrato, sendo diretamente proporcional à concentração de enzima adicionada, o que permite obter produtos finais elaborados com matéria-prima láctea e reduzido teor de lactose, indicando um importante caminho para obter fermentados lácticos voltados para o segmento de consumidores intolerantes a esse referido carboidrato;
2. Uma formação de GOS entre 2,7 e 4,2 g/L na condição de concentrações máxima de lactose e mínima de enzima, que aponta a possibilidade de obtenção de fermentados lácticos com a presença desses prebióticos através de processos que associem catálise enzimática e fermentação em uma única etapa de processamento;
3. Uma tendência de maior obtenção de GOS com a aplicação da enzima em um tempo defasado em relação ao início da fermentação;
4. Uma formação de GOS que é hidrolisada ao longo do tempo, mesmo com o fermentado mantido sob refrigeração;
5. Um impacto positivo sobre o tempo de processamento na elaboração de fermentados lácticos de baixo teor de lactose, reduzindo-o em relação à

fermentação sem enzima e, mais ainda, aos processos com múltiplos estágios;

6. Um impacto negativo sobre os parâmetros de textura dos fermentados lácteos, como viscosidade e sinérese, que poderá ser corrigido com o uso de polissacarídeos como agentes espessantes e estabilizantes;
7. Um impacto positivo na densidade dos fermentados lácticos com o aumento da concentração da enzima.

A identificação de um ponto de defasagem no tempo de adição da enzima, que permita obter o máximo de GOS sem comprometer excessivamente a textura do fermentado láctico, ou seja, em um momento anterior ao início de formação do coágulo, é o item crítico do processo desenvolvido nesse trabalho.

A adequada definição do intervalo de tempo entre o início da fermentação e a adição da enzima, permitirá potencializar as vantagens dos Bioprocessos Simultâneos Defasados (BSD), na fabricação de fermentados lácticos que conjuguem, simultaneamente, fermentação e catálise enzimática na obtenção de biomoléculas de interesse nutracêutico.

CAPÍTULO VI
SUGESTÕES

6 – Sugestões para Trabalhos Futuros

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, sugerem-se para estudos futuros os seguintes temas:

- ✓ A maximização do bioprocesso simultâneo defasado (BSD) sugerido nesse trabalho, a partir da cultura láctica e do preparado enzimático utilizados, visando uma maior produção de GOS e o estabelecimento de sua eventual relação com a conversão da lactose;
- ✓ A avaliação de bioprocessos simultâneos, defasados ou não, conduzidos por uma mistura conhecida de duas diferentes β -galactosidases comerciais que atuem ao longo do processo, permitindo a identificação da contribuição de cada tipo de enzima nos processos de elaboração de fermentados lácticos com baixo teor de lactose;
- ✓ A avaliação de bioprocessos simultâneos conduzidos apenas por β -galactosidases que atuem abaixo do pH 6,0 e sua aplicação defasada em relação ao início da fermentação;
- ✓ A avaliação da viabilidade de células dos microrganismos nos bioprocessos simultâneos e sua eventual relação com parâmetros de processo e qualidade, como o tempo de processamento, a densidade, a viscosidade e a sinérese;
- ✓ A avaliação da viabilidade de células dos microrganismos nos bioprocessos simultâneos e sua eventual relação com possível extensão de *shelf life* dos fermentados lácticos;

- ✓ A avaliação de bioprocessos simultâneos em fermentadores contínuos e sua relação com parâmetros de processo e qualidade, como o tempo de processamento, a densidade, a viscosidade e a sinérese;
- ✓ A avaliação de bioprocessos simultâneos na elaboração de *frozen yogurt* e sua eventual relação com a manutenção da concentração de GOS ao longo do *shelf life* do produto;
- ✓ A avaliação de bioprocessos simultâneos em fermentadores com enzima imobilizada e sua eventual relação com a manutenção da concentração de GOS ao longo do *shelf life* do fermentado láctico;
- ✓ A avaliação de bioprocessos simultâneos com a adição, defasada ou não, de peptidases e sua eventual relação com a obtenção de biopeptídeos na elaboração de leites fermentados;
- ✓ A avaliação de bioprocessos simultâneos com a adição, defasada ou não, de inulinas e sua eventual relação com a obtenção de frutooligosacarídeos na elaboração de leites fermentados em substratos com adição de sacarose;
- ✓ A avaliação de bioprocessos simultâneos com a adição de diferentes enzimas, tais como galactosidases, inulinas e peptidases e sua eventual relação com a obtenção de biomoléculas de interesse nutracêutico na elaboração de fermentados lácticos.

REFERÊNCIAS E APÊNDICES

REFERÊNCIAS

ABU-REESH, I.M. Optimal design for CSTR's in series performing enzymatic lactose hydrolysis. **Bioprocess Engineering**, 23: 709-713, 2000.

AFONSO, I.M.; MAIA, J.M. Rheological monitoring of structure evolution and development in stirred yoghurt. **Journal of Food Engineering**, 42: 183-190, 1999.

AMATAYAKUL, T.; SHERKAT, F.; SHAH, N.P. Syneresis in set yoghurt as affected by EPS starter cultures and levels of solid. **International Journal of Dairy Technology**, 59: 216-221, 2006.

ANTHONY, J.C.; MERRIMAN, T.M.; HEIMBACH, J.T. 90-Day oral (gavage) study in rats galactooligosaccharides syrup. **Food and Chemical Toxicology**, 44: 819-826, 2006.

BENGMARK, S.; ORTIZ DE URBINA, J.J. Simbióticos: una nueva estrategia en el tratamiento de pacientes críticos. **Nutrición Hospitalaria**, 20: 147-156, 2005.

BONN, M.A.; JANSSEN, A.E.M.; VAN'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, 26: 271-281, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Portaria nº 27 de 13/01/1998**. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 24/04/2009.

CANILHA, L.; SILVA, D.D.V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I.M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, 20: 32-41, 2006.

CARMINATTI, C.A. Ensaio de hidrólise enzimática de lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase *Kluyveromyces lactis*. 2001, 79p. **Dissertação (Mestrado**

em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

CARRARA, C.R.; RUBIOLO, A.C. Determination of kinetics parameters for free and immobilized β -galactosidase. **Process Biochemistry**, 31(3): 243-248, 1996.

COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, 69: 1052S-1057S, 1999.

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

DELZENNE, N.M.; ROBERFROID, M.R. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. **LWT**, 27: 01-06, 1994.

DJOUZI, Z.; ANDRIEUX, C. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. **British Journal of Nutrition**, 78: 313-324, 1997.

FOOKS, L.J.; GIBSON, G.R. Probiotics and modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, 88(1): S39-S49, 2002.

GALUSHKIN, A.J. **Neural Networks Theory**. Springer, Berlin (Germany): 402p, 2007.

GOULAS, A.; TZORTZIS, G.; GIBSON, G.R. Development of a process for the production and purification of α - and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. **International Dairy Journal**, 17: 648-656, 2007.

GU, Q. Enzyme-mediated reactions of oligosaccharides and polysaccharides. **Journal of Environmental Polymer Degradation**, 7: 01-07, 1999.

HATZINIKOLAOU, D.G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A.D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Modeling of the simultaneous hydrolysis-

ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, 24: 161-172, 2005.

HSU, C.A.; LEE, S.L.; CHOU, C.C. Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacteria longum* BCRC 15708. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 2225-2230, 2007.

JACOBSON, R.H.; ZHANG, J-X.; DUBOSE, R.F.; MATTHEWS, B.W. Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. **Letters to Nature**, 369: 761-766, 1994.

JANG, S-S.; WONG, D.S-H.; CHEN, J. – Intelligent Experimental Design Using an Artificial Neural Network Meta Model and Information Theory. In: ___ **Integrated Intelligent Systems for Engineering Design**. IOS Press, Amsterdam (Netherlands): Cap.13, p.258-273, 2006.

JUERS, D.H.; HEIGHTMAN, T.D.; VASSELA, A.; MCCARTER, J.D.; MACKENZIE, L.; WITHERS, S.G.; MATTHEWS, B.W. A structural view of the action of *Escherichia coli* (*lacZ*) β -galactosidase. **Biochemistry**, 40: 14781-14794, 2001.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J.M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 31: 300-309, 2002.

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

KUNZ, C.; RUDLOFF, S. Health promoting aspects of milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**, 16: 1341-1346, 2006.

LISBOA, C.R. Síntese enzimática de galactooligosacarídeos a partir de lactose e soro de leite. 2008, 76p. **Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)**, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS.

LONGO, G. Influência da adição de lactase na produção de iogurtes. 2006, 109p. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

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

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

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

MEHRA, R.; KELLY, P. Milk oligosaccharides: structural and technological aspects. **International Dairy Journal**, 16: 1334-1340, 2006.

MUSSATTO, S.I.; MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, 68: 587-597, 2007.

PARK, H-Y.; KIM, H-J.; LEE, J-K.; KIM, D.; OH, D-K. Galactooligosaccharide production by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24: 1553-1558, 2008.

PASSOS, L.M.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e uso em alimentos. **Ciência Rural**, 33(2): 385-390, 2003.

PEREIRA, M.A.G. Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e pós-acidificação de iogurtes. 2002, 86p. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

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**, 5(1): 24-30, 2004.

PESELA, B. C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, J.L.; CARRASCOSA, A.V.; GUIÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on sepabeads supports decreases product inhibition complet hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 199-205, 2003.

RABIU, B.A.; GIBSON, G.R. Carbohydrates: a limit on bacterial diversity within the colon. **Biology Review**, 77: 443-453, 2002.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: application in infant food. **Early Human Development**, 65: S43-S52, 2001.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A.; SEUMA, M. R-P. La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles. **Nutrición Hospitalaria**, 20: 135-146, 2005.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept revisited. **The Journal of Nutrition**, 137: 830S-837S, 2007.

ROBERFROID, M.R.; DELZENNE, N.M. Dietary Fructans. **Annual Review of Nutrition**, 18: 117-143, 1998.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma Estratégia Seqüencial de Planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUEZ, V.A.; CRAVERO, B.F.; ARMONÍA, A. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. **Ciencia e Tecnología de Alimentos**, 28: 109-115, 2008.

ROSALES, N. Yogurt deslactosado: proceso y ventajas (2005). Disponível em: http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MLC007_YogDeslactosa.pdf. Acesso em: 12/04/2009.

ROY, D.; DAOUDI, L.; AZAOLA, A. Optimization of galacto-oligosaccharide production by *Bifidobacterium infantis* RW-8120 using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 29: 281-285, 2002.

RUPÉREZ, P. Bifidogenic oligosaccharides. **Food Science and Technology International**, 4: 237-243, 1998.

SAAD, S.M.I Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42(1): 1-16, 2006.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, 9: 69-80, 1999.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations of human health. **Nutrition Review**, 61(3): 91-99, 2003.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 22: 558-567, 1998.

SCHAAF SMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **International Dairy Journal**, 18: 458-465, 2008.

SKÁLOVÁ, T.; DOHNÁLEK, J.; SPIWOK, V.; LIPOVOVÁ, P.; VONDRÁCKOVÁ, E.; PETROKOVÁ, H.; DUSKOVÁ, J.; STRNAD, H.; KRÁLOVÁ, B.; HASEK, J. Cold-active β -galactosidase from *Arthrobacter sp.* C2-2 forms compact 660 kDa hexamers: crystal structure at 1,9Å resolution. **Journal Molecular Biology**, 353: 282-294, 2005.

SHOAF, K.; MULVEY, G.L.; ARMSTRONG, G.D.; HUTKINS, R.W. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. **Infection and Immunity**, 74(12): 6920-6928, 2006.

SPLECHTNA, B.; NGUYEN, T-H.; HALTRICH, D. Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion process for the production prebiotic galactooligosaccharides using β -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 6772-6777, 2007.

SWALLOW, D.M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. **Annual Review of Genetics**, 37: 197-219, 2003.

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yoghurt Science and Technology**. Woodhead Publishing Limited, Cambridge (England): 626p, 2000

TOBA, T.; ARIHARA, K.; ADACHI, S. Quantitative changes in oligosaccharides during fermentation and storage of yogurt inoculated simultaneously with starter culture and β -galactosidase preparation. **Journal of Dairy Science**, 69: 1241-1245, 1986.

TREVISAN, A.P. Influência De diferentes concentrações de enzima lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado. 2008, 60p. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.

TUNGLAND, B.C.; MEYER, D. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 3: 90-109, 2002.

VALIO. Empresa finlandesa provedora de equipamentos e soluções para alimentos funcionais, detentora da marca registrada “Zero Lactose”. Disponível em: http://asiakaslehti.com/foodsandfunctionals/sites/default/files/pdf/FF_1_2009.pdf. Acesso em: 12/06/2009.

APÊNDICE 1

Laudo do leite em pó desnatado marca ELEGÊ



Unidade Teutônia
Rua Erno Dahmer, 687 – Teutônia/RS
Fone: (51) 37625650 – Fax (51) 37625782.

LAUDO DE ANÁLISES

308/08

Identificação do Produto

Produto: Leite em Pó Desnatado Instantâneo – sachet 400 g
Data de fabricação: 07/05/08
Data de validade: 07/05/09
Lote: C2

Obs: Quanto à numeração que consta na embalagem, o n° anterior ao lote é referente ao n° do palete.

Características Organolépticas

Aspecto: pó uniforme sem grumos. Ausência de substâncias estranhas macro e microscopicamente visíveis.

Cor: Branco amarelado.

Sabor e odor: agradável, não rançoso, semelhante ao leite fluido.

Características Físico-Químicas

Análise	Resultado
Teor de Gordura (%)	0,560
Peso Específico (g/cm ³)	0,513
Acidez (%)	0,135
Índice de Solubilidade (mL)	<0,5
Umidade (%)	3,88
Partículas Queimadas (ADMI)	A
Lactose (%)	53,16
Proteínas (%)	34,33
Sais Minerais (%)	8,075

Características Microbiológicas

Análise	Resultado
Contagem Total de Mesófilos	$5,0 \times 10^2$ ufc/g
Coliformes Totais	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g
Coliformes 45°C	Ausência em 1g
Bolores e Leveduras	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g
Estafilococos Coagulase Positivo	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausência em 25g
<i>Bacillus cereus</i>	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g

Teutônia, 03 de junho de 2008.


Ana Paula Melo Dominguez
Supervisora de Qualidade

APÊNDICE 2

Laudo do soro de leite em pó marca ELEGÊ



ELEVA ALIMENTOS S/A
Unidade de Ijuí

Certificado de Análise

Identificação do Produto

Descrição do Produto	Soro de Leite em Pó
Marca	Elegê
Lote	054
Data de Fabricação	04/04/08
Data de Validade	04/04/09

Características Organolépticas

1. Cor: Levemente Amarelado
2. Sabor/Odor: Próprios

Características Físico-Químicas do Produto

Análise	Resultado Obtido	Padrão
Teor de Gordura	< 0,67%	0,5 - 3%
Peso Específico	0,559 g/cm ³	Max. 0,810
Acidez	0,059%	0,02 - 0,10
pH	6,28	6,0 - 6,6
Cloretos	3,70%	Max. 6,0%
Umidade	1,72%	Max. 3,0%
Insolubilidade	< 0,5 ml/24°C	Max. 1%
Partículas Queimadas (De acordo com padrões ADMI)	A	A - B
Lactose	77,86%	69 - 79%
Proteínas	11,75%	11 - 14%
Sais Minerais	8,47%	Max. 9%

Características Microbiológicas do Produto

Análise	Resultado Obtido	Padrão
Contagem Total de Mesófilos	10,0 x 10 ³ ufc/g	30 x 10 ³ ufc/g
Coliformes Totais	< 1,0 x 10 ¹ ufc/g	10 x 10 ¹ ufc/g
Coliformes 45°C	< 1,0 x 10 ¹ ufc/g	1,0 x 10 ¹ ufc/g
Bolores	< 1,0 x 10 ¹ ufc/g	5,0 x 10 ¹ ufc/g
Levedura	< 1,0 x 10 ¹ ufc/g	5,0 x 10 ¹ ufc/g
Staphylococcus aureus	< 1,0 x 10 ² ufc/g	1,0 x 10 ² ufc/g
Salmonella sp	Ausência em 25g	Ausência em 25g
Bacillus cereus	Ausência em 1g	Ausência em 1g
Listeria sp	Ausência em 25g	Ausência em 25g

Ijuí, 22 de Abril de 2008

Helen Pereira
Supervisora da Qualidade

Eleva Alimentos S/A – Rua Hermann Wassermann, 606 – Ijuí/RS Fone: (0xx55) 3332-9968 Fax: (0xx55) 3332-7330

APÊNDICE 3

Procedimento para clarificação de amostras para uso nos kits enzimáticos MEGAZYME.

Reagentes necessários:

- Solução de Carrez I (3,60g de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ em 100 mL de água destilada);
- Solução de Carrez II (7,20g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ em 100 mL de água destilada);
- NaOH 100mM.

Materiais e equipamentos necessários:

- Tubos plásticos com marcação para 100 mL;
- Cubeta para espectro com 1 cm de caminho ótico e 3 mL de capacidade;
- Espectrofotômetro UV para leitura em 340 nm;
- Balança analítica;
- Vórtex;
- Banho termostático;
- Filtro de papel Whatman nº 01.

PROCEDIMENTO:

- 1) Pesar exatamente 01g de amostra do fermentado em um tubo;
- 2) Adicionar 60 mL de água destilada e misturar em vórtex;
- 3) Aquecer a solução a 50°C por 15 minutos;
- 4) Adicionar 02 mL de solução de Carrez I e misturar em vórtex;
- 5) Adicionar 02 mL de solução de Carrez II e misturar em vórtex;
- 6) Adicionar 04 mL de solução de NaOH 100mM e misturar em vórtex;
- 7) Completar o volume do tubo (para 100 mL) com água destilada;
- 8) Misturar vigorosamente em vórtex;
- 9) Filtrar usando filtro de papel Whatman nº 01 e desprezar o volume inicial;
- 10) Usar o filtrado clarificado nos procedimentos dos kits enzimáticos.

APÊNDICE 4

Solução por redes neurais artificiais

A solução usando redes neurais, obtida através do Statistica, gerou a malha de rede mostrada na Imagem B.

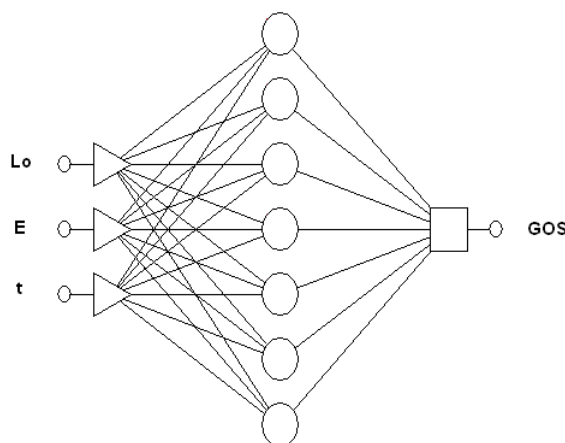


Imagem B – Representação da malha de redes neurais referente ao modelo RBF
(Fonte: Statistica)

A malha da Imagem B representa um sistema de redes neurais com 3 camadas no nível de entrada (**L₀**, **E** e **t**), 7 camadas no nível intermediário (escondido) e uma camada no nível de saída (**GOS**).

As Imagens C, D e E apresentam as telas do Statistica para a solução do modelo.

A captura de tela mostra o relatório de resumo do modelo RBF 3:3-7-1:1. O relatório contém as seguintes informações:

Index	Profile	Train Perf.	Select Perf.	Test Perf.	Train Error	Select Error	Test Error	Training/Members	Note	Inputs	Hidden(1)	Hidden(2)
3	RBF 3:3-7-1:1	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,077511	0,030003	SS,EX,PI		3	7	0

Imagem C – Descrição do modelo de redes neurais artificiais RBF 3:3-7-1:1

STATISTICA - [RBF bom* - Regression (3) (Dados GOS)]

Regression (3) (Dados GOS)

	GOS.3
Data Mean	0,627273
Data S. D.	1,368537
Error Mean	-0,041764
Error S. D.	0,098601
Abs E. Mean	0,041764
S. D. Ratio	0,072048
Correlation	0,997580

Imagem D – Resultados gerais de regressão do modelo RBF 3:3-7-1:1

STATISTICA - [RBF bom* - Prediction (3) (Dados GOS)]

Prediction (3) (Dados GOS)

	GOS	GOS.3
1	0,000000	0,000000
2	2,700000	2,700000
3	0,000000	-0,128199
4	0,000000	-0,000000
5	0,000000	0,000000
6	4,200000	4,200000
7	0,000000	-0,331202
8	0,000000	0,000000
9	0,000000	0,000000
10	0,000000	0,000000
11	0,000000	0,000000

Imagem D – Valores reais e valores preditos pelo modelo RBF 3:3-7-1:1